

Received: 2012.07.18  
Accepted: 2013.01.21  
Published: 2013.03.08

## Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych

### Biogenesis of microRNAs and their role in the development and course of selected hematologic disorders

Anna Grenda, Michał Budzyński, Agata A. Filip

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

#### Streszczenie

MikroRNA są grupą cząsteczek o długości około dwudziestu nukleotydów. Biorą one udział w regulacji ekspresji genów głównie na poziomie potranskrypcyjnym. Możliwe jest to dzięki ich komplementarności do regionów 3'UTR w mRNA. MikroRNA (miRNA) są bardzo istotne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu, ponieważ mają wpływ na przebieg procesów, takich jak angiogeneza, apoptoza, kontrola cyklu komórkowego czy onkogeneza. Na znaczenie tych cząsteczek wskazuje to, że ponad 30% genów ludzkich jest kontrolowanych przez miRNA. Zakłócenia ekspresji miRNA mogą skutkować nieprawidłowościami w przebiegu licznych procesów komórkowych. Takie zaburzenia obserwuje się m.in. w komórkach nowotworowych, a sygnatury ekspresji miRNA są charakterystyczne dla poszczególnych typów nowotworów. Sugeruje się zatem, że miRNA mogą służyć jako czynniki diagnostyczne i prognostyczne w schorzeniach onkologicznych oraz hematoonkologicznych, w których zaburzona ekspresja konkretnych miRNA może wskazywać na łagodny bądź agresywny przebieg choroby. Istnieje również możliwość szacowania ogólnego czasu przeżycia czy czasu do rozpoczęcia leczenia na podstawie profilu ekspresji miRNA. Dzięki poznaniu zmian w poziomach miRNA u chorych z zaburzeniami hematologicznymi ułatwiony wydaje się wybór terapii i pojawia się możliwość indywidualnego doboru leczenia. Ostatnie doniesienia świadczą o tym, że również miRNA krążące w osoczu czy surowicy mogą dobrze charakteryzować poszczególne zaburzenia hematoonkologiczne. Ma to potencjalnie duże znaczenie, biorąc pod uwagę dostępność materiału do badań, a także ułatwienie procedur diagnostycznych i skrócenie czasu niezbędnego do ich wykonania.

#### Słowa kluczowe:

białaczka • mikroRNA • profil ekspresji miRNA • regulacja ekspresji genów

#### Summary

MicroRNAs (miRNAs) are a group of small molecules, about twenty nucleotides in length. They are involved in the regulation of gene expression mainly at a posttranscriptional level. This function depends on their complementarity to the 3'UTR regions of mRNAs. MicroRNAs are essential for proper development and functioning of the organism. They are so important because of their participation in such processes as angiogenesis, apoptosis, cell cycle control and oncogenesis. Over thirty percent of human genes are controlled by miRNAs. This indicates the great importance of these molecules. Alterations of numerous cellular processes can be caused by the dysregulation of miRNA expression. Such disturbances are observed in cancer cells, and signatures of microRNA expression are specific to particular types of cancer. It is suggested that miRNAs may serve as diagnostic and prognostic factors in oncologic and hematoonkologic

disorders. The expression of specific miRNAs can indicate benign or aggressive course of disease. The overall survival or time to treatment are also possible to estimate based on the microRNA expression profile. Knowledge about changes in miRNA expression observed in leukemia patients may enable the selection of appropriate individual therapy. Recent reports indicate that various hematologic disorders may be well characterized by microRNAs circulating in plasma or serum. It is of great potential importance, considering the availability of material for analysis, simplicity of diagnostic procedures and shortening of time required to conduct them.

**Keywords:** leukemia • microRNA • miRNA expression profile • gene expression regulation

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1038361>

**Word count:** 4588

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 87

**Adres autorki:** mgr inż. Anna Grenda, Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, Uniwersytet Medyczny w Lublinie; ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin; e-mail: an.grenda@gmail.com

## WSTĘP

MikroRNA są rodziną jednoniciowych, niekodujących, endogennych cząsteczek regulacyjnych, powstających z dwuniciowych prekursorów. Są one obecne w komórkach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich. Zbudowane są zwykle z 21-23 nukleotydów, a ich główna rola jest związana z potranskrypcyjną regulacją ekspresji licznych genów.

Pojedyncza cząsteczka miRNA może jednocześnie kontrolować ekspresję setek docelowych genów [73]. Ponad 1/3 genów kodujących białka w ludzkich komórkach podlega regulacji przez miRNA. Szacuje się, że geny kodujące miRNA stanowią 1-5% wszystkich genów u ludzi i zwierząt [9]. Liczne doniesienia naukowe dowodzą, iż miRNA pełnią bardzo istotną rolę w przebiegu wielu ważnych procesów, takich jak podziały komórkowe, różnicowanie komórek, apoptoza, angiogeneza czy onkogeneza [38].

Pierwszymi zidentyfikowanymi miRNA były *let-7* oraz *lin-4*, które kontrolują przejście nicienia *Caenorhabditis elegans* przez kolejne stadia larwalne. Najważniejszymi regulatorami wczesnych stadiów rozwojowych tego nicienia są geny *lin-14* i *lin-28*. Ich ekspresja podlega inhibicji przez cząsteczki *lin-4* w pierwszym stadium larwalnym *C. elegans*. U osobników, u których występuje mutacja w genie *lin-4*, dochodzi do podziałów typowych dla początkowego stadium rozwojowego L1, zamiast różnicowania komórek [65]. Za regulację rozwoju nicienia w późniejszych fazach rozwojowych odpowiedzialny jest miRNA o nazwie *let-7*, który kontroluje aktywność genu *lin-41*. Geny dla *let-7* wykryto również w genomach ssaków. W przypadku mutacji w genie *let-7* komórki macierzyste nie są w stanie zakończyć cyklu komórkowego i ulec różnicowaniu we właściwym czasie, co może prowadzić do dalszych niekontrolowanych podziałów [70].

## Biogeneza mikroRNA

Geny dla mikroRNA są często zorganizowane w skupiskach, które są transkrybowane jako policistronowe jednostki transkrypcyjne [44]. Mogą występować między sekwencjami kodującymi białka i funkcjonować jako samodzielne jednostki transkrypcyjne, mogą być również umiejscowione w sekwencjach kodujących (ryc. 1) [82]. Geny dla miRNA znajdują się zarówno w eksonach, intronach, jak i w regionach niepodlegających translacji [36]. Taki układ jednostki transkrypcyjnej może prowadzić do jednoczesnego powstania transkryptów miRNA oraz mRNA [75]. Geny miRNA są zorganizowane w sposób charakterystyczny dla działania polimerazy II oraz III, transkrybującej geny małych RNA [11,45].

Powstawanie miRNA składa się z kilku etapów (ryc. 1). Pierwszy z nich to transkrypcja, która prowadzi do utworzenia pierwotnego transkryptu pri-miRNA (primary miRNA). Kolejnym jest obróbka pri-miRNA, w wyniku której powstaje pre-miRNA. Obydwa etapy zachodzą w jądrze komórkowym. Następnie pre-miRNA przenoszona jest do cytoplazmy, gdzie poddawana jest procesom prowadzącym do powstania dojrzałej, funkcjonalnej cząsteczki miRNA o długości ~20 nt [8].

