

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Dominika Šulcová

**Extracelulární mikroRNA v hematologických malignitách
a jejich využití pro diagnózu a sledování léčby**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Vít Pospíšil, Ph.D.

Praha, 2013

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, Mgr. Vítkovi Pospíšilovi, Ph.D., za odbornou pomoc při psaní této bakalářské práce a za čas, který mi věnoval. Velký dík patří také MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D. a všem dalším členům naší laboratoře, především Mgr. Haně Huškové za její podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 8. 2013

Dominika Šulcová

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
1. Úvod	7
2. MikroRNA a jejich funkce v regulaci genové exprese	8
2.1. Obecná charakteristika mikroRNA	8
2.2. Genová organizace mikroRNA	8
2.3. Biogeneze mikroRNA	9
2.4. Funkce mikroRNA	10
3. Extracelulární mikroRNA	13
3.1. Obecná charakteristika extracelulárních mikroRNA	13
3.2. Mechanizmy zajišťující stabilitu extracelulárních mikroRNA	14
3.2.1. Asociace s Argonaute-2	14
3.2.2. Asociace s Nucleophosmin-1	15
3.2.3. Asociace mikroRNA s membránovými strukturami	16
3.2.4. Asociace s lipoproteinovými částicemi.....	18
3.3. Sekrece extracelulárních mikroRNA	19
3.4. Mezibuněčná komunikace pomocí extracelulárních mikroRNA	20
4. Deregulace mikroRNA u hematologických malignit	22
4.1. Přehled hematologických malignit	22
4.2. Role mikroRNA při vývoji nádorů	23
4.3. MikroRNA u hematologických malignit	24
5. Extracelulární mikroRNA u hematologických malignit	27
6. Využití extracelulární mikroRNA při diagnóze a léčbě	30
7. Závěr	32
Použitá literatura	33

Abstrakt

MikroRNA jsou krátké nekódující RNA, které negativně regulují genovou expresi na post-transkripční úrovni tím, že v cytoplasmě buňky současně inhibují translaci a indukují degradaci cílových mRNA. V nedávné době byly překvapivě identifikované extracelulární mikroRNA, které jsou stabilní a detekovatelné v tělních tekutinách včetně krevní plazmy a séra, mozkomíšního moku, slin, mléka a moči. Extracelulární mikroRNA jsou rezistentní k RNázám a stabilní za vysokých teplot a pH. Extrémní stabilita extracelulárních mikroRNA je způsobena asociací s proteinovými komplexy (především s proteiny Argonaute), jež je ochraňují. MikroRNA jsou často deregulované v nádorových onemocněních a v nedávné době bylo zjištěno, že i v tělních tekutinách lze detekovat nádorově specifické mikroRNA, které mohou sloužit jako markery nádorového onemocnění. Tato bakalářská práce shrnuje znalosti o funkci a biogenezi mikroRNA a zaměřuje se na extracelulární mikroRNA, jejich roli v mezibuněčné komunikaci, roli v hematologických malignitách a možné využití v diagnóze a terapii.

Klíčová slova: mikroRNA, extracelulární, hematologické malignity, lymfomy, diagnostika

Abstract

MicroRNAs are short non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at post-transcriptional level by interfering with mRNA translation and stability. Recently, microRNAs were surprisingly found to be present in various body fluids including blood plasma and serum, cerebrospinal fluid, saliva, milk or urine. These extracellular microRNAs are resistant to RNases and stable in high temperature or pH. Extreme stability of extracellular microRNAs is caused by its association with protective protein complexes (mostly with Argonaute proteins). MicroRNAs are frequently deregulated in cancer and specific tumor-related microRNAs can be also detected in body fluids, indicating that extracellular microRNAs can be used as tumor specific markers. This Bachelor thesis reviews basic principles of microRNA function and biogenesis with focus on extracellular microRNAs and their role in intercellular communication, and it highlights the role of extracellular microRNAs in hematological malignancies and their possible use in diagnosis and treatment.

Key words: microRNA, extracellular, tumor, hematological malignancies, diagnosis

Seznam zkratek

7mG čepička	7-methylguanosinová čepička
Ago2	Argonaute 2
Akt-3/PKB	RAC-gamma serin/treonin protein kináza B
ALL	akutní lymfatická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
BL	Burkittův lymfom
BSA	bovine serum albumin
CLL	chronická lymfatická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
DCP	„decapping“ enzym
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DLBCL	difuzní velkobuněčný B lymfom
DMA	5-(N,N-dimethyl)-amiloride
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barr virus
FBS	fetal bovine serum
GW/P-tělíska	GW-proteinová tělíska
GW182	glycin-tryptophan repeat containing protein, 182 kDa
HCC	hepatocelulární karcinom
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
HL	Hodgkinův lymfom
IgVH	těžký řetězec imunoglobulinu
IL6	interleukin 6
kDa	kiloDalton
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MID	„middle“ doména
MM	mnohočetný myelom
mRNA	mediátorová RNA

MVB	multivezikulární tělísko
MW	molekulová hmotnost
nt	nukleotid
ORF	otevřený čtecí rámeček
PAZ	„Piwi-Argonaute-Zwille“ doména
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PCNSL	primární lymfom centrálního nervového systému
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIWI	„P-element induced wimpy testis“ doména
pre-mikroRNA	nekurzorová mikroRNA
pri-mikroRNA	primární mikroRNA
qRT-PCR	kvantitativní „real-time“ polymerázová řetězová reakce
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonukleová kyselina
SD	sérová deprivace
SHIP1	src homology 2 domain-containing inositol-5'-phosphatase
SR-BI	scavenger receptor class B member 1
Tet-Off	metoda „tetracycline-controlled transcriptional activation“
TF	transkripční faktor
TGFB1	transforming growth factor β 1
TLR	Toll-like receptor
TRBP	TAR RNA binding protein
UTR	nepřekládaná oblast
XPO5	Exportin 5

1. Úvod

MikroRNA (miR) jsou krátké nekódující RNA (19-25nt), které negativně regulují genovou expresi na post-transkripční úrovni. MikroRNA se vážou na komplementární sekvence v 3'UTR oblastech mRNA cílových genů, což vede k bloku translace a destabilizaci mRNA [1]. MikroRNA jsou exprimované ve všech eukaryotických organismech a jsou vysoce konzervované mezi taxony. MikroRNA regulují minimálně 60% lidských genů a tak ovlivňují většinu buněčných procesů, včetně diferenciaci, proliferace, metabolických pochodů a apoptózy [2].

V nedávné době byly stabilní mikroRNA detekovány v různých tělních tekutinách včetně plazmy [3], mozkomíšního moku [4], moči [5], spermatu [6], mateřského mléka [7], slz a amniové vody [8]. Na rozdíl od ostatních typů RNA, mikroRNA odolávají RNázám, které se v extracelulárních tekutinách nacházejí ve vysokých koncentracích a zachovávají si vysokou míru stability i v nepříznivých fyzikálních podmínkách jako je vysoká teplota či pH [9].

