



II. INTERNÍ  
GASTROENTEROLOGICKÁ  
KLINIKA

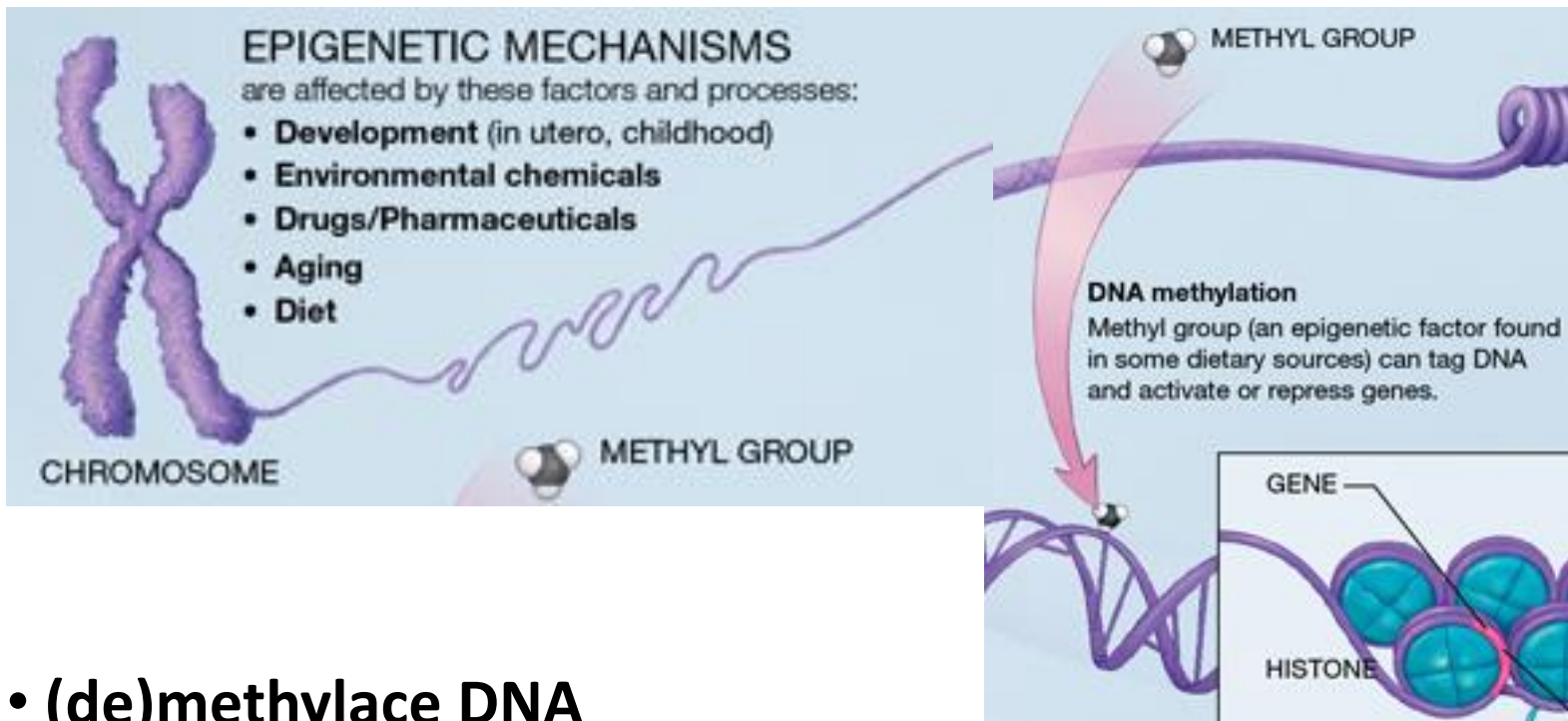


# Role mikroRNA v patofyziologii onemocnění

Tomáš Soukup

II. interní gastroenterologická klinika,  
Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice  
Hradec Králové

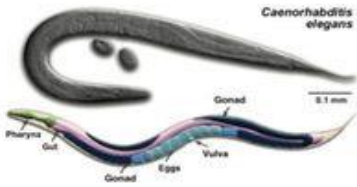
# Epigenetické faktory ovlivňují expresi genů



- **(de)methylace DNA**
- **modifikace histonů** – proteiny s kladně nabitým nábojem reverzibilně vázané na DNA
- **mikroRNA**

