

Jennifer Mytych

Niewielkie, a znaczące – rola mikroRNA w powstawaniu, detekcji oraz leczeniu nowotworów na przykładzie nowotworu żołądka

Small but significant- the role of microRNAs in the formation, detection and treatment of cancer based on gastric cancer

Zakład Genetyki, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego

STRESZCZENIE

W dobie intensywnego rozwoju chorób cywilizacyjnych, m.in. nowotworów żołądka, niezbędne jest zaprojektowanie markerów, które umożliwią wczesne ich wykrycie, pozwolą na szybkie podjęcie leczenia oraz zapobiegą zwiększeniu liczby zgonów. Taką potencjalną możliwością są mikroRNA, czyli krótkie cząsteczki RNA modulujące aktywność ściśle określonych fragmentów RNA i odgrywające szczególną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Wpływając na proliferację, cykl komórkowy oraz apoptozę komórek nowotworowych odgrywają znaczącą rolę również w nowotworzeniu. Wykrywalne w osoczu odstępstwa od ich normalnego poziomu, związane z każdym z etapów rozwojowych nowotworu mogą czynić je skutecznymi i nieinwazyjnymi biomarkerami, pozwalającymi nie tylko na detekcję i rozpoznawanie nowotworów, ale także na ich predykcję. Dalsze poznanie ich funkcji i właściwości może owocować odkryciem skutecznych leków do walki z nowotworami.

Słowa kluczowe: mikroRNA, biomarker, kancerogeneza, nowotwór żołądka

Postępujące uprzemysłowienie oraz stały rozwój cywilizacyjny są przyczyną gwałtownego wzrostu ilości czynników powodujących bezpośrednie zagrożenie dla życia oraz zdrowia ludzkiego. Wszechobecnie występujące czynniki biologiczne (np. wirusy), chemiczne (np. azbest) oraz fizyczne (np. promieniowanie rentgenowskie) mogą indukować, poprzez oddziaływanie i modyfikacje materiału genetycznego komórki, powstawanie nowotworów – jednej z najintensywniej rozwijającej się choroby cywilizacyjnej. Kancerogeneza lub inaczej nowotworzenie

ABSTRACT

In the era of intensive development of lifestyle diseases such as stomach cancer, it is crucial to design markers that enable their early detection, allow rapid introduction of treatment and prevent the increase in the number of deceases. Potential possibility is microRNAs, short RNA molecules which modulate the activity of specific fragments of RNA and play an important role in many physiological and pathological processes. Affecting cell proliferation, cell cycle and apoptosis of cancer cells also play a significant role in neoplasia. Detectable levels of derogation from the regular level associated with each of the stages of tumor development may make them effective and non-invasive biomarkers, allowing not only for early detection and identification of cancer's type, but also on their prediction. Further understanding of their functions and properties can result in the discovery of effective methods of cancer treatment.

