

Nové trendy ve výzkumu mikroRNA u solidních nádorů

Ondřej Slabý

Masarykův onkologický ústav

Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita



Moderní technologie, individualizace léčby a bioetika z pohledu Star Treku

Dr. McCoy
zvaný Bones
neboli kostra

Kapitán Kirk



Kapitán Kirk: Doktore, potřebuji urychleně vědět jestli tento Aleuviánský velvyslanec bude nebo nebude žít.

Dr. McCoy: Jimme, jsem jen prostý venkovský lékař, analýza celého genomu mi pár minut potrvá.

Dr. McCoy: OK, už je to tady. Můj počítačový program ukazuje v genomu pacienta cizorodou DNA sekvenci, která je podobná DNA Vulkánskou encefalitickou hořčicí. Pro Aleuviány je fatální.

TECHNOLOGIE

Kapitán Kirk: Sakra, Bonesi (*přezdívka dr. McCoye*). Tento muž musí žít nebo veškerá vyjednávání zkrachují.

Dr. McCoy: Analyzuji jeho DNA v naší databázi a srovnávám sekvenci jeho viru s dostupnými antivirovými léky, které by mu mohly pomoci, ale neodvažuji se mu ho podat. Nepodařilo se mi najít žádnou DNA se vykytují podivné sekvence. Neznám význam těchto a nemohu predikovat reakci na léčbu. TATO NUKLEOTIDOVÁ TERAPIE HO VYLÉCI NEBUDU. Pacient se musí rozhodnout sám.

INDIVIDUALIZACE LÉČBY

Kapitán Kirk: Proklatě Bonesi, vy jste mě přivedli do této války!

BIOETIKA

Dr. McCoy: Kapitáne, jsem lékař a jsem přísahu neublížít. Nebudu pokračovat bez souhlasu pacienta nebo dalších genomických vyšetření.

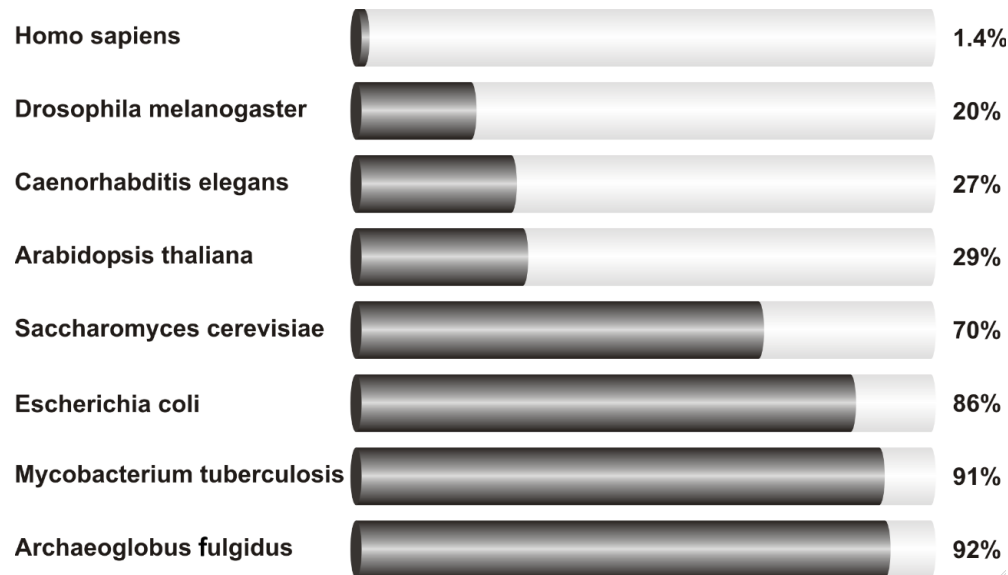
Svět nekódujících RNA

kódující geny představují méně než 2% celkové sekvence genomu

vs.

minimálně 90% lidského genomu je aktivně transkribováno

čím více je organizmus komplexní, tím více obsahuje nekódujících RNA





REVIEW

Open Access

Novel classes of non-coding RNAs and cancer

Jiri Sana^{1,2}, Petra Faltejskova^{1,2}, Marek Svoboda¹ and Ondrej Slaby^{1,2,3*}

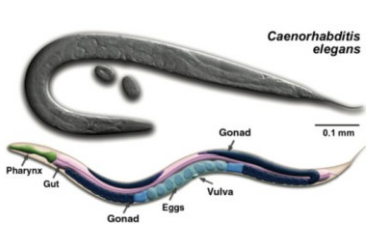
Nové třídy nekódujících RNA

Table 1: Types of recently discovered human non-coding RNAs.

	Class	Symbol	Characteristic	Disease / biological function associations
Small	MicroRNAs	miRNAs	18-25 nt; account 1-2% of the human genome; control the 50% of protein-coding genes; guide suppression of translation; Drosha and Dicer dependent small ncRNAs	Initiation of various disorders including many, if not all, cancers / regulation of proliferation, differentiation, and apoptosis; involved in human development
	all interfering RNAs	siRNAs	19-23 nt; made by Dicer processing; guide sequence specific degradation of target mRNA;	great potential in diseases treatment / posttranscriptional gene silencing mainly through RISC degradation mechanism; defence against pathogenic nucleic acids
	pi-interacting RNAs	piRNAs	26-30 nt; bind Piwi proteins; Dicer independent; exist in genome clusters; principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline	relationship between piRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in germ cell development, stem self-renewal, and retrotransposon silencing
	sall nucleolar RNAs	snoRNAs	60-300 nt; enriched in the nucleolus; in vertebrate are excised from pre-mRNA introns; bind snoRNP proteins	association with development of some cancers / important function in the maturation of other non-coding RNAs, above all, rRNAs and srRNAs; miRNA-like snoRNAs regulate mRNAs
	other-associated small RNAs	PASRs	20-200 nt; modified 5' (capped) ends; coincide with the transcriptional start sites of protein- and non-coding genes; made from transcription of short capped transcripts	relationship with diseases has not yet been discovered / involved in the regulation of the transcription of protein-coding genes by targeting epigenetic silencing complexes
	Transcription Initiation RNAs	tIRNAs	- 18 nt; have the highest density just downstream of transcriptional start sites; show patterns of positional conservation; preferentially located in GC-rich promoters	
	Centromere repeat associated small interfering RNAs	crasiRNAs	34-42 nt; processed from long dsRNAs;	relationship between crasiRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in the recruitment of heterochromatin and/or centromeric proteins
	Telomere-specific small RNAs	tel-sRNAs	- 24 nt; Dicer independent; 2'-O-methylated at the 3' terminus; evolutionarily conserved from protozoa to mammals; have not been described in human up to now	relationship between tel-sRNAs and diseases has not yet been discovered / epigenetic regulation
	Pylknons		subset of patterns of variable length; form mosaics in untranslated and protein-coding regions; more frequently in 3' UTR	expected association with cancer biology / possible link with posttranscriptional silencing of genes, mainly involved in cell communication, regulation of transcription, signaling, transport, etc.
	Long non-coding RNAs	Long intergenic noncoding RNAs	lincRNAs	ranging from several hundreds to tens of thousands nts; lie within the genomic intervals between two genes; transcriptional cis-regulation of neighbouring genes
Long intronic noncoding RNAs			lie within the introns; evolutionary conserved; tissue and subcellular expression specified	aberrantly expressed in human cancers / possible link with posttranscriptional gene silencing
Telomere-associated ncRNAs		TERRAs	100 bp - >9 kb; conserved among eukaryotes; synthesized from C-rich strand; polyadenylated; form intermolecular G-quadruplex structure with single-stranded telomeric DNA	possible impact on telomere-associated diseases including many cancers / neoplastic regulation of telomere length and activity through inhibition of telomerase
Long ncRNAs with dual functions			both protein-coding and functionally regulatory RNA capacity	deregulation has been described in breast and ovarian tumors / modulate gene expression through diverse mechanisms
Pseudogene RNAs			code for a protein; potential to regulate their protein-coding cousin; made through retrotrans-position; tissue specific	and cancer progression / regulation of tumor suppressors and oncogenes by acting as microRNA decoys
	Transcribed-ultraconserved regions	T-UCRs	longer than 200 bp; absolutely conserved between orthologous regions of human, rat, and mouse; located in both intra- and intergenic regions	expression is often altered in some cancers; possible involvement in tumorigenesis / antisense inhibitors for protein-coding genes or other ncRNAs

HISTORIE

1993 Ambros, Ruvkun – objev miRNA lin-4



Cell, 1993

1998 Fire, Mello – popis RNA interference

1999 Tuschl, Zamore, Bartel, Sharp
-RNAi 21-23 fragmenty



2006 Nobel Prize winners
Andrew Fire and Craig Mello for
their discovery of the RNAi
mechanism.

2000-2001 Hannon
-Ago2, Dicer

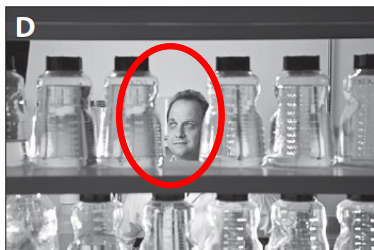
Nature, 1998

2002 Zamore

RNAi a miRNA sdílejí svoji efektorovou dráhu



2002 Croce, Calin miR-15, miR-16 u CLL
První práce popisující zapojené mikroRNA
do procesu maligní transformace!



George Calin (scientometrie z “mikroRNA let” 2003-2013)
H-index – 64 , celkový počet citací bez autocitací 22152

2007 První originální práce na téma miRNA v onkologii v ČR

Současnost



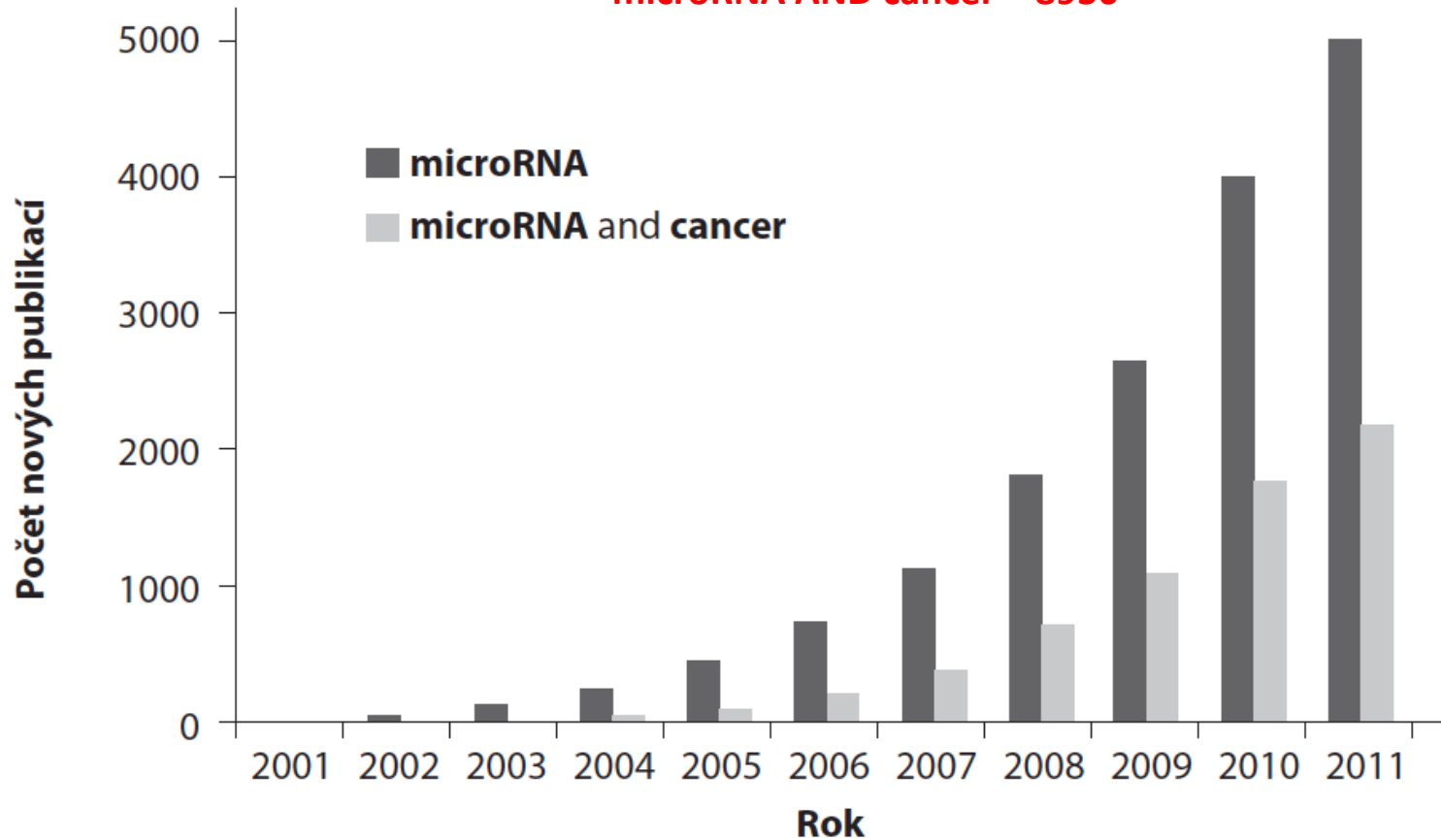
Victor Ambros
2012, CSHL

SOUČASNOST

23.4.2013, 07.05

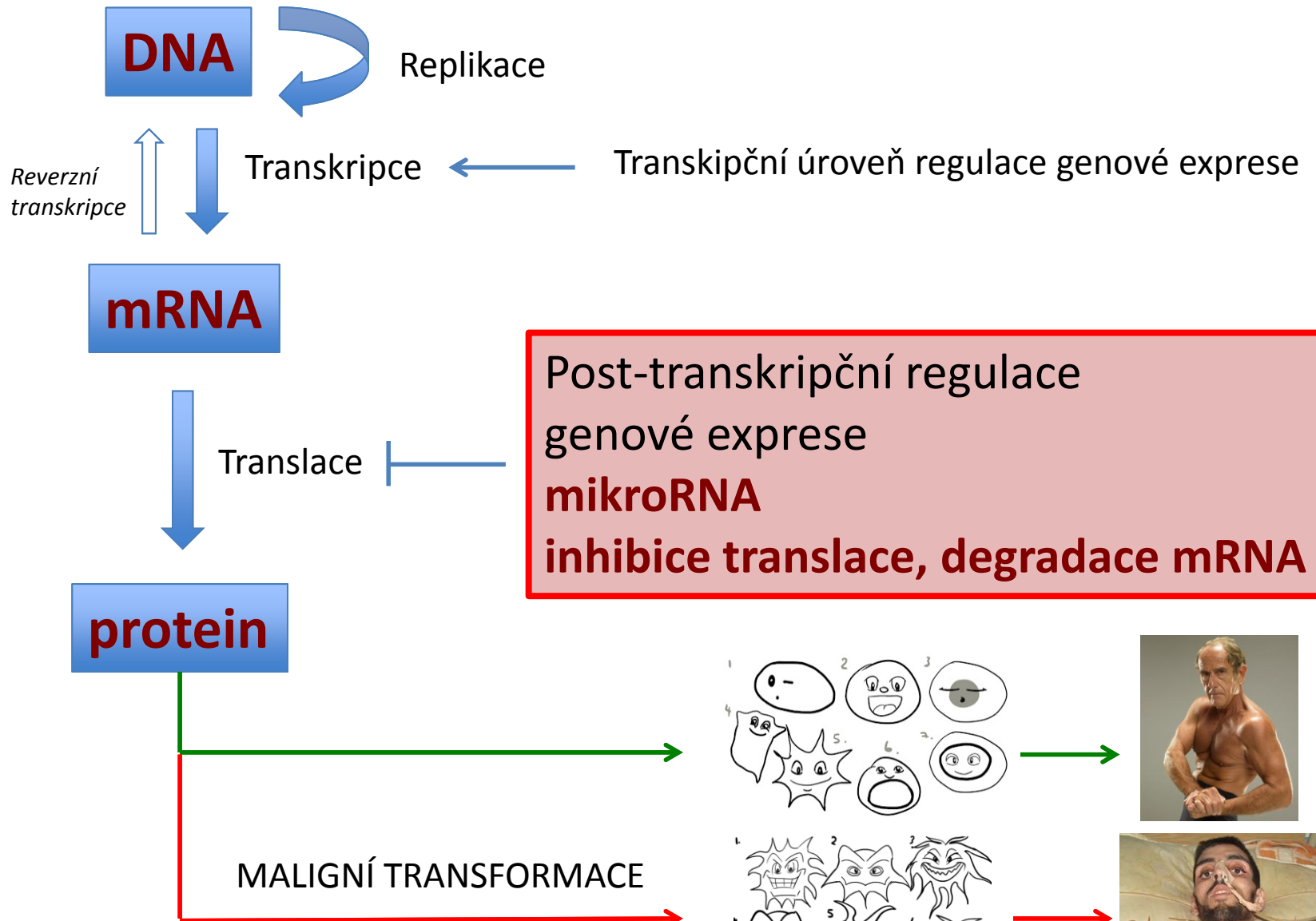
microRNA = 22113

microRNA AND cancer = 8950



Obr. 1.2. Počet nových publikací v databázi medicínských informací PubMed při zadání klíčového slova „microRNA“ nebo kombinace „microRNA“ a „cancer“.