## 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.

Nature, 1998

**2000-2001 Hannon**  
-Ago2, Dicer

**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

# mikroRNA – aktuální téma

NCBI Resources ▾ How To ▾

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed ▾ microRNA

Create RSS Create alert Advanced

## Results by year



# Ribonukleové kyseliny (RNA)

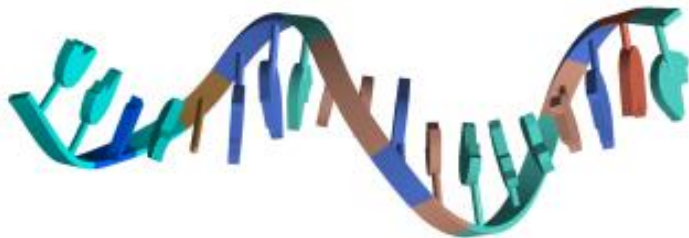
- **Messenger RNA (mRNA)** (kódující) – přenos informace  
– matrice pro vznik bílkovin – podíl genomu  
1.5-2%
- **Malé nekódující RNA** (sncRNA – small non-coding RNAs), podskupina **mikroRNA** (objeveno přes 2 tisíce)

## **Funkce mikroRNA:**

- regulaci genové exprese
- vývoj embrya tkání a orgánů
- udržování homeostázy
- **patogeneze onemocnění**

# **mikroRNA regulují expresi genů**

- **„zralé“ mikroRNA - jsou jednovláknové řetězce o délce 22-24 nukleotidů**
  - jsou senzitivní k vnějším faktorům



# Úvodní informace o mikroRNA

- Skupina **mikroRNA** byla identifikována v genomech **rostlin i živočichů** (konzervované mikroRNA)
- Předpokládá se, že geny pro mikroRNA představují asi **1-2 %** všech predikovaných genů.
- mikroRNA vznikají transkripcí z genů v DNA, ale následně **nedochází k jejich translaci v protein.**

# Funkce mikroRNA

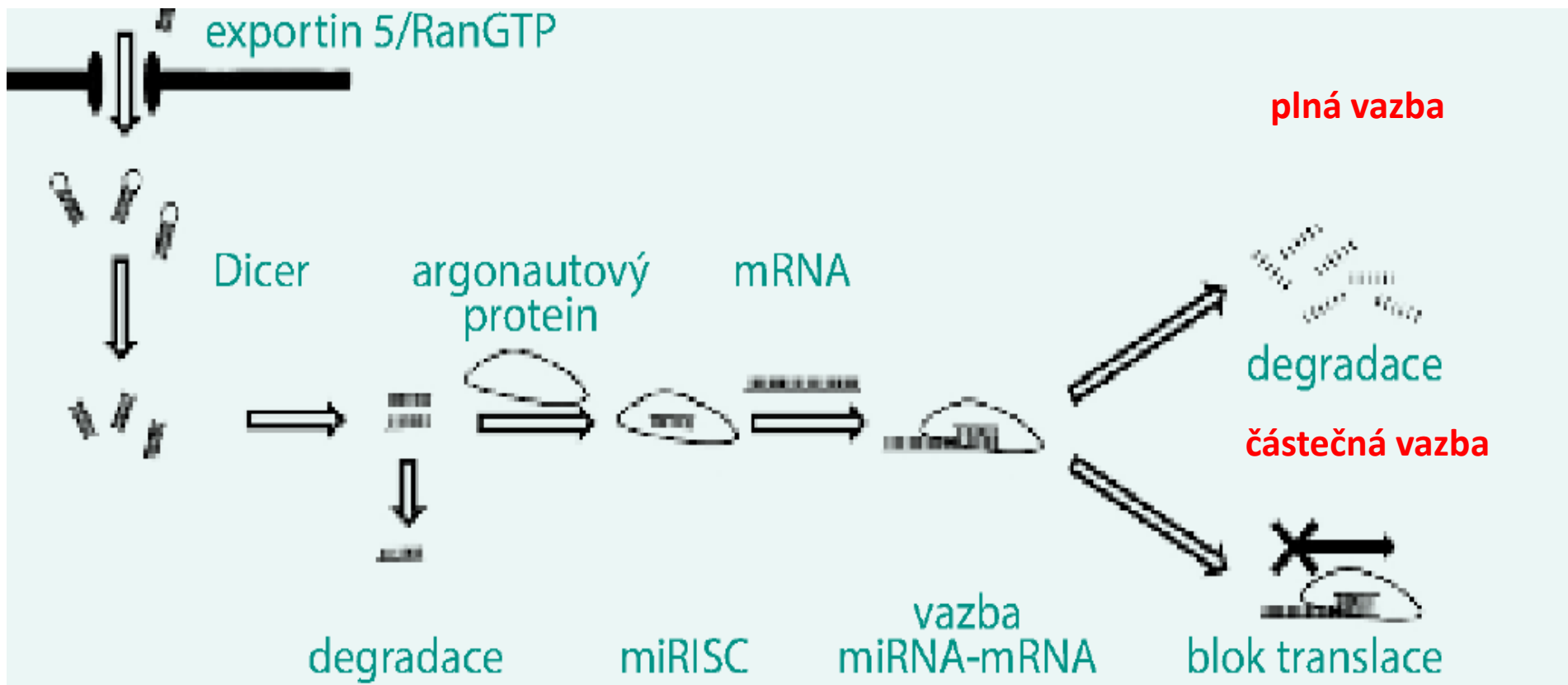
- Na podkladě komplementarity bází se vážou na mRNA