Key words: microRNA, biomarker, carcinogenesis, gastric cancer

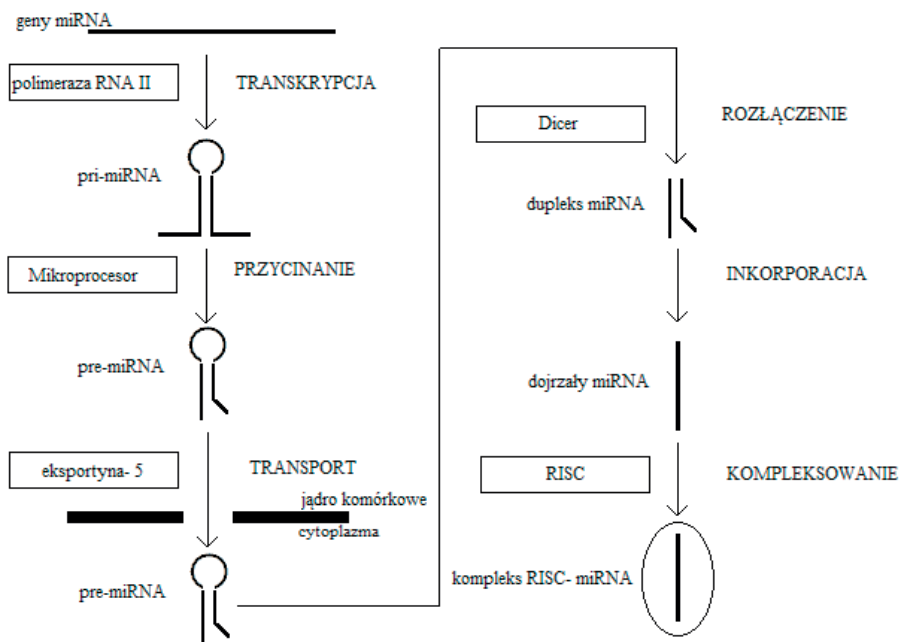
to długotrwały proces prowadzący do powstawania nowotworu. Związany on jest ze zmianami na poziomie komórkowym, a w szczególności dotyczy modyfikacji genomowych i epigenetycznych [1]. Mechanizm przemiany komórki prawidłowej w nowotworową nie został do dnia dzisiejszego dokładnie poznany. Wiadomo jednak, że inicjacją tego procesu jest wywołana przez kancerogeny aktywacja protoonkogenów (genów powszechnie występujących w prawidłowych komórkach i regulujących śmierć komórek) oraz przekształcenie ich w onkogeny

[2] prowadzące do niekontrolowanych podziałów (prolifracji), utraty zróżnicowania funkcjonalnego oraz do transformacji nowotworowej komórki. Wczesne wykrycie zmian nowotworowych oraz skuteczna kuracja daje ogromną szansę na zupełną eliminację komórek nowotworowych i całkowite wyleczenie. Obecnie wiele badań opiera się na opracowaniu skutecznych metod diagnostyki nowotworów w ich najwcześniejszym stadium rozwojowym. Obiecującym, perspektywicznym kierunkiem rozwoju tej dziedziny są mikroRNA (miRNA), czyli krótkie jednoniciowe odcinki kwasu rybonukleinowego (RNA) występujące w komórkach eukariotycznych. Po raz pierwszy zostały one opisane w 1993 roku przez zespół Ambros'a. Ich badania nad *C. elegans* pozwoliły na stwierdzenie, iż ilość syntetyzowanego białka LIN14 jest uzależniona od niewielkiego RNA kodowanego przez gen *lin-4* [3]. Od tamtej chwili do dnia dzisiejszego oszacowano, iż u człowieka obecnych jest około 1000 genów miRNA regulujących w przybliżeniu 30% wszystkich genów kodujących białka [4]. Wykrywalne zaburzenia ekspresji bądź struktury miRNA, z uwagi na ich wpływ w procesach proliferacji, różnicowania oraz apoptozy komórek, mogą odgrywać znaczącą rolę w powstawaniu oraz diagnostyce nowotworowej. Ponadto deregulacja określonego miRNA jest związana ze sprecyzowanym rodzajem nowotworu, dlatego też te niewielkie cząsteczki stanowią potencjalną metodę w klasyfikacji oraz prognozowaniu nowotworów [5].

miRNA- biogeneza, funkcje, właściwości

miRNA to krótkie, regulatorowe cząsteczki RNA o długości około 18-24 nukleotydów, modulujące aktywność ściśle określonych fragmentów RNA i odgrywające szczególną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych [6]. Mogą działać one jako onkogeny lub geny supresorowe guza. Niekiedy jednak, zależnie od typu nowotworu oraz sposobu ekspresji, mogą pełnić obie funkcje. Dobrym przykładem może być miR-125b, który w przypadku raka jajników, występując w zmniejszonej ilości, wpływa na hamowanie proliferacji komórek i rozwoju cyklu komórkowego [7]. Natomiast w przypadku raka prostaty sprzyja proliferacji oraz inwazji komórek nowotworowych [8]. Proces biogenezy, czyli tworzenia miRNA odbywa się zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie. Rozpoczyna się on od transkrypcji genów miRNA przez enzym polimerazę RNA II, w wyniku czego powstaje pri-mikroRNA (ok. 70 nukleotydów) o kształcie „spinki do włosów”. Kolejnym etapem jest dojrzewanie powstałego pri-mikroRNA przy udziale kompleksu Mikroprocesora (rybonukleaza Drosha + białko wiążące podwójną nić RNA- DGCR8). Powstały pre-mikroRNA jest transportowany do cytoplazmy za pomocą białka eksportyna-5. Następnie endonukleaza Dicer umożliwia powstanie dupleksu miRNA o długości około 22 nukleotydów, który zostaje rozdzielony