Postavení mikroRNA v centrálním dogmatu molekulární biologie



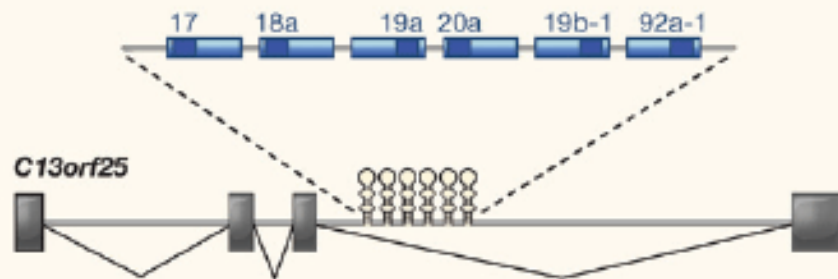
Základní fakta o mikroRNA

- Přibližně 3% predikovaných lidských genů jsou geny pro miRNA
- Jsou fylogeneticky vysoce konzervované
- Geny pro miRNA jsou rozmístěny na všech lidských chromozomech s výjimkou Y
- V databázi miRBase je anotováno 1390 mikroRNA* (1000 -2000 predikovaných)
- Maturovaná miRNA je dlouhá 20-25 nukleotidů
- MiRNA mají potenciál regulovat více než polovinu lidských kódujících genů
- Jedna miRNA může regulovat desítky až stovky cílových mRNA
- miRNA často tvoří rodiny nebo jsou kódovány v klastrech (eg. cluster miR-17)

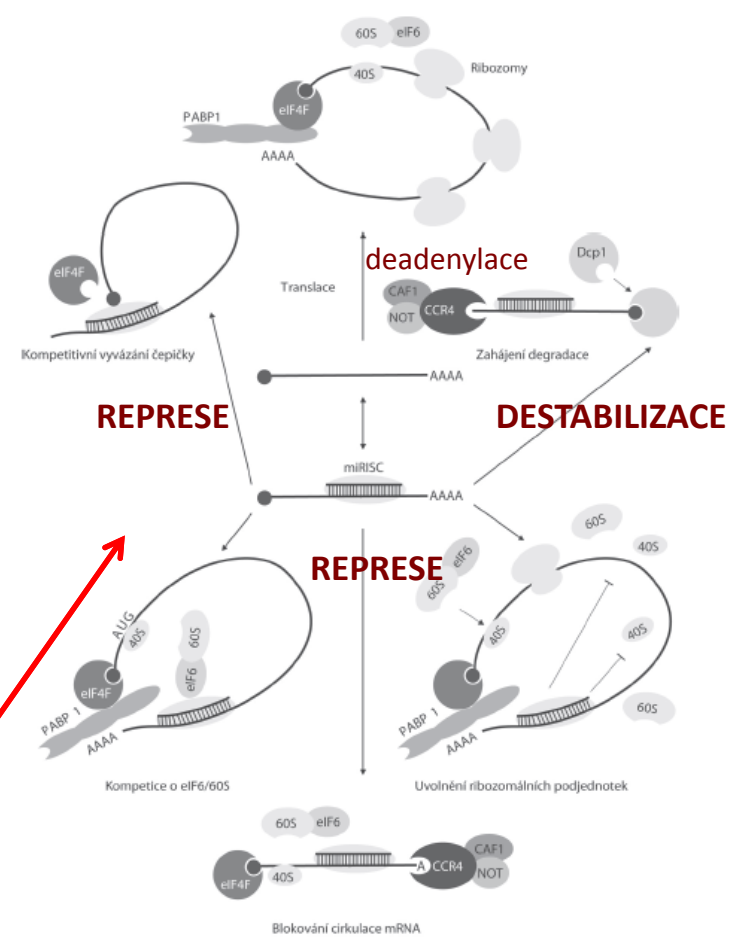
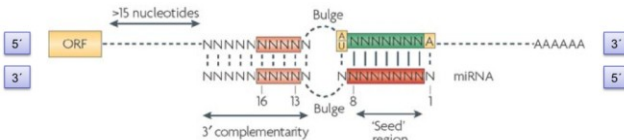
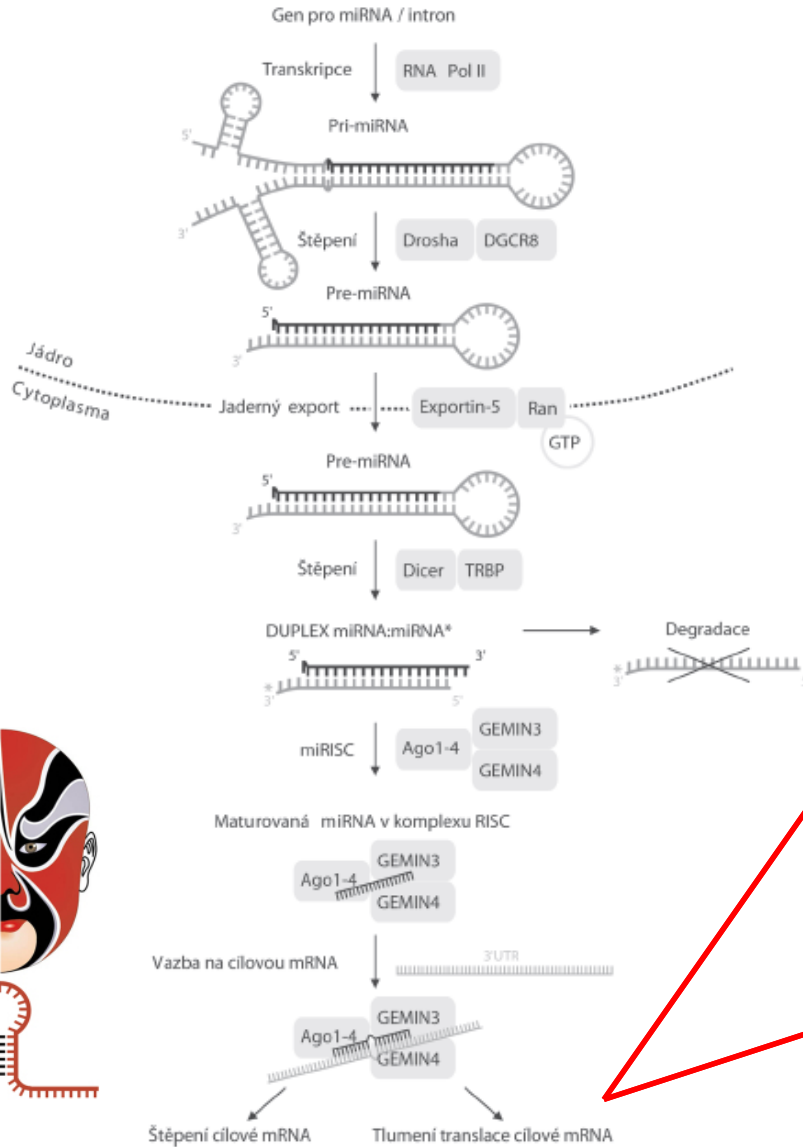
miRNA family members can be very similar eg let-7 family:

```
mmu-let-7a:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7b:  UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mmu-let-7c:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let-7d:  AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mmu-let-7e:  UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7f:  UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mmu-let-7g:  UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
mmu-let-7i:  UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU
```

miR-17-92
(13q31.3)



Kanonický model biogeneze a funkce mikroRNA



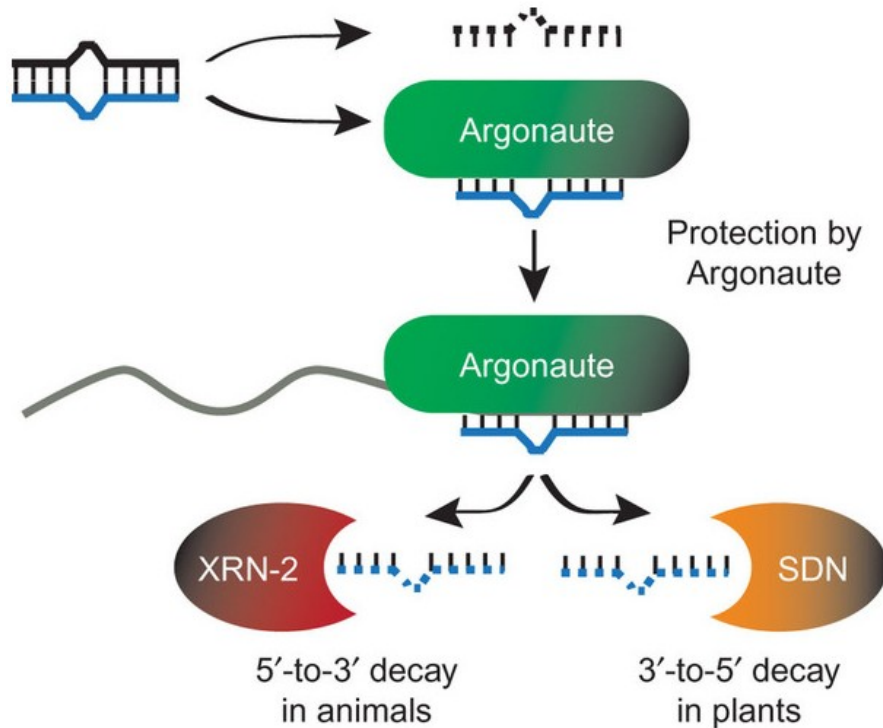
DESTABILIZACE mRNA!!!

Pokles hladiny proteinových produktů cílových genů je ve více než 80% způsoben poklesem hladin mRNA v důsledku jejich destabilizace a nikoliv translační represí. (využití RPF)

Biologický poločas a rozpad mikroRNA

MiRNA obecně představují vysoce stabilní molekuly, poločas miRNA v buněčných liniích nebo orgánech dosahuje mnoho hodin nebo dokonce i dnů!

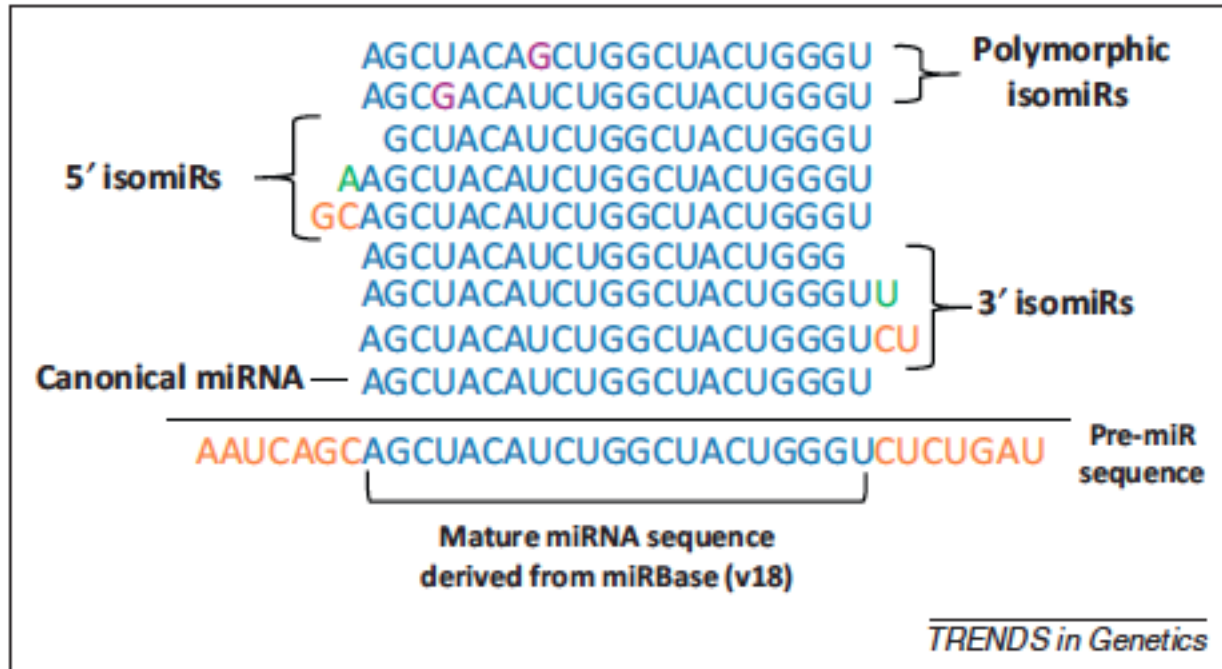
MiRNA mohou být regulované například blokováním jejich vazebných míst na mRNA pomocí RNA-vazebných proteinů. Volné miRNA jsou méně stabilní.



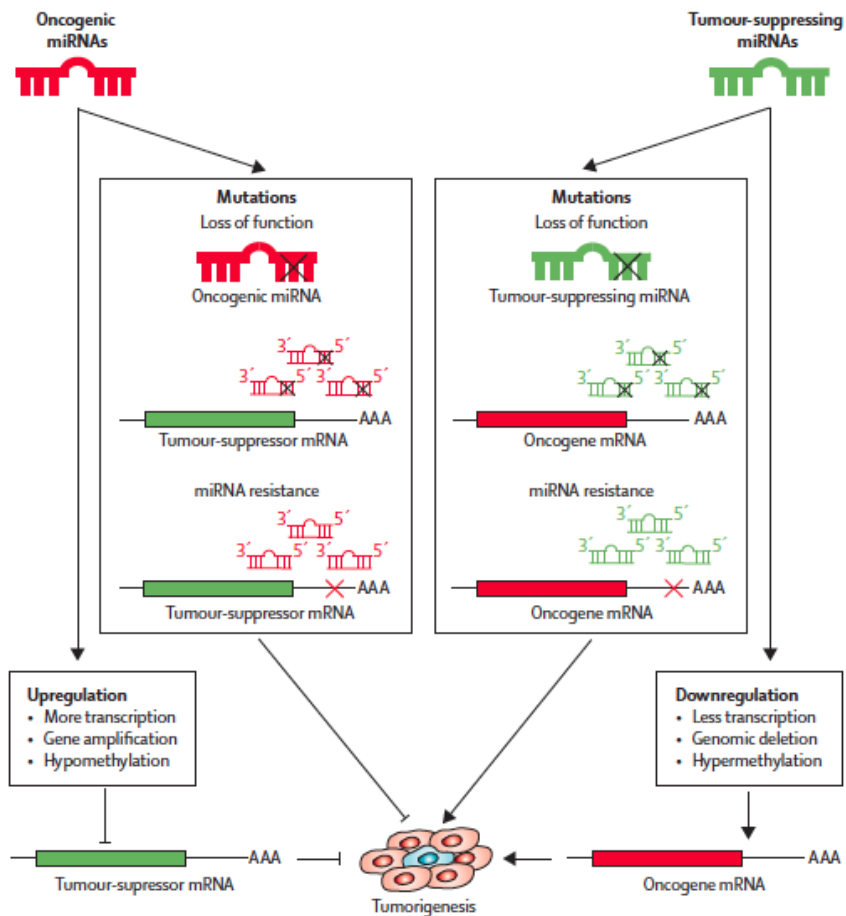
IzomiRs

- Poprvé popsány v roce 2008 na základě výsledků sekvenačních studií (Morin et al., 2008, Genome Res)
- Jedna oblast kódující miRNA může vést ke vzniku mnoha rozdílných izomiRs.
- Zastoupení jednotlivých izomiRs je tkáňově specifické a může se měnit v rámci odpovědi na různé biologické signály.
- Vznik 5' a 3' izomiRs je podmíněn štěpením Droshou a Dicerem nebo účinkem transferáz.
- Polymorfní izomiRs mohou vznikat v důsledku SNP (vzácné) nebo editací mikroRNA (A-I).