MikroRNA jsou často deregulovány v mnoha patologických stavech včetně nádorových onemocnění, přičemž jednotlivé druhy nádorů mají specifický profil mikroRNA exprese. V nedávné době bylo objeveno, že patologické stavy a nádory jsou asociované také se změnou hladin specifických mikroRNA v lidských tekutinách. Doposud byly charakterizovány expresní profily extracelulárních mikroRNA u řady onemocnění, včetně hematologických malignit, a extracelulární mikroRNA byly identifikovány jako potenciálně využitelné neinvazivní biomarkery, které je možné využít ke stanovení diagnózy, predikci dalšího vývoje onemocnění nebo sledování efektivity léčby.

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o biologii extracelulárních mikroRNA, popisuje úlohu extracelulárních mikroRNA během vzniku a vývoje hematologických malignit a jejich možné využití v diagnóze a sledování léčby těchto onemocnění.

2. MikroRNA a jejich funkce v regulaci genové exprese

2.1. Obecná charakteristika mikroRNA

MikroRNA jsou 19 – 25 nt dlouhé nekódující úseky jednovláknové RNA, které negativně regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni. Vážou se na komplementární sekvence nacházející se nejčastěji v 3' UTR oblastech cílových mRNA, což vede k inhibici translace a/nebo k destabilizaci a postupné degradaci mRNA [1].

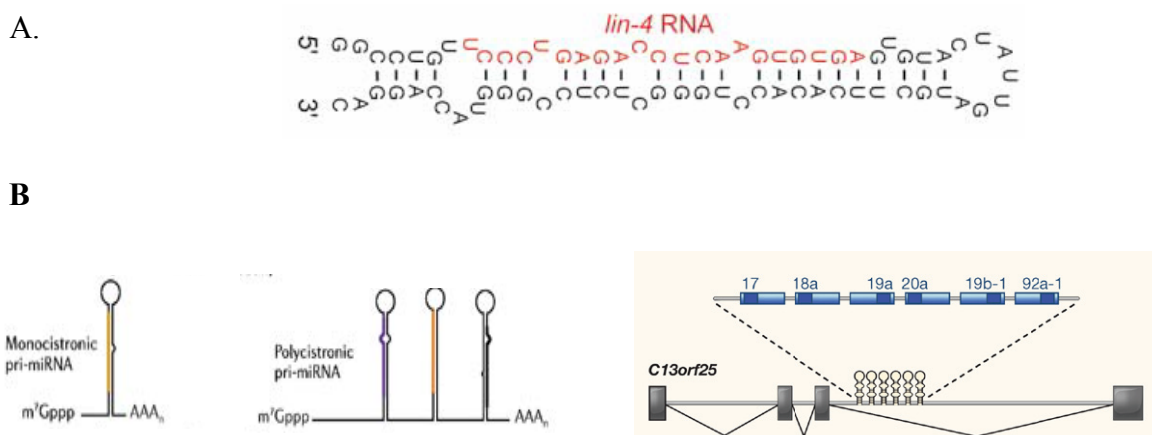
MikroRNA byly poprvé popsány již v r. 1993 při výzkumu vývoje háďatka *Caenorhabditis elegans* (mikroRNA lin-4, Obr.1), nicméně fyziologická funkce mikroRNA v té době nebyla známa. Transkript genu lin-4 snižuje hladinu genu lin-14 během prvního larválního stádia *C. elegans* a tím reguluje diverzifikaci buněk během post-embryonálního vývoje. Lee et al. zjistili, že konečným produktem genu lin-4 a tedy regulátorem exprese LIN-14 není protein, ale krátký úsek RNA [10]. V r. 2000 byla rovněž u *C. elegans* popsána další mikroRNA let-7, která řídí načasování vývoje buněk [11] a následně se ukázalo, že sekvence genu let-7 je konzervována napříč taxony, včetně obratlovců [12]. Od r. 2001 jsou mikroRNA považovány za samostatnou podskupinu malých regulačních RNA [13, 14] a podle posledního vydání online databáze miRBase (www.mirbase.org) bylo dodnes identifikováno 2578 maturovaných lidských mikroRNA.

2.2. Genová organizace mikroRNA

Geny kódující mikroRNA jsou z většiny (~70%) lokalizovány samostatně v intergenových oblastech mezi protein kódujícími geny [13]. Přibližně 30% známých genů pro mikroRNA se nachází v oblastech intronů kódujících genů, převážně v orientaci shodné s hostitelskými geny, se kterými mohou být společně přepisovány [1]. Tyto mikroRNA geny mohou být v intronech kódovány včetně svých promotorových a dalších regulačních sekvencí. Malá část z nich, tzv. miRtrony, kóduje pouze sekvenci pre-mikroRNA, která zabírá celý úsek intronu a pre-mikroRNA tedy vzniká vlastně jako vedlejší produkt po vyštěpení splicingovým aparátem během sestřihu mRNA [15, 16]. Dodnes byly miRtrony jednoznačně identifikovány u bezobratlých; u obratlovců jsou zatím popsány pouze tři funkční mirtrony [16].

Z hlediska organizace genomu je zajímavé, že až 60% savčích mikroRNA je organizováno do klastrů (obdobných jako u prokaryot), což jsou úseky DNA obsahující více za sebou jdoucích genů. MikroRNA kódované v jednom klastru mají společné regulační

oblasti a jsou přepisovány do jediného dlouhého polycistronního primárního transkriptu, čímž připomíná genovou organizaci prokaryot [13].



Obrázek 1: A. Příklad vlásenkové struktury mikroRNA. Lin-4 byla první objevená mikroRNA. Červená barva indikuje maturovanou mikroRNA [10]. B. Příklad monocistronní a polycistronní mikroRNA kódované v intronu (miR-106b-25) [17].

2.3. Biogeneze mikroRNA

Geny kódující mikroRNA jsou přepisovány RNA-polymerázou II do několik kilobází dlouhého primárního transkriptu (**pri-mikroRNA**, Obr. 1B a 2B,A). Pri-mikroRNA má 7-metylguanovinovou čepičku a poly A konec a stejně jako protein-kódující mRNA [18]. První štěpení pri-mikroRNA probíhá v jádře a je zprostředkováno mikroprocesorovým komplexem tvořeným enzymem **Drosha** (double-strand specifická RNáza III) a RNA vazebným proteinem **DGCR8** (Di George critical region 8). Zatímco Drosha má katalytickou aktivitu, DGCR8 se svými RNA vazebnými doménami váže na konkrétní úsek RNA a umožňuje tím enzymu přesně nasednout na štěpené místo (Obr. 2D) [19]. Následkem štěpení pri-mikroRNA mikroprocesorovým komplexem vzniká 70-90 nt dlouhá prekurzorová mikroRNA (**pre-mikroRNA**), která má vlásenkovou strukturu [1]. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.2., velmi krátké introny tzv. miRtrony nepodléhají štěpení mikroprocesorovým komplexem a pre-mikroRNA miRtronu je vyštěpena sestříhovým aparátem (Obr. 2C) [15, 16].