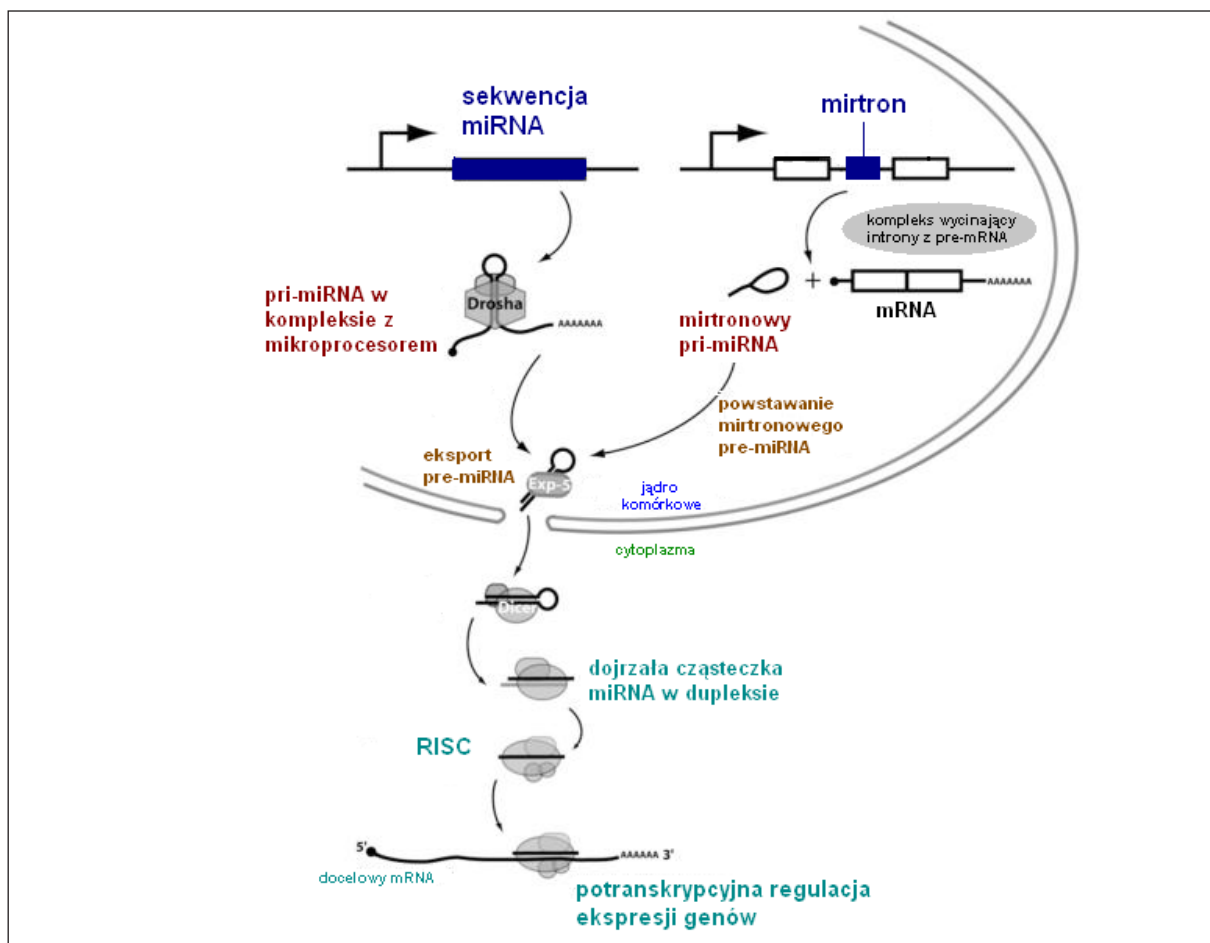
Pierwotne transkrypty (pri-miRNA) tworzą połączone ze sobą struktury szpilek do włosów, poliadenylowane oraz mające czapkę na końcu 5'. Zawierają wiele pętli macierzystych. Pri-miRNA mogą mieć długość kilku kilo par zasad [71]. Dwuniciowe struktury pri-miRNA są rozpoznawane przez białko jądrowe DGCR8 (u bezkręgowców Pasha). Białko to jest związane z rybonukleazą Drosha, enzymem należącym do grupy RNaz III. Razem tworzą kompleks mikroprocesorowy, który bierze udział w obróbce pierwotnych transkryptów miRNA w jądrze komórkowym. W kompleksie tym DGCR8 (Di George syndrome critical region gene 8) przyłącza się do jedno-

niciowych końców pri-miRNA i orientuje katalityczną domenę rybonukleazy w taki sposób, aby ta mogła przecinać transkrypty i uwalniać struktury szpilek do włosów pre-miRNA o długości ~60-100 nukleotydów [30]. W takiej postaci są one przenoszone do cytoplazmy przez Eksportyny 5 (Exp-5). Są to białka transportowe, które do poprawnego funkcjonowania potrzebują energii. Jest ona pozyskiwana z GTP związanego z białkiem RAN. Eksportyny 5 należą do grupy karyoferyn, które wymagają do swojego działania dwunukleotydowych nawisów na końcu 3', powstałych po obróbce pri-miRNA w jądrze komórkowym przez enzym Drosha [85]. Jeśli geny dla miRNA umiejscowione są w intronach (mirtrony), to powstawanie pre-miRNA z pierwotnych transkryptów zachodzi z pominięciem mikroprocesora i jest powiązane z wycinaniem intronów z mRNA [59].

W cytoplazmie obróbka pre-miRNA przez enzym Dicer prowadzi do utworzenia dwuniciowej cząsteczki o długości ~20 nukleotydów. Dicer należy do grupy RNaz-III; podobnie jak Eksportyny prawidłowo funkcjonuje tylko wobec dsRNA zawierających dwunukleotydowe nawisy na końcu 3'. W wyniku aktywności enzymu Dicer w cytoplazmie powstają dwuniciowe duplety miRNA-miRNA\*.

Jedna nić w duplesie jest nazywana wiodącą, druga zaś nić pasażerską i jest oznaczana gwiazdką. Obie nici są połączone ze sobą przez pewien czas, przy czym niektóre nukleotydy w duplesie mogą pozostawać niesparowane, co związane jest z możliwością występowania różnic w sekwencji rybonukleotydów między tymi nićmi. Do niedawna sądzono, że nić pasażerska w większości przypadków jest degradowana, badania jednak wykazały, że obydwie nici mogą być funkcjonalne [60,74]. Aktywna postać miRNA to ssRNA, wbudowana w białkowy kompleks miRNP nazywany RISC (microRNA induced silencing complex). Składa się na niego wiele białek, ale główną rolę w miRISC odgrywają białka Ago (Argonaute). Dzięki nim możliwa jest degradacja docelowego mRNA lub represja translacji, albo połączenie obu procesów. Rodzina ludzkich białek Argonaute obejmuje osiem rodzajów. Wykazano, że ludzkie Ago2 ma aktywność endonukleazy [55].

Białka Ago są podstawowym składnikiem kompleksów wyciszających, działających transkrypcyjnie lub potranskrypcyjnie. Niedawno wykazano, że Ago2 buduje kompleksy wyciszające z cząsteczkami pre-miRNA. Takie połączenia aktywne *in vitro* stanowią niestandardowy model RISC [78].



Ryc. 1. Biogeneza cząsteczek mirtrona; po lewej: szlak powstawania miRNA z samodzielnej jednostki transkrypcyjnej; po prawej: szlak powstawania miRNA z mirtronu (za [59], zmodyfikowano)

## Regulacyjna funkcja cząsteczek miRNA

Mechanizm działania cząsteczek miRNA związany jest z potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów, która możliwa jest dzięki komplementarności par zasad z cząsteczkami informacyjnego RNA [83].

Wyciszenie genów może się odbywać albo poprzez degradację określonego mRNA, albo w wyniku zahamowania translacji transkryptu. Cząsteczki miRNA są przyłączane do regionu 3' nieulegającego translacji (3'UTR) docelowego mRNA [7]. Jeśli istnieje całkowita komplementarność między cząsteczką miRNA a określoną sekwencją mRNA, białko Ago2 może rozszczepiać cząsteczkę mRNA prowadząc do jej bezpośredniej degradacji. W przypadku niepełnej komplementarności wyciszenie odbywa się na zasadzie blokowania translacji [86]. W przeciwieństwie do roślin, u zwierząt mechanizm związany z degradacją RNA informacyjnego występuje znacznie rzadziej, a dominuje wyciszenie genów w wyniku inhibicji translacji. Szacuje się, że u ssaków mniej niż 5% sekwencji docelowych dla miRNA ulega rozszczepieniu wskutek związania tych cząsteczek regulatorowych [40].

Gdy miRNA degraduje docelowy transkrypt, obserwowane miejsca cięcia są identyczne, jak w przypadku degradacji katalizowanej przez małe interferujące RNA (siRNA) – do rozszczepienia dochodzi przeważnie między nukleotydami w pozycjach 10 i 11 powstałego dupleksu siRNA:mRNA [7,19,34]. Miejsca rozszczepień nie zmieniają się nawet jeśli nie dojdzie do idealnego sparowania miRNA z sekwencją docelową mRNA na jej końcu 5'. Po degradacji określonego transkryptu miRNA może rozpoznawać i katalizować rozszczepianie kolejnych cząsteczek matrycowego RNA, ponieważ podczas tego procesu nie ulega uszkodzeniu [34].