- brání překlada cílové mRNA do bílkoviny nebo inicijují degradaci cílové mRNA

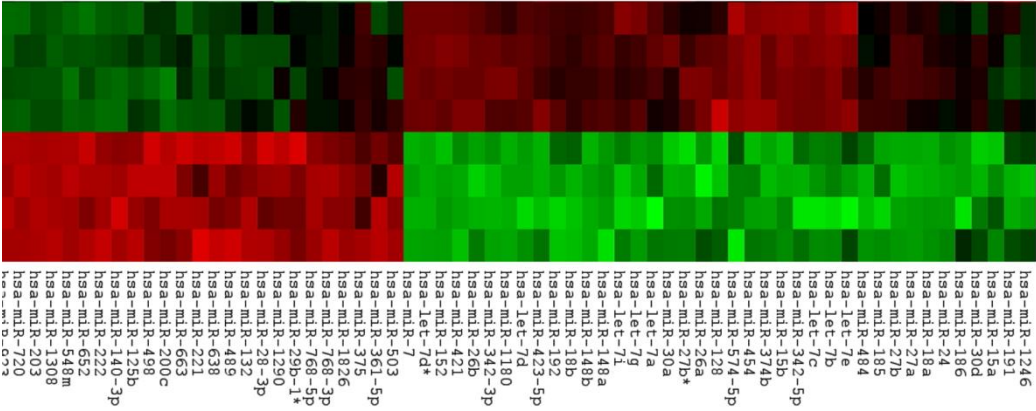


# Funkce mikroRNA

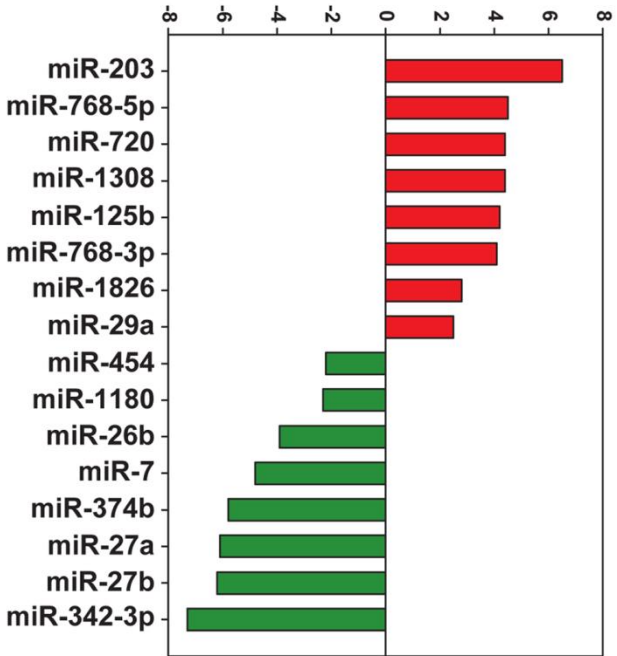


# mikroRNA

- Množství mikroRNA molekul v buňkách se radikálně liší **podle typu buněk, vývojového stadia** - můžeme nalézt od několika kopií až po 5000.
- **Množstevní zastoupení vypovídá o aktivitě** mikroRNA v daném kontextu – předpoklad prací studující mikroRNA u různých nemocí.



Relative Expression



# Funkce mikroRNA

- ↑ nebo ↓ mikroRNA vede k ↑ nebo ↓  
**embryogeneze, organogeneze**
- **Vztah mikroRNA k fyziologickým dějům:** krvetvorbě, sekreci inzulínu, vývoji nervové soustavy
- **Vztah některých mikroRNA k nádorovému bujení, kardiomyopatii,...**

- 
- [Moss EG](#). MicroRNAs: hidden in the genome. [Curr Biol](#) 2002; 12(4):R138-40.