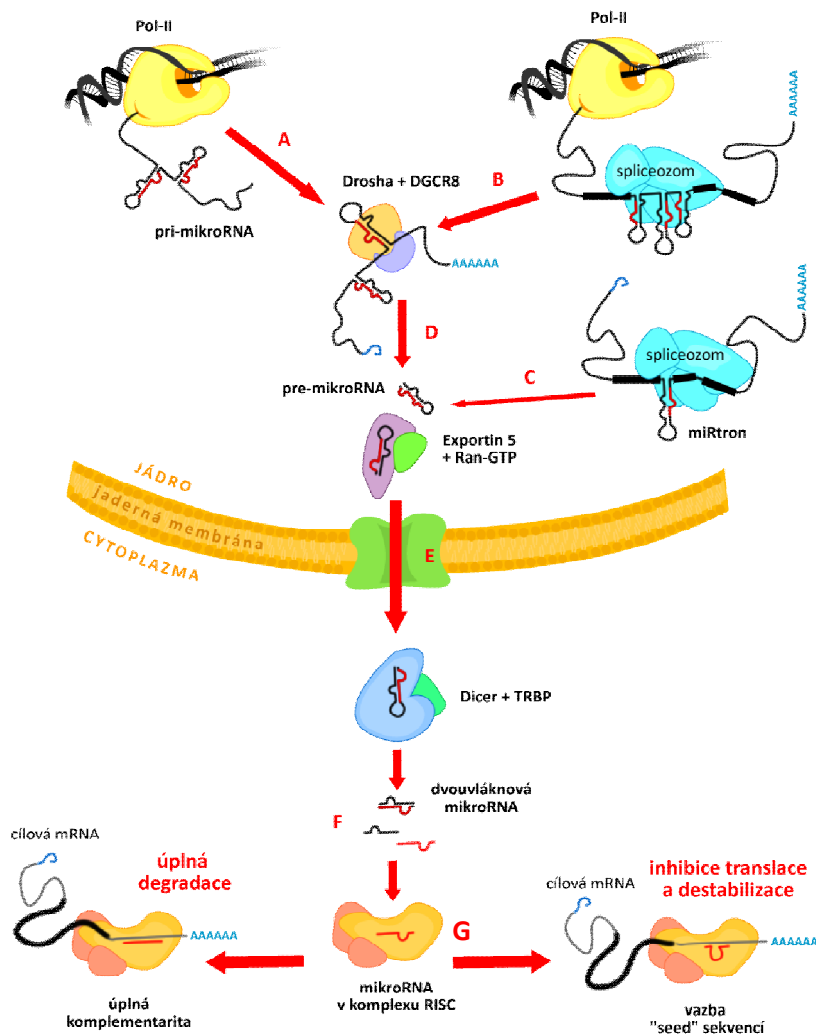
Další úprava probíhá v cytoplazmě, kam je pre-mikroRNA aktivně transportována pomocí proteinu **Exportin-5** (XPO5). XPO5 váže a přenáší pre-mikroRNA přes nukleární membránu za přítomnosti Ran-GTP kofaktoru (Obr. 2E) [20]. V cytoplazmě je z pre-mikroRNA odštěpena terminální smyčka a vzniká přibližně 22 nt dlouhý duplex mikroRNA (Obr. 2F). Štěpení je zprostředkováno enzymatickým komplexem, jehož klíčové složky jsou endonukleáza **Dicer** (RNáza III) a RNA vazebný protein TRBP (TAR RNA binding protein).

Dicer obsahuje PAZ doménu, která váže konce pre-mikroRNA s 2nt 3' přesahem. Štěpení probíhá v aktivním centru enzymatického komplexu, které je tvořeno dvěma doménami s RNázovou aktivitou (RIIIa a RIIIb) [21]. Savci a hlísti mají pouze jeden gen pro Dicer, zatímco jiné organizmy jich kódují více – např. u octomilky (*Drosophila melanogaster*) se vyskytují dva různé geny pro Dicer a každý se specializuje na štěpení jiného druhu malých RNA [22]. Lze najít i výjimky, které využívají alternativní, Dicer-nezávislý způsob maturace. Jedná se o miR-451, která se u savců účastní erythropoézy a ke konečnému sestřihu využívá protein Ago2 s nukleázovou aktivitou [23].

Maturovaná dvouvláknová mikroRNA (obsahující částečně komplementární vlákno původem z 5' nebo 3' ramene pre-mikroRNA vlásenky) se okamžitě po svém vzniku dostává do kontaktu s proteiny rodiny **Argonaute** (Ago), které jsou schopné mikroRNA vázat pomocí svých domén PAZ (3' konec mikroRNA) a MID (5' konec mikroRNA). Ago proteiny obsahují také PIWI doménu, jejíž terciální struktura připomíná RNázu H a může umožňovat nukleázovou aktivitu [24]. Jednotlivé organizmy kódují variabilní počet Ago proteinů, např. u lidí existují čtyři (Ago1 – Ago4) a všechny se mohou účastnit mikroRNA-zprostředkované inhibice mRNA, popř. degradace mRNA v P-tělískách. Ago2 má navíc schopnost štěpit mRNA přímo v cytoplazmě pomocí své PIWI domény a tento mechanismus se uplatňuje např. v RNA interferenci [25, 26]. Po navázání na Ago protein dochází k rozpletení obou vláken mikroRNA a jedno (častěji 5' vlákno) nebo nezávisle obě dvě vlákna jsou inkorporována do komplexu **RISC** (**R**NA **I**nducing **S**ilencing **C**omplex – viz dále) (Obr. 2G) [27].

2.4. Funkce mikroRNA

Jak již bylo řečeno, mikroRNA funguje jako klíčový regulátor genové exprese na posttranskripční úrovni. Vlastní inhibici genové exprese zprostředkovává komplex **RISC**, ve kterém mikroRNA představuje modul rozpoznávající cílovou mRNA. Komplex RISC je tvořen Ago proteinem s navázanou mikroRNA a několika dalšími proteiny, z nichž nejvýznamnější je GW182 (glycin-tryptophan repeat containing protein, 182 kDa) [28]. MikroRNA páruje s bázemi cílové mRNA a zajišťuje tak specifitu interakce RISC komplexu.



Obrázek 2: Biogeneze mikroRNA. Vysvětlení v textu.