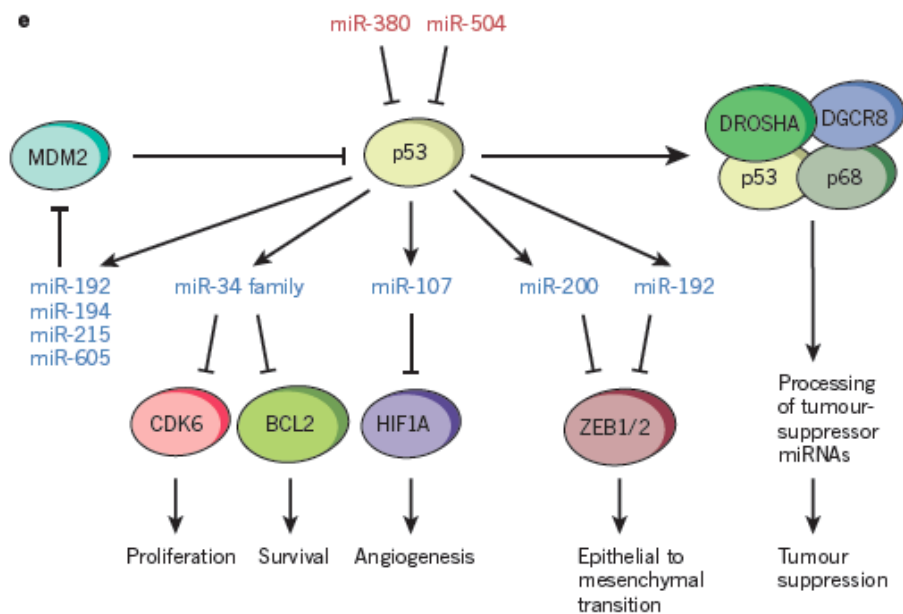
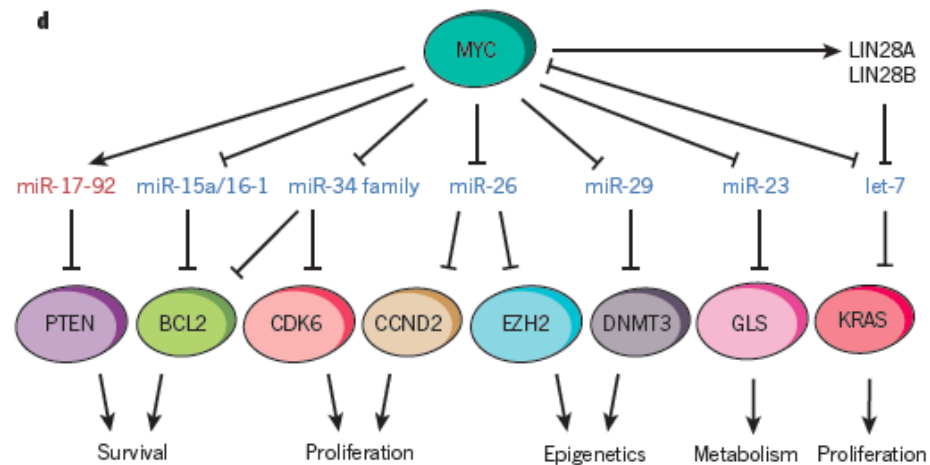
Funkční dopady: specificita pro cílové mRNA, Ago loading, biologický poločas



MikroRNA jako onkogeny nebo nádorové supresory

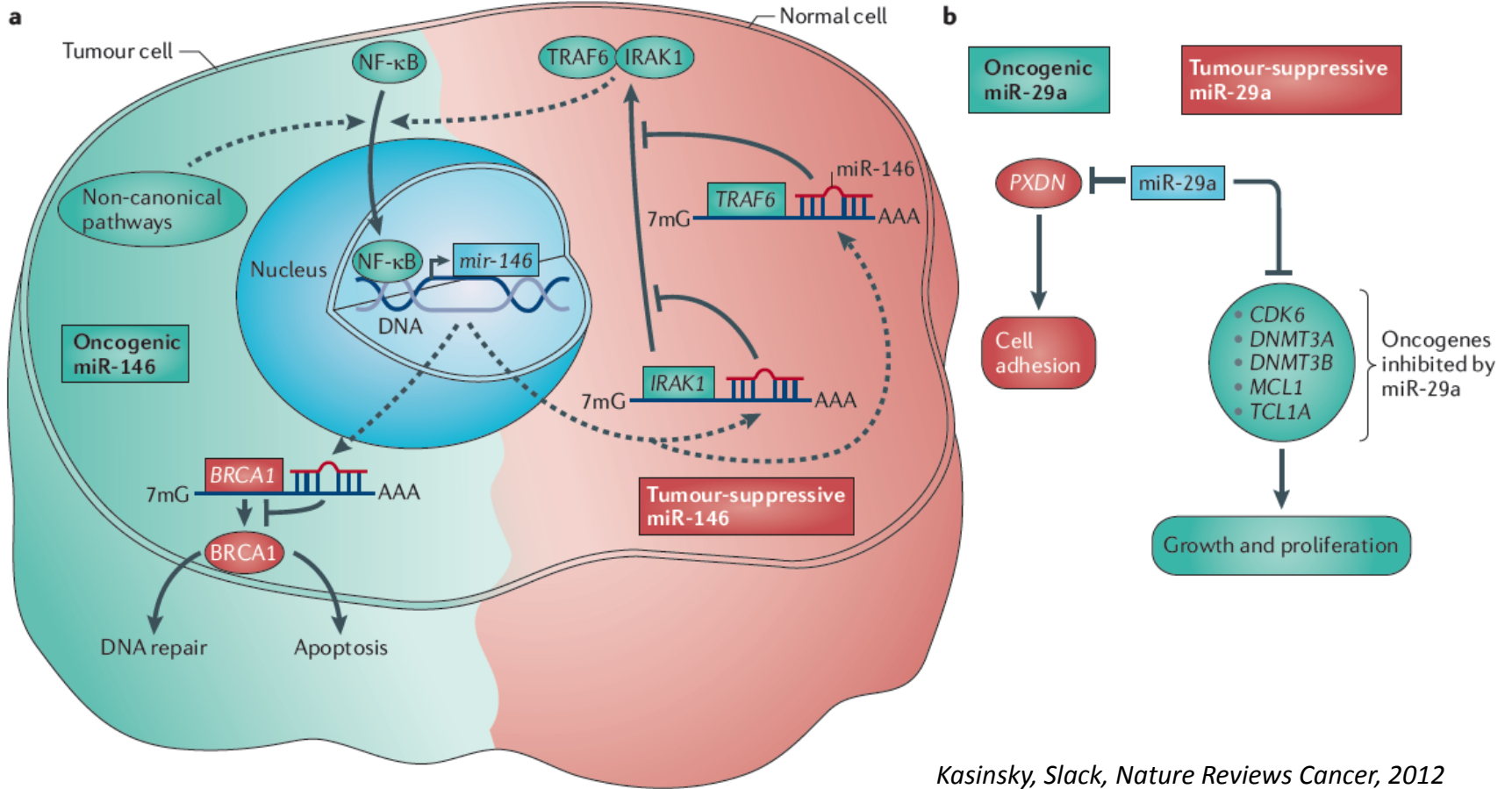


Kong et al, Lancet Oncology 2012



Lujambio, Nature 2012

MikroRNA jako onkogeny nebo TS v závislosti na buněčném kontextu



Kasinsky, Slack, Nature Reviews Cancer, 2012

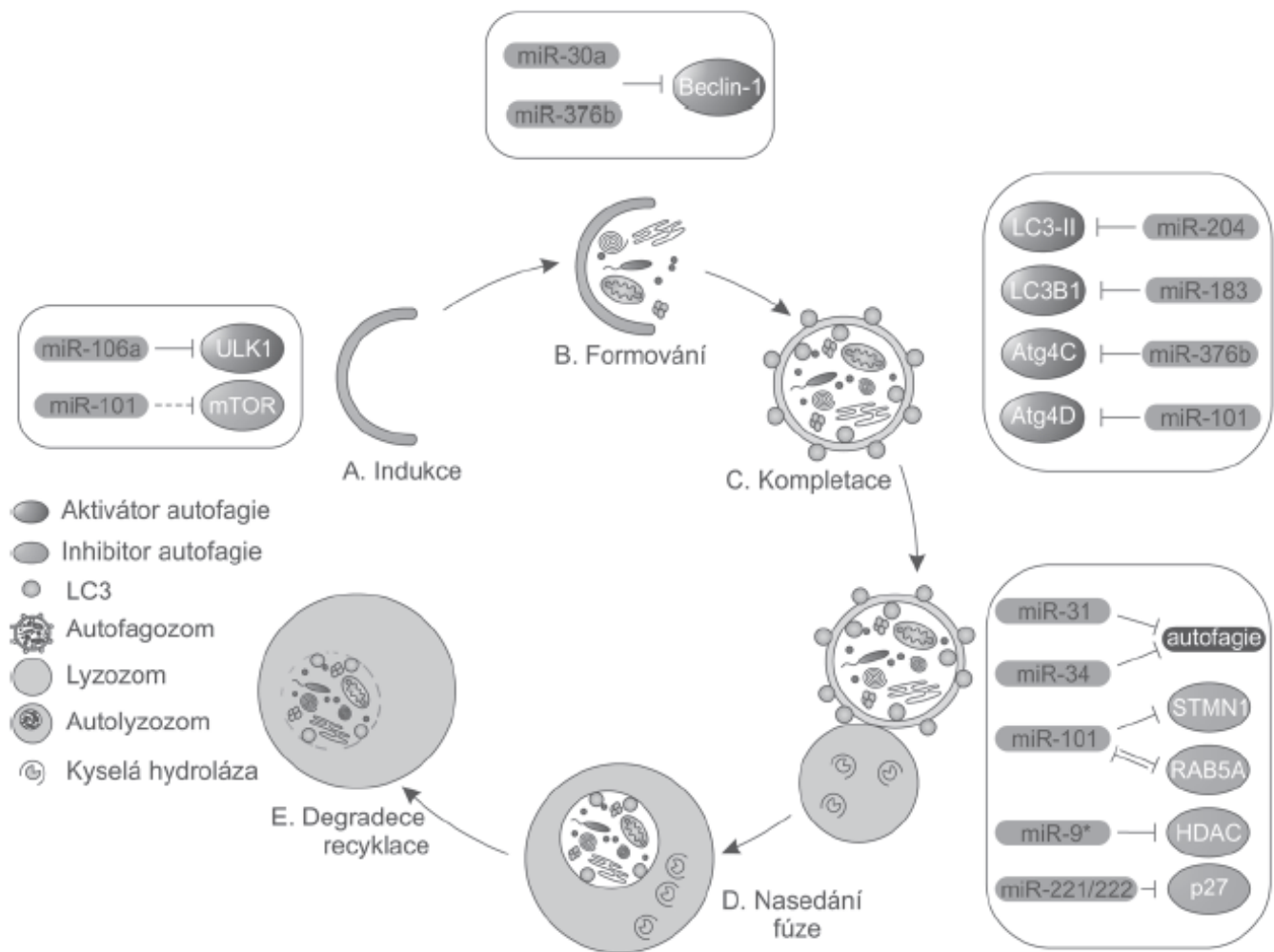
MikroRNA v patogenezi nádorových onemocnění

MikroRNA jsou zapojeny do regulace všech šesti klasických a čtyř nových získaných znaků maligního nádoru dle Weinberga a Hanahana. (Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, 2011)

Znaky maligní transformace	MikroRNA
soběstačnost v produkci růstových signálů	let-7, miR-7, miR-21, miR-34b/c, miR-125a/b, miR-126, miR-128, miR-143, miR-145, miR-199, miR-331
necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus	klastr miR-17-92 a miR-106b-25, miR-34a, miR-221, miR-222
poškozená apoptóza	miR-15, miR-16, miR-21, miR-29, rodina miR-34, miR-125b, miR-133, miR-145, miR-221, miR-222, miR-605
neomezený replikační potenciál	rodina miR-34, miR-138, miR-290, miR-372, miR-373
angiogeneze	miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, miR-107, miR-126, miR-181, miR-210, miR-213, miR-221, miR-222, miR-296
invazivita a metastazování	rodina miR-9, miR-10b, miR-21, miR-31, miR-122, miR-146a, miR-148a/b, miR-155, rodina miR-200, miR-210, miR-373, miR-520c
narušený energetický metabolismus	miR-23a/b, miR-122, miR-375
únik imunitnímu systému	miR-17-5p, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373 a miR-520c, miR-155, hcmv-miR-UL112
genomová nestabilita	klastr miR-17-92, miR-15, miR-16, let-7
nádorový zánět	miR-9, klastr miR-17-92, miR-21, miR-101, miR-146a, miR-192

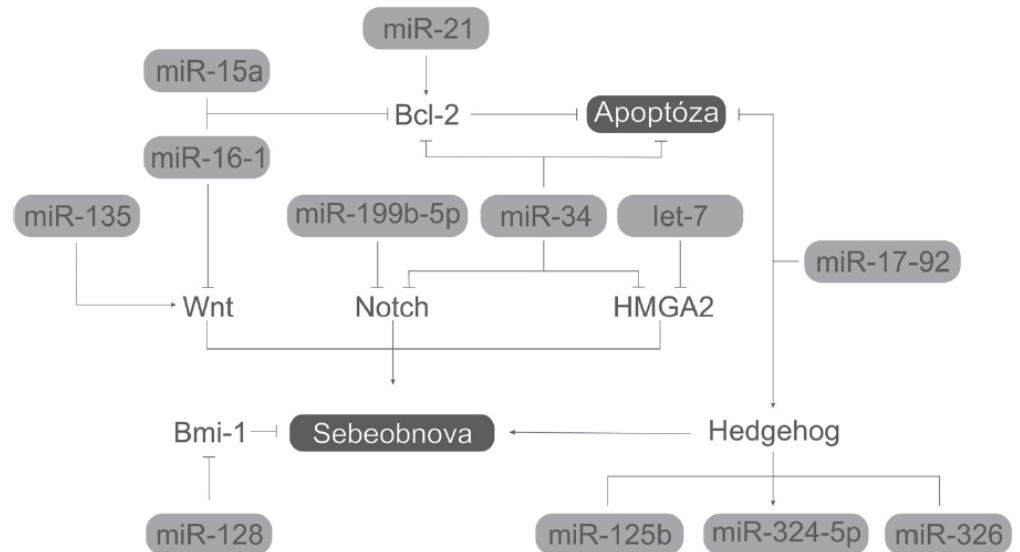
MikroRNA a autofagie

MikroRNA se podílejí na regulaci různých procesů autofagie, jako jsou signalizace mTOR, skládání komplexu ULK1, interakce proteinu Beclin-1 nebo ATG4 signalizace.



MikroRNA a nádorové kmenové buňky

MikroRNA jsou zapojeny do regulace kmenové vlastnosti a signálních drah regulujících kmenové vlastnosti kmenových buněk.



MikroRNA jako tkáňové biomarkery

mikroRNA nepodléhají degradačním procesům během formalínové fixace a archivace v parafinových blocích jako je tomu u mRNA

→ ARCHIVY FFPE MATERIÁLU NA PATOLOGÍCH JE TAK MOŽNÉ VYUŽÍVAT PRO ROZSÁHLE RETROSPEKTIVNÍ STUDIE

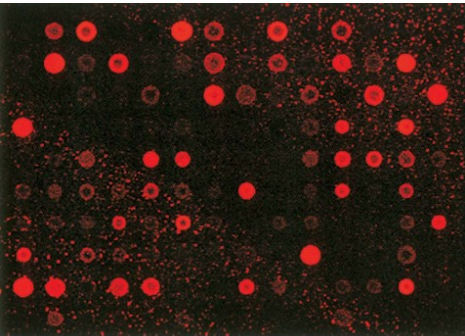
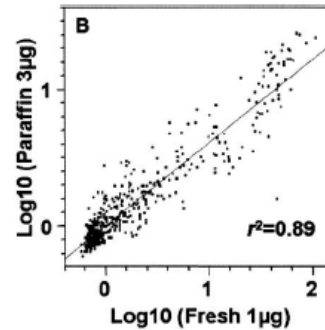
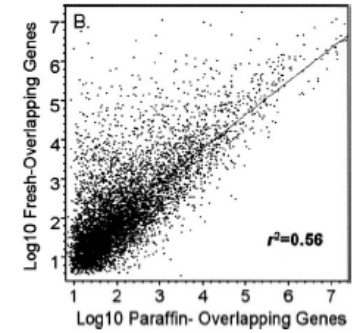
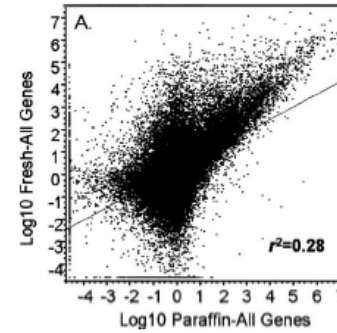


FIGURE 7. Representative miRNA array image from a 10-yr-old FFPE colon cancer sample.