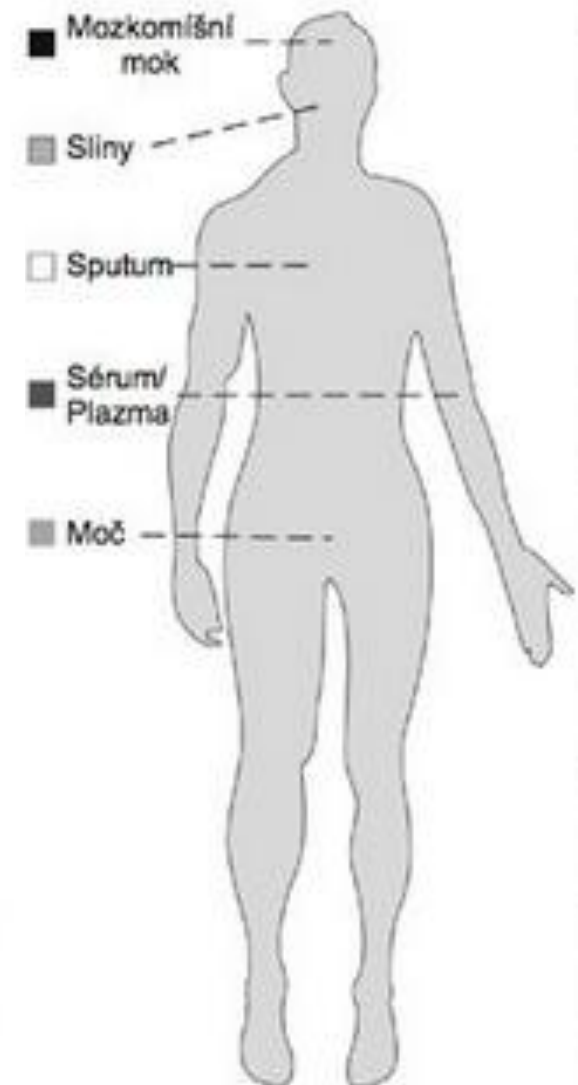
# „tkáňově specifické“ mikroRNA

- Exprese v určité tkáni až 40x zvýšená
- Přítomnost v cirkulaci může odrážet poškození orgánu

# mikroRNA jsou v tělních tekutinách

Méně stabilní než  
tkáňové/nitrobuněčné  
mikroRNA

| 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       | 17770 (7673)                                                          | 436                         |
| Tears               | 564 (631)                                                             | 320                         |
| Urine               | 94 (129)                                                              | 204                         |



# Extracelulární (cirkulující) mikroRNA

- **V tělních tekutinách:** plazma sérum, moč, sliny, pot
- Do oběhu se dostávají pasivně při **nekróze buněk, aktivní transport** z buněk
- Zajišťují mezibuněčnou komunikaci
- Jsou **stabilní, konstantní hladiny**, podobné u jedinců téhož druhu
- Stanovení hladin je reprodučibilní
- Hladiny extracelulárních mikroRNA se liší mezi nemocnými a zdravými jednoho druhu
- Hladiny odrážejí poškození, změny ve vnitřním prostředí
- Komplex s proteiny apoptotická tělíska, , exozomy, mikrovezikuly, lipoproteinové částice
- **Biomarkery** nemoci nebo poškození orgánu, prediktivní hodnota, mediátory mezibuněčné komunikace

# mikroRNA - biomarker

- Onkologie – miR-141 Ca prostaty
- DM s ischemií DKK - ↓ miR-126
- PAH u systémové sklerodermie
- Prediktivní faktor: ↑ miR-15 IM pro srdeční selhání

Mitchell PS et al. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(30): 10513–10518.

Zampetaki A et al. Circ Res 2010; 107(6): 810–817.

Hullinger TG et al. Circ Res 2012; 110(1): 71–81.



# Funkce mikroRNA

- jedna mikroRNA cílí na více mRNA různých proteinů
- jedna mRNA je cílem více mikroRNA  
→ regulační síť

# Funkce mikroRNA

- jedna mikroRNA cílí na více mRNA různých proteinů
- jedna mRNA je cílem více mikroRNA  
→ regulační síť

Bioinformatika



Latest miRBase blog posts

miRBase 22 release

By sam (March 12, 2018)

After repeated and unreasonable delay, miRBase 22 is finally released. As you might expect with such a long gap, the number of sequences in the database has jumped significantly — by over a third. The vast majority of the increase comes from new microRNA annotations in species not previous represented in the database. Indeed, there [...]

High confidence miRNA set available for miRBase 21

By sam (July 3, 2014)

As mentioned previously, we briefly held off from releasing the set of “high confidence” miRNAs for miRBase 21, because of a last-gasp bug. Those data are now available, tagged with the label “high confidence” on the entry pages, and for download on the FTP site. The total number of miRNAs labelled “high confidence” has increased [...]

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Se hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the matu hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results.

Stem-loop sequence hsa-mir-124-1

Accession

MI0000443 ([change log](#))

Previous IDs

hsa-mir-124a-1

Symbol

[HGNC:MIR124-1](#)

Description

Homo sapiens miR-124-1 stem-loop

Gene family

MIPF0000021; [mir-124](#)

Community annotation

This text is a summary paragraph taken from the [Wikipedia](#) entry entitled [mir-124 microRNA precursor family](#), miRBase and [Rfam](#) are facilitating community annotation of microRNA families and entries in Wikipedia. [Read more...](#)

The miR-124 microRNA precursor is a small non-coding RNA molecule that has been identified in flies ([MI0000373](#)), nematode worms ([MI0000302](#)), mouse ([MI0000150](#)) and human ([MI0000443](#)). The mature ~21 nucleotide microRNAs are processed from hairpin precursor sequences by the Dicer enzyme, and in this case originates from the 3' arm. miR-124 has been found to be the most abundant microRNA expressed in neuronal cells. Experiments to alter expression of miR-124 in neural cells did not appear to affect differentiation. However these results are controversial since other reports have described a role for miR-124 during neuronal differentiation.