Szczegółowy przebieg mechanizmu związanego z blokowaniem translacji nie jest dokładnie poznany. Przypuszcza się, że sekwencje docelowe dla miRNA mogą być kompleksowane na polisomach lub też przyciągane do komórkowych ciałek P, gdzie są usuwane z kompleksu translacyjnego i ewentualnie niszczone [49].

Dobór odpowiedniego mechanizmu nie zależy od tego czy mała wyciszająca cząsteczka RNA powstaje jako siRNA lub miRNA, ale jest determinowany przez rodzaj sekwencji docelowej. Raz przyłączone do cytoplazmatycznego kompleksu RISC miRNA będzie swoiście prowadziło do rozszczepienia transkryptu, w przypadku wystarczającej komplementarności mRNA. Hamowanie translacji będzie następowało w sytuacji niepełnego dopasowania mRNA i miRNA, ale przy zachowaniu odpowiedniego układu i rozmieszczenia miejsc komplementarnych [7,19].

### NIEPRAWIDŁOWOŚCI W EKSPRESJI miRNA W WYBRANYCH ZABURZENIACH HEMATOLOGICZNYCH

#### Udział miRNA w patogenezie i rozwoju chorób nowotworowych

Zaburzenia ekspresji mikroRNA są obserwowane w różnego rodzaju nowotworach. Prawie 50% genów miRNA

jest umiejscowionych w miejscach łabliwych genomu (fragile sites). Mutacje w tych obszarach często są powiązane z nowotworzeniem. Wskazuje to na znaczącą funkcję mikroRNA w powstawaniu i progresji nowotworów [15].

Miejscami łabliwymi nazywamy obszary, gdzie z dużą częstotliwością dochodzi do utraty czy przegrupowania fragmentów chromosomów. Takie zmiany często obserwuje się w komórkach nowotworowych. Ekspresja genów mikroRNA zlokalizowanych w pobliżu takich regionów może być zaburzona. Przykładem są geny *miR-15a* i *miR-16-1* znajdujące się na długim ramieniu chromosomu 13 w obszarze 14.2, gdzie często dochodzi do delecji. Zmniejszony poziom czy całkowity brak *miR-15a* i *miR-16-1* stwierdza się u wielu chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową, rakiem prostaty, chłoniakiem komórek płaszczą i szpiczakiem mnogim [13]. Zmiany poziomu ekspresji około 200 miRNA są obserwowane w wielu typach nowotworów [6].

#### Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL)

CLL jest schorzeniem dotyczącym najczęściej osoby starsze, bardzo rzadko diagnozowana jest u dzieci [1,64]. Rzadko występuje u osób przed czterdziestym rokiem życia. Osoby nowo diagnozowane między 50. a 55. rokiem życia stanowią niewielki odsetek chorych z CLL [23]. Pewną liczbę komórek o fenotypie charakterystycznym dla CLL można zauważyć we krwi zdrowych osób. Zjawisko to określa się jako MBL (monoclonal B-cell lymphocytosis). U około 3% populacji powyżej 40. roku życia stwierdza się we krwi obwodowej kłony takich limfocytów [69]. W większości tych przypadków nie dochodzi do rozwoju CLL.

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa jest jedną z najczęstszych białaczek diagnozowanych w zachodnim świecie. Opisuje się dwie jej postacie. W przypadku CLL o agresywnym przebiegu występuje wysoka ekspresja genów kodujących ZAP-70 (zeta-chain associated protein kinase 70 kDa) oraz niezmutowana postać genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin IgVH. W większości przypadków łagodnych przebiegów CLL obserwuje się niski poziom białka ZAP-70 i mutacje genów IgVH [17,68].

Rozwój przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej jest często powiązany z aberracjami chromosomowymi. Występują one w ponad 80% przypadków CLL i obejmują takie zmiany jak: del(13q), del(11q), +12, del(17p) oraz del(6q) [20]. Delecja 13q jest jednym z najczęściej stwierdzanych zaburzeń chromosomowych u chorych z CLL. Często obserwuje się trzy delecje współistniejące, tj. 11q, 13q, 17p, w jednym klonie komórek białaczkowych [22].

Wykazano, że duże delecje w regionie 13q14 mogą się przyczyniać do rozwoju CLL, co ma związek z destabilizacją genomu [61]. Takie zaburzenia chromosomowe opisywane są prawie u 20% chorych. Duże delecje regionu 13q14 wiążą się także ze skróconym czasem przeżycia. U niektórych chorych delecje obejmują fragmenty, w których jest umiejscowiony gen *RBI* (retinoblastoma protein 1), kodujący białko supresorowe, odpowiedzialne za zahamowanie cyklu komórkowego [61].

Wskazuje się na ogromne znaczenie cząsteczek miRNA w rozwoju CLL (tab. 1). Zauważono związek między ekspresją cząsteczek mikroRNA a delecjami w regionie 13q14. W tym miejscu są geny dla dwóch miRNA, które są charakteryzowane jako supresory nowotworu. Mogą one wpływać na ilość białka BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) przez wyciszanie jego transkryptów. BCL2 ma właściwości antyapoptotyczne, co oznacza, że bierze

udział w procesach, które chronią komórkę przed śmiercią. W przypadku delecji w regionie 13q14 nie dochodzi do ekspresji *miR-15a* i *miR-16-1* lub jest ona na bardzo niskim poziomie. Delecja monoalleliczna może skutkować zwiększoną ilością białka BCL2. Ma to związek z nagromadzeniem białaczkowych limfocytów u chorych z B-CLL [13,63]. Ekspresja miRNA-15/16 jest obniżona prawie u 70% chorych z CLL [14].

Tabela 1. Zaburzenia ekspresji wybranych mikroRNA w poszczególnych typach białaczek

Obniżona ekspresja	Źródło	Nadekspresja	Źródło
<b>Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL)</b>			
miR-15a	13, 14	miR-29B	66
miR-16-1	66	miR-221	24
miR-29A	14	miR-222	24
miR-29b	76		
miR-29c	5		
miR-34a	14		
miR-181b	76		
miR-223	75		
<b>Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)</b>			
miR-9-1	71	miR-19b	54
miR-9-2	71	miR-20a	54
miR-9-3	71	miR-26a	54
miR-124a	3	miR-92	54
miR-196b	10	miR-128b	51
miR-451	47	miR-142-3p	50
miR-709	47	miR-181b-1	84
		miR-204	84
		miR-218	84
		miR-223	54
		miR-331	84
<b>Ostra białaczka szpikowa (AML)</b>			
miR-15a	27	miR-1-2	28
miR-23b	37	miR-10a	62
miR-34b	27	miR-30d	27
miR-193a	25, 26	miR-34a	37
miR-193b	25, 26	miR-124a	48,52
let-7b	41	miR-126	47, 52
let-7c	41	miR-134	41
		miR-221	37
		miR-222	37
		miR-299-5p	41
		miR-323	41
		miR-376a	41
		miR-382	41
<b>Przewlekła białaczka szpikowa (CML)</b>			
miR-10a	2	miR-17-92	81
miR-24	4	miR-130a	77
miR-150	2	miR-130b	77
miR-151	2	miR-148a	77
miR-199b	50	miR-212	77
miR-451	35, 50		

A – agresywna postać choroby, B – łagodny przebieg choroby

Wykazano, że u chorych z CLL dochodzi do zaburzeń w ekspresji genów, które kodują białka będące czynnikami transkrypcyjnymi, białka biorące udział w cyklu komórkowym, w przekazywaniu sygnałów komórkowych, białka apoptotyczne czy antyapoptotyczne. Szczególną uwagę zwrócono na pięć genów, których poziom ekspresji wykazuje zależność od skupiska miRNA-15a/16-1. Są to *BAZ2A* (bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A) i *RNF41* (ring finger protein 41), w przypadku których obserwuje się wzrost ekspresji oraz *RASSF5* (Ras association domain family member 5), *MKK3* (mitogen activated protein kinase kinase 3) i *LRIG1* (leucin-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1), które wykazują niższe poziomy ekspresji. W trzech przypadkach wykazano, że obniżenie ekspresji miRNA-15a i 16-1 było obserwowane także przy braku delecji w regionie 13q14 [31]. Może to wskazywać na większą złożoność procesów regulacyjnych, w których biorą udział mikroRNA.

