

Received: 2016.06.28
Accepted: 2017.07.11
Published: 2017.12.28

Perspektywy wykorzystania miRNA jako biomarkera w ukierunkowanym molekularnie leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR*

Current perspectives on the use of miRNA as a biomarker for EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer

Mateusz Florczuk, Adam Szpechciński, Joanna Chorostowska-Wynimko

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej w Warszawie

Streszczenie

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest główną przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia tej choroby. Trwają również badania nad skuteczniejszym wykorzystaniem nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej, które umożliwią identyfikację określonych cech genetycznych i epigenetycznych nowotworu (biomarkerów predykcyjnych) i pozwolą dobrać najbardziej efektywne metody leczenia dla konkretnego chorego (terapia spersonalizowana). Najpowszechniej stosowaną formą terapii spersonalizowanej NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (IKT EGFR). Korzystna odpowiedź na leczenie IKT EGFR jest uzależniona od obecności somatycznych mutacji w genie *EGFR*. Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR w terapii spersonalizowanej NDRP jest oporność na te leki, nabywana przez chorych w trakcie leczenia. Obecnie poszukuje się wieloczynnikowych markerów molekularnych, m.in. z użyciem wysoko przepustowych technik analizy genetycznej (mikromacierze, sekwencjonowanie nowej generacji), w celu poprawy skuteczności terapii ukierunkowanych molekularnie. Poznanie epigenetycznych mechanizmów regulujących zjawiska wrażliwości i oporności komórek NDRP na IKT EGFR, w postaci małych, niekodujących cząsteczek miRNA (mikroRNA) może się okazać przełomem w terapii spersonalizowanej tego typu nowotworu. W procesie kancerogenezy pewne miRNA mogą pełnić funkcję onkogenną, a inne onkosupresorową. Z klinicznego punktu widzenia, podwójna rola miRNA w rozwoju nowotworu może mieć decydujący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie. Ponadto, stabilne postaci nowotworowego miRNA wykrywa się nie tylko bezpośrednio w tkance guza, ale również w płynach ustrojowych chorego, zwłaszcza we krwi obwodowej, co stwarza dodatkowe możliwości rozwoju niemalże bezinwazyjnego diagnozowania i monitorowania efektywności leczenia w czasie.

Słowa kluczowe:

miRNA • niedrobnokomórkowy rak płuca • biomarkery • terapia ukierunkowana molekularnie • inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego nr 4/XIII/14 finansowanego przez Naukową Fundację Polpharma powołaną przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A.

Summary

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of death from cancer in the world. Currently, a large number of research studies are conducted to develop and implement new treatment strategies. Intensive efforts are also made to improve the robustness of modern molecular diagnostics to identify more precisely the specific genetic and epigenetic cancer features (predictive biomarkers) and to adjust the most effective treatment options for individual patients (personalized therapy). The so-called targeted therapy based on using epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is nowadays the most widely chosen form of personalized treatment in advanced NSCLC. Favorable response to treatment with EGFR TKIs depends on the presence of somatic mutations in *EGFR* gene, detectable in lung cancer tissue. The resistance to EGFR TKIs acquired by most patients during the treatment is the main obstacle in overcome in targeted therapy of NSCLC.

At present, epi-/genome of lung cancer is intensively screened using high-throughput techniques (e.g. microarrays, Next-Generation Sequencing) to select novel epi-/genetic biomarkers that could be used as predictors of the targeted treatment outcome, apart from single gene alterations. A better understanding of epigenetic mechanisms regulating either the sensitivity or the resistance of NSCLC cells to EGFR TKIs, through activity of small, non-coding miRNA (microRNA) molecules, may become a breakthrough in targeted therapy of lung cancer. During carcinogenesis, miRNAs exhibit their dual regulatory function: they promote cancer development as oncogenes or act as tumor suppressors. From a clinical point of view, such a dual regulatory function of microRNAs might significantly impact the further development of targeted therapies. Moreover, stable forms of tumor-related miRNA are detected not only in tumor tissue, but also in body fluids of NSCLC patients, particularly in their peripheral blood. This finding provides new options of minimally invasive cancer diagnosis and monitoring of treatment effectiveness over time.

Keywords: miRNA • non-small cell lung cancer • biomarkers • targeted therapy • EGFR tyrosine kinase inhibitors

GICID: 01.3001.0010.7613
DOI: 10.5604/01.3001.0010.7613
Word count: 3941
Tables: 1
Figures: 2
References: 87

Adres autora: dr n. med. Adam Szpechciński, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa, e-mail: a.szpehcinski@igichp.edu.pl

WPROWADZENIE

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów na choroby nowotworowe na świecie (1,59 mln przypadków śmiertelnych w 2012 r.) [68]. W Polsce jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim, po raku piersi, u kobiet. W 2013 r. w Polsce liczba zachorowań na nowotwory złośliwe płuc wynosiła prawie 21 tys. przypadków, a zgonów nieco ponad 22 tys. (16 tys. mężczyzn i 6,5 tys. kobiet) [78]. Tak wysoka śmiertelność wiąże się z tym, że większość chorych jest diagnozowana w zaawansowanym stadium choroby, gdy możliwość zastosowania skutecznego leczenia chirurgicznego jest ograniczona. Konwencjonalne strategie leczenia, chemio- i radioterapia również nie osiągają satysfakcjonującej skuteczności.

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), najczęstszy typ raka płuca (80-85% wszystkich przypadków), jest trudnym celem diagnostycznym, zarówno ze względu na znaczące zróżnicowanie klonów komórek nowotworowych w guzie, jak również utrudniony dostęp do dobrego jakościowo, informatywnego materiału diagnostycznego [15]. W miarę rozwoju nowotworu zmienia się również profil markerów molekularnych [14]. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia NDRP. Badania opierają się głównie na identyfikacji potencjalnych markerów nowotworu, jak również typowaniu najbardziej odpowiedniej i skutecznej metody leczenia (rozwój terapii personalizowanej). Analiza profilu zmian epigenetycznych w NDRP mogłaby dostarczyć istotnych wskazówek dla doboru najskuteczniejszych leków i rokowania powodzenia prowadzonej

terapii, jak również minimalizacji skutków ubocznych, wynikających z nieuzasadnionego klinicznie zastosowania leku. Scharakteryzowanie zaburzeń molekularnych towarzyszących kolejnym stadiom rozwoju NDRP, mających jednocześnie walor markera diagnostycznego, prognostycznego lub predykcyjnego wciąż nastęrcza wielu trudności, mimo intensywnych poszukiwań prowadzonych przez wiele ośrodków na całym świecie. W przypadku leków ukierunkowanych molekularnie konieczność oznaczania molekularnych czynników predykcyjnych wpisana jest niemal w ich definicję.

LECZENIE PERSONALIZOWANE NDRP

Najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie (targeted therapy) z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT), które, w odróżnieniu od standardowej chemioterapii, wybiórczo hamują wzrost komórek nowotworu przez swoiste oddziaływanie na domenę wewnątrzkomórkową receptora naskórkowego czynnika wzrostu (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) [13].

Szlak sygnałowy EGFR jest istotnym elementem w powstawaniu i progresji wielu chorób nowotworowych. Aktywacja EGFR, przez przyłączenie swobodnego liganda lub mutację genu, promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, zwiększając ich inwazyjny potencjał oraz hamuje sygnały apoptotyczne [63].

W leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca korzystna odpowiedź na leczenie IKT zależy od obecności somatycznych mutacji w genie *EGFR* [51,74]. Mutacje aktywujące występują w obrębie eksonów 18-21 genu *EGFR* i powodują jego konstytutywną aktywację. Obecność mutacji aktywujących jest również związana ze zwiększonym powinowactwem receptora do cząsteczki inhibitora i zahamowaniem proliferacji komórek guza w odpowiedzi na terapię IKT. Najczęściej występującymi zmianami (~90%) o charakterze mutacji aktywujących są niewielkie delecje w obrębie kodonów 746-753 w eksonie 19 oraz mutacja punktowa powodująca substytucję leucyny na argininę w kodonie 858 (L858R) w eksonie 21 genu *EGFR* [69].

Mutacje w genie *EGFR* dotyczą głównie chorych na raka gruczołowego płuca, niepalących, nieznacznie częściej kobiet niż mężczyzn i osób po 65. roku życia [39, 60, 66]. Mutacje występują znacznie częściej u chorych rasy azjatyckiej (40%) niż kaukaskiej (10%, z czego 3-25% w populacji amerykańskiej, 10-24% w populacji południowo-europejskiej). Standardem klinicznym w personalizowanej terapii NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie z użyciem IKT wiążących EGFR w sposób odwracalny (erlotynib i gefitynib), bądź nieodwracalny (afatynib, ozymertynib) [29,55].

MECHANIZMY PIERWOTNEJ I NABYTEJ OPORNOŚCI NA IKT EGFR w NDRP

Największym ograniczeniem stosowania odwracalnych inhibitorów IKT EGFR jest oporność na te leki. Może mieć

Tabela 1. Molekularne mechanizmy oporności na IKT EGFR (% - częstość występowania u chorych na NDRP)

Oporność pierwotna	Oporność nabyta
• Mutacja w 2 eksonie <i>KRAS</i> (20-30%)	• Wtórne mutacje oporności w <i>EGFR</i> : T790M (50%) lub D761Y, T854A
• Mutacje genu <i>BRAF</i> (2-3%)	• Amplifikacja <i>MET</i> (20%)
• Mutacje <i>EGFR</i> : insercje w eksonie 20 (4%), T790M (<5%)	• Nadekspresja IGF-R1
• Amplifikacja <i>MET</i> (4%)	• Transformacja NDRP do raka drobnokomórkowego (DRP) (14%)
• Mutacja w genie <i>PIK3CA</i> (5%)	• Przemiana nabłonka w mezenchymę (epithelial to mesenchymal transition, EMT) (5%)
• Brak ekspresji białka EGFR	• Inne, dotąd nieznane mechanizmy (30%)
• Utrata <i>PTEN</i> (brak ekspresji białka)	
• Fuzja genów <i>EML4-ALK</i> (2-7%)	
• Wtórna mutacja <i>EGFR</i> występująca jednocześnie z pierwotną mutacją aktywującą w eksonie 18, 19 i 21 (rzadko)	

charakter pierwotny, warunkowany przez tzw. mutacje oporności, od początku obecne w komórkach guza, równocześnie do mutacji aktywujących, albo charakter nabyty, gdy mutacje oporności rozwijają się w trakcie leczenia IKT EGFR (tabela 1) [37, 48]. Niemal wszyscy chory na NDRP, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na IKT EGFR, z czasem nabywają oporność na nie, zwykle między 9 a 12 miesiącem leczenia.

Guz pierwotny płuca jest tworem genetycznie heterogennym. Oznacza to, że możliwe jest współistnienie klonów komórek nowotworowych z mutacją aktywującą *EGFR* i z natywną postacią genu (wild-type), a nawet komórek wrażliwych i opornych na leczenie IKT EGFR. Prowadzenie terapii ukierunkowanej molekularnie z czasem eliminuje klon wrażliwy i powoduje selekcję komórek bez mutacji aktywujących lub komórek z mutacją warunkującą oporność, z klinicznie daje obraz częściowej remisji/wznowy, czy też ograniczonej odpowiedzi na leczenie w zależności od udziału odsetkowego poszczególnych populacji komórkowych w guzie.

Obecnie określenie w czasie momentu nabycia oporności na IKT EGFR w trakcie leczenia jest w praktyce klinicznej bardzo trudne ze względu na to, że ponowna operacja i/lub biopsja w celu pobrania materiału tkankowego do analizy molekularnej jest niemożliwa do przeprowadzenia u znaczącego odsetka chorych. W tym przypadku analiza krwi obwodowej chorego, zawierającej pozakomórkowy materiał genetyczny, pochodzący z komórek

guza mogłaby umożliwić śledzenie rozwoju choroby w czasie rzeczywistym i monitorowanie przebiegu leczenia [81]. Uważa się, że miRNA, odgrywające główną rolę w mechanizmach nowotworzenia, mogłyby stanowić nową klasę epigenetycznych biomarkerów, pomocnych w ocenie statusu choroby i skuteczności leczenia.

miRNA

miRNA to klasa niekodujących, endogennych i jednoniciowych RNA o stosunkowo małych cząsteczkach długości 19-22 nukleotydów. Funkcjonują one jako regulatory ekspresji genów zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt [2,4]. U ssaków, w tym człowieka, miRNA mogą regulować ponad 50% wszystkich genów kodujących białka [73]. Od czasu ich odkrycia, liczba nowo zidentyfikowanych ludzkich miRNA stale wzrasta i obecnie sięga ponad 2,5 tysiąca znanych sekwencji [16]. Odpowiada to około 1-4% wszystkich genów ulegających ekspresji u człowieka, przez co miRNA są uważane za jedną z najliczniejszych klas genowych regulatorów [7,11,47]. Cząsteczki miRNA są zdolne do regulacji genów na poziomie posttranskrypcyjnym, przez swoiste rozpoznawanie i oddziaływanie na matrycowe RNA (mRNA) [27]. Proces wyciszania genów może przebiegać na dwa sposoby, w zależności od stopnia komplementarności między cząsteczkami miRNA i mRNA. Aby miRNA mogło przyłączyć się do odpowiedniej sekwencji mRNA wystarczy jedynie 2-7 komplementarnych nukleotydów. Dzięki temu pojedyncza cząsteczka miRNA wpływa na tysiące różnych transkryptów mRNA, a jedno mRNA podlega regulacji przez wiele rodzajów miRNA. U człowieka i zwierząt miRNA spełniają funkcję regulatorową, przyłączając się najczęściej na zasadzie niepełnej komplementarności do końca 3' nici mRNA w regionie nieulegającym translacji (3'UTR), który odpowiada za poliadenylację, translację i stabilność mRNA [3,5,58]. W tym przypadku, ekspresja białka jest hamowana przez zatrzymanie translacji bądź przez deadenylację cząsteczki mRNA [62].

U ssaków miRNA znacznie rzadziej przyłącza się do mRNA z zachowaniem pełnej komplementarności, co wywołuje zależny od miRNA rozpad transkryptu mRNA [57]. W tej sytuacji, miRNA dołącza się do dwóch protein (białka GW182) i jednego z białek z rodziny Ago (rodzina białek Argona)utów) i tworzy indukowany przez miRNA kompleks wyciszający (miRISC). Następnie transkrypt mRNA zostaje pocięty przez rybonukleazy związane z miRISC. Dodatkowo miRNA może działać jako regulator ekspresji genów, przyłączając się do sekwencji promotorowej danego genu [59].