MikroRNA mohou regulovat expresi cílového genu několika způsoby. V případě úplné komplementarity celé sekvence mikroRNA je cílová mRNA rozštěpena uprostřed komplementárního úseku (mezi 3' hydroxylovou skupinou a 5' fosfátem 10tého a 11tého nukleotidu) pomocí proteinu Ago2. Následně dochází k její degradaci. Tento mechanismus je běžně využíván rostlinnými buňkami, v živočišných buňkách je sice funkční, ale velice vzácný [29, 30].

V živočišných buňkách převažují mikroRNA, které jsou k cílovým mRNA pouze částečně komplementární a vazba mikroRNA do mRNA v tomto případě vede k represi translace a/nebo k destabilizaci cílové mRNA. Komplementární úsek mikroRNA se nazývá „seed“ sekvence a je často v evolučně velmi konzervovaný. „Seed“ sekvence se ve většině případů nachází na 5' konci mikroRNA (2. – 8. nt) a dle délky komplementarity se se „seed“

sekvence rozdělují na „6mer seed“ až „8mer seed match“ [29]. Vazba „seed“ sekvence může být v cca 10% případů ještě zesílena párováním na 3' konci mikroRNA [31]. Dále existuje skupina mikroRNA, které se nepárují v 5' „seed“ sekvenci, ale komplementární úsek se nachází uprostřed sekvence mikroRNA (přibližně mezi 5. až 17. nt) a dochází k tzv. centrovanému párování [32].

Komplementární úsek pro mikroRNA se většinou nachází v 3' nepřekládané oblasti cílové mRNA („3' untranslated region“, UTR). Kromě komplementarity v „seed“ sekvenci ovlivňují efektivitu mikroRNA zprostředkované inhibice další faktory, zejména kontext lokalizace komplementárního místa v 3' UTR. Bylo prokázáno, že efektivitu mikroRNA zesilují opakující se vazebná místa mikroRNA nebo AU-bohaté sekvence v blízkosti vazebného místa, naopak efektivitu snižuje lokalizace vazebného místa na začátek UTR [29]. MikroRNA se také mohou vázat do ORF („open reading frame“) nebo 5'UTR oblastí mRNA, vazba v těchto místech je však mnohem méně častá [33].

Prvotní práce indikovaly, že mikroRNA přednostně inhibují translaci, zatímco jejich vliv na koncentraci mRNA je malý. Poslední výzkumy ale ukazují, že na inhibici genové exprese se současně podílí jak inhibice translace tak destabilizace mRNA [34]. Inhibice translace cílových mRNA probíhá pravděpodobně v tzv. GW/P-tělískách („GW protein containing neboli processing bodies“). GW/P-tělíska jsou heterogenní granula, která obsahují inhibované mRNA, Ago proteiny a proteiny GW182 [35]. Podle nedávných studií jsou mRNA v GW/P-tělískách inhibována a zároveň chráněna před degradací [36]. Akt-3/PKB gama protein kináza fosforyluje Ago protein, čímž umožňuje interakci Ago s GW182 a zprostředkuje lokalizaci RISC komplexu a cílové mRNA do GW/P-tělisek. V důsledku toho je upřednostněna inhibice translace před degradací cílové mRNA.[37].

Destabilizaci cílové mRNA zřejmě zprostředkovávají hlavně cytoplazmatické RISC komplexy. Dochází k deadenylaci a odstranění 7mG čepičky deadenylázami a DCP enzymy navázanými na GW182. Následuje ubiquitinylace a degradace cílové mRNA [38].

3. Extracelulární mikroRNA

3.1. Obecná charakteristika extracelulárních mikroRNA

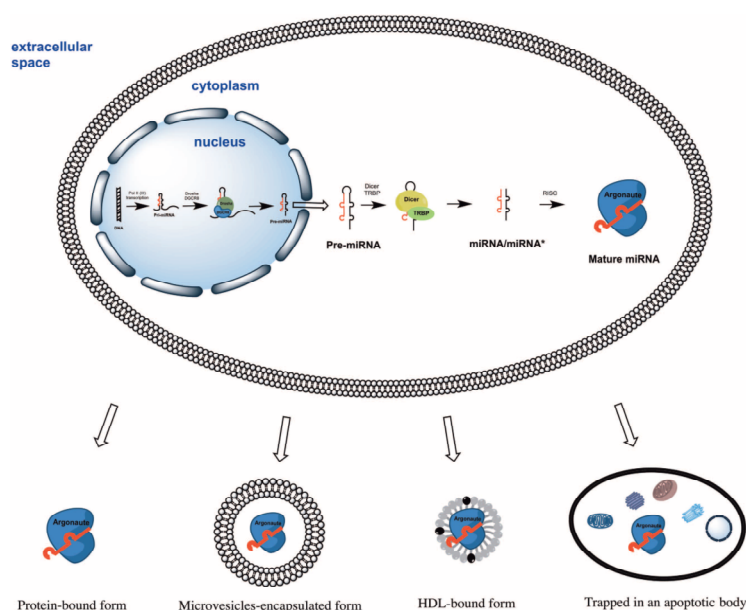
Mimobuněčné tekutiny a extracelulární prostory jsou typické vysokým obsahem ribonukleáz (RNáz), sloužících v organismu jako obrana proti cizorodým (např. virovým) RNA [39]. Z toho důvodu je RNA v mimobuněčném prostoru velice rychle degradována a většina druhů RNA včetně mediátorové RNA (mRNA) je v tělních tekutinách nedetekovatelná PCR a dalšími metodami. Vzhledem k takto „RNA nepřátelskému“ prostředí byl velice překvapivý objev stabilních mikroRNA v extracelulárních tekutinách.

Poprvé byly nedegradované mimobuněčné mikroRNA posány v r. 2008 v séru a plazmě několika nezávislými skupinami. Lawrie et al. detekovali mikroRNA v séru pacientů s lymfomy [3], Mitchell *et al.* prokázali výskyt stabilní mikroRNA v lidské plazmě zdravých jedinců a pacientů s nádorem prostaty. Hladiny mikroRNA v plazmě korelovali s hladinami v séru, což naznačuje možné klinické využití extracelulárních mikroRNA jak z plazmy, tak séra v detekci nádorů [4]. V mateřské plazmě byly dále popsána přítomnost placentární mikroRNA [40]. Následně byly mikroRNA detekovány i v dalších tělních tekutinách a biologických vzorcích včetně slin [41], spermatu [6], moči [5] a mateřského mléka [7]. Kromě přirozených tělních tekutin se mikroRNA vyskytují ve vysoké koncentraci i v médiu buněčných kultur [9] a také v aditivech do buněčných medií biologického původu, jako např. BSA či FBS .