na dwie nici, a jedna z nich inkorporuje do kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex) [9]. Kompleks ten skierowany zostaje przez miRNA do docelowego mRNA, z którym hybrydyzuje. Efekt tego połączenia może być dwójaki: rozcięcie mRNA lub zablokowanie translacji i uzależniony jest od stopnia niedopasowania pomiędzy miRNA oraz jego celem, czyli mRNA [10]. Uproszczony schemat procesu biogenezy miRNA został przedstawiony na rycinie 1. Główną funkcją miRNA jest regulacja genów poprzez oddziaływanie z mRNA. Fakt, że miRNA są komplementarne do więcej niż jednego fragmentu mRNA (zwykle w pobliżu 3'UTR), a także brak konieczności 100% dopasowania w trakcie hybrydyzacji sprawia, że wywierają one wpływ na wiele mechanizmów komórkowych. W kontekście nowotworzenia najistotniejsze znaczenie mają zmiany w kontroli proliferacji komórek, ich różnicowania, wzrostu i apoptozy. Przykładowo, *let-7* wywołuje powstawanie guza poprzez regulację transkryptów KRAS i NRAS [11] (grupa białek sprawująca kontrolę nad takimi procesami jak integracja cytoszkieletu aktynowego, migracje komórkowe, adhezje komórkowe, a także proliferacja komórkowa), miR-125b odgrywa ważną rolę w dyferencjacji ludzkich komórek nerwowych [12], a miR-29 reguluje w znaczący sposób apoptozę komórek poprzez utratę zdolności i właściwości mitochondriów (modyfikacja genu BCL-2) [13]. Ponadto wykazano, że miR-17-92 zachowuje się jak swoisty przełącznik pomiędzy proliferacją a apoptozą [14], co potwierdza fakt, że niewielkie, subtelne zmiany mogą stanowić podstawę do kancerogenezy. Niektóre miRNA mogą także powodować modyfikacje histonów oraz metylację DNA, czyli zmiany na poziomie epigenetycznym [15], również prowadzące do nowotworzenia. Ogólny wzrost poziomu miRNA jest najczęściej obserwowany przy większości nowotworów, niekiedy jednak znaczący jest również zaniżony poziom miRNA. Lu i jego współpracownicy jako pierwsi zaobserwowali tę zależność. Dokonali analizy poziomu ekspresji 217 ludzkich i mysich miRNA w przypadku 334 nowotworów, nowotworowych linii komórkowych oraz normalnych tkanek, wykazując, że w obecności nowotworu poziom ich ekspresji jest znacznie zaniżony, jak również udowodnili, że ma to decydujący wpływ na stopień zróżnicowania komórek [5]. Zmieniony poziom ekspresji określonego miRNA (podwyższony lub obniżony) jest ściśle uzależniony od linii i stadium rozwojowego komórki [16]. Właściwość ta wpływa na typ nowotworu, jego histologiczny podtyp oraz stopień rozwoju. Ostatnie wyniki sugerują, że miRNA mogą być uwalniane podczas procesu patologicznego do krwiobiegu, nie są jednak związane z komórkami, lecz znajdują się w mikropełcherzykach, egzosomach, mikrocząsteczkach lub ciałkach apoptotycznych, gdzie chronione są przed szkodliwym działaniem endogennych RNaz [17], co czyni je stabilnymi biomarkerami. Wykrycie we krwi