Biogeneza miRNA

Geny miRNA często są zorganizowane w grupach i znajdują się nie tylko w eksonach, ale także w intronach i regionach niepodlegających translacji [36,44]. Taki układ jednostek transkrypcyjnych pozwala na jednoczesne powstawanie zarówno transkryptów miRNA, jak i mRNA. Sposób zorganizowania genów miRNA pozwala na działanie polimerazy II i III, które transkrybują geny dla małych RNA [45,67].

miRNA ulega transkrypcji przez polimerazę RNA II do postaci zwanej pierwotnym miRNA (pri-miRNA), które jest cząsteczką kilkakrotnie większą niż dojrzałe miRNA (zwykle 100-1000 nukleotydów) (ryc.1) [43]. Następnie w jądrze komórkowym pri-miRNA jest skracane przez rybonukleazę III o właściwościach endonukleazy (zwaną enzymem Drosha) i białko DGCR8 (Pasha) do pre-miRNA (prekursorowe miRNA) o długości ~60-120 nukleotydów. Prekursorowe miRNA zostaje zwinięte w charakterystyczną strukturę „spinki do włosów” (hairpin) [6,10,20,22,28,43,46,79,82] i transportowane przez eksportynę-5 zależną od RAN-GTP do cytoplazmy, gdzie podlega dalszemu skróceniu przez RNAzę typu III, zwaną Dicer, do właściwych sekwencji miRNA o długości 19-22 nukleotydów [8,35]. Dojrzałe miRNA początkowo występuje jako asymetryczny podwójny kompleks (dupleks) dwóch nici miRNA:miRNA*. Zwykle nić o mniej termostabilnym końcu 5' jest pakowana do kompleksu białkowego (RISC), którego głównym komponentem jest białko z rodziny Argonautów [40,59]. Kompleks miRISC może następnie działać w obrębie komórki jako aktywator bądź represor translacji.

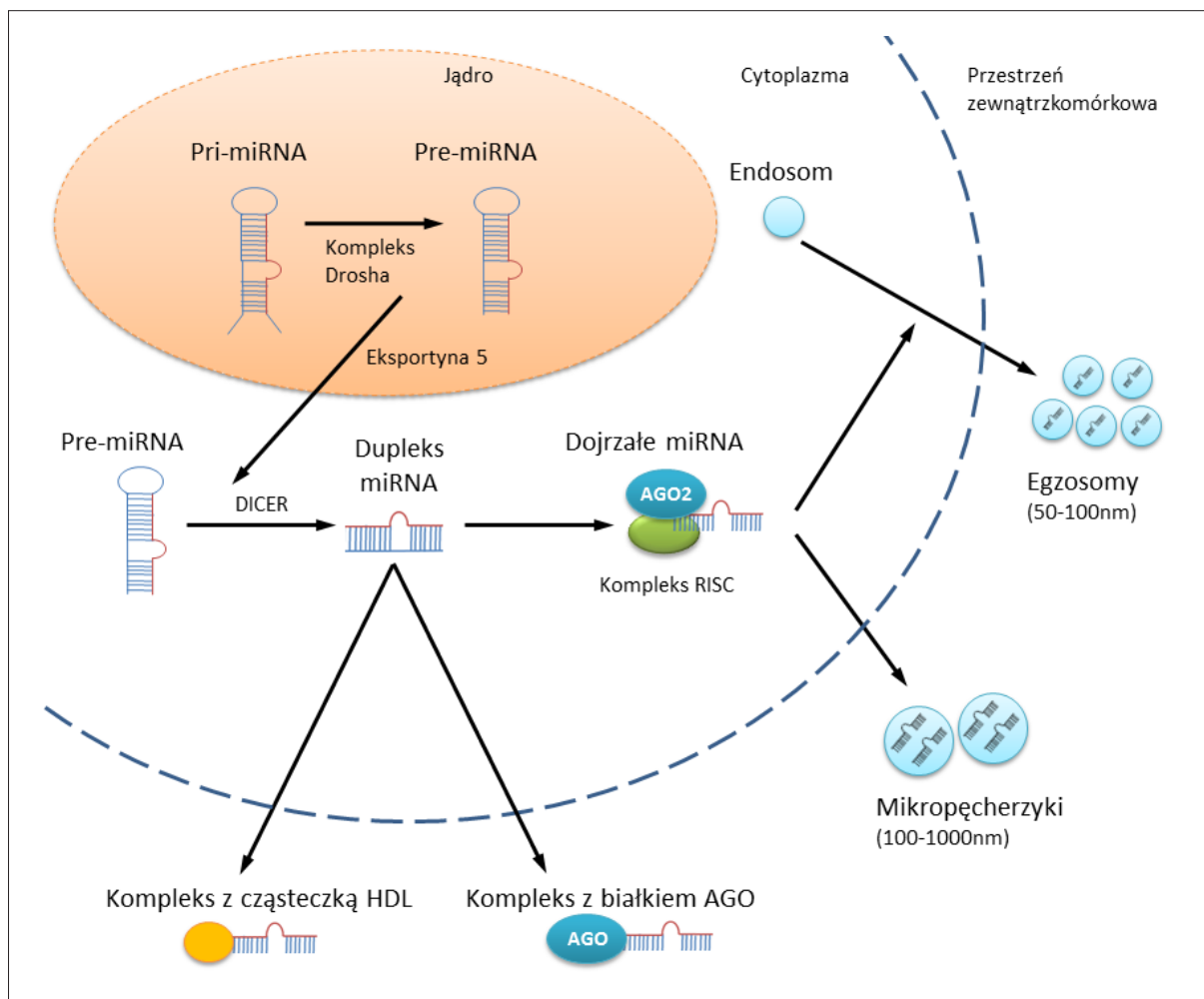
Na początku sądzono, że w większości przypadków jedna z nici prekursora jest degradowana. Jednak nowsze badania wykazały, że obydwie nici mogą być funkcjonalne [54,61]. W tym przypadku nić o dominującej ekspresji w komórce nazywa się wiodącą, a drugą nić tego samego prekursora, która występuje w mniejszej liczbie kopii – pasażerską i oznacza gwiazdką. Jeśli brakuje danych określających poziom ekspresji danej nici, zwykle do nazwy dojrzałego miRNA dodaje się końcówkę 5p (nić z ramienia 5' prekursora) lub 3p (nić z ramienia 3'), np. miR-142-5p i miR-142-3p.

Obecnie wiadomo, że w regionach kodujących sekwencje prekursorowe dla miRNA występuje około 2 tys. miejsc polimorficznych dla pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism, SNP), które mogą wpływać na interakcję miRNA:mRNA [49]. Zmiany genetyczne w obrębie sekwencji miRNA prawdopodobnie mają wpływ na ich aktywność regulatorową, a przez to na wiele procesów komórkowych, w tym kancerogenezę [21]. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu Rs11614913 (C>T) w pre-miR-196a2 wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia NDRP [33, 71, 80].

Pozakomórkowe miRNA

Badania wielu grup potwierdziły występowanie miRNA w różnych płynach ustrojowych człowieka, m.in. surowicy [12,26,52] i osoczu krwi [12,26], ślinie [56], moczu [30], mleku [41], płynie mózgowo-rdzeniowym [18], płynie nasiennym [31].