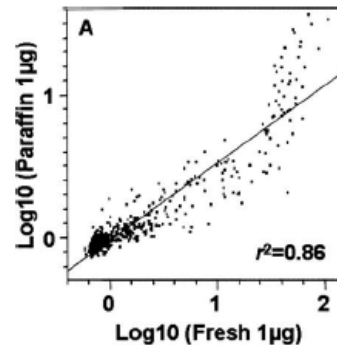


versus



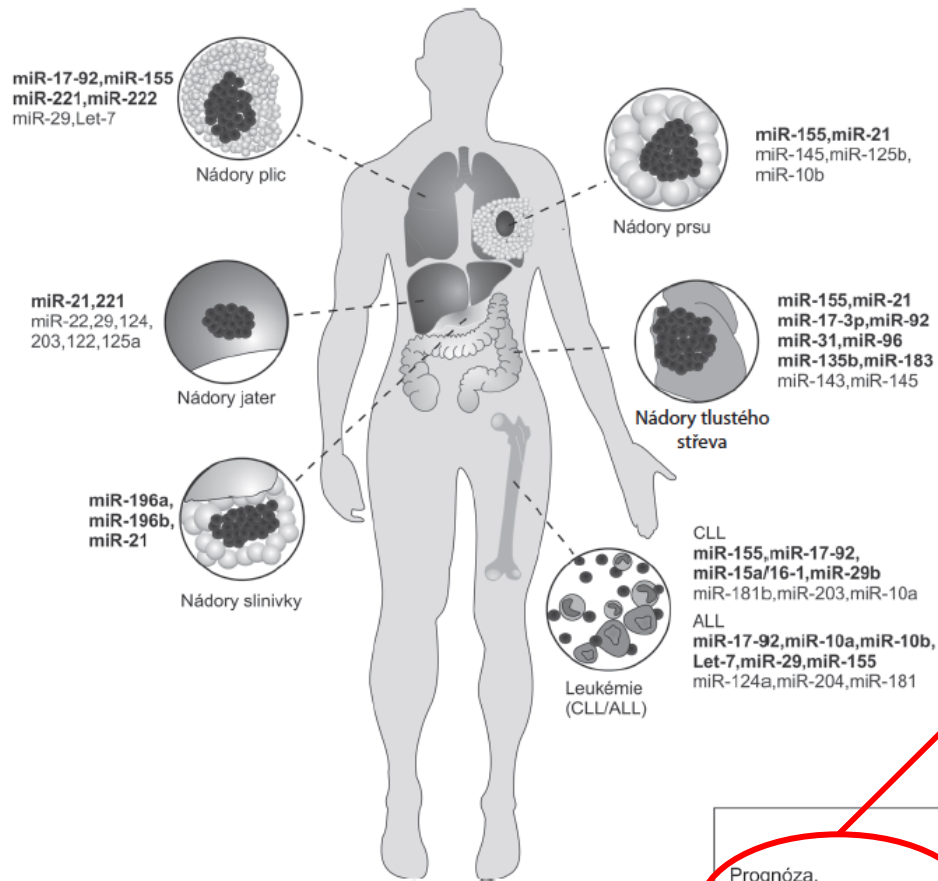
mikroRNA z FFPE

mRNA z FFPE



Yaguang Xi, RNA, 2007, 13:1-7

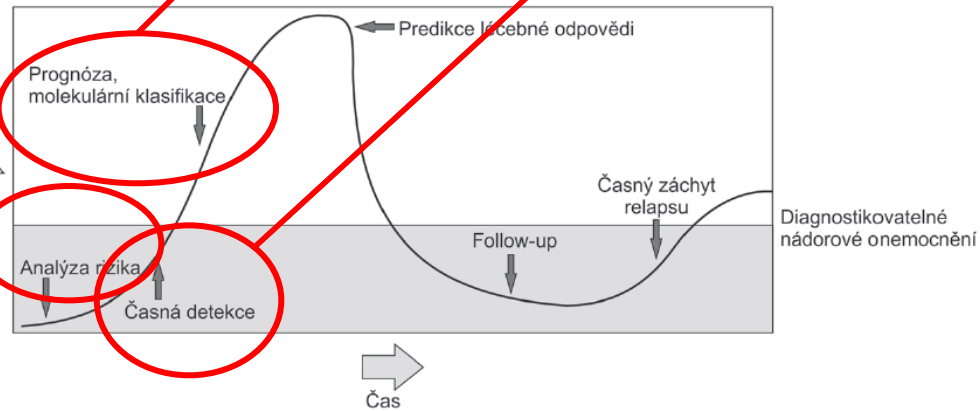
MikroRNA jako biomarkery v onkologii



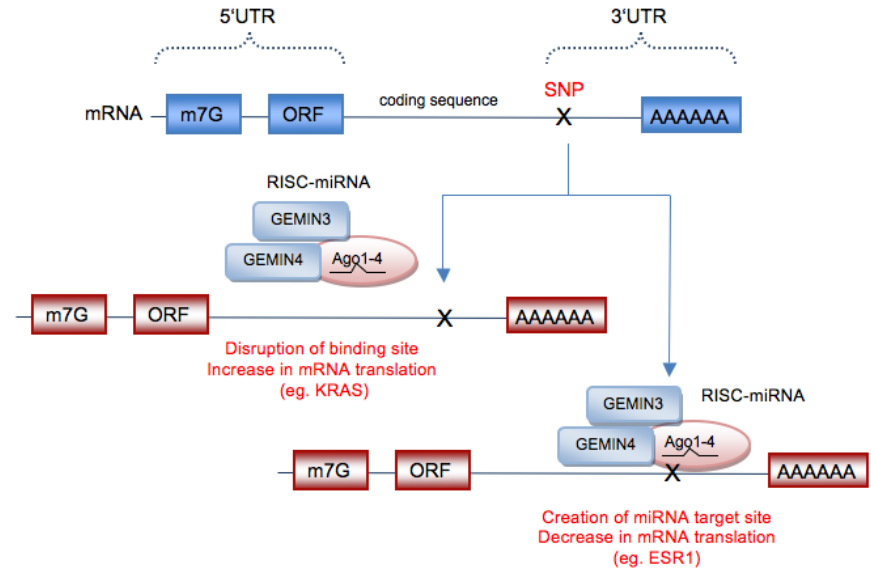
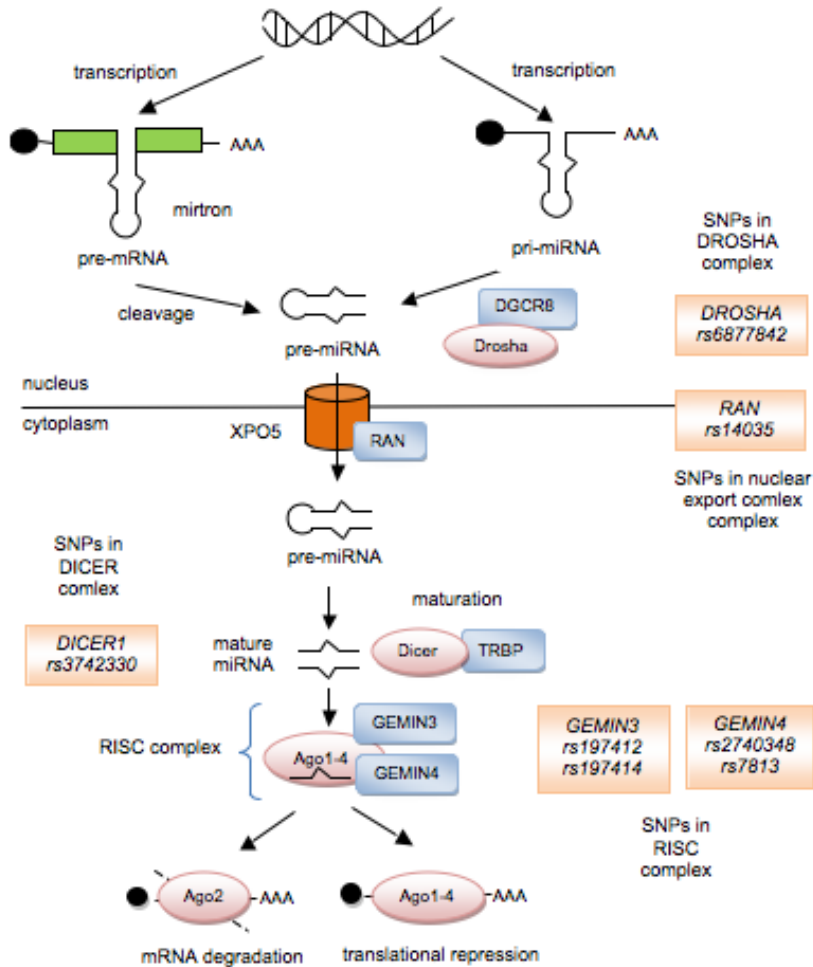
Prognostický biomarker
Příklad tkáňové mikroRNA
u renálního karcinomu

Diagnostický biomarker
Příklad sérových mikroRNA
u renálního karcinomu

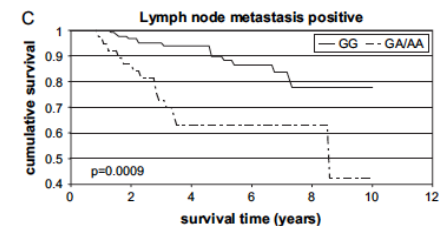
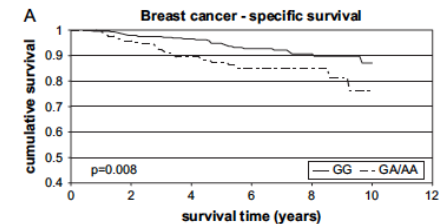
SNP ve vazebných místech
pro miRNA u CRC



SNP a mikroRNA, rizikové faktory



Slaby et al., J Cell Mol Med, 2011



1. SNPs v biogenetické dráze miRNA
2. SNPs v sekvenci pri, pre a maturované miRNA
3. SNPs ve vazebných oblastech pro miRNA

G/A *ITGB4* (miR-34a) Brendle et al, Carcinogenesis 2009

SNP a mikroRNA

SNP ve vazebných místech pro miRNA regulované chemoprotektanty

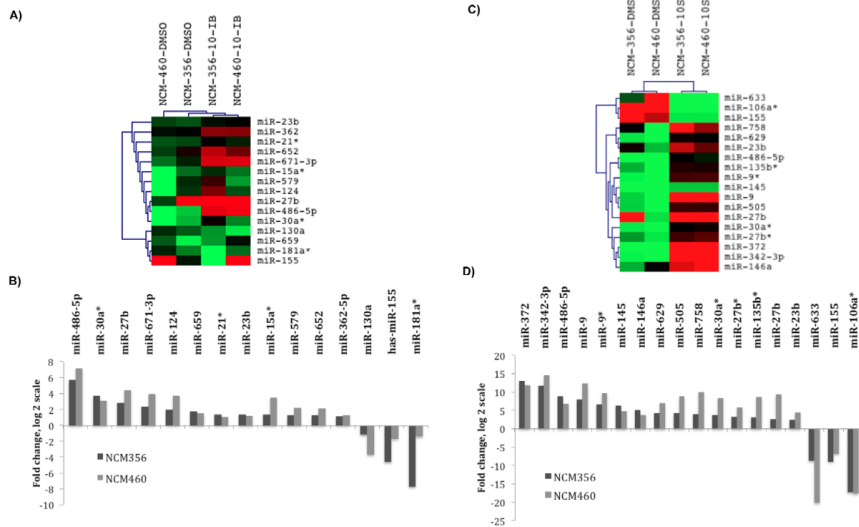


Table 1 MiRNAs affected by isothiocyanates treatment.

miRNA	ITCs	Tumor tissue	Association with cancer	Chromosome localization	Validated targets	References
miR-27b	up	down/up	NBL, glioma	9q22.32	PPARG, MEF2C, MMP13	25, 40, 41
miR-23b	up	down/up	CRC, HCC, RCC	9q22.32	SMAD3, FZD7, MAP3K1	21-24, 42
miR-155	down	up	CRC, BC, NSCLC, PC, EC, see Tili et al. 2009	21q21.3	SHIP1, FOXO3A, SOCS1, CKAP5, STAB1, SMAD5, BMPs	26-30

NBL neuroblastoma, CRC colorectal cancer, HCC hepatocellular carcinoma, RCC renal cell carcinoma, BC breast cancer, NSCLC non-small cell lung cancer, PC pancreatic cancer, EC endometrial cancer, PPARG peroxisome proliferator-activated receptor gamma, MEF2C myocyte enhancer factor 2C, MMP13 matrix metalloproteinase 13, SMAD3 SMAD family member 3, FZD7 frizzled family receptor 7, MAP3K1 mitogen-activated protein kinase kinase 1, SHIP1 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1, FOXO3 forkhead box O3, SOCS1 suppressor of cytokine signaling 1, CKAP5 cytoskeleton associated protein 5, STAB1 stabilin 1, SMAD5 SMAD family member 5, BMPs bone morphogenetic proteins

Table 2 In silico identified SNPs in ITC-related miRNA binding sites and flanking regions.

SNP	Symbol	Gene name	Association with cancer*	Variation	MAF**	Targeting miRNA
SNPs in miRNA binding regions						
rs5186	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	17	A/C	0.25	miR-155
		tumor necrosis factor, alpha-induced				
rs710100	TNFAIP2	protein 2	15	A/G	0.29	miR-155
rs411103	PRKCB	protein kinase C, beta	90	A/T	0.33	miR-27b
SNPs in flanking regions of miRNA binding sites						
rs12009	HSPA9	heat shock 70kDa protein 5	20	A/G	0.48	miR-155
rs700082	RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	2	G/C	0.12	miR-155
rs1057035	DICER1	dicer 1, ribonuclease type III	96	C/T	0.36	miR-23b
rs10404	ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19	17	T/C	0.23	miR-23b
		von Willebrand factor A domain				
rs1939861	VWA5A	containing 5A	6	C/T	0.38	miR-27b
rs3757261	SIRT5	sirtuin 5	5	T/C	0.24	miR-27b

*The total number of hits in Pubmed when gene symbol is combined with keyword cancer

**Minor allele frequency in Caucasians

Table 3 Logistic regression analysis for the selected SNPs in the miRNA target sequences and their flanking regions.

Gene	SNP	Controls ^a		Cases ^a		-/+ versus +/+		OR ^b	95% CI	P-value	-/- versus +/+		P-value	P-value
		+/+	-/-	+/+	-/-	OR ^b	95% CI							
AGTR1	rs5186	125	73	14	104	78	15	1.25	(0.83, 1.90)	0.313	1.37	(0.62, 3.00)	0.42	0.239
TNFAIP2	rs710100	100	89	23	85	86	26	1.15	(0.76, 1.75)	0.507	1.33	(0.70, 2.53)	0.399	0.516
PRKCB	rs411103	77	108	27	75	97	25	0.96	(0.63, 1.47)	0.869	0.99	(0.52, 1.87)	0.947	0.841
HSPA9	rs12009	63	108	32	60	100	38	0.94	(0.60, 1.48)	0.831	1.19	(0.66, 2.17)	0.603	0.659
RABGAP1	rs700082	166	36	1	158	37	2	1.13	(0.68, 1.90)	0.73	2.76	(0.24, 32.06)	0.395	0.458
ADAM19	rs10404	91	32	96	82	20	0.75	(0.49, 1.15)	0.217	0.49	(0.25, 0.95)	0.036	0.183	
DICER1	rs1057035	114	74	15	107	72	19	1.13	(0.74, 1.73)	0.54	1.45	(0.69, 3.04)	0.351	0.312
VWA5A	rs1939861	79	93	31	91	80	27	0.74	(0.48, 1.14)	0.213	0.78	(0.42, 1.43)	0.402	0.169
SIRT5	rs3757261	116	81	6	117	75	6	0.95	(0.63, 1.44)	0.839	0.92	(0.28, 2.98)	0.789	0.798

^aNumbers may not add up to 100% of subjects due to genotyping failure. All samples that did not give a reliable result in the first round of genotyping were resubmitted to up to two additional rounds of genotyping. Data points that were still not filled after this procedure were left blank.

^bORs were adjusted for sex and age. Only results for the codominant model are shown. Statistically significant results (P < 0.05) are shown in bold.