Show Wikipedia entry

View @ Wikipedia

Edit Wikipedia entry

Stem-loop

5'

3'

g g c c u c

u c u

g g u u c c

g g c

c c u u g a u u

g

u c g g g g

a g a

c g u a g u g

c g c

g g a u u a a

c

g

u a

a c

g

a c

c a u a c

Get sequence

Deep sequencing

22673 reads, 409 reads per million, 47 experiments

# reads

Confidence

Annotation confidence: high

Feedback: Do you believe this miRNA is real?

Yes (+39)

No (-10)

Leave comment

miRNA count: 38589 entries

Release 22: March 2018

Search by miRNA name or keyword

mir-124

Go

Example

mmu-mir-124-3

cel-mir-124

dme-mir-124

hsa-mir-124-1

hsa-mir-124-2

hsa-mir-124-3

cbr-mir-124a

mmu-mir-124-1

mmu-mir-124-2

rno-mir-124-3

rno-mir-124-1

ed miRNA data

P site

presents a predicted

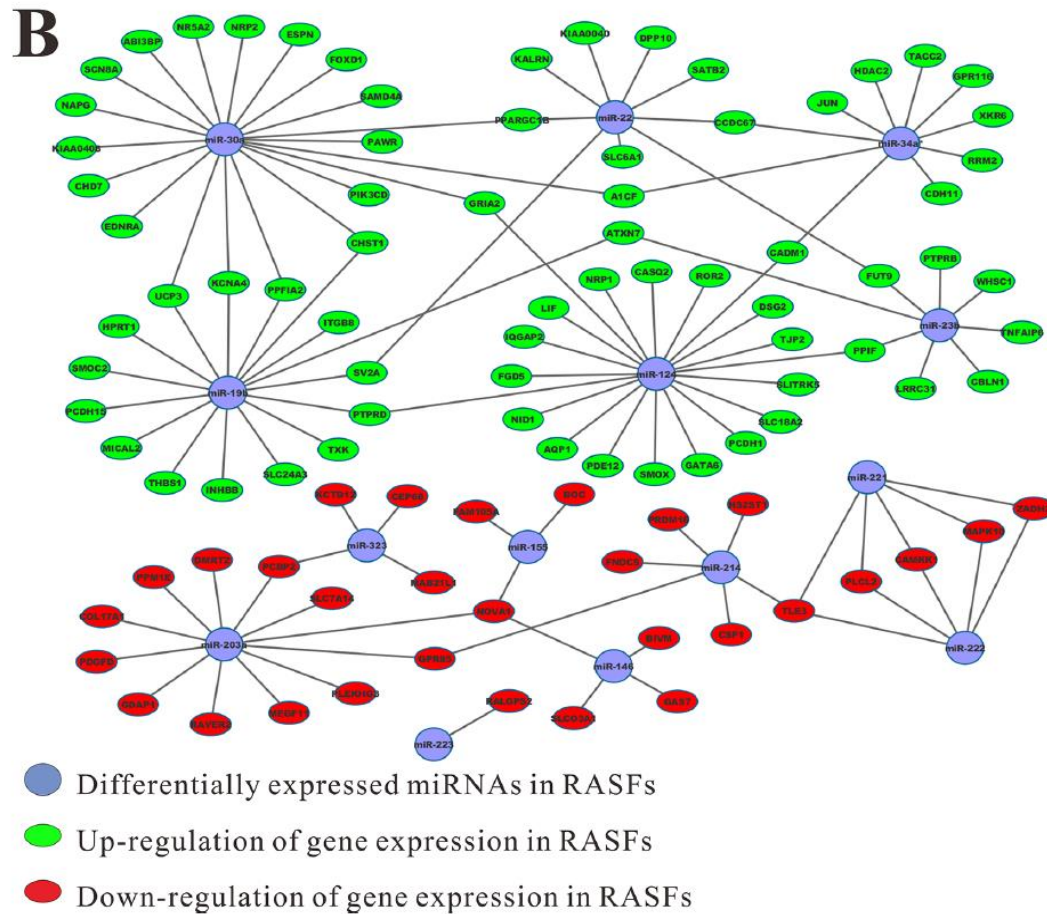
e (termed miR). Both

otation. All sequence

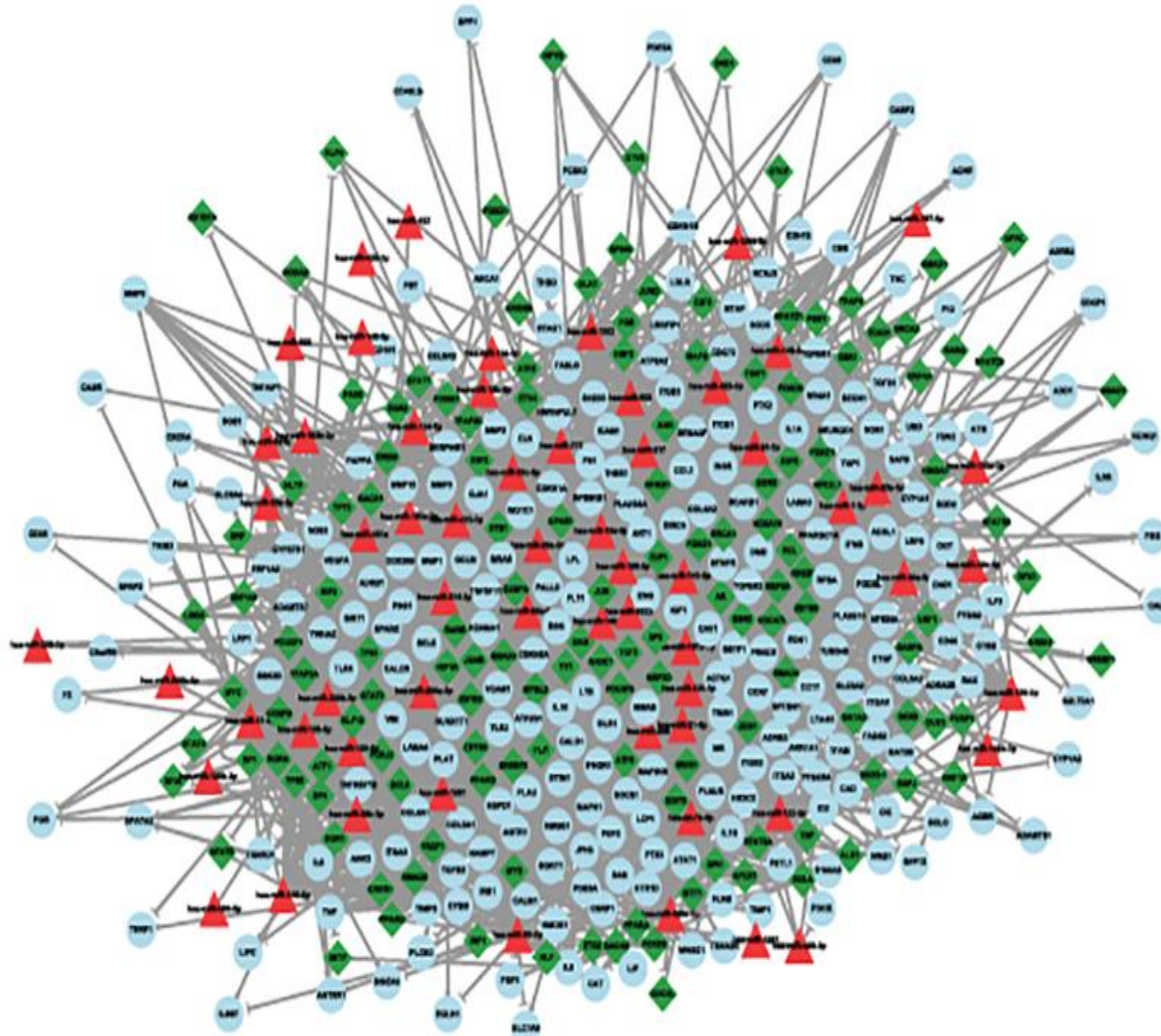
for more information

www.fad

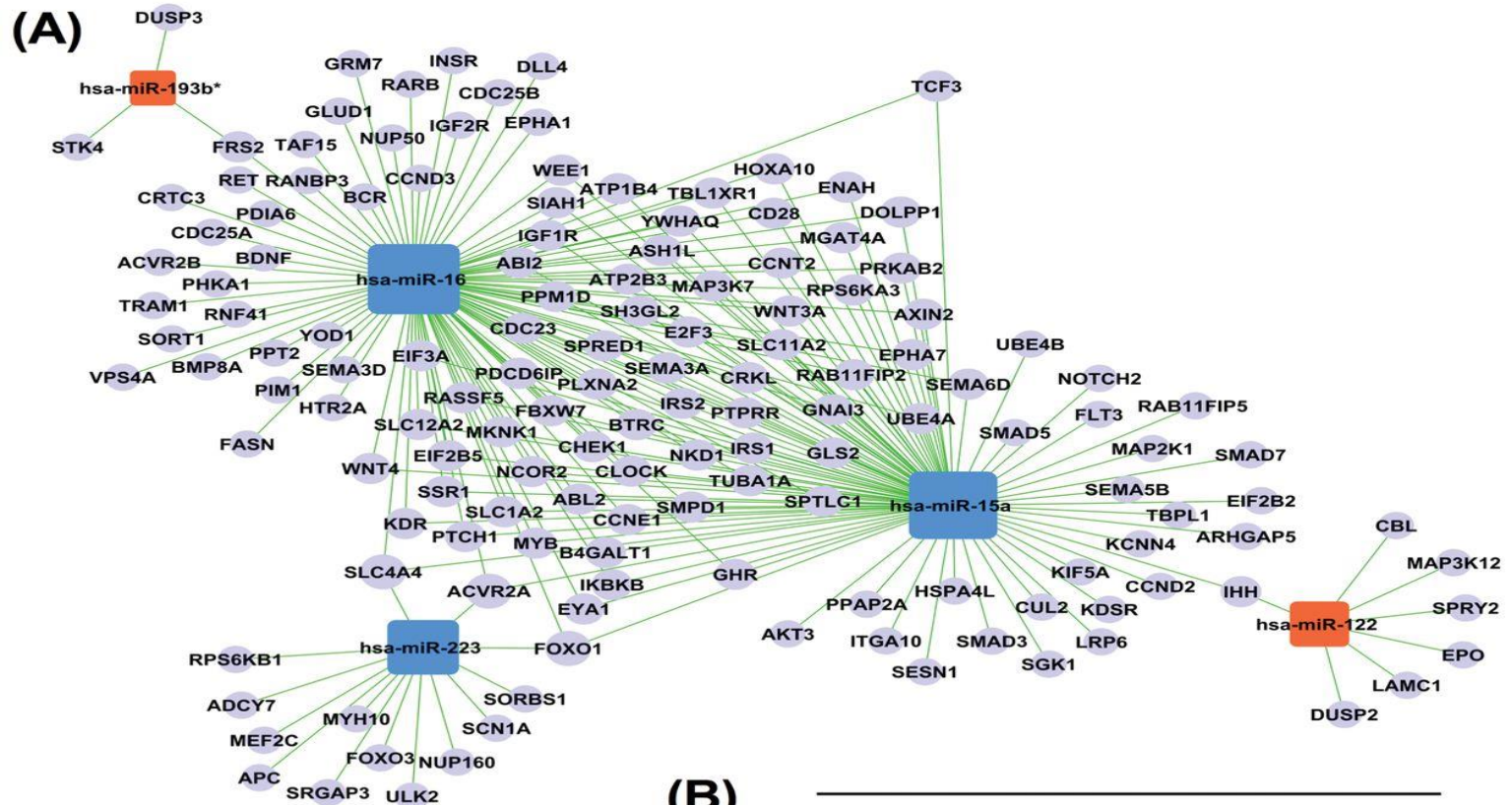
# Genetic interaction networks for mRNA/microRNA pair candidates.