Ryc. 1. Proces biogenezy miRNA

Fig. 1. MiRNA biogenesis process

zmienionych poziomów określonych miRNA pozwala za zdiagnozowanie danego typu nowotworu. Niekiedy jednak, jeden miRNA może być markerem dla więcej niż jednego nowotworu. Przykładem takiej sytuacji może być podwyższony poziom miRNA -21 zarówno w przypadku glejaków, jak i nowotworu żołądka [18]. W tabeli 1 zaprezentowano przykłady zmienionego profilu ekspresji miRNA w kilku typach nowotworów.

miRNA a rozwój nowotworu żołądka i jego detekcja

Nowotwór żołądka pod względem częstości występowania nowotworów złośliwych w Polsce plasuje się na 5 miejscu w przypadku mężczyzn i na 9 w przypadku kobiet. Przeżywalność 5-letnia we wszystkich stadiach zaawansowania to około 10-25%, jednak wykrycie we wczesnym stopniu rozwojowym daje 90% szansę na przeżycie [30]. Dlatego właśnie, wczesna detekcja komórek nowotworowych jest kluczowym elementem w zwiększeniu przeżywalności chorych. Ponadto, diagnostyka raka żołądka opiera się głównie na badaniu gastroscopowym, radiologicznym, laparoskopowym lub tomograficznym [31]. Metody te są jednak bolesne lub/i kosztowne. Stąd też, cyrkulujące we krwi miRNA niosą ze sobą ogromny potencjał jako biomarkery sprzyjające bezinwazyjnemu, skutecznemu i stosunkowo tanemu wykrywaniu wczesnych stadiów rozwojowych nowotworu żołądka. W tabeli 2 przedstawiono miRNA, których zwiększona lub zmniejszona ilość w krążącej krwi może stanowić sygnał rozwijającego się nowotworu żołądka.

Kancerogeneza żołądkowa jest wieloetapowym procesem powodowanym między innymi przez zmienioną ekspresję miRNA. Jak dotąd dokładny mechanizm tych

zmian nie został poznany, jednak przedstawiono dwie prawdopodobne przyczyny tego zjawiska: zmiany transkrypcyjne oraz epigenetyczne miRNA. Jak już wcześniej wspomniano, większość miRNA jest transkrybowana przez polimerazę RNA II, dlatego właśnie czynniki działające na promotor miRNA mogą wpływać na ich poziom ekspresji. Badania przeprowadzone przez Liao i wsp. wykazują, że ETS2 (czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek ETS, do której należą aktywatory oraz represory transkrypcji) stanowi potencjalny represor miR-196b, którego podwyższony poziom jest bardzo często obserwowany w przypadku nowotworów żołądka. Na powierzchni promotora miR-196b zaobserwowano 3 ugrupowania prawdopodobnie zdolne do wiązania z tym represorem. Mutacje w obrębie miejsc wiążących geny ETS2 powodują zablokowanie ich właściwości represyjnych oraz nadekspresję miR-196b [35]. Z kolei czynnik transkrypcyjny E2F1 powoduje bezpośrednią aktywację i ekspresję zespołu miR-106b-25. Interesujące jest, że ekspresja tegoż czynnika kontrolowana jest przez miR-106b oraz miR-93, czyniąc cały ten proces regulowanym na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [37]. Zatem niewielka nieprawidłowość w tych przemianach prowadząca do zwiększonej ekspresji lub jej zahamowania któregoś z czynników może stanowić podstawę nowotworzenia. Również epigenetyczne zmiany wpływają na poziom ekspresjonowania miRNA. Podstawowy mechanizm transkrypcji miRNA jest zasadniczo podobny do genów kodujących białka, stąd hipermetylacja lub demetylacja promotora supresorowego miRNA może doprowadzić do powstania nowotworu i jego progresji. Tsai i wsp. w swej pracy zaprezentowali, że znacząca nadekspresja ogromnego zespołu miRNA (C19MC)