Cirkulující mikroRNA jsou přítomny ve dvanácti typech tělních tekutin

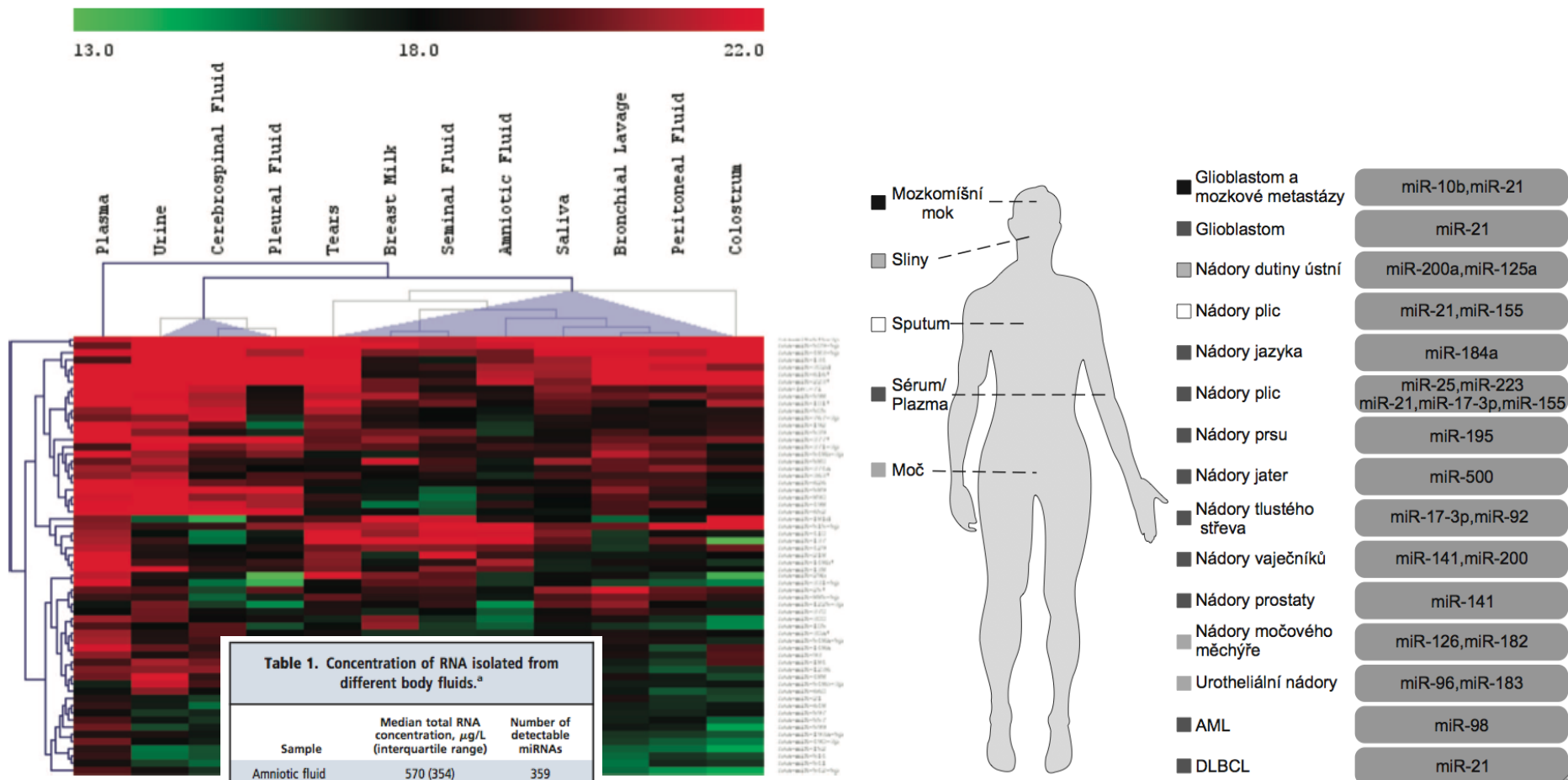


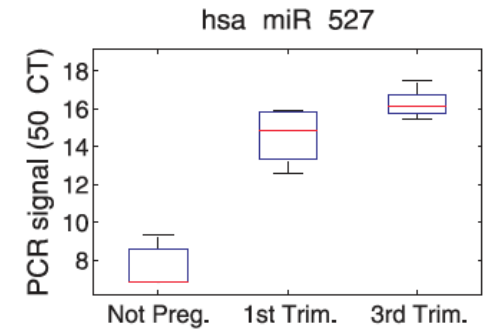
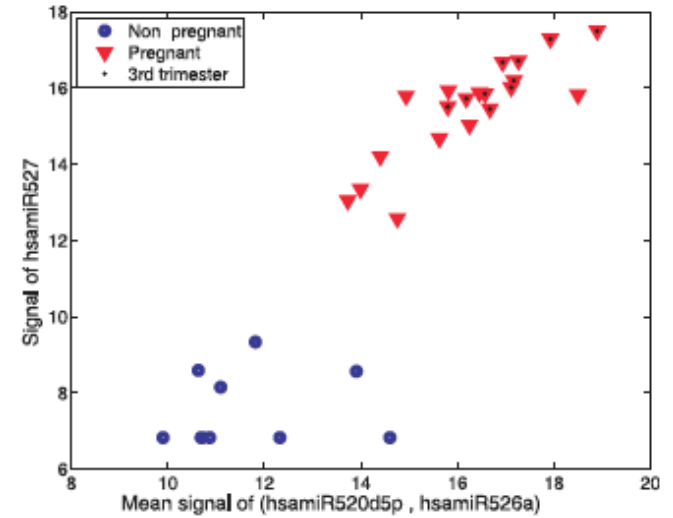
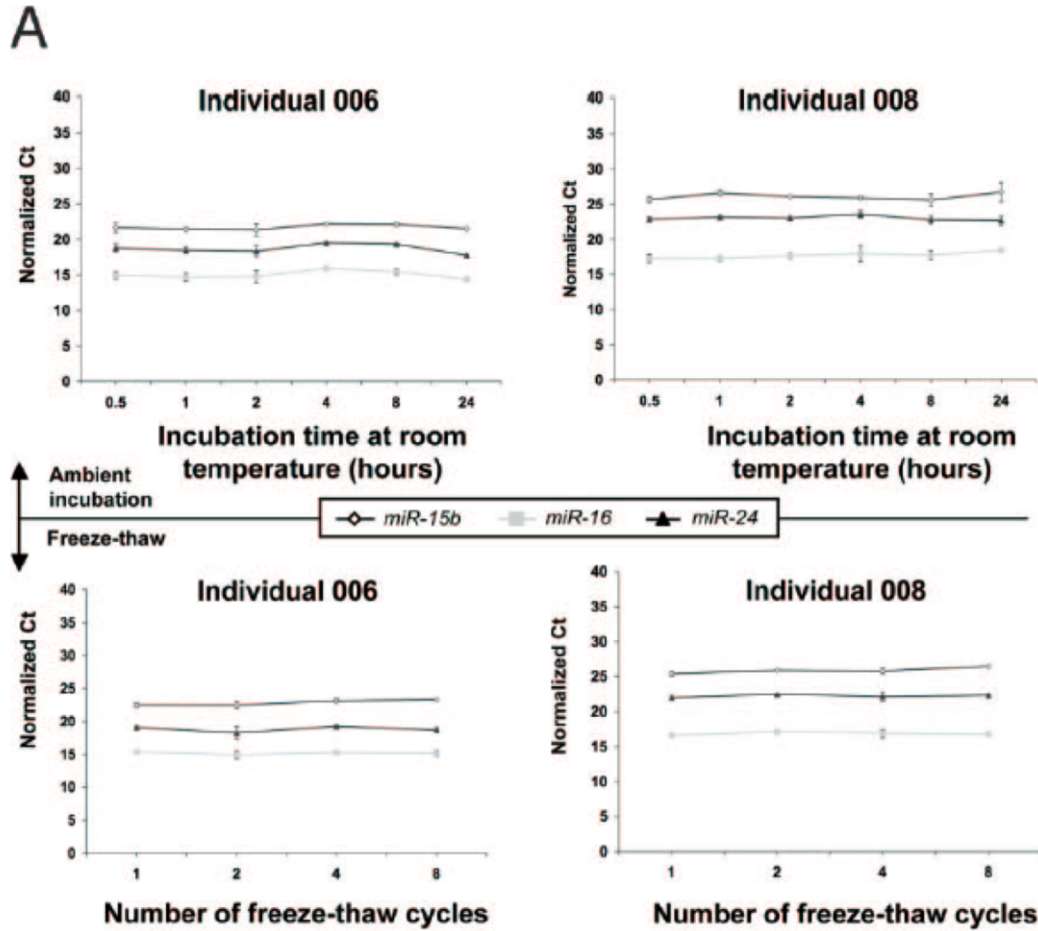
Table 1. Concentration of RNA isolated from different body fluids.^a

Sample	Median total RNA concentration, $\mu\text{g/L}$ (interquartile range)	Number of detectable miRNAs
Amniotic fluid	570 (354)	359
Breast milk	47 240 (73 180)	429
Bronchial lavage	1128 (886)	260
Cerebrospinal fluid	111 (66)	212
Colostrum	585 (NA)	386
Peritoneal fluid	775 (345)	397
Plasma	308 (104)	349
Pleural fluid	470 (190)	210
Saliva	1945 (2495)	458
Seminal fluid	17 770 (7673)	436
Tears	564 (631)	320
Urine	94 (129)	204

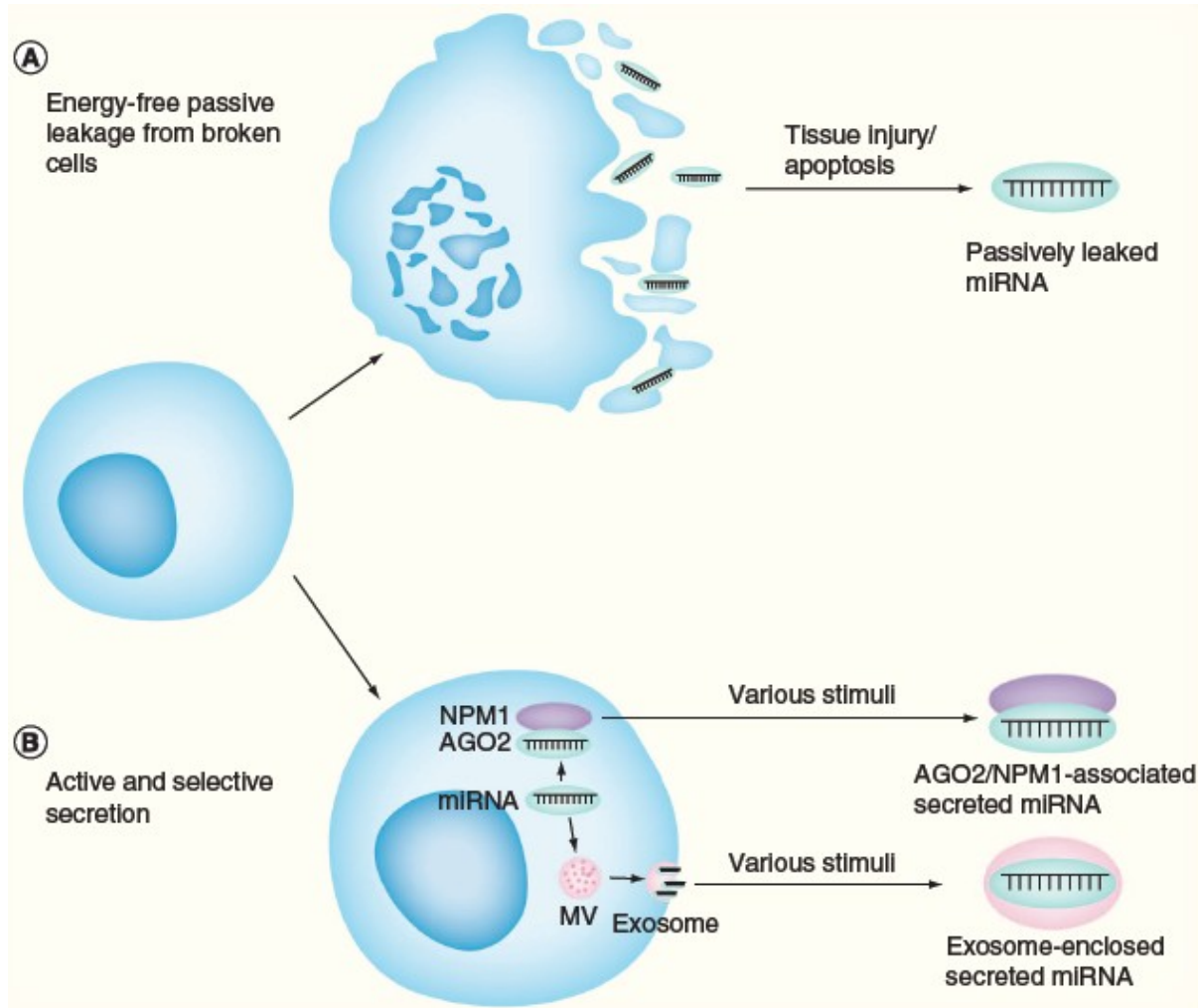
^a As estimated by the Agilent 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Pico Total RNA chip, median concentration across all 5 samples except colostrum. The number of detected miRNAs in each body fluid is based on the number of miRNA species with a level of >80% of the global mean.

Weber et al., Clin Chem, 2010

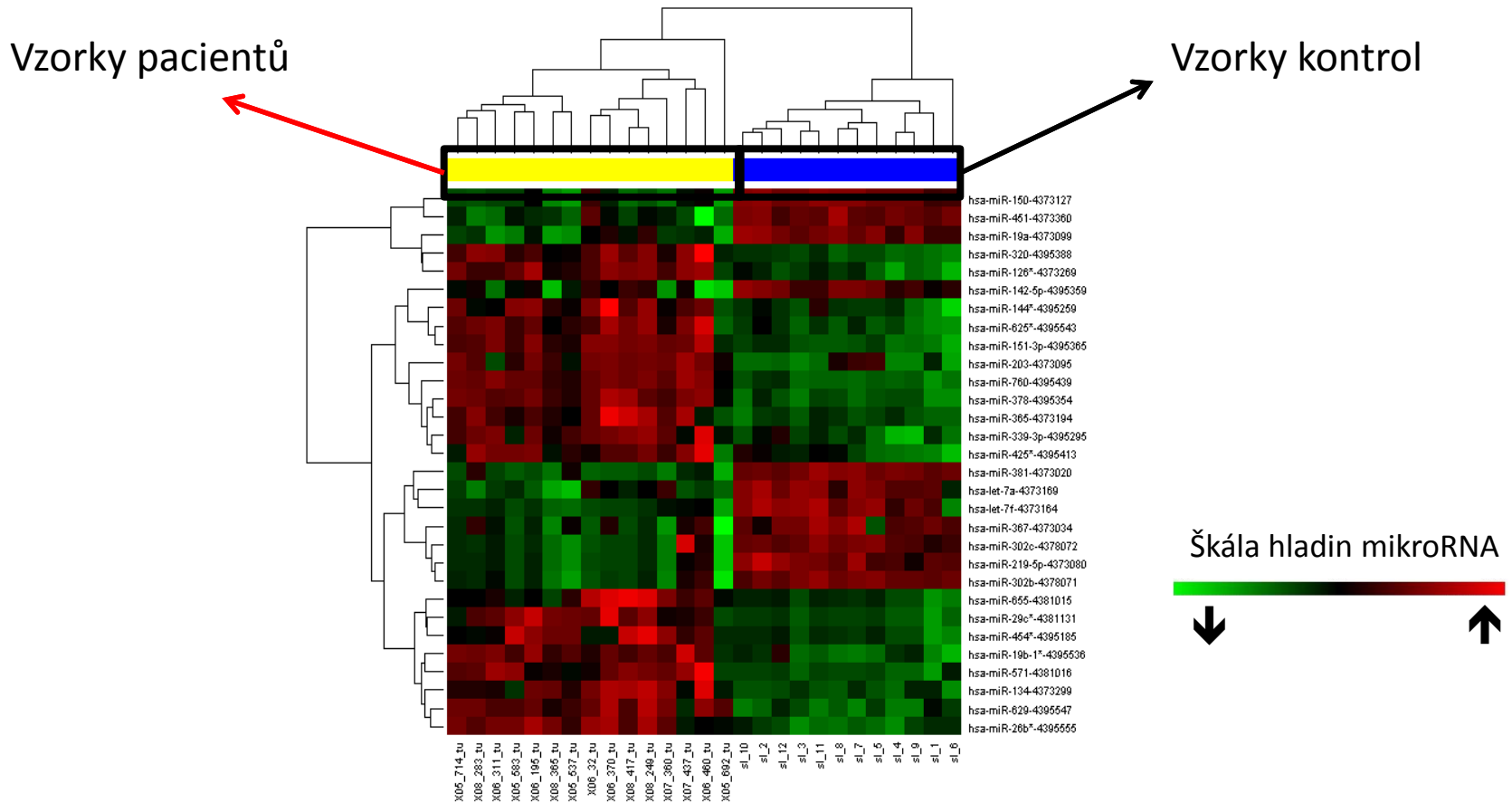
Stabilita cirkulujících mikroRNA



Původ cirkulujících mikroRNA

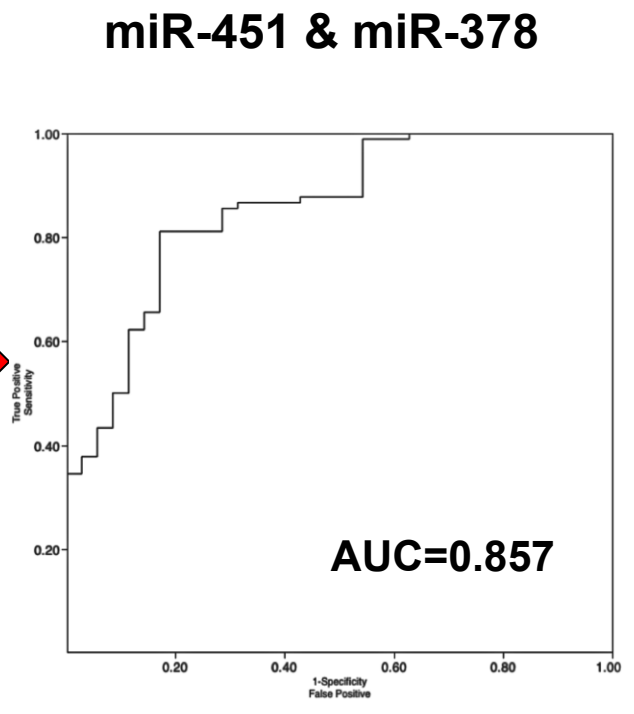
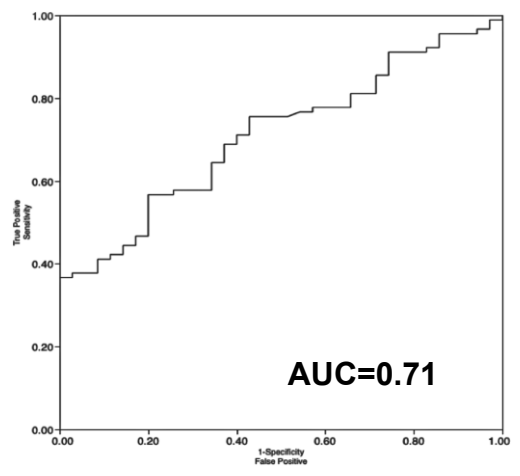
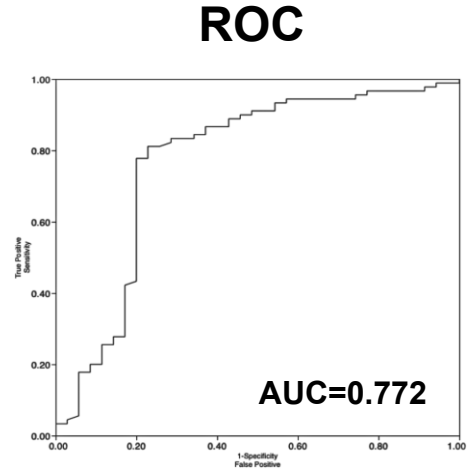
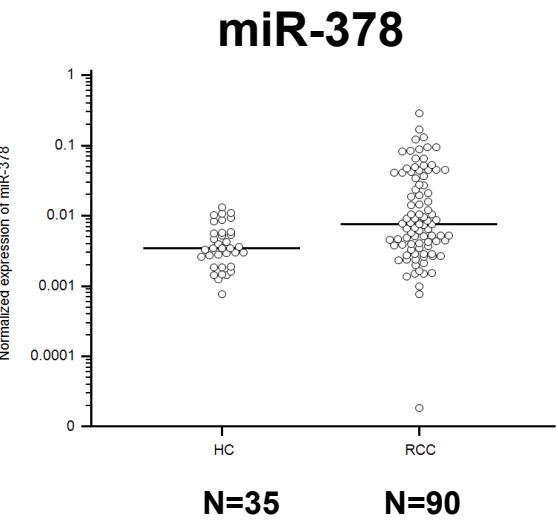
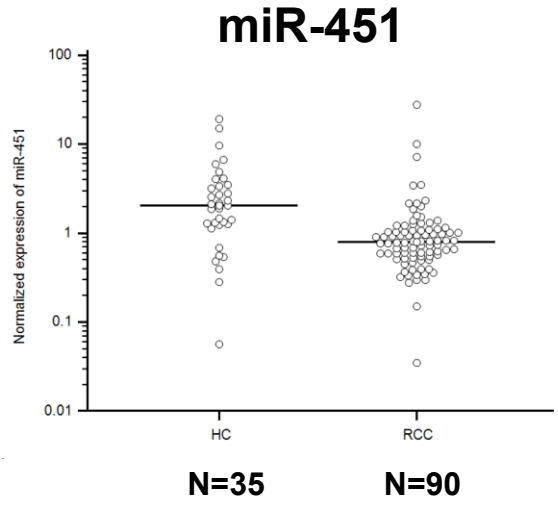