# Regulační síť mikroRNA a mRNA pro infarkt myokardu

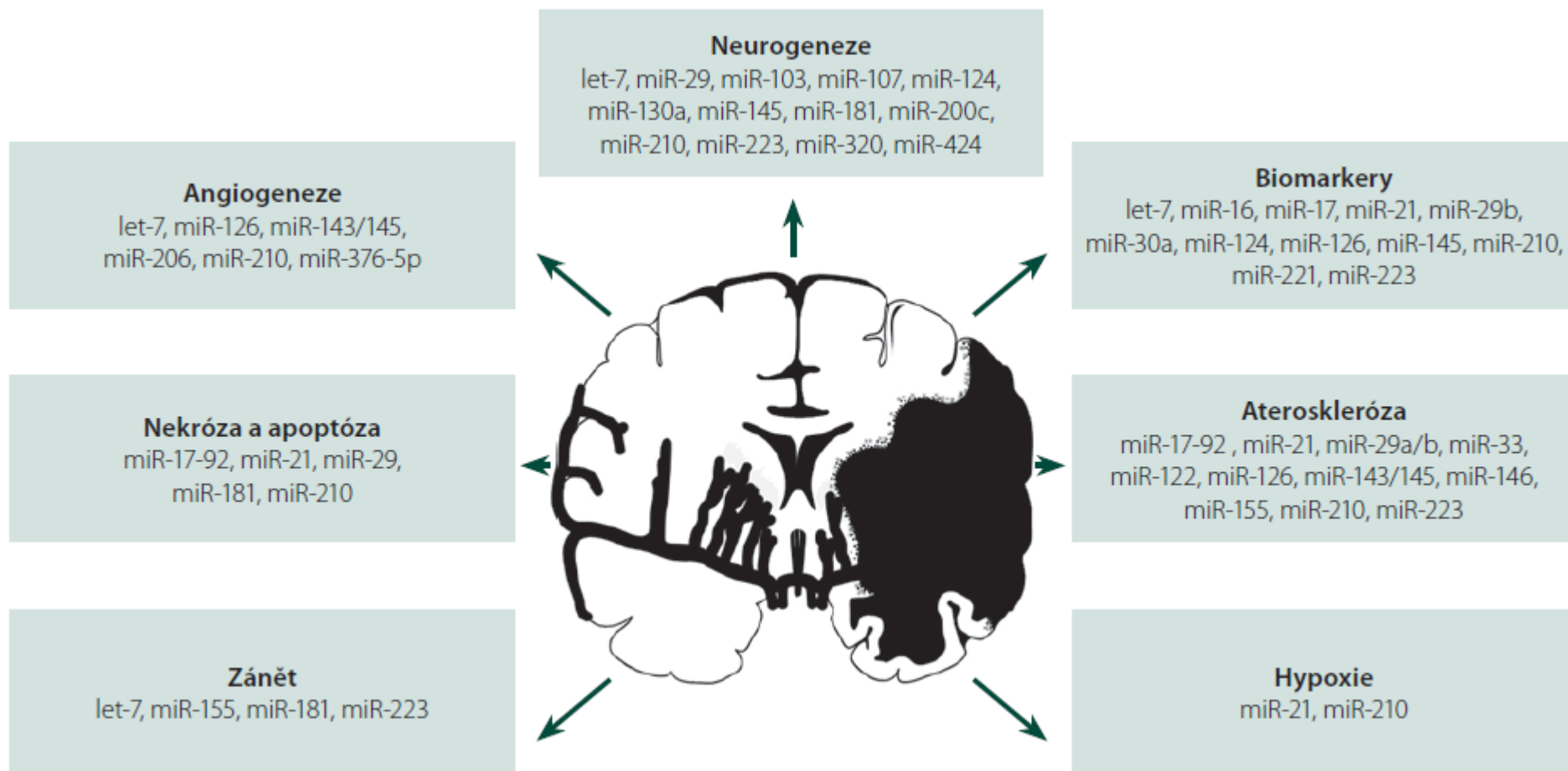






| MicroRNA      | Degree | Regulation |
|---------------|--------|------------|
| Hsa-miR-16    | 101    | Down       |
| Hsa-miR-15a   | 94     | Down       |
| Hsa-miR-223   | 14     | Down       |
| Hsa-miR-122   | 7      | Up         |
| Hsa-miR-193b* | 3      | Up         |

# mikroRNA u akutního mozkového infarktu



# RNA interference

- Technika, která využívá malé vnesené dsRNA molekuly.
- aplikace malých dsRNA molekul (short interfering (si)RNA, short hairpin (sh)RNA) → cílená miR → silencing cílových genů
- Vnesením siRNA, shRNA je stanovena exprese cílového genu, aby se zjistila míra ztlumení.
- Pomocí RNA interference je možné zkoumat funkci genů, signalizačních a metabolických drah, testovat efekt léčiv a rovněž vytvářet tzv. knock-down modely



# mikroRNA v léčbě nemocí

## Terapie mikroRNA:

- ***navýšit/substituovat***
  - demethylace DNA kódující mikroRNA → exprese mikroRNA; virové vektory (adenoviry); enoxacin - ↑ aktivitu DICERu
- ***zablokovat*** – anti-mikroRNA a **mikroRNA inhibitory** (na základě komplementarity) – **RNA-interference**
- Stabilizace mikroRNA – napojení na molekulu cholesterolu

# Léčebný potenciál mikroRNA

## Seznam mikroRNA které jsou testovány jako potenciální terapeutické cíle

| MikroRNA                     | Indikace                                               | Společnost           | Validace cíle | Optimalizace vůdčí struktury | Pre-klinické testování | Fáze 1 | Fáze 2 |
|------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|---------------|------------------------------|------------------------|--------|--------|
| <b>Inhibiční strategie</b>   |                                                        |                      |               |                              |                        |        |        |