Dotychczas poznano różne mechanizmy uwalniania miRNA poza komórkę, które obejmują udział procesów śmierci komórkowej (nekrozy i apoptozy) oraz aktywnej sekrecji [62]. W tym ostatnim mechanizmie, miRNA jest wydzielane wewnątrz egzozomów i innych pęcherzykowatych struktur lub w postaci kompleksów z białkami wiążącymi RNA, z rodziny Argonautów czy lipoprotein



Ryc. 1. Schemat biogenezy miRNA

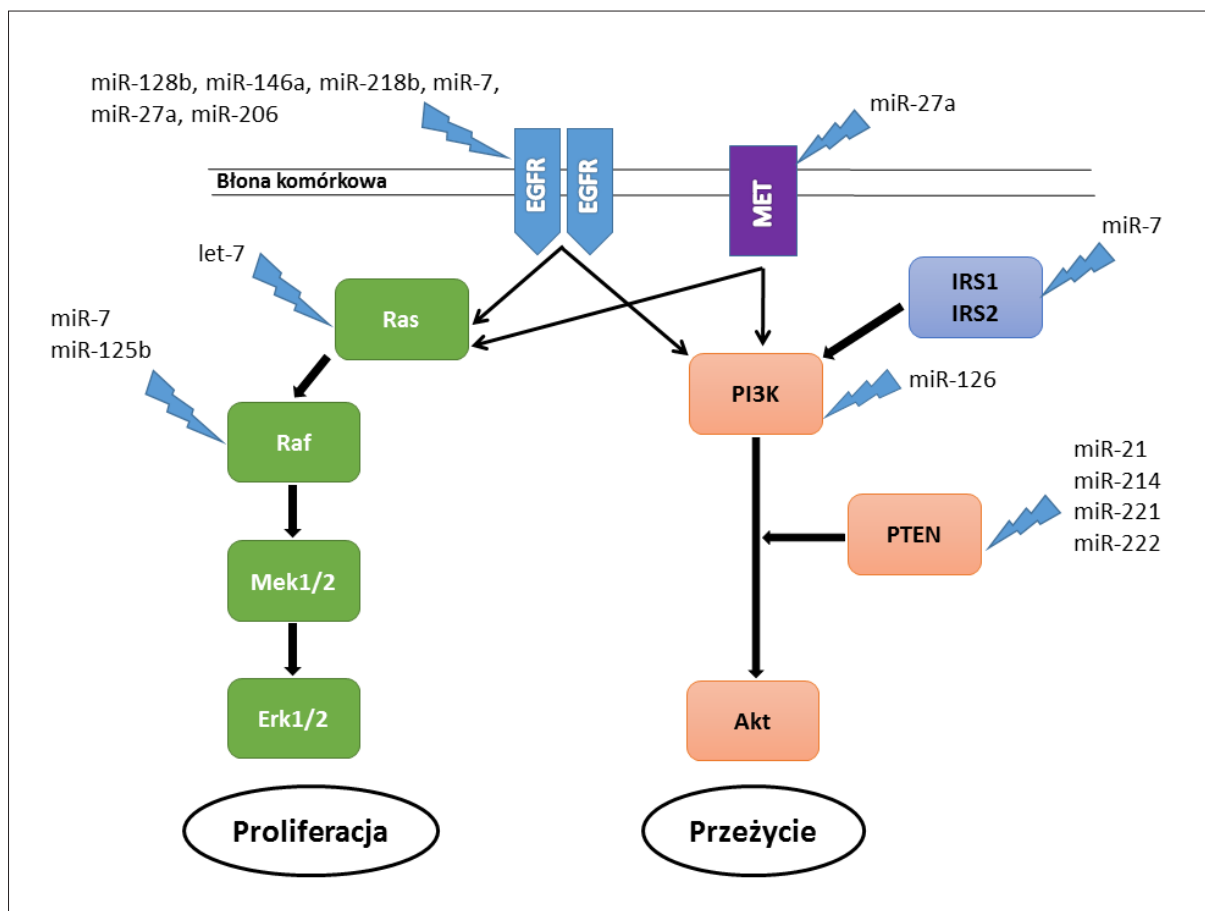
o dużej gęstości (HDL). Badania nad pozakomórkowym miRNA potwierdziły dużą stabilność tych cząsteczek zarówno w osoczu jak i w surowicy [50]. Analizy biochemiczne wykazały, że pozakomórkowe miRNA obecne w krwi jest odporne na działanie RNaz, a także wyjątkowo trwałe w środowisku o skrajnych wartościach pH i temperatury [12,26].

Obecność i profil miRNA w płynach ustrojowych może bezpośrednio odzwierciedlać stan fizjologiczny organizmu, a przede wszystkim procesy chorobowe [1]. Istotnie zwiększone lub zmniejszone uwalnianie pewnych miRNA do krwiobiegu jest charakterystyczne dla poszczególnych typów nowotworów, również NDRP [32]. Potencjalne korzyści jakie płyną z wykorzystania pozakomórkowych miRNA w płynach ustrojowych, pobieranych jako tzw. „płynna biopsja” (liquid biopsy), w diagnostyce nowotworów to przede wszystkim mała inwazyjność (w stosunku do zabiegów pozyskiwania komórek/tkanki nowotworu), powtarzalność i łatwość pozyskania materiału. Ponadto, analiza osocza krwi jako rezerwuaru cząsteczek miRNA uwalnianych przez komórki nowotworu z różnych partii guza pierwotnego

będź z różnych lokalizacji w organizmie (odległe prze-rzuty) pozwala pominąć zjawisko komórkowej i molekularnej heterogenności nowotworu [23].

METODY BADANIA EKSPRESJI miRNA

Wiarygodna analiza ekspresji miRNA, zwłaszcza tych obecnych w płynach ustrojowych, wciąż stanowi wyzwanie analityczne ze względu na unikalną charakterystykę cząsteczek miRNA (mały rozmiar, wysoka homologia między miRNA z tej samej rodziny, niskie stężenie miRNA w płynach ustrojowych), brak ujednoczonych protokołów metodologicznych, dostępność różnych komercyjnych zestawów odczynnikowych i aparatury zróżnicowanej pod względem sposobu i czułości detekcji [53]. Obecnie najczęściej stosowanymi metodami analizy ekspresji miRNA są: RT-qPCR, mikromacierze oraz sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS). Najbardziej odpowiednią metodą w diagnostyce klinicznej, po uwzględnieniu kosztu aparatury, odczynników oraz nakładu pracy, zdaje się technika RT-qPCR. Jest to metoda znacznie tańsza niż NGS i niewymagająca roz-



Ryc. 2. miRNA zaangażowane w mechanizmy regulacji ekspresji EGFR i alternatywnych szlaków sygnałowych

budowanego zaplecza technicznego oraz wyspecjalizowanej kadry bioinformatycznej do analizy uzyskanych wyników. Jednak technologia NGS jest powszechnie uważana za przyszłość nie tylko biologii molekularnej czy genomiki, ale także diagnostyki onkologicznej, gdyż pozwala na jednoczesną analizę dużej liczby sekwencji miRNA z wielu badanych prób. Niemniej metoda PCR jest obecnie „złotym standardem” w diagnostyce molekularnej nowotworów, a mnogość jej zalet faworyzuje ją jako najbardziej przydatną w standardowej diagnostyce chorób nowotworowych.

Niewielka powtarzalność publikowanych wyników badań pod względem wyboru optymalnego panelu miRNA jako biomarkerów NDRP wynika z braku standardów metodologicznych oraz częstych błędów w planowaniu doświadczeń, m.in. nieprawidłowego doboru bądź słabej reprezentatywności grup badanych chorych, niewłaściwej obróbki i przechowywania analizowanych próbek, niewystarczającej mocy statystycznej badania. Brak jest również konsensusu co do normalizacji uzyskiwanych danych. Dlatego przed wdrożeniem metod diagnostycznych z użyciem miRNA do praktyki klinicznej, wymagana jest walidacja i standaryzacja wszystkich etapów procedury analitycznej [72].

miRNA JAKO REGULATORY GŁÓWNYCH SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH W KANCEROGENEZIE

Oddziaływanie niekodujących RNA na mRNA genów biorących udział w różnych procesach biologicznych obejmuje szeroki zakres aktywności: począwszy od kontroli różnicowania i wzrostu komórek, naprawy DNA po kierowanie komórki na drogę apoptozy. Sugeruje to ścisły związek miRNA z przebiegiem kancerogenezy, w której te procesy są zaburzone. Faktem jest występowanie dużej liczby genów miRNA w punktach złamań chromosomów, sekwencjach deletowanych lub amplifikowanych, co podczas transformacji nowotworowej powoduje implikacje funkcjonalne. Ich następstwem jest nadmiar lub brak obecności konkretnych miRNA w transformowanej komórce, a w związku z tym, upośledzony jest mechanizm kontroli prawidłowej ekspresji wielu genów. Gdy miRNA w prawidłowej komórce oddziałuje hamująco na pewien onkogen, to w przypadku delekcji genu miRNA, dany onkogen ulegnie nadekspresji. Przeciwnie, amplifikacja genu miRNA regulującego supresor nowotworu, spowoduje blokadę jego ekspresji i promocję kancerogenezy.