Další výzkumy potvrdily vysokou stabilitu mikroRNA v mimobuněčných tekutinách. Např. 24 hodinová inkubace při pokojové teplotě vedla pouze k 10% a 96 hodinová kultivace k ~ 20% snížení měřitelné koncentrace endogenní mikroRNA v séru a plazmě, zatímco exogenní chemicky syntetizované mikroRNA byly okamžitě degradovány [9]. Obdobně Park *et al.* porovnali rychlost degradace endogenních a exogenních mikroRNA v lidských slinách. Exogenní mikroRNA degradovaly velmi rychle po přidání do vzorku slin a po třech minutách již bylo detekováno méně než 10% původního množství. Oproti tomu endogenní mikroRNA degradovaly výrazně pomaleji a po 30ti minutách inkubace při pokojové teplotě bylo 30% původního množství mikroRNA stále detekovatelných [41]. MikroRNA jsou také rezistentní k extrémním hodnotám pH - po třech hodinách v prostředí s pH=1 nebo pH=12 byl naměřen maximálně 50% úbytek. MikroRNA rovněž zůstávají stabilní po 10 cyklech zamrazování a tání [42]. Tato pozorování naznačují, že mikroRNA jsou v mimobuněčném prostředí ochráněny proti vlivu RNáz a degradaci.

3.2. Mechanizmy zajišťující stabilitu extracelulárních mikroRNA

Nejprve byla přítomnost mimobuněčných mikroRNA detekována v exozomech, které byly uvolňovány do média buňkami buněčné kultury [43], poté Hunter *et al.* detekovali mikroRNA také v mikrovezikulech a apoptotických tělíscích ve vzorcích periferní krve [44]. Tato pozorování nasvědčovala tomu, že mikroRNA jsou ochráněny před degradací v mezibuněčném prostoru enkapsulací do membránových struktur, nicméně membránové vezikuly obsahují proteiny a mohou tedy obsahovat i RNÁzy. Později se ukázalo, že většina extracelulárních mikroRNA se nachází mimo membránové vezikuly v komplexu s proteiny Ago2, popř. NPM1 [45] a ve stejných proteinových komplexech je mikroRNA detekovaná i v membránových vezikulech [46]. Vickers *et al.* také detekovali malý podíl extracelulárních mikroRNA lidské plazmy vázaných v HDL částicích [47]. Jednotlivé formy extracelulární mikroRNA jsou podrobně popsány v následujících pokapitolách a znázorněny na Obr.3 a 4.



Obrázek 3: Stabilizační mechanismy extracelulárních mikroRNA (Upraveno z [48])

3.2.1. Asociace s Argonaute-2

Arroyo *et al.* systematicky charakterizovali výskyt mikroRNA v lidské plazmě a séru pomocí diferenciální centrifugace, size-exclusion chromatografie, imunoprecipitace a westernblotu. Po odstranění buněčných fragmentů ze vzorku plazmy a média diferenciální ultracentrifugací (až 120 000g) zůstalo přes 97% mikroRNA v supernatantu a jen velmi malá část byla detekována ve frakci odpovídající exozomům a mikrovezikulům. Size-exclusion chromatografie na sefadexové koloně identifikovala dvě frakce extracelulárních mikroRNA.

Většina druhů mikroRNA byla nabohacena v proteinových komplexech, zatímco jen malá frakce mikroRNA (např. let7a a miR-142-3p) se vyskytovala ve frakci odpovídající lipidickým vezikulům. Zajímavé je, že některé mikroRNA byly detekované převážně ve frakci odpovídající membránovým vezikulům (let-7a, cca 60%), zatímco většina druhů mikroRNA byla v plasmě nabohacena ve frakci odpovídající proteinovým komplexům. Aby autoři ověřili hypotézu, že proteinové komplexy jsou zodpovědné za stabilitu extracelulární mikroRNA, inkubovali frakciované vzorky plazmy s proteinázou K. Proteolytické štěpení ribonucleoproteinových komplexů vedlo k degradaci plazmových mikroRNA. Tyto experimenty naznačují, že naprostá většina extracelulární mikroRNA v plasmě se vyskytuje ve formě komplexů s proteiny, jež mikroRNA stabilizují a ochraňují před degradací RNázami [45].

Obdobných výsledků dosáhl i Turchinovich *et al.*, když podrobili vzorky plazmy a média z buněčných kultur ultrafiltraci přes nanomembrány s různou velikostí pórů. Autoři zjistili, že zatímco většina mikroRNA je detekovatelných po průchodu přes 300 kDa filtr (což vylučuje možnou vazbu mikroRNA v mikrovezikulech a jiných membránových strukturách), po průchodu 100 kDa filtrem bylo detekovatelných cca jen 10% plazmových mikroRNA, a přes 50 kDa filtr prošlo již pouze zanedbatelné množství. Tyto experimenty indikovaly, že mikroRNA v plasmě je pravděpodobně v proteinovém komplexu o velikosti mezi 300-50 kDa [9]. Jelikož v buněčné cytoplazmě se mikroRNA vyskytují v komplexu s proteiny Argonaute 1-4 (MW cca 96 kDa), provedli nezávisle obě skupiny imunoprecipitaci Ago proteinů v krevní plasmě a buněčném médiu a následně pomocí RT qPCR detekovali mikroRNA v precipitátu. V obojím případě plazmové mikroRNA precipitovaly s Ago proteiny, přednostně s Ago2 [9, 45]. Uvedené experimenty indikují, že většina extracelulárních mikroRNA v plasmě (a zřejmě i ostatních tělesných mimobuněčných tekutinách) a médiu z buněčných kultur se vyskytuje ve formě komplexů s Ago2, efektorovým proteinem cytoplasmatického RISC komplexu, který mikroRNA ochraňuje před degradací RNázami.

3.2.2. Asociace s Nucleophosmin-1

Dalším proteinem, který by mohl být v komplexu s extracelulárními mikroRNA, je nucleophosmin-1 (NPM1). Nucleophosmin-1 je multifunkční jaderný fosfoprotein, který neustále prochází z jádra do cytoplazmy a naopak [49]. V buňce funguje jako chaperon, který zabraňuje agregaci jaderných proteinů. Dále je mu přisuzována důležitá role v regulaci buněčného cyklu, neboť interaguje s cyklin E/CDK2 komplexem [50] a reguluje aktivitu p53

[51]. V závislosti na hladině exprese, buněčné lokalizaci a vazebných partnerech může mít NPM1 tumor supresorovou i onkogenní funkci. U některých typů leukemií (např. AML) slouží mutace v genu pro NPM1 jako predikční faktor [52].

NPM1 se s velkou afinitou váže na jednovláknové nukleové kyseliny, s čímž pravděpodobně souvisí jeho regulační funkce při transportu preribozomálních komponent přes jadernou membránu [53]. Tato vlastnost NPM1 také naznačuje jeho možnou asociaci s extracelulárními mikroRNA.