| 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                      |        |        |
| <b>Substituční strategie</b> |                                                        |                      |               |                              |                        |        |        |
| 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                            |                        |        |        |

# Závěry

- **Studium mikroRNA umožňuje:**
  - \* zpřesnit informace o **funkci genů**
  - \* nalézt nové **biomarkery** nemocí
  - \* nalézt **nové terapeutické možnosti** v léčbě nádorů, virových infekcí, autoimunitních nemocí.
- **Interpretace výsledků genetických studií** týkajících se SNP genů jsou složitější vzhledem k vlivu mikroRNA.

MikroRNA představují extrémně rychle rostoucí oblast molekulární biologie a poznatky o nich se již staly jedním ze základních stavebních kamenů nádorové biologie. Z tohoto postavení vyplývá i potenciální využití mikroRNA v klinické praxi, a to jak v diagnostice, tak v terapii nádorových onemocnění. To, že se jedná o reálné předpoklady, dokazuje i vstup prvních léčiv na bázi mikroRNA do klinických hodnocení.

První monografie na toto téma v naší literatuře přináší informace o základních principech biologie mikroRNA a metodách jejich studia, ale především systematicky zpracovává zapojení mikroRNA do patogenese hlavních skupin solidních a hematologických malignit, s užtím zaměřením na využití mikroRNA jako biomarkerů v diagnostické a prediktivní onkologii a pro terapeutické účely. Monografii připravil autorský kolektiv odborníků, kteří mají praktické zkušenosti s výzkumem mikroRNA a své poznatky publikují v mezinárodních odborných časopisech.

[www.galen.cz](http://www.galen.cz)



MIKRORNA V ONKOLOGII

Ondřej Slabý, Marek Svoboda et al.



Ondřej Slabý  
Marek Svoboda et al.

# MIKRORNA V ONKOLOGII



GALÉN