Ponadto, aktywacja/inaktywacja miRNA podlega regulacji przez czynniki transkrypcyjne lub mechanizmy

epigenetyczne (metylacja promotora genu miRNA, acetylacja histonów). Opisano również mutacje w sekwencjach miRNA oraz sekwencjach 3' regionów UTR genów docelowych rozpoznawanych przez miRNA. W obydwu przypadkach swoistość rozpoznania miRNA-mRNA zostaje zmieniona: miRNA „nabywa” zdolność rozpoznawania nowego mRNA bądź dany gen docelowy wymyka się spod negatywnej kontroli miRNA [70]. Zatem niektóre miRNA mogą działać onkosupresorowo, a inne onkogenicznie, stymulując rozwój nowotworów [19]

Zaburzona ekspresja konkretnych sekwencji lub rodzin miRNA ma poważne konsekwencje w postaci nieprawidłowej regulacji aktywności podstawowych komponentów najważniejszych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworu (ryc. 2). Podwójna, onkogeniczna lub supresorowa, aktywność miRNA w kancerogenezie wydaje się mieć znaczący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie, w tym IKT EGFR w raku płuca. Nieprawidłowa regulacja ekspresji genów przez miRNA prowadzi do uruchomienia alternatywnych (obocznych) ścieżek sygnałowych lub aktywacji kolejnych mediatorów sygnału, omijając szlak zablokowany przez inhibitor IKT EGFR. Sprzężenie zwrotne między poziomem miRNA, a aktywnością pewnych genów docelowych (rozpoznawanych przez dane miRNA), w tym onkogenów i supresorów nowotworu, powoduje dynamiczne zmiany ekspresji miRNA, których pomiar umożliwiłby ocenę statusu aktywności genetycznej komórek. Identyfikacja profilu miRNA zaangażowanych w mechanizmy odpowiedzi komórkowej na IKT EGFR może stworzyć nowy kierunek badań nad opracowaniem bardziej skutecznej terapii personalizowanej dla chorych na NDRP, jak również w znaczący sposób zwiększyć efektywność monitorowania przebiegu choroby jak i samego leczenia.

UDZIAŁ miRNA W MECHANIZMACH WRAŻLIWOŚCI I OPORNOŚCI KOMÓREK NDRP NA IKT EGFR

Dostępne piśmiennictwo dotyczące roli miRNA w mechanizmach wrażliwości i oporności komórek NDRP na inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR jest bardzo skąpe i zazwyczaj ograniczone do badań *in vitro* na modelach linii komórkowych. Weiss i wsp. wysunęli hipotezę, że obniżona ekspresja lub utrata miRNA regulujących ekspresję genu *EGFR* może zwiększać wytwarzanie białka EGFR stanowiącego cel molekularny inhibitorów kinazy tyrozynowej [77]. Autorzy typowali miRNA o wysokiej homologii sekwencji do fragmentu 3'UTR genu *EGFR*, których *loci* znajdowały się w regionach chromosomów szczególnie podatnych na delecje w komórkach raka płuca. Po przeanalizowaniu danych wyselekcjonowano miR-128b, którego gen kodujący jest umiejscowiony na chromosomie 3p. Delecję chromosomu 3p wykrywa się w 96% przypadków raka płuca oraz 78% próbek stanu przednowotworowego w nabłonku płuc. Utrata heterozygotyczności (delecja jednego z alleli lub rearanżacja w regionie 3p22 chromosomu) miR-128b korelowała z lepszą odpowiedzią na gefitynib u chorych leczonych IKT EGFR.

W innych badaniach, wywołanie nadekspresji trzech supresorowych miRNA (miR-126, miR-145, let-7) w liniach komórkowych raka płuca (H460, A549) z natywną postacią genu *EGFR* oraz zmutowanym genem *KRAS*, pozwoliło przełamać ich pierwotną oporność na gefitynib [86]. Zwłaszcza nadekspresja miR-126 zwiększyła aż 6-krotnie wrażliwość komórek linii H460 na cytotoksyczne działanie gefitynibu.

Natomiast Wang i wsp. zaobserwowali, że nabycie w warunkach *in vitro* oporności na gefitynib przez pierwotnie wrażliwe komórki NDRP typu gruczolowego linii HCC827 (zawierające aktywującą mutację *EGFR* w eksonie 19) było związane ze znaczącym wzrostem ekspresji miR-214 [75]. Knock-out miR-214 w komórkach opornych na gefitynib spowodował aktywację ścieżki sygnałowej P13K/Akt zależnej od PTEN/AKT i przywrócenie ich lekowrażliwości.

Dotąd zidentyfikowano co najmniej kilkadziesiąt różnych miRNA, które wykazują homologię do 3'UTR genu *EGFR* (baza: <http://www.targetscan.org/>). Dlatego słusznym rozwiązaniem w poszukiwaniu nowych epigenetycznych biomarkerów, przydatnych w ocenie skuteczności leczenia IKT EGFR wydaje się kompleksowe typowanie wielu miRNA jednocześnie w co najmniej kilku liniach komórkowych pierwotnego nowotworu płuca, o zróżnicowanej charakterystyce zaburzeń genetycznych szlaku sygnałowego EGFR, z użyciem metod wysokoprzepustowych. Taką hipotezę jako pierwsi zasugerowali Bryant i wsp. [9]. Autorzy wytypowali sygnaturę 13 miRNA prezentującą potencjalną wartość predykcyjną dla odpowiedzi na leczenie erlotynibem w liniach komórek raka płuca, zróżnicowanych pod względem statusu mutacji *EGFR*. Analiza bioinformatyczna potencjalnych genów docelowych badanych 13 miRNA ujawniła znaczącą liczbę czynników zaangażowanych w przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT). Ograniczeniem pracy jest jednak technika mikromacierzowa użyta do typowania sygnatury miRNA, wymagająca każdorazowo endogennych kontroli do normalizacji danych, a przez to bardziej podatna na błędy interpretacyjne [34].

Webster i wsp. w badaniach *in vitro* linii raka płuca A549 zaobserwowali, że miR-7 jest zdolne do zablokowania ekspresji genów *Raf1* i *EGFR* przez degradację ich mRNA [76]. Transfekcja komórek nowotworowych prekursorowym miR-7 (pre-miR-7) powodowała znaczące zmniejszenie ich żywotności i liczebności. Spadek żywotności komórek linii A549 następował przez hamowanie ekspresji genu *EGFR* i indukcję innych szlaków sygnałowych, promujących śmierć komórki.

Garofalo i wsp. wykazali, że ekspresja swoistych sekwencji miRNA kontrolowana przez geny *EGFR* i *MET*, jak miR-30b/c czy miR-221/222, może regulować oporność komórek nowotworowych na gefitynib [24]. Porównując ekspresję poszczególnych miRNA w komórkach niewrażliwych linii NDRP (Calu-1 i A549) oraz w komórkach z delecją w eksonie 19 genu *EGFR* (PC-9 i HCC827), wrażliwość

liwych na gefitynib obserwowali zmniejszenie ekspresji miR-30b/c i miR-221/222. Po indukcji nadekspresji tych miRNA, zmniejszała się wrażliwość komórek linii PC-9 i HCC827 na stosowany lek, co jednoznacznie potwierdza ich istotną rolę w mechanizmie oporności na IKT EGFR.