Cirkukující sérové mikroRNA v diagnostice renálního karcinomu



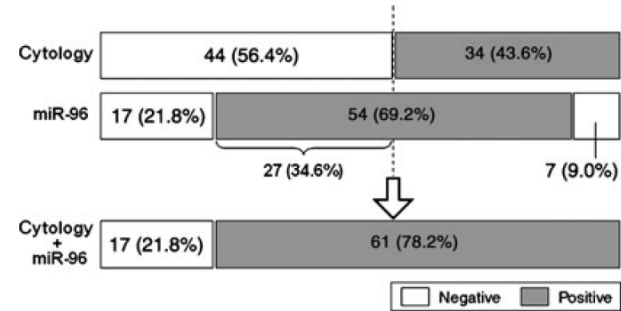
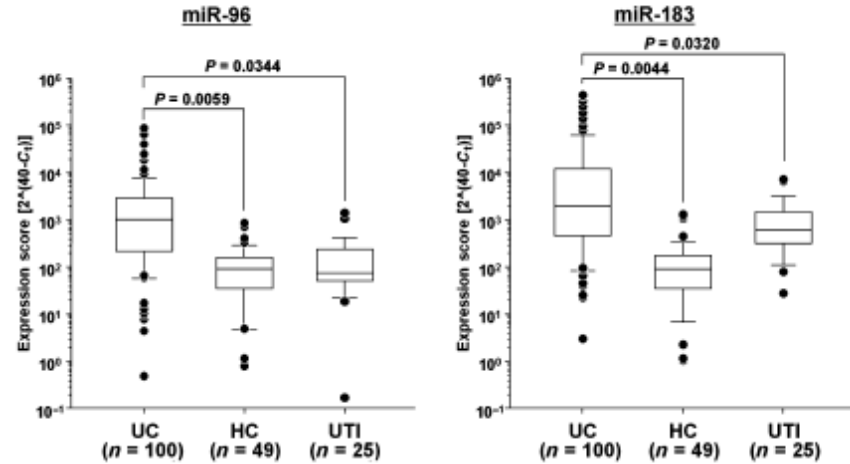
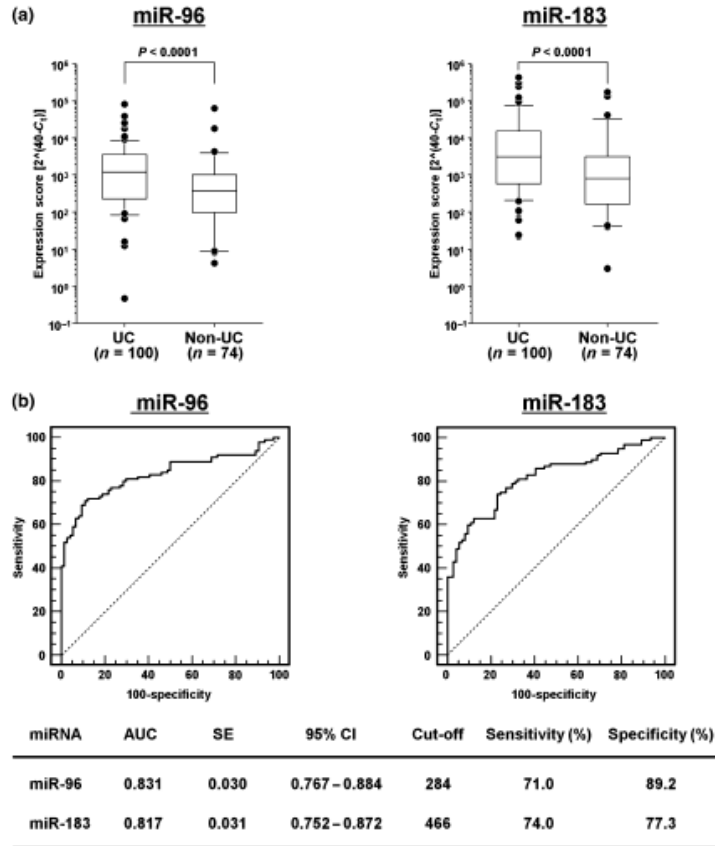
Vzorky krevního séra rozdělené do skupin na základě rozdílné exprese miRNA (žlutá barva znamená vzorky pacientů s renálním karcinomem, modrá pak vzorky kontrolních jedinců, vyhodnoceno metodou LIMMA, $p < 0001$)

Cirkulující sérové mikroRNA v diagnostice renálního karcinomu



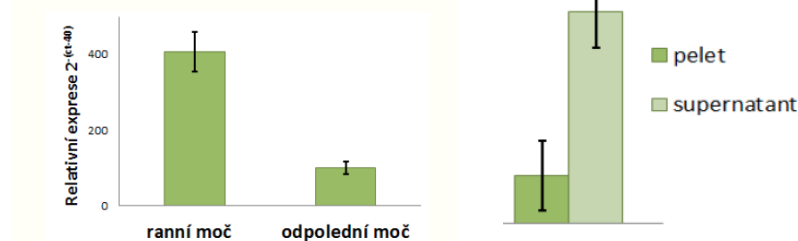
Senzitivita=81%
Specifická=83%

Močové mikroRNA jako diagnostické biomarkery uroteliálního karcinomu



Yamada et al. Cancer Science, 2010

Obr. 3 – Expresce miRNA-125b v ranní a odpolední moči



nepublikovaná data, 2013

MikroRNA jako prognostické tkáňové biomarkery u renální karcinomu

Predikce časného relapsu po nefrektomii u pacientů s renálním karcinomem

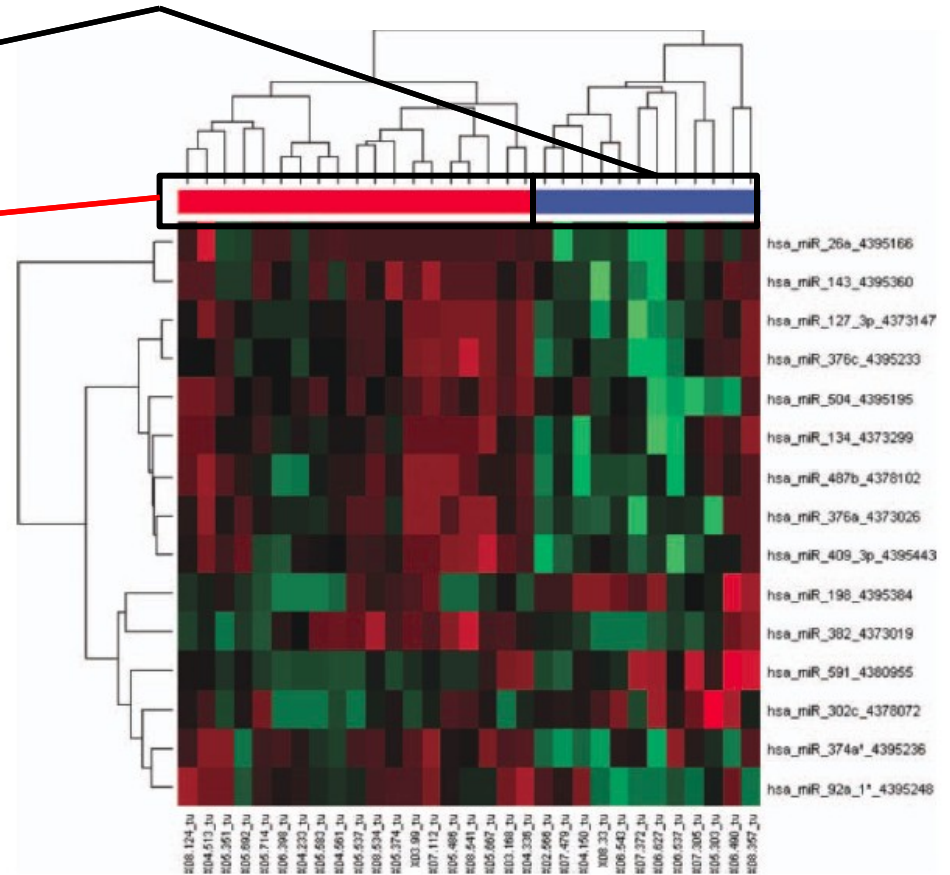
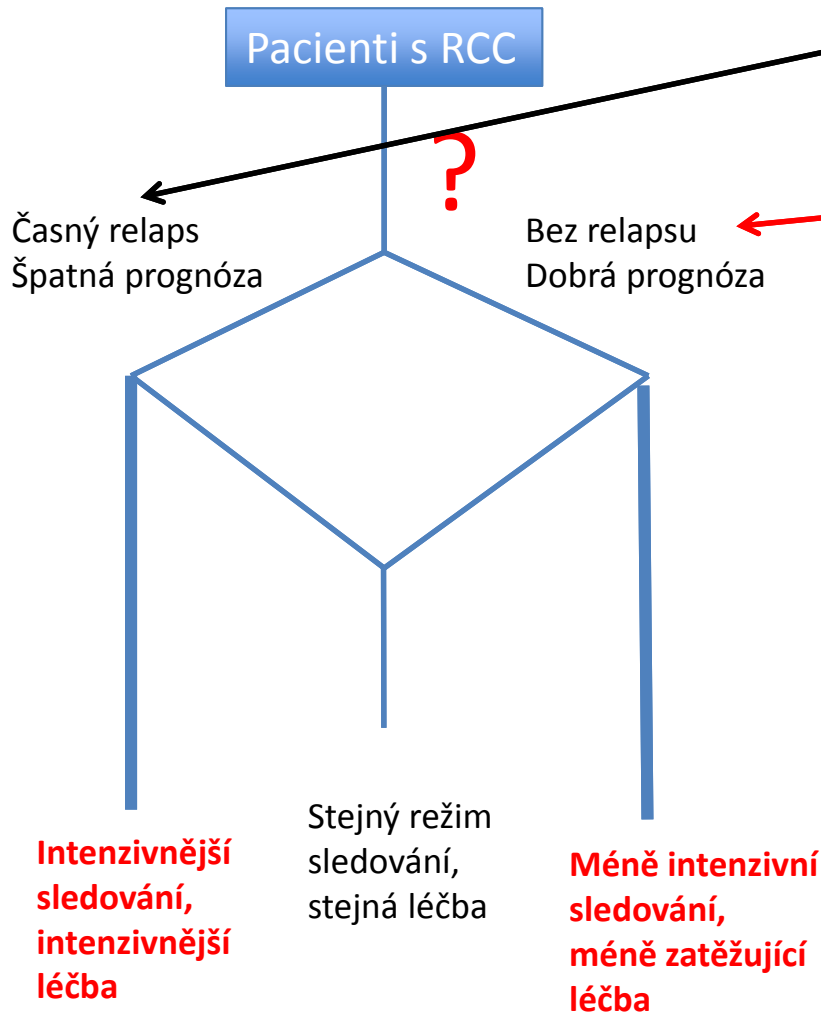


Figure 1. Hierarchical clustergram discriminating RCC patients developing tumor relapse and relapse-free RCC patients according to differentially expressed miRNAs (blue color indicate RCC with relapse, blue relapse-free RCC, $P < 0.01$).

MikroRNA jako prognostické tkáňové biomarkery u renální karcinomu

Predikce časného relapsu po nefrektomii u pacientů s renálním karcinomem

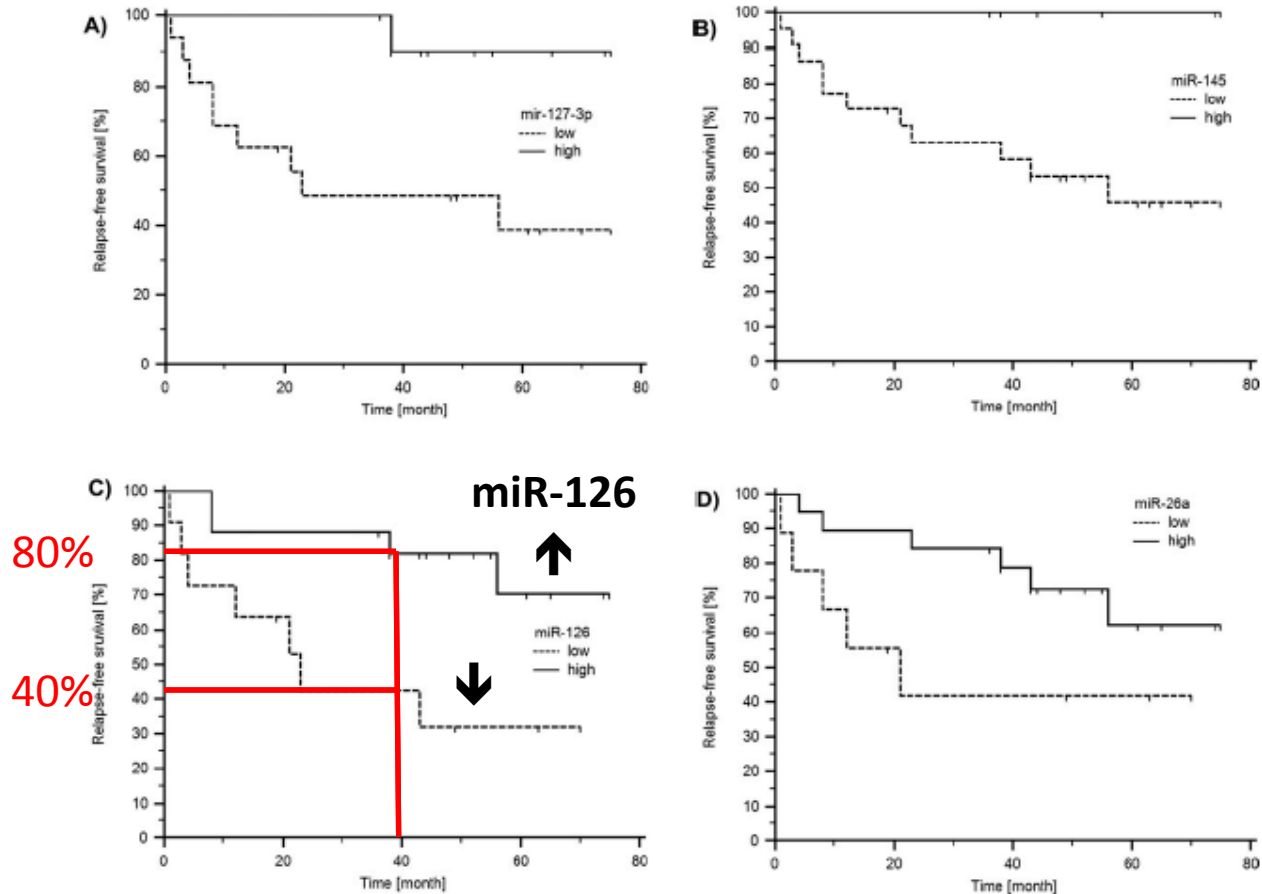
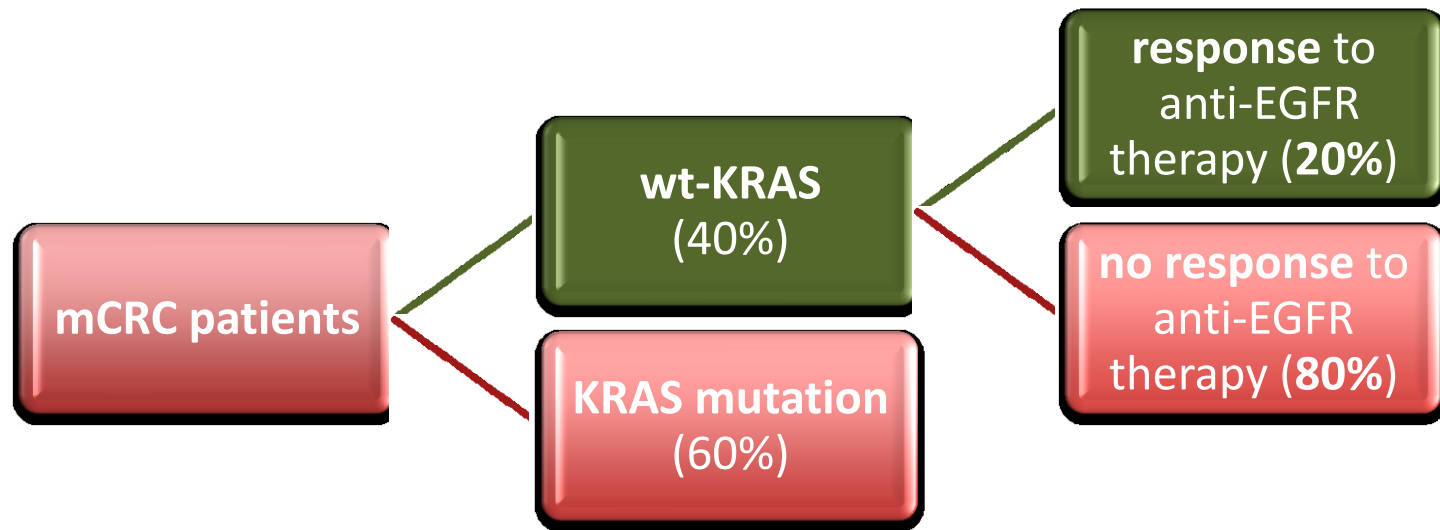