Kolejnym mikroRNA, które może mieć znaczenie w patogenezie CLL jest miR-34a. Wykazano, że u chorych z zaburzeniami chromosomowymi obejmującymi *locus* genu *TP53* (tumor protein p53) ekspresja miR-34a jest niska. Wiąże się to z gorszym rokowaniem oraz krótszym czasem przeżycia [5]. Białko P53, produkt genu *TP53*, bierze udział w regulacji ekspresji miR-34a. Mutacje czy delecje w regionie 17p13, *locus* genu *TP53* mogą pośrednio prowadzić do obniżenia ekspresji miR-34a, co prawdopodobnie jest związane ze zwiększoną aktywnością podziałową limfocytów [5].

W badaniach nad zaburzeniami ekspresji mikroRNA w CLL zwrócono uwagę na białko P27 (cyklin-dependent kinase inhibitor p27), które jest głównym regulatorem cyklu komórkowego. Badano jego związki z miRNA-221/222 na liniach komórkowych, gdzie została wymuszona ekspresja tych miRNA. Okazało się, że poziom białka P27 ulega znacznemu obniżeniu przy wysokiej ekspresji miR-221/222. Analiza limfocytów krwi obwodowej, komórek szpiku kostnego i węzłów chłonnych wykazała, że miRNA-221/222 ulegają podwyższonej ekspresji u chorych z CLL przy spadku ekspresji *CDKN4* (cyclin-dependent kinase inhibitor p27). Uzyskane wyniki sugerują, że te dwie cząsteczki miRNA regulują ekspresję genu dla P27. Ma to zapewne związek z utrzymywaniem obwodowych limfocytów CLL w fazie spoczynkowej G0 [24].

Przypuszcza się, że niektóre miRNA mogą pełnić rolę zarówno supresorów nowotworów, jak też onkogenów. Przykładem jest miRNA-29, który wykazuje nadekspresję w łagodnym przebiegu białaczki bądź obniżoną ekspresję w agresywnej postaci CLL. miRNA-29 może hamować translację transkryptów genu *TCL1*, krytycznego onkogenu w rozwoju CLL [66].

*TCL1* (T cell leukemia/lymphoma 1) jest bardzo silnym onkogenem. Jego nieprawidłowa ekspresja przyczynia się do zahamowania śmierci limfocytów białaczkowych, co wiąże się z szybką ekspansją klonów komórek białaczkowych.

Mechanizm działania *TCL1* jest powiązany z przekazywaniem sygnałów antyapoptotycznych, zależnych od kinazy AKT (actin-like protein) [32]. Nadekspresja *TCL1* jest związana z delecjami w regionie 11q. Sugeruje się, że w tym *locus* są umiejscowione aktywatory dla miR-29b oraz miR-181b, które regulują ekspresję *TCL1*. W agresywnej postaci CLL dochodzi do obniżenia ekspresji miR-29b oraz miR-181b, co prawdopodobnie ma związek z delecjami w *locus* 11q [14]. *TCL1* może być negatywnie regulowany również przez inne miRNA lub dodatkowe mechanizmy, ponieważ u niektórych chorych obserwowano obniżony poziom miR-29b oraz miR-181b i zmniejszone ilości białka *TCL1* [67].

Rozwój CLL jest związany z zaburzeniami ekspresji wielu mikroRNA. Zmienione profile ekspresji niektórych miRNA (miR-29c, miR-223) są powiązane z poziomem białka ZAP-70 oraz mutacjami w regionach IgVH, które odgrywają znaczącą rolę w przebiegu CLL i uwzględniane są przy wyborze leczenia [46]. Wykazano, że poziom ekspresji miR-29c oraz miR-223 jest znacznie obniżony u pacjentów z niekorzystnym rokowaniem, co może być indywidualnie wykorzystane do oceny całkowitego czasu przeżycia oraz czasu do rozpoczęcia leczenia [76].

### Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych wieku dziecięcego, u dzieci stanowi 95% białaczek, a u dorosłych około 25% wszystkich ostrych białaczek. ALL jest nowotworem układu limfoidalnego, wywodzącym się z wczesnych stadiów rozwojowych linii B (B-ALL) lub linii T (T-ALL). W przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej stwierdza się nieprawidłowy poziom ekspresji wybranych miRNA, które w wyniku utraty zdolności supresorowych bądź nasilenia właściwości onkogennych mogą się przyczyniać do rozwoju nowotworu (tab. 1). W przypadku ALL wykazano bardzo wysoki poziom ekspresji takich cząsteczek regulatorowych, jak m.in. miR-128b, miR-204, miR-218, miR-331 oraz miR-181b-1. Prawdopodobnym genem docelowym dla miR-331 jest *SOCS1* (suppressor of cytokine signaling 1), którego obniżona ekspresja może być powiązana z nadmierną proliferacją komórek i ich przetrwaniem, gdyż *SOCS1* jest regulatorem ścieżki sygnałowej STAT [84].

Cząsteczkami regulatorowymi o funkcji onkogenów mogą być też miR-19b, miR-20a, miR-26a, miR-92 oraz miR-223 [54]. Ich zwiększona ekspresja prowadzi do represji licznych genów o działaniu supresorowym, np. *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *BCL2L11* (BCL2-like 11 apoptosis facilitator), *PHF6* (PHD finger protein 6), *NF1* (neurofibromine 1), *FBXW7* (F-box/WD repeat-containing protein 7), co może się przyczyniać do rozwoju ALL. Potencjalną funkcję onkogenową w limfocytach chorych cierpiących na T-ALL pełni miR-142-3p [51]. Nadekspresja tego miRNA prowadzi do obniżenia poziomu kinazy białkowej A (PKA) zależnej od cAMP oraz receptora glukokortykoidowego  $\alpha$  [51].

Spośród wielu cząsteczek miRNA, których ekspresja jest obniżona w przebiegu ALL na szczególną uwagę zasługują te należące do rodziny miR-9 (miR-9-1, miR-9-2, miR-9-3). Udowodniono, że zmniejszony poziom ich ekspresji w komórkach nowotworowych wynika z hipermetylacji genów kodujących te miRNA. Epigenetyczna inhibicja miR-9 skutkuje nadekspresją genów docelowych, którymi są *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1) oraz *CDK6* (cyclin-dependent kinase 6), co z kolei może prowadzić do wzrostu wskaźnika proliferacji i zahamowania apoptozy komórek ALL [72].

Hamowanie ekspresji miR-124a w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej również wynika z regulacji epigenetycznej. Na skutek hipermetylacji promotora genu dla tego miRNA dochodzi do nadekspresji genu *CDK6* oraz fosforylacji białka RB1 (retinoblastoma). W konsekwencji może dochodzić do niewłaściwych i niekontrolowanych podziałów komórek ALL. Obniżona ekspresja miR-124a jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym związanym ze zwiększoną śmiertelnością chorych [3].

Funkcję supresorową w rozwoju ostrej białaczki limfoblastycznej (T-ALL) pełnią też miR-451 oraz miR-709. Obydwie te cząsteczki hamują ekspresję onkogenu *MYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), a miR-709 dodatkowo blokuje ekspresję *AKT* (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) i *RAS-GRF1* (Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1). Obniżony poziom tych miRNA przypuszczalnie wynika z aktywacji ścieżki sygnałowej NOTCH1 wpływającej na degradację supresora nowotworowego *TCF3* (transcription factor 3, E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47), który stymuluje transkrypcję genów kodujących miR-451 i miR-709 [47].

Cząsteczki należące do rodziny miR-196, regulujące ekspresję licznych onkogenów również wykazują znacznie obniżony poziom ekspresji w komórkach T-ALL [10]. Dla miR-196a i miR-196b genem docelowym jest *ERG* (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog), kodujący czynnik transkrypcyjny ERG, którego nadekspresja jest złym czynnikiem prognostycznym w przebiegu T-ALL u osób dorosłych [18]. MiR-196b reguluje także ekspresję onkogenu *c-MYC* [10].