Niska/zahamowana ekspresja genu *PTEN* warunkująca oporność na IKT EGFR podlega regulacji przez miR-21. Nadekspresja miR-21 indukowana w warunkach *in vitro* znacząco zwiększała oporność linii komórkowej PC-9 na gefitynib przez obniżenie ekspresji *PTEN*, ale także stymulowała aktywację szlaku sygnalizacyjnego zależnego od Akt i ERK [64]. Natomiast knock-down miR-21 w linii niewrażliwej na IKT EGFR wywoływał proces odwrotny. U chorych na NDRP leczonych IKT wysoka ekspresja miR-21 korelowała z krótszym czasem wolnym od progresji choroby. Wyższa ekspresja tego miRNA i obniżona genu *PTEN* wskazywała na słabszą odpowiedź na terapię IKT EGFR oraz krótszy całkowity czas przeżycia.

Innym miRNA zaangażowanym w mechanizm oporności na IKT EGFR jest miR-147 [42]. Poziom jego ekspresji jest znacząco obniżony zarówno w próbkach surowicy, jak i tkanek guza pobranych od chorych na NDRP [17]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano zdolność miR-147 do kontroli procesu przejścia mezenchymalno-epitelialnego komórek linii A549 i przywrócenia ich wrażliwości na IKT EGFR w komórkach nowotworowych pierwotnie opornych na ten typ terapii [42]. Indukcja nadekspresji miR-147 w komórkach NDRP zmniejszała oporność na gefitynib. W innych badaniach indukowana nadekspresja miR-130a powodowała hamowanie proliferacji komórek NDRP i ich zwiększoną apoptozę po zastosowaniu gefitynibu, natomiast obniżenie ekspresji miR-130a wywoływało proces odwrotny [87].

Cząsteczki miRNA odgrywają istotną rolę we wspomnianym już procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego, będącym jednym z mechanizmów nabytej oporności na IKT EGFR [84]. W procesie EMT komórki nabłonkowe przerywają połączenia międzykomórkowe i tracą właściwości adhezyjne, nabywając większej ruchliwości i zdolności do migracji. EMT komórek nowotworowych sprzyja progresji choroby i tworzeniu odległych przerzutów w organizmie. Rodzina miR-200 oraz miR-205 odpowiada za regulację ekspresji czynników transkrypcyjnych ZEB1 i ZEB2, głównych w EMT i procesie metastazy. Badania wskazują, że rodzina miR-200 kontroluje ekspresję ZEB1/2, lecz transkrypcja tych miRNA jest zwrotnie regulowana przez czynniki ZEB1/2. Ten wzajemny wpływ zapewnia ścisłą kontrolę procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego i zaburzenie równowagi między oddziałującymi ZEB1/2, a cząsteczkami z rodziny miR-200 powoduje nabycie zdolności do inwazji i przerzutowania przez komórkę nowotworową [42].

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA BIOMARKERÓW miRNA W LECZENIU IKT EGFR

Liczne badania potwierdzają potencjalną użyteczność poszczególnych sekwencji miRNA jako biomarkerów

nowotworowych ze względu na ich dużą stabilność zarówno w utrwalonych preparatach tkanki nowotworowej (zwłaszcza w postaci blozków parafinowych), jak i płynach ustrojowych. Zaletą potencjalnego wykorzystania miRNA w diagnostyce onkologicznej jest możliwość ich analizy ilościowej i jakościowej z użyciem real-time PCR, jako powszechnie dostępnej techniki laboratoryjnej oraz zwalidowanych, dostępnych komercyjnie zestawów odczynnikowych. Wobec ścisłego powiązania między szlakiem sygnałowym EGFR i ekspresją pewnych miRNA, wysunięto hipotezę, że cząsteczki te mogłyby być pomocne podczas selekcji chorych na NDRP do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR. Zaproponowano m.in. miR-10b i miR-21 jako potencjalne biomarkery miRNA, których profil ekspresji wiąże się z obecnością mutacji w genie *EGFR* [65]. Analizie poddano próbki osocza pobrane od chorych na NDRP po resekcji guza (60 chorych z mutacją *EGFR*, 68 chorych bez mutacji oraz 32 zdrowych osób jako grupa kontrolna). Zarówno ekspresja miR-10b, jak i miR-21 była znacznie wyższa ($p < 0,001$) u chorych na NDRP, u których występowała mutacja w genie *EGFR* w porównaniu do chorych bez mutacji.

Ekspresja panelu 5 pozakomórkowych sekwencji miRNA (miR-21, miR-122, miR-195, miR-125b, miR-25) również korelowała ze statusem mutacji w genie *EGFR* u chorych na NDRP [85]. Potwierdzono to w badaniach *in vitro* na kilku liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca o różnym stopniu wrażliwości na gefitynib, dokonując selekcji panelu miRNA metodą mikromacierzową. Następnie ekspresję wyselekcjonowanych miRNA sprawdzono w 150 próbkach tkanki nowotworowej i osocza od chorych na NDRP. Panel 5 miRNA korelował z obecnością mutacji *EGFR* z czułością i swoistością około 87%.

Zhang i wsp. [83] obserwowali niższy poziom ekspresji miR-195 i miR-122 u chorych na NDRP z potwierdzoną obecnością mutacji aktywujących w genie *EGFR* w stosunku do chorych bez mutacji. Badania przeprowadzono na próbkach osocza pobranych od 105 niepalących kobiet, chorujących na NDRP typu gruczolowego. Poziom ekspresji obu tych sekwencji miRNA był istotnie związany z obecnością mutacji w genie *EGFR* u chorych z gruczolakorakiem płuca, zwłaszcza u pacjentek z zaawansowaną postacią NDRP. Obniżony poziom ekspresji miR-122 i miR-195 w osoczu korelował także z dłuższym czasem całkowitego przeżycia u pacjentek w zaawansowanym stadium choroby.

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na liniach komórkowych NDRP wykazano, że poziom poszczególnych miRNA: miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-203, miR-3182, miR-934 i miR-3196 wiąże się z obecnością mutacji w genie *EGFR* [38]. W dalszej części doświadczeń przeprowadzono analizę trzech wybranych sekwencji miRNA (miR-200c, miR-203 i miR-3196) w próbkach surowicy pobranych od niepalących kobiet chorujących na NDRP, u których wykryto mutację aktywującą w genie *EGFR* w porównaniu do chorych bez mutacji. Obniżony

poziom ekspresji miR-3196 w surowicy korelował dodatnio z obecnością delekcji w eksonie 19 genu *EGFR*.

Gasparini i wsp. [25] badali profile ekspresji miRNA w preparatach tkanki nowotworowej od 67 chorych na NDRP, które różniły się statusem mutacji kilku onkogenów: genu kinazy chłoniaka anaplastycznego (*ALK*), *EGFR* i *KRAS*, w odniesieniu do 18 kontrolnych materiałów prawidłowej tkanki płuca. Analiza statystyczna danych metodą taksonomiczną (hierarchical clustering) pozwoliła wyodrębnić unikalne sygnatury ekspresji miRNA dla materiałów różniących się statusem rearanzacji genu *ALK* (rearanzacja genu *versus* typ natywny) oraz statusem mutacji genów *EGFR* i *KRAS* (mutacja genu *versus* typ natywny). Wysoki poziom ekspresji miR-504 korelował dodatnio z obecnością mutacji w genie *EGFR* ($p=0,04$). Sugeruje to możliwość wykorzystania cząsteczek miRNA jako nowych biomarkerów, które mogłyby uzupełnić metody molekularne, stosowane obecnie w diagnostyce onkologicznej.