Wang *et al.* provedli sérii pokusů s buněčnými kulturami, konkrétně s liniemi A549 (epiteliální nádor) a HepG2. Sledovali především změnu v produkci extracelulárních mikroRNA v reakci na stres – stresovým faktorem byla v tomto případě sérová deprivace (SD), buňky byly kultivované v čistém médiu. To zároveň usnadnilo detekci buněčných mikroRNA, neboť nedocházelo ke kontaminaci sérovými mikroRNA. Během 2 hodin po SD bylo pozorováno významné zvýšení hladiny mikroRNA v médiu zároveň s poklesem intracelulárních mikroRNA. Zajímavé je, že spolu s mikroRNA se zvýšila i hladina RNA-vazebných proteinů v séru včetně NPM1. Experimentálně byla prokázána schopnost NPM1 vázat mikroRNA a ochránit je před působením RNáz. Tyto výsledky, spolu s korelací distribuce mikroRNA a NPM1 vně a uvnitř buněk, podporují hypotézu možné asociace extracelulární mikroRNA s NPM1.

3.2.3. Asociace mikroRNA s membránovými strukturami

V roce 2007 byla detekována přítomnost mikroRNA v mikrovezikulech pocházejících z média z kultury buněk kostní dřeně (HMC-1) [43]. Následně byla přítomnost mikroRNA identifikována v dalších membránových strukturách včetně exozomů a apoptotických tělísek [44, 54-56]. Tyto nálezy daly vzniknout hypotéze předpokládající, že extracelulární mikroRNA jsou ochráněny před degradací sekvestrací do membránových vezikulů. Série experimentů za použití detergentů, diferenciální centrifugace a filtrace (viz kapitola 3.2.1.) prokázala mylnost této hypotézy.

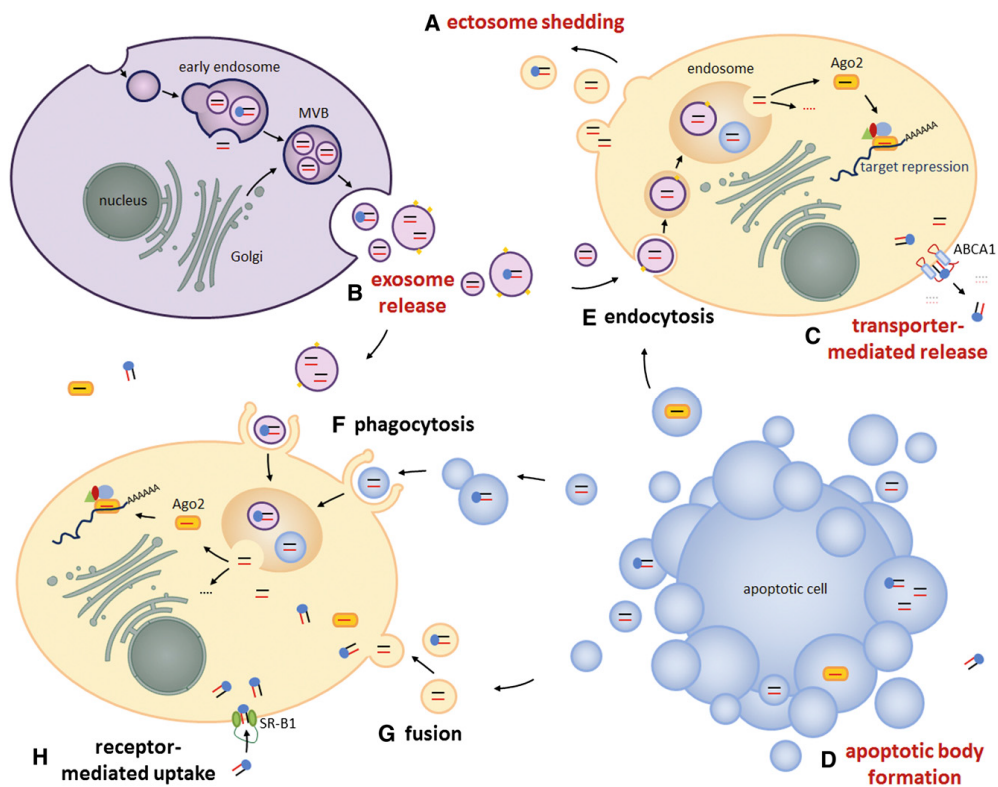
Mikrovezikuly jsou oddíly cytoplazmy ohraničené fosfolipidovou dvojvrstvou odvozenou z buněčné membrány, které jsou uvolňovány do mezibuněčného prostoru buňkami téměř všech typů a to jak za normálních, tak patologických stavů. Mikrovezikuly obsahují zejména lipidy a proteiny, v menší míře také nukleové kyseliny včetně mRNA a mikroRNA. Obsah mikrovezikulů se může lišit s buněčným typem mateřské buňky, s konkrétním stimulem pro sekreci a povahou lokálního úseku membrány [57], nicméně většina

mikrovezikulů obsahuje stejný set konzervovaných proteinů (např. CD9 a CD63, sloužící jako exosomální marker [58]) MikroRNA se v mikrovezikulech nachází v komplexu s Ago2, jak bylo popsáno výše. Mikrovezikuly navíc obsahují další komponenty RISC komplexu, především GW128 a lze proto usuzovat, že mikrovezikuly obsahují celý funkční komplex RISC. RISC komplex může zároveň hrát roli i při inkorporaci mikroRNA do vezikulů [46]. Některé práce indikují, že hromadění mikroRNA do mikrovezikulu je aktivní – vyžaduje energetický výdej buňky [59].

Podle mechanismu, kterým vznikají, můžeme mikrovezikuly rozdělit na exozomy a pučící vezikuly (viz Obr.4). **Exozomy** (30 – 100 nm) (Obr.4B) vznikají v původním raném endozomu, do kterého invaginují fragmenty cytoplazmy a vytváří tak multivezikulární tělísko, MVB [60]. MVB buď splývá s lysozomem a obsah podstoupí degradaci, nebo jsou exozomy vypuštěny mimo buňku při fúzi buněčné a MVB membrány [61]. Kosaka *et al* popsali, že mikroRNA obsažené v exosomech jsou uvolňovány pomocí ceramidové sekreční dráhy. Ceramidová dráha je regulována enzymem neutrální sfingomyelináza-2 (nSMase2), který zprostředkovává hydrolyzu sfingomyelinu na ceramid [62]. Inhibice nSMase2, vedle snížení počtu exozomů vedla i k snížení sekrece mikroRNA, zatímco aktivace ceramidové dráhy zvýšenou expresí nSMase2 naopak zvýšila množství sekretované mikroRNA v exosomech [63].

Pučící vezikuly (Obr.4A) jsou větší než exozomy (100nm – 1 μ m) a vznikají pučením buněčné membrány do vnějšího prostoru a následným zaškrcením [64]. Vzhledem k tomu, že malé pučící váčky a exozomy mají podobnou velikost a nedají se odseparovat většinou fyzikálních metod jako ultracentrifugace, popisují publikace věnující se exosomálním mikroRNA ve skutečnosti smíšenou populaci exozomů a pučících vezikulů [65].