### Ostra białaczka szpikowa (AML)

Ostre białaczki szpikowe (AML) częściej występują u dorosłych, u których stanowią około 60% białaczek ostrych. Charakteryzują się zaburzeniami proliferacji i dojrzewania komórek, co powoduje nagromadzenie w szpiku kostnym komórek nieprawidłowych oraz ich naciekania do różnych tkanek i narządów. Zastępowanie prawidłowych komórek szpiku komórkami białaczkowymi skutkuje zmniejszeniem liczby erytrocytów, prawidłowych leukocytów oraz trombocytów. Nieprawidłowości te mogą wynikać m.in. z zaburzeń w profilach ekspresji miRNA o funkcjach supresorowych i onkogennych (tab. 1). Wśród miRNA, których funkcja związana jest z proliferacją i różnicowaniem komórek, a które wyka-

zują odmienną od wzorców ekspresję należy wymienić m.in. miR-155, miR-221, miR-126, let-7 i miR-196b. Poziom ich ekspresji uzależniony jest od określonego podtypu choroby [16].

Jednymi z najbardziej charakterystycznych miRNA w patogenezie AML są miR-34a i miR-221/222 o znacznej nadekspresji oraz miR-23b podlegający represji w komórkach białaczkowych w porównaniu z komórkami prawidłowego szpiku kostnego i hematopoetycznymi komórkami progenitorowymi CD34<sup>+</sup> [37]. Wyraźnie podwyższony poziom ekspresji w komórkach AML dotyczy również cząsteczek z rodziny miR-181 (miR-181a, miR-181b) [53].

Cząsteczki z rodziny miR-193 funkcjonują jako regulatory o funkcji supresorowej w stosunku do licznych onkogenów. Wykazano, że na skutek hipermetylacji odcinków promotorowych genów kodujących te miRNA dochodzi do ich represji w komórkach AML [26]. W wyniku obniżenia ekspresji miR-193a wzrasta ekspresja onkogenu *c-KIT* i jego produktu białkowego. To z kolei indukuje nieprawidłowe podziały komórkowe i skutkuje niezadowalającymi wynikami leczenia. Podobne rezultaty uzyskano w przypadku obniżonej ekspresji miR-193b [25]. Przywracanie prawidłowej ekspresji miRNA z rodziny *miR-193* może w przyszłości być wykorzystane w terapii chorych z ostrymi białaczkami szpikowymi, ponieważ wykazano, że wprowadzenie syntetycznych *miR-193a* czy też czynników hipometylujących prowadzi do obniżenia ekspresji protoonkogenu *c-KIT* i zahamowania wzrostu komórek białaczkowych AML [25,26].

Komórki AML cechują się wyraźną nadekspresją miR-1-2 i miR-133a-1 [28]. Transkrypcja tych miRNA związana jest z aktywnością genu *EVII* (ecotropic virus integration site 1 protein homolog), który koduje czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję niektórych miRNA. Wykazano, że w przypadku ostrej białaczki szpikowej dochodzi do nadekspresji *EVII*, która ściśle koreluje z poziomem miR-1-2, a to z kolei może się przekładać na niewłaściwą proliferację komórek i rozwój szczególnie agresywnej postaci AML. Znacznie zwiększony poziom ekspresji u pacjentów z AML o pośrednim ryzyku (IR - intermediate risk) zaobserwowano też w przypadku miR-10a [62]. Nadekspresja jest zauważalna zwłaszcza u tych chorych, u których stwierdzono mutację w genie *NPM1* (nucleophosmin). W konsekwencji dochodzi do obniżonej ekspresji genu docelowego dla miR-10a – *MDM4* (Mdm4 p53 binding protein homolog), którego produkt wchodzi w interakcję z białkiem *TP53* i w ten sposób uczestniczy w indukcji apoptozy. Mutacja w genie *NPM1* u chorych na AML wiąże się także z podwyższoną ekspresją miR-196a i miR-196b [18].

Nadekspresja miR-126 obserwowana w komórkach białaczkowych AML przyczynia się do zahamowania zaprogramowanej śmierci komórek. Zwiększona ekspresja miR-126 wynikająca prawdopodobnie z hipometylacji promotora genu kodującego tę cząsteczkę prowadzi do obniżonej aktywności genu supresorowego *PLK2* (polo-like kinase 2), a co za tym idzie do zablokowania apopto-

zy i zwiększenia żywotności komórek AML. Jest to jeden z kilku mechanizmów wyciszania genu *PLK2* [48, 52].

Prognozowanie przebiegu AML jest związane z obecnością w komórkach białaczkowych charakterystycznych aberracji chromosomowych. Do najczęściej wykrywanych zaburzeń cytogenetycznych należą: t(15;17), t(8;21), inv(16) o względnie korzystnej prognozie oraz zaburzenia w regionie 3q, delecje -5/-5q i -7 rokujące niepomyślnie [29].

W większości przypadków chorych z AML wskazuje się na ścisłą zależność między obecnością t(15;17), t(8;21) oraz inv(16) a charakterystycznymi profilami ekspresji miRNA [41]. W przypadku translokacji t(15;17) wykazano znacznie podwyższony poziom ekspresji miRNA-382, miRNA-134, miRNA-376a, miRNA-299-5p oraz miRNA-323. Geny dla większości z nich są skupione na chromosomie 14, a zatem obecność aberracji nie ma bezpośredniego wpływu na zaburzenie ich funkcjonowania. Chorzy, u których stwierdzono translokację t(8;21) oraz ci z inv(16) wykazują obniżony poziom ekspresji cząsteczek o charakterze supresorów nowotworowych: *let-7b* i *let-7c*. Przypuszcza się więc, że nadekspresja genu *RAS*, który jest genem docelowym dla *let-7* może być czynnikiem sprzyjającym leukemogenezie u chorych z tymi aberracjami [41].

Analizy zależności między określonymi zaburzeniami cytogenetycznymi a zmianami w ekspresji miRNA u chorych na AML podjęli się też Garzon i wsp. [27]. W przypadku rearanżacji w regionie 11q23 zaobserwowali oni nadekspresję 8 miRNA oraz obniżony poziom ekspresji 14 z nich, w porównaniu z komórkami bez tej aberracji. Obniżona ekspresja dotyczyła cząsteczek supresorowych regulujących aktywność głównych onkogenów, np. *miR-34b* – *CDK4*, *miR-15a* – *BCL2*, *let-7* – *RAS*. W przypadku trisomii chromosomu 8 stwierdzono zwiększony poziom ekspresji aż 42 różnych miRNA, w tym miR-124a i miRNA-30d zlokalizowanych odpowiednio w *loci* 8p21 i 8p23 [27].

### Przewlekła białaczka szpikowa (CML)

Przewlekła białaczka szpikowa (CML) jest zespołem mieloproliferacyjnym związanym z rozrostem klonalnym komórek macierzystych szpiku kostnego zmienionych nowotworowo. Większość zachorowań obserwuje się u osób dorosłych, a u dzieci jest rzadko spotykana. Obecność CML diagnozuje się na podstawie obecności transkryptu genu fuzyjnego *BCR/ABL*, który przyczynia się do niekontrolowanego rozrostu białych krwinek i znacznego wzrostu ich liczby we krwi. W diagnostyce i terapii CML cały czas poszukuje się nowych markerów molekularnych, które mogłyby się przyczynić do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów patogenezy tej choroby. Przykładami takich cząsteczek są miRNA. Jak wykazali Polakova i wsp. zmienione profile ekspresji w komórkach CML dotyczą nawet 49 różnych miRNA, wśród których najistotniejsze są: miR-150, miR-20a, miR-17, miR-19a, miR-103, miR-144, miR-155, miR-

-181a, miR-221 oraz miR-222 [48]. Geny docelowe dla tych miRNA kodują białka pełniące różnorakie funkcje w cyklu komórkowym i regulacji wzrostu, a także podstawowe białka szlaków sygnalizacji komórkowej czy receptory czynników wzrostu.

Istotną rolę w patogenezie CML pełni miR-451, którego obniżoną ekspresję stwierdzono niedawno w komórkach białaczkowych [50]. Być może istnieje pętla regulacyjna między *BCR/ABL* a miR-451, gdyż z jednej strony pojawienie się genu fuzyjnego i kinazy *BCR/ABL* prowadzi do obniżenia ekspresji tego miRNA, a z drugiej strony potencjalnym celem molekularnym dla miR-451 może być *BCR/ABL* [35]. Mimo istnienia wielu miRNA, których obniżony poziom w komórkach CML wynika z aktywności kinazy *BCR/ABL*, np. miR-150 i miR-151, wykazano też niską ekspresję miR-10a, niezależnie od ekspresji genu fuzyjnego [2]. Prawdopodobnym celem molekularnym dla miR-10a jest gen *USF2* (upstream transcription factor 2), kodujący czynnik transkrypcyjny *USF2*. W wielu przypadkach CML stwierdza się nadekspresję *USF2* powiązaną z niską ekspresją miR-10a, co może przyspieszać wzrost komórek białaczkowych.