Figure 3. Relapse-free survival of patients with RCC in the validation cohort based on the expression levels of miR-127-3p (A), miR-145 (B), miR-126 (C), and miR-26a (D).

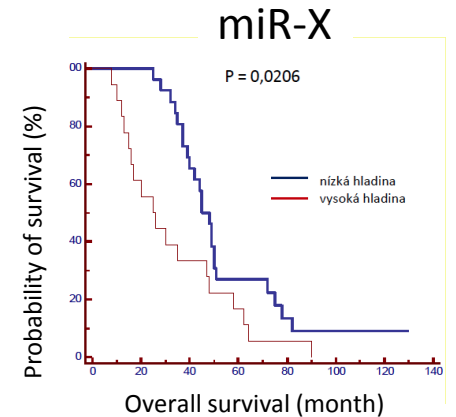
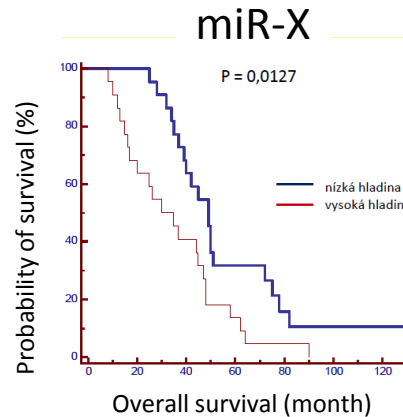
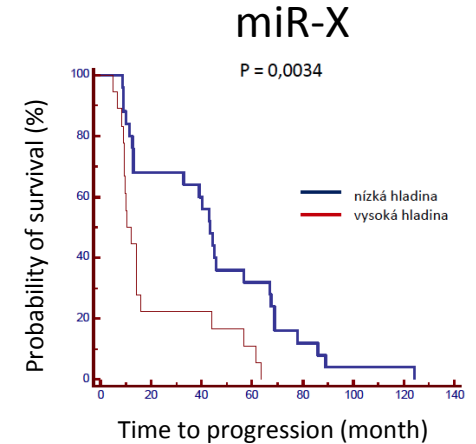
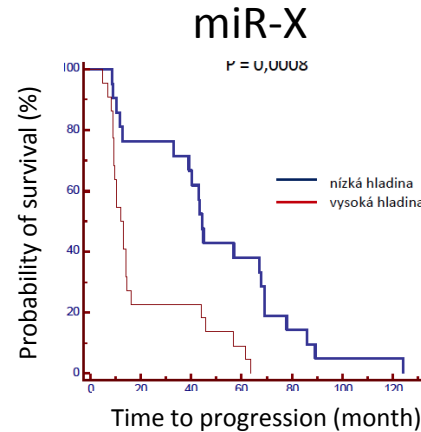
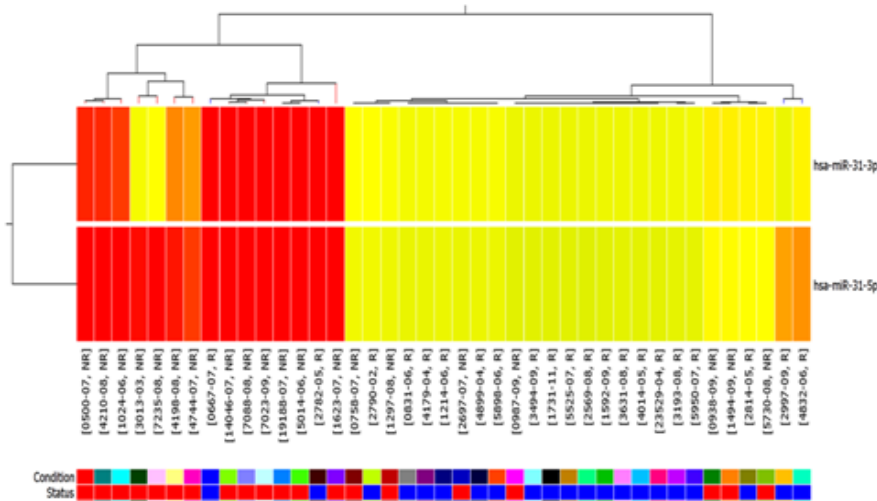
MikroRNA jako prediktivní biomarkery odpovědi na anti-EGFR terapii u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem

anti-EGFR therapy → cetuximab

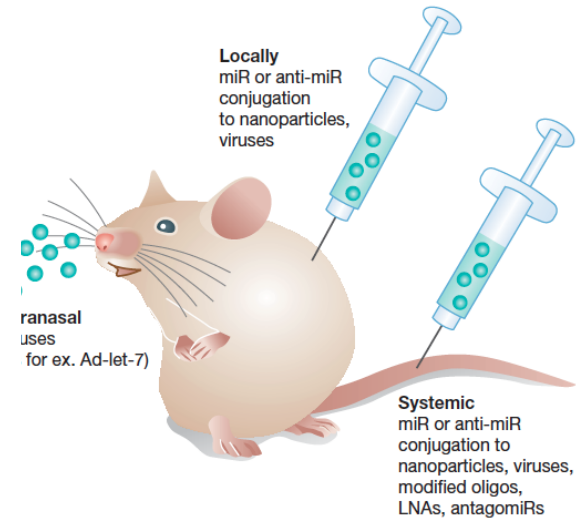
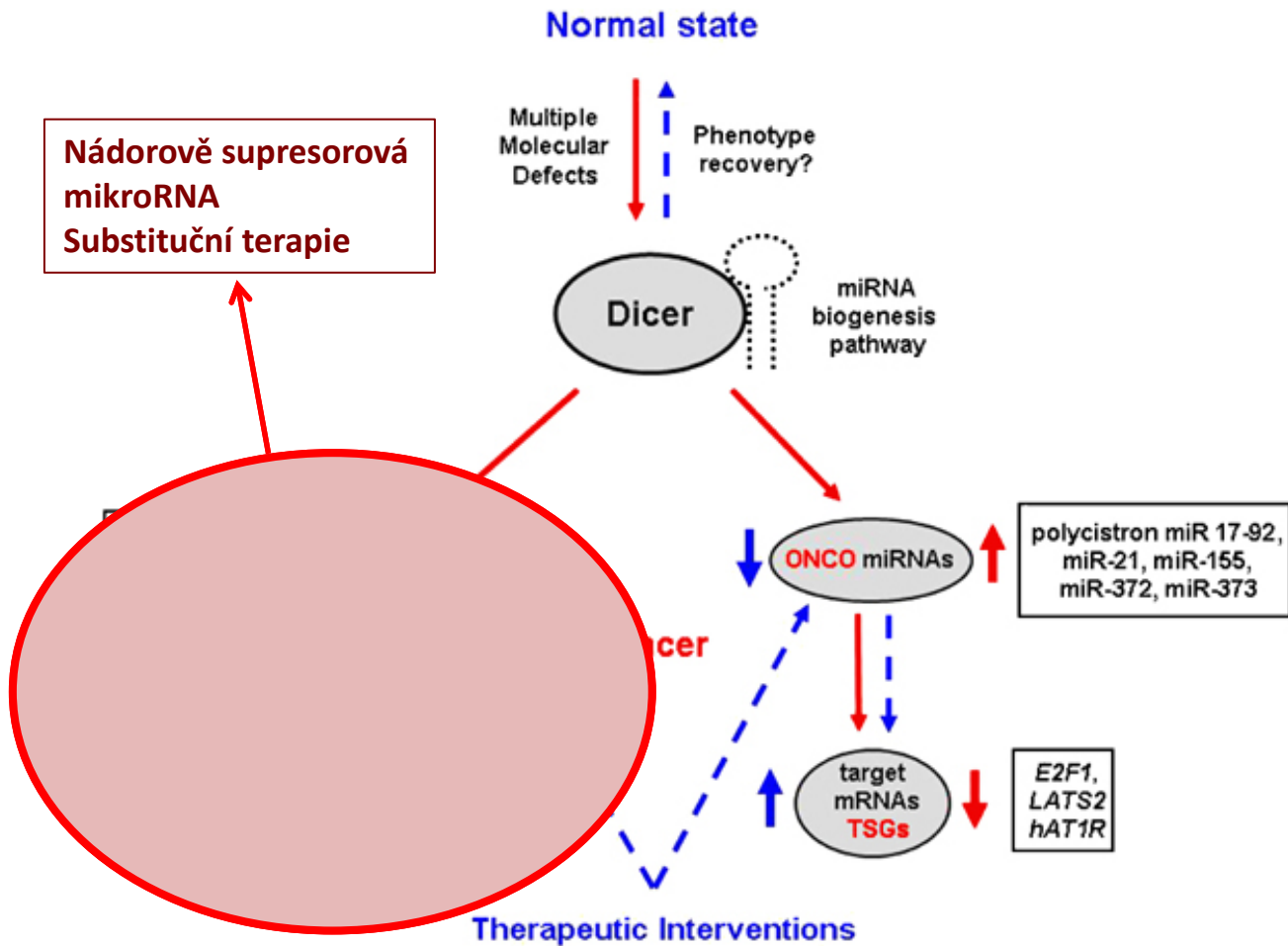


MikroRNA jako prediktivní biomarkery odpovědi na anti-EGFR terapii u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem

miR-X a miR-X



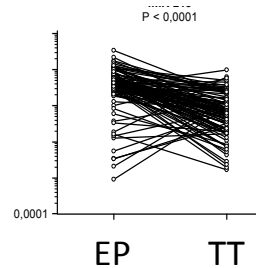
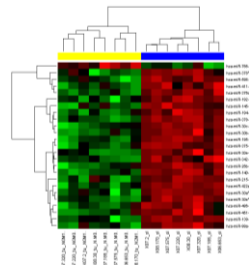
MikroRNA jako terapeutické cíle



Iorio et al., EMBO Mol Med, 2012

Wurdinger et al., Pharmacogenomics J, 2008

Funkční in vitro analýza mikroRNA deregulovaných u kolorektálního karcinomu



miR-215

Jaká je funkce miR-215 v buňkách kolorektálního karcinomu?



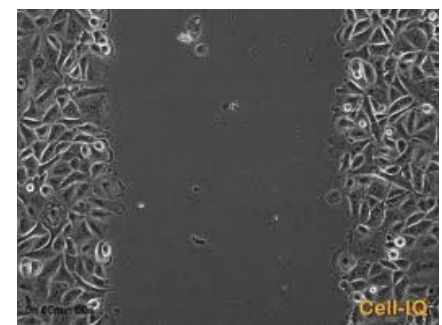
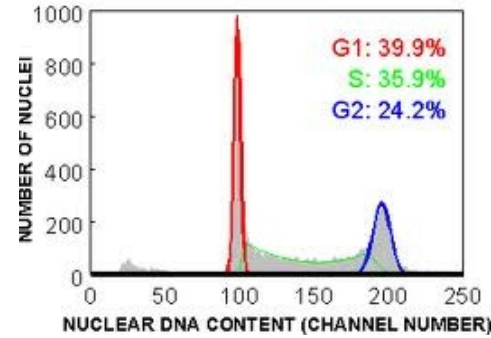
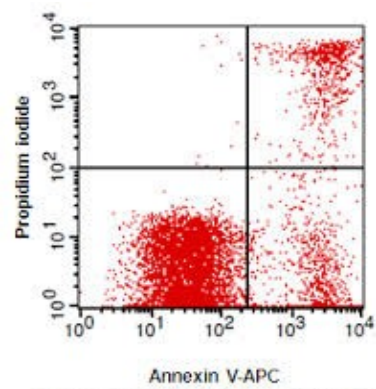
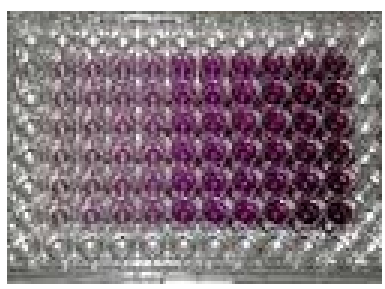
DLD-1

HCT-116^{+/+}

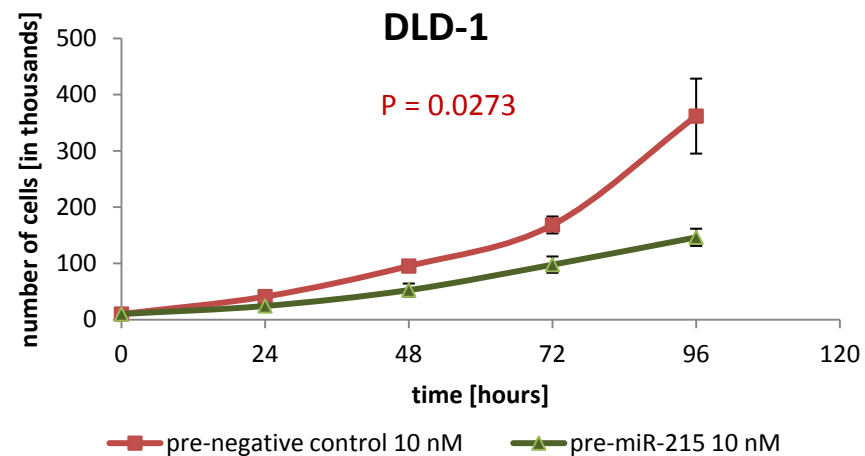
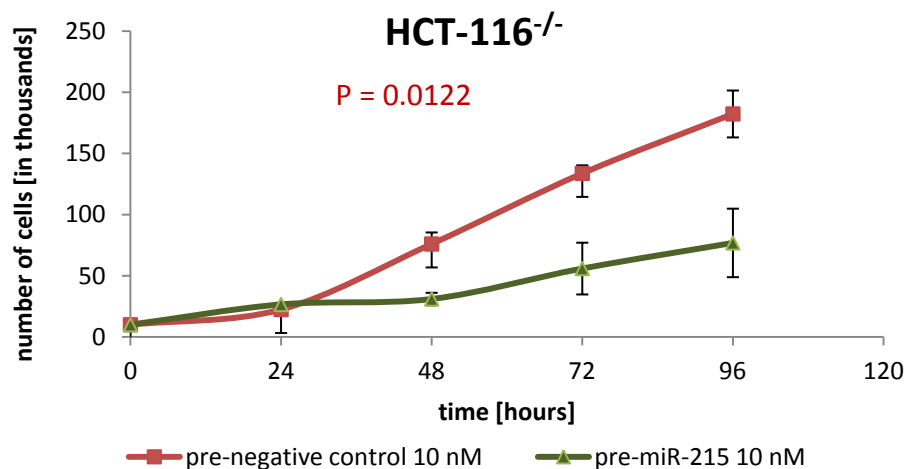
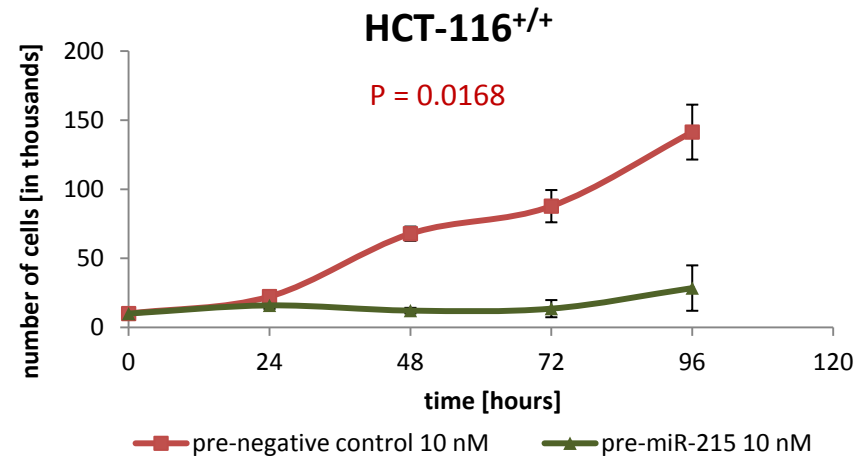
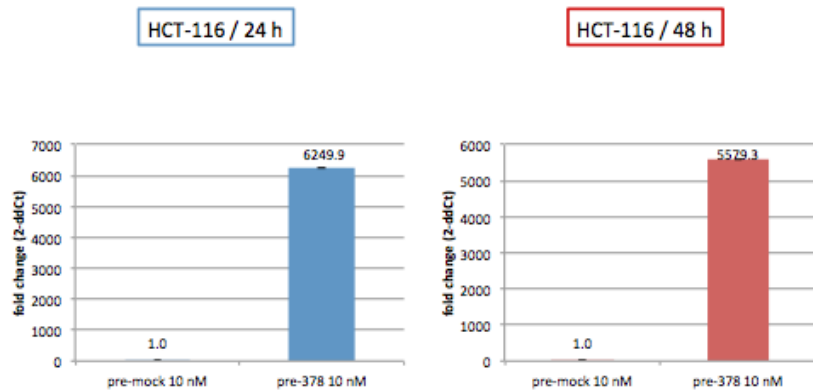
HCT-116^{-/-}