Należy podkreślić, że żadna z omawianych wyżej prace nie ma jeszcze charakteru aplikacyjnego, a jej wyniki nie mogą być wdrożone w praktyce klinicznej. Wskazana jest walidacja wytypowanych sygnatur miRNA w warunkach *ex vivo*, zarówno w oparciu o nowotworowy materiał tkankowy, jak i krew obwodową (płynną biopsję) od dużej liczby chorych na NDRP ze zróżnicowanym statusem mutacji genu *EGFR* w celu jednoznacznej weryfikacji powyższych danych.

PODSUMOWANIE

W ciągu kilkunastu lat, które upłynęły od odkrycia miRNA, wiele badań poświęcono możliwości ich wykorzystania jako biomarkerów przydatnych w diagnozo-

waniu i leczeniu NDRP. Ze względu na zaangażowanie miRNA w procesy kancerogenezy na wszystkich jej etapach, cząsteczki te mogłyby służyć nie tylko jako swoiste indykatory choroby nowotworowej płuca (biomarkery diagnostyczne), ale również jako dynamiczne wskaźniki statusu tkanki guza przed (biomarkery prognostyczne) i w trakcie leczenia (biomarkery predykcyjne). Szczególną przydatność kliniczną przedstawiają pozakomórkowe miRNA, wydzielane w stabilnej postaci przez komórki nowotworu do krwi i innych płynów ustrojowych już we wczesnych stadiach rozwoju raka płuca. Ich podstawową zaletą jest łatwość śledzenia zmian ilościowych i jakościowych na każdym etapie choroby, bez narażania pacjentów na inwazyjne pobieranie materiału do badań. Obecnie duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząsteczek miRNA jako biomarkerów w prognozowaniu skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie, zwłaszcza opartego o IKT *EGFR*.

Ogromny postęp technologiczny, jaki dokonał się w czasie ostatniej dekady w metodologii wykrywania i identyfikacji miRNA, zwłaszcza technikami wysoko przepustowymi jak sekwencjonowanie nowej generacji, rozpoczęła nową erę badań translacyjnych, umożliwiając obiektywną analizę już nie pojedynczych, lecz wielu miRNA jednocześnie tworzących epigenetyczny profiraka płuca. Nie mniejsze znaczenie ma rozwój narzędzi bioinformatycznych, potrzebnych do analizy ogromnej liczby surowych danych, klasyfikacji rodzin miRNA oraz przewidywania ich potencjalnych genów docelowych. Wydaje się oczywiste, że wszelkie eksperymenty mające na celu zrozumienie patomechanizmów choroby nowotworowej przybliżają nas do przełożenia wyników badań laboratoryjnych na praktykę kliniczną.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ardekani A.M., Naeini M.M.: The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, 2010; 2: 161-179
- [2] Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P.: The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008; 455: 64-71
- [3] Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D.: Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol. Life Sci.*, 2012; 69: 3613-3634
- [4] Bartel D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281-297
- [5] Bartel D.P.: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009; 136: 215-233
- [6] Basyuk E., Suavet F., Doglio A., Bordonné R., Bertrand E.: Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 6593-6597
- [7] Berezikov E., Guryev V., van de Belt J., Wienholds E., Plasterk R.H., Cuppen E.: Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2005; 120: 21-24
- [8] Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D.: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 2004; 10: 185-191
- [9] Bryant J.L., Britson J., Balko J.M., Willian M., Timmons R., Frolov A., Black E.P.: A microRNA gene expression signature predicts response to erlotinib in epithelial cancer cell lines and targets EMT. *Br. J. Cancer*, 2012; 106: 148-156
- [10] Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R.: Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004; 10: 1957-1966
- [11] Chang S., Johnston R.J., Jr., Frokjaer-Jensen C., Lockery S., Hobert O.: MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature*, 2004; 430: 785-789
- [12] Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J. i wsp.: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 2008; 18: 997-1006
- [13] Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechcinski A.: Molekularne markery prognostyczne i predykcyjne w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkol. Info.*, 2011; 8: 160-167
- [14] Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechcinski A.: Markery molekularne we wczesnej diagnostyce raka płuca - fakty i nadzieje. *Onkol. Info.*, 2011; 8: 152-159
- [15] Chorostowska-Wynimko J., Szpechcinski A.: The impact of gene-

tic markers on the diagnosis of lung cancer: a current perspective. *J. Thorac. Oncol.*, 2007; 2: 1044-1051

[16] Chou C.H., Chang N.W., Shrestha S., Hsu S.D., Lin Y.L., Lee W.H., Yang C.D., Hong H.C., Wei T.Y., Tu S.J., Tsai T.R., Ho S.Y., Jian T.Y., Wu H.Y., Chen P.R. i wsp.: miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.*, 2016; 44: D239-D247

[17] Chu G., Zhang J., Chen X.: Serum level of microRNA-147 as diagnostic biomarker in human non-small cell lung cancer. *J. Drug Target*, 2016; 24: 613-617

[18] Cogswell J.P., Ward J., Taylor I.A., Waters M., Shi Y., Cannon B., Kelnar K., Kempainen J., Brown D., Chen C., Prinjha R.K., Richardson J.C., Saunders A.M., Roses A.D., Richards C.A.: Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.*, 2008; 14: 27-41

[19] Croce C.M.: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 704-714

[20] Cullen B.R.: Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004; 16: 861-865

[21] de la Chapelle A., Jazdzewski K.: MicroRNAs in thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011; 96: 3326-3336

[22] Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J.: Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 2004; 432: 231-235

[23] Esposito A., Criscitello C., Locatelli M., Milano M., Curigliano G.: Liquid biopsies for solid tumors: Understanding tumor heterogeneity and real time monitoring of early resistance to targeted therapies. *Pharmacol. Ther.*, 2016; 157: 120-124

[24] Garofalo M., Romano G., Di Leva G., Nuovo G., Jeon Y.J., Ngankou A., Sun J., Lovat F., Alder H., Condorelli G., Engelman J.A., Ono M., Rho J.K., Cascione L., Volinia S., Nephew K.P., Croce C.M.: EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat. Med.*, 2011; 18: 74-82

[25] Gasparini P., Cascione L., Landi L., Carasi S., Lovat F., Tibaldi C., Ali G., D'Incecco A., Minuti G., Chella A., Fontanini G., Fassan M., Cappuzzo F., Croce C.M.: microRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015; 112: 14924-14929

[26] Gilad S., Meiri E., Yogev Y., Benjamin S., Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholak H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., Chajut A.: Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008; 3: e3148

[27] Giovannetti E., Erozcenci A., Smit J., Danesi R., Peters G.J.: Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2012; 81: 103-122

[28] Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R.: The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004; 432: 235-240

[29] Haaland B., Tan P.S., de Castro G.Jr., Lopes G.: Meta-analysis of first-line therapies in advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR-activating mutations. *J. Thorac. Oncol.*, 2014; 9: 805-811

[30] Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A.C., Kausch I., Jocham D., Warnecke J.M., Szczakiel G.: A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2010; 28: 655-661

[31] Hanson E.K., Lubenow H., Ballantyne J.: Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal. Biochem.*, 2009; 387: 303-314

[32] Hayes J., Peruzzi P.P., Lawler S.: MicroRNAs in cancer: biomar-

kers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.*, 2014; 20: 460-469

[33] Hu Z., Chen J., Tian T., Zhou X., Gu H., Xu L., Zeng Y., Miao R., Jin G., Ma H., Chen Y., Shen H.: Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 2600-2608

[34] Hurd P.J., Nelson C.J.: Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 2009; 8: 174-183

[35] Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Bálint E., Tuschl T., Zamore P.D.: A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001; 293: 834-838

[36] Isik M., Korswagen H.C., Berezikov E.: Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence*, 2010; 1: 5