Znacznie obniżona ekspresja w komórkach CML dotyczy również miR-199b oraz miR-24 [4]. miR-199b może okazać się kluczowy w rozwoju CML, ponieważ kontroluje ekspresję genów uczestniczących w takich procesach komórkowych, jak transdukcja sygnału, regulacja transkrypcji, proliferacja komórek czy naprawa DNA. Udowodniono też, że w przypadku delecji regionów chromosomowych obejmujących geny kodujące te miRNA, chorzy wykazują oporność na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych i terapię IFN- $\alpha$  [4].

Rozwój przewlekłej białaczki szpikowej jest również związany z nadekspresją miR-130a i miR-130b [77]. Onkogenne cząsteczki regulatorowe hamują ekspresję genu *NOV* (nephroblastoma overexpressed gene), którego produkt białkowy funkcjonuje jako negatywny regulator wzrostu komórek. Wykazano, że obecność genu fuzyjnego *BCR/ABL* skutkuje aktywacją niektórych onkogennych miRNA, np. miR-148a, miR-212, a przede wszystkim miR-130a/b. Ich nadekspresja zaś związana jest ze zmniejszoną aktywnością *NOV*, co przekłada się na zahamowanie zdolności regulatorowych białka *NOV* w CML [77].

Cząsteczkami miRNA funkcjonującymi jako onkogeny w wielu typach nowotworów, w tym również w przewlekłej białaczce szpikowej są te związane z policistronem miR-17-92. Jak wykazali Venturini i wsp. nadekspresja tych cząsteczek regulatorowych jest widoczna zwłaszcza w fazie przewlekłej choroby [81]. Udowodniono, że ekspresja miR-17-92 zależy od aktywności kinazy *BCR/ABL*. Innym czynnikiem mającym wpływ na nadekspresję miR-17-92 jest zwiększona aktywność onkogeny *c-MYC*. Wszystkie te czynniki przyczyniają się do indukcji proliferacji komórek i mogą świadczyć o istnieniu skomplikowanej sieci sygnalizacyjnej *BCR/ABL* – *c-MYC* – miR-17-92 w limfocytach CML [81].



## **Ekspresja krążących miRNA w zaburzeniach hematologicznych**

Osocze i surowica krwi są bogatym źródłem swoistych biomarkerów przydatnych w diagnozowaniu chorób oraz ocenie rokowania, zwłaszcza w przypadku nowotworów. Przykładem takich cząsteczek są miRNA, które w osoczu/surowicy występują w bardzo stabilnej postaci [56]. W dotychczasowych badaniach naukowych temat krążących miRNA, obecnych w surowicy/osoczu pojawiał się bardzo rzadko. Sądzono, że ulegają one degradacji spowodowanej działaniem rybonukleaz. Okazało się jednak, że są cząsteczkami bardzo trwałymi, odpornymi na działanie endogennych RNaz obecnych we krwi [21,56]. Co więcej, udowodniono, że komórki nowotworowe uwalniają wybrane typy miRNA do układu krążenia (krążące miRNA), a ich profile ulegają modyfikacjom w różnych stadiach choroby [12].

Podwyższony wskaźnik proliferacji i lizy komórek nowotworowych sprzyja uwalnianiu miRNA z tych komórek. Przypuszcza się, że miRNA mogą się pojawiać w krwiobiegu na skutek działania jednego z dwóch mechanizmów. Jeden z nich związany jest z urazami i uszkodzeniami tkanek, co wykazano np. dla miR-208, którego ekspresję obserwowano w surowicy po uszkodzeniu tkanki mięśniowej serca [39]. Drugi mechanizm związany jest z tzw. mikropęcherzykami (egzosomami) – niewielkimi strukturami komórkowymi pełniącymi istotną rolę w transporcie mRNA i miRNA między komórkami, które usuwane są z błony cytoplazmatycznej komórki do przestrzeni międzykomórkowej i krwiobiegu [80]. Przypuszcza się, że egzosomy są zaangażowane w immunosupresję towarzyszącą chorobom nowotworowym, tworzenie przerzutów i angiogenezę. Struktury te wywodzą się bezpośrednio z błony cytoplazmatycznej i odzwierciedlają skład antygenowy komórek, z których powstają [33].

Nieliczne doniesienia wskazują, iż w nowotworach układu krwiotwórczego również możliwe jest ustalenie pewnych profili ekspresji cząsteczek miRNA uwalnianych przez komórki nowotworowe do krwiobiegu. Tanaka i wsp. wykazali, że w osoczu pacjentów cierpiących na ostre białaczki AML i ALL można zaobserwować wyraźnie obniżoną ekspresję miR-92a, niezależnie od podtypu choroby. Obniżona ekspresja dotyczy też miR-638 w porównaniu z osoczem zdrowych osób. Te dane świadczą o możliwości wykorzystania miR-92a i miR-638 jako cennych i czułych markerów klinicznych użytecznych w diagnozowaniu i prognozowaniu przebiegu białaczek ostrych [79].

Przewlekłe białaczki limfocytowe również cechują się charakterystycznym profilem ekspresji miRNA uwalnianych do krwiobiegu. Całkowita ilość możliwych do wykrycia miRNA jest tu wyraźnie wyższa niż w osoczu osób zdrowych. Szczególnie wysoka ekspresja w osoczu dotyczy miR-150, miR-19b, miR-29a, miR-223, miR-320, miR-484 i miR-17 [57]. Poziom wybranych miRNA w osoczu krwi wykazuje znaczące różnice uza-

leżnione od typu CLL – w przypadkach pozytywnych i negatywnych pod względem ekspresji cytoplazmatycznej kinazy ZAP-70 [87]. U chorych z B-CLL ZAP-70(+) możliwe jest wykrycie większej liczby krążących miRNA niż w przypadkach ZAP-70(-). W tej drugiej grupie chorych najwyższa ekspresja obserwowana była w przypadku miR-150. Świadczy to o możliwości wykorzystania profili ekspresji niektórych miRNA jako markerów diagnostycznych dla CLL oraz wskaźników pozwalających na określanie statusu białka ZAP-70 [57]. Najnowsze doniesienia świadczą też o znaczeniu prognostycznym miR-155, którego zaburzenia ekspresji stwierdzono w surowicy wielu chorych na CLL [87].

W surowicy chorych na chłoniaka rozlanego olbrzymiokomórkowego z komórek B (diffuse large B-cell lymphoma - DLBCL) udało się określić ekspresję wybranych miRNA zaangażowanych w onkogenezę. Udowodniono, że takie cząsteczki jak miR-155, miR-210 i miR-21 wykazują nadekspresję w surowicy pacjentów w stosunku do surowicy kontrolnej [43]. Ponadto podwyższony poziom ekspresji miR-21 jest związany z lepszym rokowaniem i dłuższym czasem przeżycia chorych na DLBCL.

## **PODSUMOWANIE**

Wydaje się, że regulacyjne cząsteczki miRNA nabierają coraz większego znaczenia w badaniach, których celem jest wskazanie i wyodrębnienie markerów molekularnych związanych z patogenezą i rokowaniem w zaburzeniach hematologicznych. Znajomość profili ekspresji mikroRNA w określonych schorzeniach być może posłuży do szybkiej i precyzyjnej diagnozy. Ponadto wiedza o zaburzeniach ekspresji tych cząsteczek przypuszczalnie będzie mogła stanowić wskazówkę co do wyboru terapii u poszczególnych chorych.

Jeden typ cząsteczek miRNA może regulować ekspresję kilku rodzajów genów (ich transkryptów), natomiast jeden transkrypt może mieć region 3'-UTR rozpoznawany przez wiele miRNA [58]. Wynika z tego, że profilowanie ekspresji mikroRNA charakterystycznych dla zaburzeń hematologicznych może dostarczać wielu informacji, które będą użyteczne w diagnostyce czy wyborze indywidualnego leczenia już we wczesnych stadiach choroby.