Tab. 1. Zmiany profilu ekspresji mikroRNA w przypadku niektórych nowotworów

Tab. 1. Changes in microRNA expression profiles in human cancers

Typ nowotworu	MikroRNA	Cytowanie
Rak jądra	miR-372, miR-373	[19]
Rak płuc	miR-21, miR-191, miR-205, miR-210, miR-214	[1]
Glejak wielopostaciowy	miR-21	[1]
Rak piersi	miR-125b, miR-145, mi-21, miR-155	[20]
Rak trzustki	miR-155, miR-21, miR-221, miR-222, miR-376a, miR-301	[21]
Rak jajnika	miR-200a, miR-141, miR-200c, miR-200b, miR-199a, miR-140, miR-145, miR-125b1	[22]
Rak prostaty	miR-125b, miR-145, miR-224, miR-23b, miR-145, miR-222	[23]
Rak skóry	miR-34b miR-203, miR-205, miR-200c	[24] [25]
Rak jelita grubego	let-7b, miR-15b, miR-181b, miR-191, miR-200c, miR-26a, miR-27a, miR-30c	[26]
Rak wątroby	miR-145, miR-198, miR-222, miR-224, miR-301	[27]
Rak nerki	miRNA-424, miRNA-203, miRNA-32	[28]
Rak tarczycy	miR-221, miR-222, miR-16-1, miR-15a, miR-155	[29]

ulokowanego na ludzkim chromosomie 19 bezpośrednio związana jest z aktywnością czynnika demetylującego 5-aza-2'-deoksycytdyny. Dalsze badania pozwoliły im na stwierdzenie, iż aktywacja ekspresyjnego wzorca tegoż właśnie zespołu w komórkach nowotworowych żołądka wywołana została poprzez demetylację regionu bogatego w wyspy CpG (odcinki promotorów housekeeping genes), zlokalizowanego w odległości ok. 17.6 kb od C19MC [38]. Wyspy CpG w większości przypadków nie są metylowane. Ich metylacja w regionach promotorowych często powoduje wyciszenie niektórych genów supresorowych, prowadząc do powstania nowotworu [15]. Hipermetylacja tego samego regionu powoduje znaczące wyciszenie miR-34b i miR-34c, co zostało zaobserwowane w większości przypadków nowotworów żołądka [36]. Bardziej szczegółowe wnioski przyniosły eksperymenty prowadzone nad miR-9, którego ekspresja pochodzi z 3 genomowych loci zlokalizowanych na 1,5 i 15 chromosomie. Modyfikacja każdego z tych loci może powodować zmianę ekspresji całego miR-9. Zidentyfikowano trzy regiony bogate w wyspy CpG ulokowane w przypuszczalnych miejscach inicjacji transkrypcji miR-9-1, miR-9-2 i miR-9-3, których aktywność może być kontrolowana przez metylację DNA. Metoda COBRA pozwoliła stwierdzić całkowitą hipermetylację promotora miR-9-1 oraz zwiększoną metylację w przypadku miR-9-2 oraz miR-9-3 w tkankach nowotworowych w porównaniu do tkanek zdrowych, co przyczyniło się do dramatycznej redukcji ekspresji miR-9. Ponadto hipermetylacja określonego locus miR-9 nadaje nowotworowi zupełnie różne właściwości i translacyjne konsekwencje w rozwoju choroby. I tak na przykład hipermetylacja miR-9-3 związana jest ze złymi wynikami limfatycznymi oraz zmniejszoną przeżywalnością [39]. Ponadto nie tylko rodzaj, ale także ilość wykrytego