Apoptická tělíska (1 - 5 μ m) (Obr.4D) jsou nepravidelné membránové váčky vznikající jako následek programované buněčné smrti - apoptózy. Obsahují cytoplasmu, zbytky buněčných organel, fragmentovanou DNA a RNA včetně mikroRNA [66]. Zernecke *et al.* ve své práci popsali zvýšenou hladinu miR-126 v apoptických váčkách umírajících endoteliálních buněk během arteriosklerózy, podání těchto apoptotických tělísek obsahujících miR-126 inhibovalo arteriosklerózu skrze nepřímou aktivaci chemokinového receptoru CXCL12. [54].



Obrázek 4: Sekrece extracelulárních mikroRNA (Upraveno z [67])

3.2.4. Asociace s lipoproteinovými částicemi

Malá frakce extracelulárních mikroRNA koprecipituje s buněčnými vysokodenzitními (HDL) a v menší míře i s nízkodenzitními (LDL) lipoproteiny [68]. Lipoproteinové částice jsou ohrazené jednou řadou fosfolipidů s apolipoproteiny (ApoA-I). MikroRNA se v nich zřejmě také nachází v asociaci s Ago2 proteiny. Je zajímavé, že ceramidová dráha, která pozitivně ovlivňuje sekreci mikroRNA do exozomů, zároveň potlačuje asociaci mikroRNA s HDL částicemi [47].

Lipoproteinové částice se vážou na recipientní buňky pomocí povrchového receptoru SR-BI, který zajišťuje selektivní vstřebávání cholesterylových esterů a jejich přenos do cytoplazmy. Tímto způsobem se obchází lysozomální transportní dráha, což by v případě přenosu mikroRNA mohlo zajistit její větší stabilitu [47]. Již v minulosti byly u zvířecích modelů využívány umělé HDL částice k systémové distribuci a specifickému přenosu siRNA [69], existuje tedy předpoklad, že by se stejný princip mohl fungovat i pro přenos mikroRNA.

Wagner *et al.* měřili výskyt několika mikroRNA asociovaných s HDL částicemi ve vzorcích periferní krve pacientů s kardiovaskulárními onemocněními. miR-223 byla nejčastěji detekovanou mikroRNA, nicméně její HDL vázaná forma tvořila pouze 8%

celkového množství v krvi [68]. miR-223 se nachází ve zvýšené hladině u monocytů (makrofágů), a je tedy možné, že jsou to právě tyto buňky, které své mikroRNA do HDL částic secernují [47]. Nebyl však pozorován žádný signifikantní přenos mikroRNA z lipoproteinových částic do endoteliálních buněk, hladkých svalů, ani okolních krevních buněk [68].

3.3. Sekrece extracelulárních mikroRNA

Velká část extracelulárních mikroRNA, které jsou vázané pouze na proteinové komplexy, se zřejmě do okolí uvolňuje pasivně v průběhu buněčné smrti, např. během zánětu a díky své stabilitě pak mohou být detekovatelné v extracelulárním prostoru [70]. V souladu s tímto tvrzením je pozorování, že zvýší-li se počet buněk nebo frekvence buněčné smrti v určité tkáni, je to doprovázeno zvýšením hladiny tkáňově specifických mikroRNA v krvi [71]. Práce Wang *et al.* však naznačuje, že by export mikroRNA-proteinových komplexů mohl být aktivní proces, protože po blokaci buněčného dýchacího řetězce (rotenonem) došlo k zastavení nárůstu hladiny mikroRNA v médiu. Naopak po omezení sekrece proteinů z Golgiho aparátu (pomocí BFA) a tvorby exozomů (blokáda iontových kanálů pomocí DMA) nebyla pozorována změna v sekreci mikroRNA-proteinových komplexů, což naznačuje, že mikroRNA asociované s proteinovými komplexy se z buněk uvolňují bez využití exozomální dráhy [72].

Druhou možností je sekrece mikroRNA prostřednictvím mikrovezikulů a apoptotických tělísek. Ačkoliv lze předpokládat, že do mikrovezikulů jsou inkorporovány všechny druhy mikroRNA obsažené v cytoplasmě, existují důkazy selektivní sekrece specifických mikroRNA. Bylo zjištěno, že spektrum mikroRNA v mikrovezikulech nemusí vždy korelovat se skladbou mikroRNA v původních buňkách [72]. Hunter *et al.* popsali 36 mikroRNA, jejichž hladina v mikrovezikulech byla dramaticky vyšší než v PBMC buňkách, ze kterých pocházely, a naopak jiné mikroRNA byly v daleko větší míře zastoupeny v buňkách a do vezikulů pronikaly minimálně [44]. Na druhou stranu je známo, že jednotlivé populace mikroRNA se mohou lišit svou stabilitou a rychlostí rozpadu, což může zkreslit výsledky těchto experimentů [73]

3.4. Mezibuněčná komunikace pomocí extracelulárních mikroRNA

Existuje velké množství prací popisujících existenci extracelulárních mikroRNA. Tyto mikroRNA mohou být přítomné v mezibuněčném prostoru a tělních tekutinách pouze jako pasivní následek buněčné smrti. Na druhou stranu, vzhledem ke skutečnosti že si extracelulární mikroRNA zachovávají plně svoji funkčnost, lze předpokládat, že mohou hrát roli v přenosu informace mezi buňkami a regulovat genovou expresi v recipientních buňkách.

Teorie mezibuněčné komunikace pomocí extracelulárních mikroRNA předpokládá přenos mimobuněčné mikroRNA do recipientních buněk. Takovýto přenos byl popsán u mikrovezikulů a exozomů, které se do cílových buněk dostávají internalizací endocytózou či fagocytózou, popř. přímou fúzí s buněčnou membránou (viz Obr. 4). V obou případech zřejmě hrají roli signální molekuly v membráně vezikulu a receptory na povrchu recipientní buňky, které zatím nebyly přesně identifikovány. Během endocytózy často dochází k rozpadu exozomů a degradaci jejich obsahu, hrozí tedy degradace přenášené mikroRNA, zatímco při přímé fúzi tento problém nenastává [74]. U extracelulárních mikroRNA vázaných ve volných proteinových komplexech doposud nebyl popsán mechanismus zpětné resorpce do dalších buněk, což však neznamená, že neexistuje.