MikroRNA wydają się również czynnikami prognostycznymi o charakterze uniwersalnym. Profile ekspresji poszczególnych cząsteczek miRNA specyficznie charakteryzują wybrane typy i stadia rozwoju nowotworów. Stabilność i odporność miRNA na degradację jest nieporównywalnie wyższa niż mRNA. Dodatkowo pozyskanie materiału do badań jest mniej kłopotliwe, ponieważ można oceniać ekspresję miRNA w surowicy lub osoczu krwi. To wszystko zwiększa dostępność materiału badawczego, ułatwia przeprowadzanie procedur analitycznych i umożliwia wieloaspektowe analizy retrospektywne, mogące się przyczynić do lepszego zrozumienia biologii komórek nowotworowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Giné E, Moreno C, Muntañola A, Rozman M, Villamor N, Hodgson K, Campo E, Bosch F, Montserrat E.: Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood*, 2009; 114: 2044-2050
- [2] Agirre X, Jimenez-Velasco A, San Jose-Eneriz E, Garate L, Bandrés E., Cordeu L., Aparicio O., Saez B., Navarro G., Vilas-Zornoza A., Pérez-Roger I., García-Foncillas J., Torres A., Heiniger A., Calasanz M.J., Fortes P., Román-Gómez J., Prósper F.: Down-regulation of *hsa-miR-10a* in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases *USF2*-mediated cell growth. *Mol. Cancer Res.*, 2008; 6: 1830-1840
- [3] Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jimenez-Velasco A, Martín-Subero J.I., Cordeu L., Gárate L., San José-Eneriz E., Abizanda G., Rodríguez-Otero P., Fortes P., Rifón J., Bandrés E., Calasanz M.J., Martín V., Heiniger A., Torres A., Siebert R., Román-Gomez J., Prósper F.: Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA *hsa-miR-124a* regulates *CDK6* expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 2009; 69: 4443-4453
- [4] Albano F., Anelli N., Zagaria A., Liso V., Rocchi M., Specchia G.: *MIRN199B* downregulation in chronic myeloid leukaemia is associated with deletions on *der(9)*. *Br. J. Haematol.*, 2009; 144: 271-273
- [5] Asslaber D., Piñón J.D., Seyfried I., Desch P., Stöcher M., Tinhofer I., Egle A., Merkel O., Greil R.: MicroRNA-34a expression correlates with *MDM2* SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2010; 115: 4191-4197
- [6] Bandyopadhyay S., Mitra R., Maulik U., Zhang M.Q.: Development of the human cancer mikroRNA network. *Silence*, 2010; 1: 6
- [7] Bartel D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281-297
- [8] Beezhold K.J., Castranova V., Chen F.: Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol. Cancer*, 2010; 9: 134
- [9] Berezikov E., Guryev V., van de Belt J., Wienholds E., Plasterk R., Cuppen E.: Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2004; 120: 21-24
- [10] Bhatia S., Kaul D., Varma N.: Functional genomics of tumor suppressor *miR-196b* in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cell. Biochem.*, 2011; 346: 103-116
- [11] Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L.: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006; 13: 1097-1101
- [12] Brase J.C., Wutting D., Kuner R., Sültmann H.: Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol. Cancer*, 2010; 9: 306
- [13] Calin G., Dumitru C., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 15524-15529
- [14] Calin G.A., Pekarsky Y., Croce C.M.: The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2007; 20: 425-437
- [15] Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M.: Human genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2999-3004
- [16] Cammarata G., Augugliaro L., Salemi D., Agueli C., La Rosa M., Dagnino L., Civiletto G., Messina F., Marfia A., Bica M.G., Cascio L., Florida P.M., Mineo A.M., Russo M., Fabbiano F., Santoro A.: Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.*, 2010; 85: 331-339
- [17] Chen L., Widhopf G., Huynh L., Rassenti L., Rai K.R., Weiss A., Kipps T.J.: Expression of *ZAP-70* is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002; 100: 4608-4614
- [18] Coskun E., von der Heide E.K., Schlee C., Kühnl A., Gökbuğten N., Hoelzer D., Hofmann W.K., Thiel E., Baldus C.D.: The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 2011; 35: 208-213
- [19] Doench J.G., Petersen C.P., Sharp P.A.: siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, 2003; 17: 438-442
- [20] Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P.: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343: 1910-1916
- [21] Duttagupta R., Jiang R., Gollub J., Getts R.C., Jones K.W.: Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*, 2011; 6: e20769
- [22] Fabbri M.,ottoni A., Shimizu M., Spizzo R., Nicoloso M.S., Rossi S., Barbarotto E., Cimmino A., Adair B., Wojcik S.E., Valeri N., Calore F., Sampath D., Fanini F., Vannini I., Musuraca G., Dell'Aquila M., Alder H., Davuluri R.V., Rassenti L.Z., Negrini M., Nakamura T., Amadori D., Kay N.E., Rai K.R., Keating M.J., Kipps T.J., Calin G.A., Croce C.M.: Association of a microRNA/*TP53* feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*, 2011; 305: 59-67
- [23] Ferrajoli A.: Treatment of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Hematology Education Program Book*, 2010; 1: 82-89
- [24] Frenquelli M., Muzio M., Scielzo C., Fazi C., Scarfò L., Rossi C., Ferrari G., Ghia P., Caligaris-Cappio F.: MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between *miR-221/222* cluster and *p27*. *Blood*, 2010; 115: 3949-3959
- [25] Gao X.N., Lin J., Gao L., Li Y.H., Wang L.L., Yu L.: MicroRNA-193b regulates *c-Kit* proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 2011; 35: 1226-1232
- [26] Gao X.N., Lin J., Li Y.H., Gao L., Wang X.R., Wang W., Kang H.Y., Yan G.T., Wang L.L., Yu L.: MicroRNA-193a represses *c-kit* expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 2011; 30: 3416-3428
- [27] Garzon R., Volinia S., Liu C.G., Fernandez-Cymering C., Palumbo T., Pichiorri F., Fabbri M., Coombes K., Alder H., Nakamura T., Flomenberg N., Marucci G., Calin G.A., Kornblau S.M., Kantarjian H., Bloomfield C.D., Andreeff M., Croce C.M.: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008; 111: 3183-3189
- [28] Gomez-Benito M., Conchillo A., Garcia M.A., Vázquez I., Maicas M., Vicente C., Cristobal I., Marcotegui N., García-Ortí L., Bandrés E., Calasanz M.J., Alonso M.M., Otero M.D.: *EVI1* controls proliferation in acute myeloid leukemia through modulation of *miR-I-2*. *Br. J. Cancer*, 2010; 103: 1292-1296
- [29] Grimwade D., Walker H., Harrison G., Oliver F., Chatters S., Harrison C.J., Wheatley K., Burnett A.K., Goldstone A.H.: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 2001; 98: 1312-1320
- [30] Han J., Lee Y., Yeom K.H., Nam J.W., Heo I., Rhee J.K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.T., Kim V.N.: Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Droscha-DGCR8 complex. *Cell*, 2006; 125: 887-901
- [31] Hanlon K., Rudin C.E., Harries L.W.: Investigating the targets of *MIR-15a* and *MIR-16-1* in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *PLoS One*, 2009; 4: e7169