miRNA może mieć znaczący wpływ na dalsze leczenie nowotworu żołądka. Przeprowadzono badania na 161 tkankach nowotworowych zdiagnozowanych w różnych stadiach rozwojowych (stadium I – 29, stadium II – 31, stadium III – 51, stadium IV – 50). W porównaniu z innymi parametrami klinikopatologicznymi nadekspresja miR-107 wykazała istotny związek z zaawansowaniem nowotworu, jego stadium rozwojowym oraz z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Analizę Kaplana – Meiera przeprowadzono w kontekście czasu przeżycia bez objawów choroby (DFS- disease-free survival) oraz przeżycia całkowitego (OS- overall survival). Zaprezentowane wyniki jednoznacznie wskazują, iż parametry te były znacznie gorsze u osób z wysoką ekspresją miR-107 niż u osób z niską ekspresją. Jednocześnie wieloczynnikowa analiza Coxa potwierdziła fakt, iż ekspresja miR-107 w nowotworowych tkankach żołądka była niezależnym czynnikiem prognostycznym dla DFS i OS [40]. Jak to już zostało wcześniej wspomniane, miRNA mogą przyczyniać się do powstawania zmian w procesach takich jak proliferacja komórek, ich migracja, inwazja i hamowanie apoptozy. Wykorzystanie tych faktów umożliwi nie tylko wykrywanie zmian nowotworowych, lecz również projektowanie nowych terapii antynowotworowych. Przykładowo, poziom miR-126 w tkankach nowotworowych żołądka jest znacznie obniżony w porównaniu do zdrowych tkanek. Ekspresja tegoż miRNA silnie hamuje wzrost komórki poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 in vitro, jak również in vivo [41]. Celem jego działalności inhibicyjnej jest białko Crk, aktywujące kinazy Erk/MAP- aktywatory czynników transkrypcji genów, m. in. ELK1 odpowiedzialnego za ekspresję genów promujących wzrost komórki. Inhibicja miR-372, którego podwyższony poziom jest notowany w sytuacji nowotwo-

Tab. 2. miRNA charakterystyczne dla nowotworu żołądka ([32]–[36])

Tab. 2. miRNA characteristic of gastric cancer ([32]–[36])

Podwyższony poziom		Obniżony poziom	
miR-221,	miR-744,	miR-128b,	miR-129,
miR-376c,	miR-191,	miR-148,	miR-433,
miR-27a,	miR-27b,	miR-409,	miR-9,
miR-107,	miR-222,	miR-34b,	miR-34c,
miR-21,	miR-34b,	let-7g, let-7e,	miR-15b,
miR-34c,	miR-128a,	miR-16,	miR-17-5b,
miR-214,	let-7e,	miR-20a,	miR-23b,
miR-302b,	miR-492		

ru żołądka, przy użyciu antysensownych oligonukleotydów miR-372 prowadzi do zatrzymania cyklu w G2/M fazie, hamując rozwój i wywołując apoptozę poprzez wzmożoną aktywność genu supresorowego LATS2 [42]. Prawdopodobne jest również, iż miR-107 jest regulatorem ekspresji cyklinozależnej kinazy 6. Zatrzymując cykl w fazie G1, hamuje jej aktywność oraz inwazję komórek nowotworowych [43]. Podobne działanie ma miR-137, którego epigenetyczne wyciszenie (jego zaniżona ilość w tkankach raka żołądka wywołana jest hipermetylacją promotora) indukuje aktywację innej kinazy- Cdc42. Przywrócenie do ustroju miR-137 inaktywuje Cdc42 oraz sprzyja apoptozie i zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1 [44]. Białko p53 jest jednym z czynników transkrypcyjnych odgrywających znaczącą rolę podczas aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki. Komórki nowotworowe dokonują jego dezaktywacji, co umożliwia im uzyskanie nieśmiertelności. Funkcjonalność p53 w komórkach nowotworowych może zostać wznowiona poprzez przywrócenie odpowiedniego poziomu miR-34, który bezpośrednio oddziałuje na Bcl-2, czyli czynnik blokujący apoptozę, którego nadekspresja obserwowana jest w wielu nowotworach, włącznie z nowotworem żołądka [45]. Ciekawą perspektywę w hamowaniu tworzenia przerzutów wykryto w blokowaniu aktywności genu HMGA2 (high mobility group A2) przez let-7. HMGA2 zawiera niehistonowe białko jądrowe zmieniające architekturę chromatyny, jego natężona ekspresja obserwowana jest w szczególności w komórkach guzowych z translokacją w chromosomie 12. Grupa let-7 (let-7a, let-7b oraz let-7c) wpływa negatywnie na ekspresję HMGA2, hamując rozwój nowotworu żołądka i jego przerzutów [46]. Niedawne badania nad linią komórkową SGC-7901 (nowotwór