[37] Jänne P.A.: Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours. *Lung Cancer*, 2008; 60: S3-S9

[38] Ju L., Han M., Zhao C., Li X.: Genome-wide analysis of microRNA signature in lung adenocarcinoma with EGFR exon 19 deletion. *BioRxiv* 2016 <https://www.biorxiv.org/content/early/2016/04/04/032367> (19.11.2017)

[39] Kawaguchi T., Matsumura A., Fukai S., Tamura A., Saito R., Zell J.A., Maruyama Y., Ziogas A., Kawahara M., Ignatius O.S.H.: Japanese ethnicity compared with Caucasian ethnicity and never-smoking status are independent favorable prognostic factors for overall survival in non-small cell lung cancer: a collaborative epidemiologic study of the National Hospital Organization Study Group for Lung Cancer (NHSGLC) in Japan and a Southern California Regional Cancer Registry databases. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 1001-1010

[40] Ketting R.F., Fischer S.E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H.: Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, 2001; 15: 2654-2659

[41] Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T.: microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010; 1: 7

[42] Lee C.G., McCarthy S., Gruidl M., Timme C., Yeatman T.J.: MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance. *PLoS One*, 2014; 9: e84597

[43] Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003; 425: 415-419

[44] Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N.: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.*, 2002; 21: 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; 23: 4051-4060

[46] Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W., Kim K., He Z., Sontheimer E.J., Carthew R.W.: Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004; 117: 69-81

[47] Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B., Bartel D.P.: Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003; 299: 1540

[48] Lin L., Bivona T.G.: Mechanisms of resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors and novel therapeutic strategies to overcome resistance in NSCLC patients. *Chemother. Res. Pract.*, 2012; 2012: 817297

[49] Liu C., Zhang F., Li T., Lu M., Wang L., Yue W., Zhang D.: MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics*, 2012; 13: 661

[50] Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005; 435: 834-838

- [51] Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., Haber D.A.: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 2129-2139
- [52] 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. i wsp.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 10513-10518
- [53] Moldovan L., Batte K.E., Trgovcich J., Wisler J., Marsh C.B., Piper M.: Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell Mol. Med.*, 2014; 18: 371-390
- [54] Okamura K., Liu N., Lai E.C.: Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila Argonautes*. *Mol. Cell.*, 2009; 36: 431-444
- [55] Park K., Tan E.H., O'Byrne K., Zhang L., Boyer M., Mok T., Hirsh V., Yang J.C., Lee K.H., Lu S., Shi Y., Kim S.W., Laskin J., Kim D.W., Arvis C.D. i wsp.: Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.*, 2016; 17: 577-589
- [56] Park N.J., Zhou H., Elashoff D., Henson B.S., Kastratovic D.A., Abemayor E., Wong D.T.: Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 5473-5477
- [57] Pfaff J., Meister G.: Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013; 41: 855-860
- [58] Pichon X., Wilson L.A., Stoneley M., Bastide A., King H.A., Somers J., Willis A.E.: RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012; 13: 294-304
- [59] Place R.F., Li L.C., Pookot D., Noonan E.J., Dahiya R.: MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 1608-1613
- [60] Rosell R., Moran T., Queralt C., Porta R., Cardenal F., Camps C., Majem M., Lopez-Vivanco G., Isla D., Provencio M., Insa A., Massuti B., Gonzalez-Larriba J.L., Paz-Ares L., Bover I. i wsp.: Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 958-967
- [61] 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
- [62] Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K.: Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2014; 11: 145-156
- [63] Sharma S.V., Bell D.W., Settleman J., Haber D.A.: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7: 169-181
- [64] Shen H., Zhu F., Liu J., Xu T., Pei D., Wang R., Qian Y., Li Q., Wang L., Shi Z., Zheng J., Chen Q., Jiang B., Shu Y.: Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e103305
- [65] Shen Y., Tang D., Yao R., Wang M., Wang Y., Yao Y., Li X., Zhang H.: microRNA expression profiles associated with survival, disease progression, and response to gefitinib in completely resected non-small-cell lung cancer with EGFR mutation. *Med. Oncol.*, 2013; 30: 750
- [66] Shigematsu H., Lin L., Takahashi T., Nomura M., Suzuki M., Wistuba I.I., Fong K.M., Lee H., Toyooka S., Shimizu N., Fujisawa T., Feng Z., Roth J.A., Herz J., Minna J.D., Gazdar A.F.: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005; 97: 339-346
- [67] Shomron N., Levy C.: MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009; 2009: 594678
- [68] Siegel R., Naishadham D., Jemal A.: Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J. Clin.*, 2013; 63: 11-30
- [69] Skronski M., Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J.: Współczesne metody wykrywania mutacji genu EGFR jako czynnika predykcynego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca - czy istnieje „złoty standard” diagnostyczny? *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2014; 82: 311-322
- [70] Szaumkessel M., Szyfter K.: mikro RNA w patogenezie płaskonabłonkowych raków głowy i szyi. *Biotechnologia*, 2010; 3: 64-74
- [71] Tian T., Shu Y., Chen J., Hu Z., Xu L., Jin G., Liang J., Liu P., Zhou X., Miao R., Ma H., Chen Y., Shen H.: A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009; 18: 1183-1187
- [72] Tiberio P., Callari M., Angeloni V., Daidone M.G., Appierto V.: Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *BioMed Res. Int.*, 2015; 2015: 731479
- [73] Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B.: Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem. Sci.*, 2012; 37: 460-465
- [74] Uramoto H., Mitsudomi T.: Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer? *Br. J. Cancer*, 2007; 96: 857-863
- [75] Wang Y.S., Wang Y.H., Xia H.P., Zhou S.W., Schmid-Bindert G., Zhou C.C.: MicroRNA-214 regulates the acquired resistance to gefitinib via the PTEN/AKT pathway in EGFR-mutant cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012; 13: 255-260
- [76] Webster R.J., Giles K.M., Price K.J., Zhang P.M., Mattick J.S., Lederman P.J.: Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 5731-5741
- [77] Weiss G.J., Bemis L.T., Nakajima E., Sugita M., Birks D.K., Robinson W.A., Varela-Garcia M., Bunn P.A.Jr., Haney J., Helfrich B.A., Kato H., Hirsch F.R., Franklin W.A.: EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann. Oncol.*, 2008; 19: 1053-1059
- [78] Wojciechowska U., Didkowska J.: Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. *Krajowy Rejestr Nowotworów*, 2013
- [79] Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, 2003; 17: 3011-3016
- [80] Yuan Z., Zeng X., Yang D., Wang W., Liu Z.: Effects of common polymorphism rs11614913 in Hsa-miR-196a2 on lung cancer risk. *PLoS One*, 2013; 8: e61047
- [81] Zandberga E., Kozirovskis V., Abols A., Andrejeva D., Purkalne G., Line A.: Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013; 52: 356-369
- [82] Zeng Y., Cullen B.R.: Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003; 9: 112-23
- [83] Zhang H., Su Y., Xu F., Kong J., Yu H., Qian B.: Circulating microRNAs in relation to EGFR status and survival of lung adenocarcinoma in female non-smokers. *PLoS One*, 2013; 8: e81408
- [84] Zhang J., Ma L.: MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 2012; 31: 653-662
- [85] Zhao Q., Cao J., Wu Y.C., Liu X., Han J., Huang X.C., Jiang L.H., Hou X.X., Mao W.M., Ling Z.Q.: Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers. *Am. J. Cancer Res.*, 2015; 5: 1692-1705

[86] Zhong M., Ma X., Sun C., Chen L.: MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2010; 184: 431-438

[87] Zhou Y.M., Liu J., Sun W.: MiR-130a overcomes gefitinib resistance by targeting met in non-small cell lung cancer cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 1391-1396

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.