HT-29

SW-620

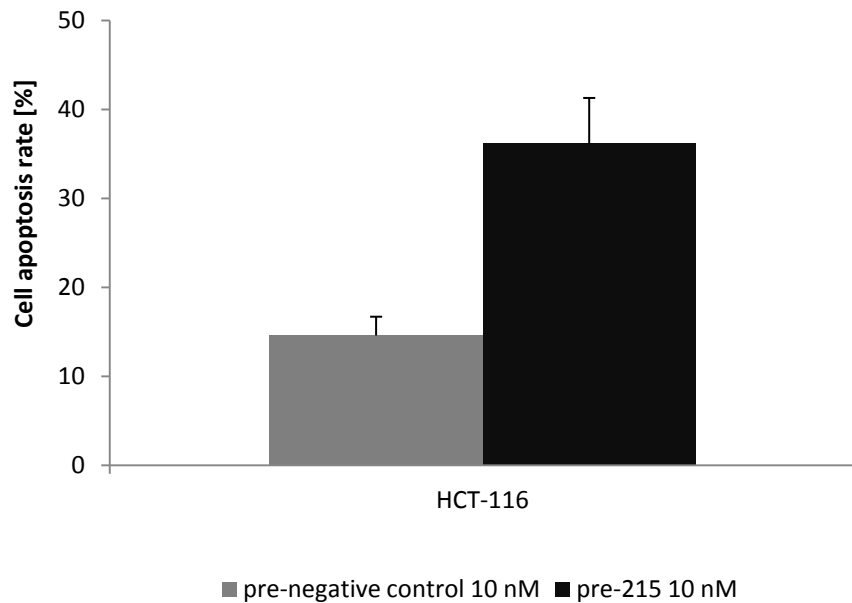


In vitro funkční analýza miR-215 u kolorektálního karcinomu: ovlivnění proliferace

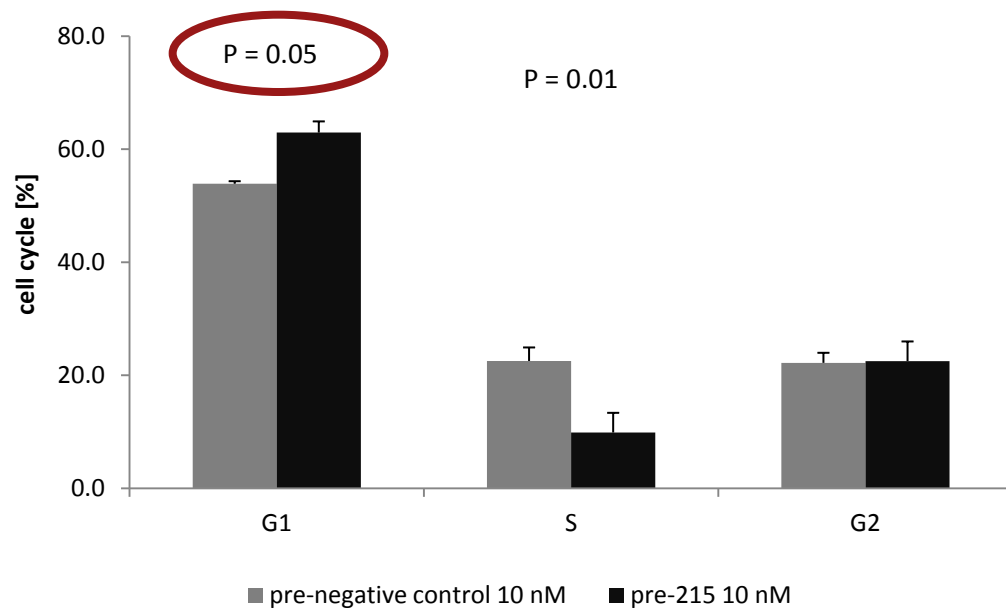


In vitro funkční analýza miR-215 u kolorektálního karcinomu: ovlivnění apoptózy a buněčného cyklu

P = 0.005



HCT-116^{+/+}

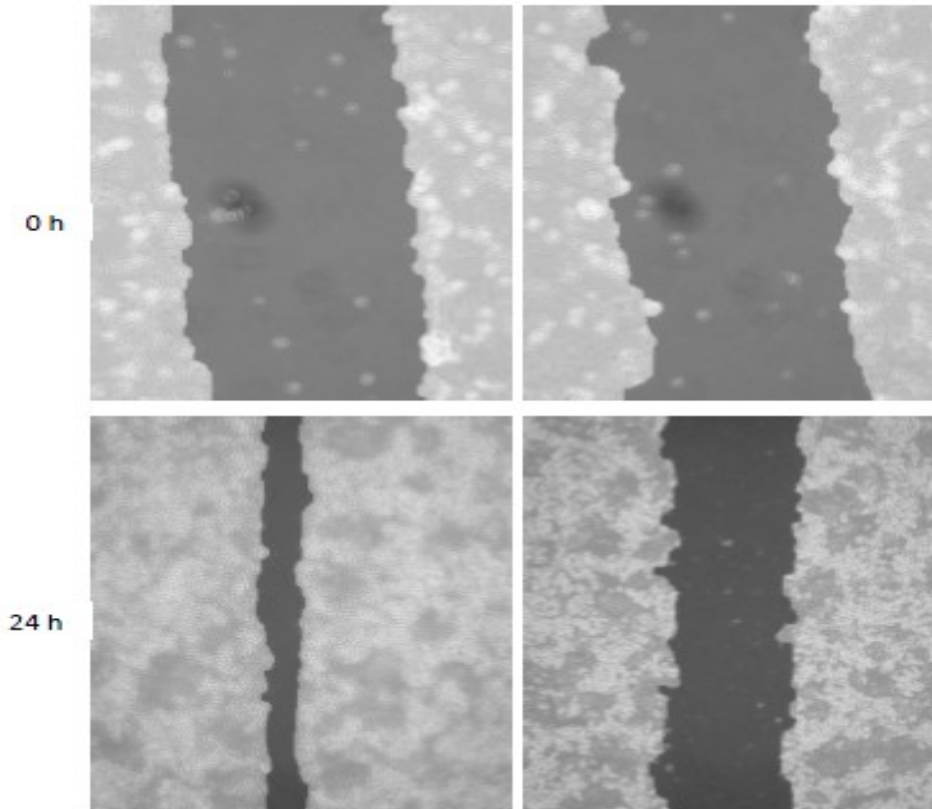


In vitro funkční analýza miR-215 u kolorektálního karcinomu: ovlivnění migrační schopnosti nádorových buněk

DLD-1

pre-mock 10 nM

pre-miR-215 10 nM



Identification and functional screening of microRNAs
highly deregulated in colorectal cancer

P. Faltejskova, M. Svoboda, K. Srutova, *et al.*

J Cell Mol Med, 2012



↓ 50%

- Experimentální potvrzení predikovaných cílových genů miR-215 (ZEB1, ZEB2)
- Validace pozorování získaných in vitro na in vivo myším modelu
- Vývoj nanočástic (železité nanočástice konjugované s chitosanem) jako delivery systému pro podání terapeutických miRNA in vivo



MikroRNA jako terapeutické cíle

Seznam mikroRNA které jsou testovány jako potenciální terapeutické cíle

MikroRNA	Indikace	Společnost	Validace cíle	Optimalizace vůdčí struktury	Pre-klinické testování	Fáze 1	Fáze 2
Inhibiční strategie							
miR-122*	hepatitida typu C	Santaris Pharma	X	X	X	X	X
miR-21	multiformní glioblastom	Regulus Therapeutics	X	X	X		
miR-21	hepatocelulární karcinom	Regulus Therapeutics	X	X	X		
miR-21	renální fibróza	Regulus Therapeutics	X	X	X		
miR-33a/b	ateroskleróza	Regulus Therapeutics	X	X	X		
miR-208/miR-499	chronické srdeční selhání	miRagen Therapeutics	X	X	X		
miR-15/miR-195	remodelace po infarktu myokardu	miRagen Therapeutics	X	X	X		
miR-451	polycythemia vera	miRagen Therapeutics	X	X	X		
Substituční strategie							
miR-34	hepatocelulární karcinom fáze 1 – první čtvrtletí 2013	miRNA therapeutics	X	X	X		
miR-34	nemalobuněčný karcinom plic	miRNA therapeutics	X	X	X		
miR-34	karcinom prostaty	miRNA therapeutics	X	X	X		
let-7	nemalobuněčný karcinom plic	miRNA therapeutics	X	X	X		
miR-29	srdeční fibróza	mirage Therapeutics	X	X			

Miravirsen (SPC3649)

miR-122

Hepatitis C



Miravirsen (SPC3649)

A New Treatment Targeting Hepatitis C

MicroRNAs as therapeutic targets

Miravirsen, anti-miR-122

Léčivou látkou je nový LNA-antimiRTM oligonukleotid s přiřazeným mezinárodním nechráněným názvem (INN) miravirsen sodium. Léčivá látka je vyráběna jako sodná sůl. Miravirsen sodium je hygroskopický, bílý až lehce nažloutlý prášek rozpustný ve vodě. Sumární vzorec a molekulová hmotnost jsou uvedeny níže.

Sumární vzorec (protonovaná forma): $C_{156}H_{181}N_{49}Na_{14}O_{83}P_{14}S_{14}$
($C_{156}H_{195}N_{49}O_{83}P_{14}S_{14}$)

Molekulová hmotnost (protonovaná forma): 5,274 8 g/mol (4,967 g/mol)

Název molekuly: SPC3649

INN: miravirsen sodium

Miravirsen je 15nukleotidový (15-mer) fosforothioatový oligonukleotid, tvořený -D-oxy-LNA a DNA monomery. Molekula miravirsenu obsahuje osm nukleotidů s LNA modifikací a sedm DNA nukleotidů uspořádaných v následující sekvenci:

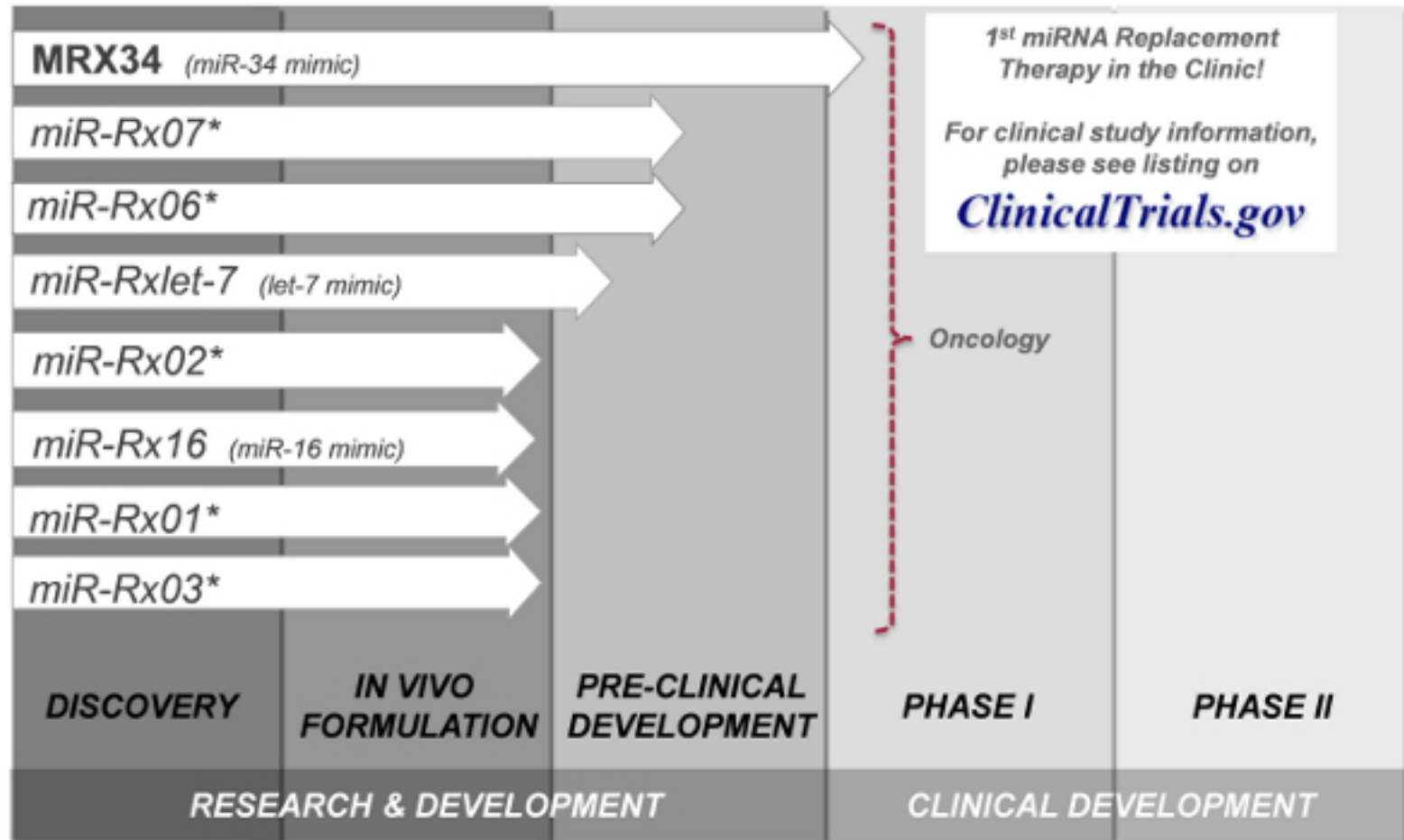
5'- mC c A t t G T c a mC am C t mC mC -3'

Velká písmena označují nukleotidy s LNA modifikací (mC značí LNA-5-methylcytidin) a malými písmeny jsou označeny nukleotidy DNA. LNA modifikace významně zvyšuje vazebnou afinitu molekuly k cílové miR-122 a také její biologický poločas. Všechny vazby mezi nukleotidy u miravirsenu, celkem 14, mají charakter fosforotioátu, což zlepšuje farmakokinetické vlastnosti oligonukleotidu.

Delivering on the promise of RNA medicines today

MikroRNA jako terapeutické cíle: from bench to bedside

MRX34 – hepatocelulární karcinom



* miRNA mimics undisclosed

Poděkování

CEITEC, Skupina Molekulární onkologie II



postdocs	doc. RNDr. Ondřej Slabý, PhD Mgr. Martina Rádová, PhD MUDr. Marek Svoboda, PhD MUDr. Julie Bienertová-Vašků, PhD Nithyananda Thorenoor, PhD
PhD studenti	Mgr. Renata Héžová Mgr. Jiří Šána Mgr. Petra Faltejsková Mgr. Hana Mlčochová Mgr. Robert Iliev Mgr. Zbyněk Čech Mgr. Jana Merhautová Mgr. Andrej Bešše Mgr. Jitka Mlčochová Mgr. Jaroslav Juráček
Pregraduální studenti	Bc. Anna Čurďová Bc. Renata Kleinová Bc. Zdeňka Kosařová Bc. Soňa Klusová Bc. Zuzana Ožanová