żołądka) wykazały, iż poziom miR-409-3p w tkankach nowotworowych jest znacznie obniżony. Jego podwyższenie wywołuje proliferację oraz apoptozę komórek zarówno in vitro, jak i in vivo. Ponadto, targetem tego miRNA jest gen PHF10, co sugeruje, że miR-409-3p może działać jako supresor w przypadku nowotworu żołądka i jego antynowotworowa aktywność może skupiać się na inhibicji PHF10 [47]. Powyższe przykłady udowadniają, że te niewielkie cząsteczki krążące w osoczu, mające ogromne znaczenie w większości procesów związanych z powstawaniem jak i rozwojem nowotworów żołądka, mogą stanowić narzędzie służące nie tylko do wykrywania, ale także do leczenia nowotworów.

Wnioski

MiRNA zostały niedawno odkryte, jednak badania nad ich właściwościami i możliwymi zastosowaniami wciąż trwają i niosą ze sobą ogromne perspektywy. Jednym z aspektów ich wykorzystania jest dziedzina nowotworów, m. in. nowotworu żołądka. Zaburzenia ich właściwości bądź struktury ze względu na znaczące funkcje pełnione w organizmie mogą przyczyniać się do kancerogenezy. Zmienne poziomy ekspresji miRNA mogą być wykrywalne we krwi chorych. Wiele badań potwierdza, że określone miRNA związane są nie tylko z typem nowotworu, ale i również jego stadium rozwojowym. Reasumując, odkrycia te w niedalekiej przyszłości mogą skutkować zaprojektowaniem skutecznego, nieinwazyjnego molekularnego biomarkera służącego do detekcji nowotworów, ich prognozowania, a także monitoringu efektów leczenia. Dalsze badania nad ich specyfiką z kolei mogą umożliwić wytworzenie skutecznych leków do walki z rozwijającymi się nowotworami.

Piśmiennictwo / References

1. Wittmann J, Jack HM. *Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1806(2):200-7.
2. Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. *Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis*. *Environmental Health Perspectives*. 1992;98:13-24.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
4. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. *Nature Genetics*. 2005;37(7):766-70.
5. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*. 2005;435(7043):834-8.
6. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. *Circulating microRNAs as*