- [32] Hoyer K.K., French S.W., Turner D.E., Nguyen M.T., Renard M., Malone C.S., Knoetig S., Qi C.F., Su T.T., Cheroutre H., Wall R., Rawlings D.J., Morse H.C., Teitel M.A.: Dysregulated *TCL1* promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 14392-14397
- [33] Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.L., Schmittgen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura D., Marsh C.B.: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008; 3: e3694
- [34] Hutvagner G., Zamore P.D.: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002; 297: 2056-2060
- [35] Iraci N., Valli E., Gherardi S., Soverini S., Kalebic T., Baccharani M., Martinelli G., Perini G.: Suppression of BCR-ABL expression in CML by a panel of miRNAs (abstract). *Blood*, 2009; 114: 351
- [36] Isik M., Korswagen H.C., Berezikov E.: Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence*, 2010; 1: 5
- [37] Isken F., Steffen B., Merk S., Dugas M., Markus B., Tidow N., Zühlendorf M., Illmer T., Thiede C., Berdel W.E., Serve H., Müller-Tidow C.: Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br. J. Haematol.*, 2008; 140: 153-161
- [38] Izzotti A., Calin G.A., Arrigo P., Steele V.E., Croce C.M., De Flora S.: Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J.*, 2009; 23: 806-812
- [39] Ji X., Takahashi R., Hiura Y., Hirokawa G., Fukushima Y., Iwai N.: Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin. Chem.*, 2009; 55: 1944-1949
- [40] John B., Enright A.J., Aravin A., Tuschl T., Sander C., Marks D.S.: Human microRNA targets. *PLoS Biol.*, 2004; 2: e363
- [41] Jongen-Lavrencic M., Sun S.M., Dijkstra M.K., Valk P.J., Lowenberg B.: MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008; 111: 5078-5085
- [42] Kato M., Slack F.J.: MicroRNAs: small molecules with big roles - *C. elegans* to human cancer. *Biol. Cell*, 2008; 100: 71-81
- [43] Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K., Banham A.H., Pezzella F., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hattton C.S., Harris A.L.: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 2008; 141: 672-675
- [44] Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N.: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.*, 2002; 17: 4663-4670
- [45] Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, 2004; 20: 4051-4060
- [46] Li S., Moffett H.F., Lu J., Werner L., Zhang H., Ritz J., Neuberg D., Wucherpfennig K.W., Brown J.R., Novina C.D.: MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*, 2011; 6: e16956
- [47] Li X., Sanda T., Look T., Novina C.D., von Boehmer H.: Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 663-675
- [48] Li Z., Lu J., Sun M. Mi S., Zhang H., Luo R.T., Chen P., Wang Y., Yan M., Qian Z., Neilly M.B., Jin J., Zhang Y., Bohlander S.K., Zhang D.E., Larson R.A., Le Beau M.M., Thirman M.J., Golub T.R., Rowley J.D., Chen J.: Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 15535-15540
- [49] Liu J., Valencia-Sanchez M.A., Hannon G.J., Parker R.: MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 719-723
- [50] Lopotova T., Zackova M., Klamova H., Moravcova J.: MicroRNA-451 in chronic myeloid leukemia: miR-451-BCR-ABL regulatory loop? *Leuk. Res.*, 2011; 35: 974-977
- [51] Lv M., Zhang X., Jia H., Li D., Zhang B., Zhang H., Hong M., Jiang T., Jiang Q., Lu J., Huang X., Huang B.: An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- $\alpha$  and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*, 2012; 26: 769-777
- [52] Machova Polakova K., Lopotova T., Klamova H., Burda P., Trnecny M., Stopka T., Moravcova J.: Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol. Cancer*, 2011; 10: 41
- [53] Marucci G., Radmacher M.D., Maharry K., Mrózek K., Ruppert A.S., Paschka P., Vukosavljevic T., Whitman S.P., Baldus C.D., Langer C., Liu C.G., Carroll A.J., Powell B.L., Garzon R., Croce C.M., Kolitz J.E., Caligiuri M.A., Larson R.A., Bloomfield C.D.: MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 358: 1919-1928
- [54] Mavrakis K.J., van der Meulen J., Wolfe A.L., Liu X., Mets E., Taghon T., Khan A.A., Setty M., Rondou P., Vandenberghe P., Delabesse E., Benoit Y., Socci N.B., Leslie C.S., Van Vlierberghe P., Speleman F., Wendel H.G.: A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat. Genet.*, 2011; 43: 673-678
- [55] Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T.: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*, 2004; 15: 185-197
- [56] Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 10513-10518
- [57] Moussay E., Wang K., Cho J.H., van Moer K., Pierson S., Paggetti J., Nazarov P.V., Palissot V., Hood L.E., Berchem G., Galas D.J.: MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 6573-6578
- [58] Network analysis of microRNA using MetaCore and MetaLink [www.genego.com/pdf/MetaLinkmicroDNACS\\_LR.pdf](http://www.genego.com/pdf/MetaLinkmicroDNACS_LR.pdf) (17.01.2013)
- [59] Okamura K., Hagen J.W., Duan H., Tyler D.M., Lai E.C.: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007; 130: 89-100
- [60] Okamura K., Liu N., Lai E.C.: Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol. Cell*, 2009; 36: 431-444
- [61] Ouillette P., Collins R., Shakhani S., Li J., Li C., Shedden K., Malek S.N.: The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 6778-6790
- [62] Ovcharenko D., Stölzel F., Poitz D., Fierro F., Schaich M., Neubauer A., Kelnar K., Davison T., Müller-Tidow C., Thiede C., Bornhäuser M., Ehninger G., Brown D., Illmer T.: miR-10a overexpression is associated with *NPM1* mutations and *MDM4* downregulation in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.*, 2011; 39: 1030-1042
- [63] Palamarchuk A., Efanov A., Nazaryan N., Santanam U., Alder H., Rassenti L., Kipps T., Croce C.M., Pekarsky Y.: 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*, 2010; 115: 3916-3922
- [64] Parker T.R., Strout M.P.: Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and impact on treatment. *Discov. Med.*, 2011; 11: 115-123
- [65] Pasquinelli A.E., Ruvkun G.: Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2002; 18: 495-513
- [66] Pekarsky Y., Croce C.M.: Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget*, 2010; 1: 224-227

- [67] Pekarsky Y., Santanam U., Cimmino A., Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Volinia S., Alder H., Liu C.G., Rassenti L., Calin G.A., Hagan J.P., Kipps T., Croce C.M.: Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11590-11593
- [68] Pekarsky Y., Zanesi N., Croce C.M.: Molecular basis of CLL. *Semin. Cancer Biol.*, 2010; 20: 370-376
- [69] Rawstron A.C., Green M.J., Kuzmicki A., Kennedy B., Fenton J.A., Evans P.A., O'Connor S.J., Richards S.J., Morgan G.J., Jack A.S., Hillmen P.: Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*, 2002; 100: 635-639
- [70] Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G.: The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000; 403: 901-906
- [71] Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A.: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.*, 2004; 14: 1902-1910
- [72] Rodriguez-Otero P., Román-Gómez J., Vilas-Zornoza A., José-Eneriz E.S., Martín-Palanco V., Rifón J., Torres A., Calasanz M.J., Agirre X., Prosper F.: Deregulation of *FGFR1* and *CDK6* oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. *Br. J. Haematol.*, 2011; 155: 73-83
- [73] Satoh J., Tabunoki H.: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining*, 2011; 4: 17
- [74] Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003; 115: 199-208
- [75] Shomron N., Levy C.: MicroRNA - biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009; 2009: 594678
- [76] Stamatopoulos B., Meuleman N., Haibe-Kains B., Saussoy P., Van Den Neste E., Michaux L., Heimann P., Martiat P., Bron D., Lagneaux L.: MicroRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, 2009; 113: 5237-5245
- [77] Suresh S., McCallum L., Lu W., Lazar N., Perbal B., Irvine A.E.: MicroRNAs 130a/b are regulated by BCR-ABL and down-regulate expression of CCN3 in CML. *J. Cell Commun. Signal.*, 2011; 5: 183-191
- [78] Tan G.S., Garchow B.G., Liu X., Metzler D., Kiriakidou M.: Clarifying mammalian RISC assembly *in vitro*. *BMC Mol. Biol.*, 2011; 12: 19
- [79] Tanaka M., Oikawa K., Takanashi M., Kudo M., Ohyashiki J., Ohyashiki K., Kuroda M.: Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One*, 2009; 4: e5532
- [80] Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lovtall J.O.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 654-659
- [81] Venturini L., Battmer K., Castoldi M., Schultheis B., Hochhaus A., Muckenthaler M.U.: Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood*, 2007; 109: 4399-4405
- [82] Wang Z.: MicroRNA: A matter of life or death. *World J. Biol. Chem.*, 2010; 1: 41-54
- [83] Wienholds E., Plasterk R.H.: MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 5911-5922
- [84] Zanette D.L., Rivadavia F., Molfetta G.A., Barbuzano F.G., Proto-Siqueira R., Silva-Jr W.A., Falcao R.P., Zago M.A.: miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2007; 40: 1435-1440
- [85] Zeng Y., Cullen B.R.: Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 4776-4785
- [86] Zeng Y., Wagner E.J., Cullen B.R.: Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell*, 2002; 9: 1327-1333
- [87] Zhang Y., Rombaoa C.P., Banwait R., Liu Y., Ngo H.T., Quang P., Azab A.K., Azab F., Maiso P., Reagan M., Sacco A., Roccardo A.M., Brown J.R., Ghobrial I.M.: MicroRNA-155 as a potential plasma biomarker for chronic lymphocytic leukemia and Waldenstrom macroglobulinemia. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2011. Oral and Poster Abstracts

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.