- stable blood-based markers for cancer detection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(30):10513-8.
7. Guan Y, Yao H, Zheng Z, Qiu G, Sun K. *MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation*. International Journal of Cancer Journal International du Cancer. 2011;128(10):2274-83.
 8. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. *Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer*. Oncogene. 2008;27(12):1788-93.
 9. Murchison EP, Hannon GJ. *miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery*. Current Opinion in Cell Biology. 2004;16(3):223-9.
 10. Du T, Zamore PD. *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development. 2005;132(21):4645-52.
 11. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell. 2005;120(5):635-47.
 12. Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, Um M, et al. *MiR-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets*. Molecular and cellular Biology. 2009;29(19):5290-305.
 13. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, et al. *Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma*. Hepatology. 2010;51(3):836-45.
 14. Jiang P, Rao EY, Meng N, Zhao Y, Wang JJ. *MicroRNA-17-92 significantly enhances radioresistance in human mantle cell lymphoma cells*. Radiat Oncol. 2010;5:100.
 15. Chuang JC, Jones PA. *Epigenetics and microRNAs*. Pediatric Research. 2007;61(5 Pt 2):24R-9R.
 16. Meltzer PS. *Cancer genomics: small RNAs with big impacts*. Nature. 2005;435(7043):745-6.
 17. Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. *Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks*. Cardiovascular Research. 2012;93(4):555-62.
 18. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nature Cell Biology. 2008;10(12):1470-6.
 19. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2007;604:17-46.
 20. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Research. 2005;65(16):7065-70.
 21. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. International Journal of Cancer Journal International du Cancer. 2007;120(5):1046-54.
 22. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. Cancer Research. 2007;67(18):8699-707.
 23. Gandellini P, Folini M, Zaffaroni N. *Emerging role of microRNAs in prostate cancer: implications for personalized medicine*. Discovery Medicine. 2010;9(46):212-8.
 24. Mazar J, Khaitan D, DeBlasio D, Zhong C, Govindarajan SS, Kopanathi S, et al. *Epigenetic regulation of microRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma*. PLoS One. 2011;6(9):e24922.
 25. Xu Y, Brenn T, Brown ER, Doherty V, Melton DW. *Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors*. British Journal of Cancer. 2012;106(3):553-61.
 26. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, et al. *Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer*. Biomarker Insights. 2006;2:113-21.
 27. Varnholt H. *The role of microRNAs in primary liver cancer*. Annals of Hepatology. 2008;7(2):104-13.
 28. Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. *MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes*. International Journal of Oncology. 2009;35(1):109-14.
 29. Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. *MicroRNA expression profiles in thyroid tumors*. Endocrine Pathology. 2009;20(2):85-91.
 30. Grzebieńiak Z, Kurkiewicz E, Rudno-Rudzinska J, Kielan W. *Zaawansowany nowotwór żołądka leczony chirurgicznie z istotnymi powikłaniami*. [http://www.przypadkimedyczne.pl/czasopismo/papers/1-2012-full.pdf\(10.05.2012\)](http://www.przypadkimedyczne.pl/czasopismo/papers/1-2012-full.pdf(10.05.2012)).
 31. Halvorsen RA, Jr., Yee J, McCormick VD. *Diagnosis and staging of gastric cancer*. Seminars in Oncology. 1996;23(3):325-35.
 32. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. *microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer*. International Journal of Oncology. 2009;34(2):537-42.
 33. Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, et al. *Identification of Serum MicroRNAs as Novel Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Gastric Cancer*. PLoS One. 2012;7(3):e33608.
 34. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. *Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis*. The Lancet Oncology. 2010;11(2):136-46.
 35. Liao YL, Hu LY, Tsai KW, Wu CW, Chan WC, Li SC, et al. *Transcriptional regulation of miR-196b by ETS2 in gastric cancer cells*. Carcinogenesis. 2012;33(4):760-9.
 36. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, et al. *Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect*. Carcinogenesis. 2010;31(12):2066-73.
 37. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, et al. *E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-*

- dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(3):272-86.
38. Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, Lin WC. *Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells*. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*. 2009;4(8):587-92.
39. Tsai KW, Liao YL, Wu CW, Hu LY, Li SC, Chan WC, et al. *Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer*. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*. 2011;6(10):1189-97.
40. Inoue T, Iinuma H, Ogawa E, Inaba T, Fukushima R. *Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer*. *Oncology Reports*. 2012;27(6):1759-64.
41. Feng R, Chen X, Yu Y, Su L, Yu B, Li J, et al. *miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer*. *Cancer Letters*. 2010;298(1):50-63.
42. Cho WJ, Shin JM, Kim JS, Lee MR, Hong KS, Lee JH, et al. *miR-372 regulates cell cycle and apoptosis of ags human gastric cancer cell line through direct regulation of LATS2*. *Molecules and Cells*. 2009;28(6):521-7.
43. Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. *miR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells*. *Med Oncol*. 2011.
44. Chen Q, Chen X, Zhang M, Fan Q, Luo S, Cao X. *miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42*. *Digestive Diseases and Sciences*. 2011;56(7):2009-16.
45. Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, et al. *Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres*. *BMC Cancer*. 2008;8:266.
46. Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. *Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family*. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(8):2334-40.
47. Li C, Nie H, Wang M, Su L, Li J, Yu B, et al. *MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer*. *Cancer Letters*. 2012;320(2):189-97.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Jennifer Mytych
Zakład Genetyki
Zamiejscowy Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Rzeszowskiego
ul. Sokołowska 26, 36-100 Kolbuszowa
tel. 503699880
jennifermtych@wp.pl