Kosaka *et al.* v r. 2010 provedli jednoduchý experiment, kdy v HEK293 buňkách uměle nadprodukovali z expresního vektoru miR-146. Následně odebrali médium z těchto buněk a po centrifugaci aplikovali na jiné recipientní buňky (COS-7), které naopak exprimovali luciferázový senzor pro miR-146. Obě dvě linie neexprimují endogenní miR-146. Společná kultivace recipientních buněk s mediem z buněk produkujících miR-146 vedla k výraznému snížení luciferázy reporterového vektoru. Tento experiment prokázal velice důležitou vlastnost extracelulárních mikroRNA a sice to, že jsou plně funkční a schopné samovolné inkorporace do příjemcovských buněk [63]. Následně řada dalších prací prokázala funkčnost a schopnost přenosu extracelulárních mikroRNA mezi buňkami *in vitro*.

Extracelulární mikroRNA odvozené z nádorových buněk by také mohly hrát roli v šíření nádoru, pokud by pronikaly do okolních zdravých buněk, kde by se podílely na alternaci genové exprese a tím např. ovlivnili okolní mikroprostředí. Skog *et al.* identifikovali několik mikroRNA (mezi nimi např. miR-21), které jsou nabohacené v mikrovezikulech odvozených z buněk primárního lidského glioblastomu. Glioblastomové mikrovezikuly obsažené v séru stimulovaly v myších angiogenezi proliferaci a endotelových buněk, nicméně není jasné, zda je tento efekt sprostředkován pouze extracelulárními mikroRNA [75].

MikroRNA mohou regulovat genovou expresi díky vysoké míře konzervovanosti pravděpodobně i mezidruhově. miR-168, která pochází z rýže a je konzervovaná napříč taxony od rostlin po savce byla podaná potkanům v rýžové dietě. miR-168 přestoupila přes trávicí soustavu a byla následně detekovaná v krvi potkanů a v játrech byla schopna ovlivnit expresi receptoru (LDLRAP1 – low density lipoprotein receptor adapter protein 1) a tím i hladinu sérového LDL-cholesterolu. Tyto *in vivo* experimenty indikují, že stravou přijaté mikroRNA se mohou podílet na regulaci buněčných pochodů v recipientním organismu [76]. Tuto možnost naznačuje i přítomnost mikroRNA v mateřském mléce [7].

Jinou zajímavou a velice překvapivou funkcí extracelulárních mikroRNA je schopnost působit jako ligand membránových receptorů. Toll like receptory (TLR) imunitních buněk slouží jako obrana proti virům tím, že váží jednořetězcové virové RNA a způsobují zánětlivou odpověď. Fabbri *et al.* prokázali, že dvě tumor-specifické mikroRNA, miR-21 a miR-29b uvolňované buňkami plicního nádoru váží a aktivují Toll-like receptor 7 (TLR7) imunitních buněk. Tato aktivace vedla ke vzniku zánětlivé reakce, která pak může dále podněcovat nádorové bujení. Inhibice miR-21 a miR-29b nebo TLR7 vedla ke snížení nádorového růstu [77]. Obdobný mechanismus byl prokázán i pro mikroRNA let-7, když aktivace TLR7 receptoru pomocí let-7 injikované do mozkomíšního moku myši byla schopná způsobit neurodegeneraci [78].

Uvedené experimenty indikují že mikroRNA by mohly působit jako endokrinní hormony. Tomu ale neodpovídá skutečnost, že velice nízká koncentrace mikroRNA (~100fM) přítomná v krevním oběhu je pravděpodobně nedostatečná aktivovat funkci mikroRNA v buňkách, pro kterou je nezbytná přítomnost cca 100kopií [79]. Na rozdíl od hormonů, jejichž signál je amplifikovaný pomocí jejich receptorů navíc mikroRNA a její cílové mRNA musí být v poměru 1:1 a nedochází tudíž k žádné amplifikaci. Z těchto důvodů se dá předpokládat, že extracelulární mikroRNA mohou působit spíše parakrynně v blízkém mezibuněčném kontaktu [80].

4. Deregulace mikroRNA u hematologických malignit

V následující kapitole budou nejdříve stručně charakterizovány hematologické malignity. Následovat bude popis role mikroRNA ve vývoji nádorů a příklady deregulace mikroRNA v hematologických malignitách.

4.1. Přehled hematologických malignit

Hematologické malignity jsou nádorová proliferativní onemocnění krevních buněk které jsou zastaveny v různých stádiích vývoje. Mohou mít difuzní charakter v případě leukemií, nebo vytvářet pevné nádory – lymfomy a myelomy.

Leukemie se projevují abnormálním zmnožením bílých krvinek v kostní dřeni, kde se hromadí, omezují normální hematopoézu a dále pronikají do krevního oběhu. Leukemie se dělí podle typu mateřské buňky na lymfoidní a myeloidní a dále podle průběhu na akutní a chronické.

Akutní leukémie jsou odvozené od nezralých blastů, mají rychlý nástup a ačkoliv reagují na chemoterapii, jsou často fatální. Patří mezi ně akutní myeloidní leukemie (AML), která postihuje především starší dospělou populaci, a akutní lymfatická leukemie (ALL), což je nejběžnější leukemické onemocnění u dětí do 5 let věku.

Chronické leukemie vznikají z vyspělejších leukocytů, pomalu se projevují a často umožňují dlouhé přežívání pacienta. Chronická lymfoidní leukemie (CLL) je nejběžnější leukemické onemocnění dospělých na západní polokouli (tvoří asi 25% všech leukemií). Nádorové buňky mohou vznikat z naivních, nebo aktivovaných B-lymfocytů, které produkují mutovaný imunoglobulin IgVH [81]. Chronická myeloidní leukemie (CML) postihuje především mladší dospělou populaci a tvoří 15-20% všech leukemií.

Lymfomy jsou maligní neoplázie primárně vznikající v lymfatických tkáních a orgánech, kde tvoří solidní nádory. Vznikají z různých vývojových stádií lymfocytů, nejčastěji z lymfocytů germinálního centra, ve kterých probíhají rozsáhlé přestavby genů pro imunoglobuliny během germinální reakce. Lymfomy tvoří velice heterogenní skupinu onemocnění a jsou základně klasifikovány jako Hodgkinovy a non-Hodgkinovy lymfomy, které se dále dělí podle střední doby přežívání na vysoce agresivní (týdny), agresivní (měsíce) a málo agresivní (roky).

Hodgkinův lymfom (HL) je častým typem lymfomu (asi 10% všech lymfoproliferativních malignit), který vzniká z buněk germinálního centra. Může být buď

klasický HL, nebo (asi v 5%) nodulární HL s převahou lymfocytů (NLPHL). V současnosti už je dobře léčitelný, terapie dosahuje účinnosti přes 80%.

Burkittův lymfom (BL) je nejagresivnějším non-Hodgkinovým nádorem s častou extranodální manifestací, který může vytvářet endemický (více u dětí), nebo sporadický typ nádoru. Může také vznikat u imunodeficientních pacientů.

Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) je jeden z nejběžnějších lymfomů u dospělých (představuje cca 14% všech lymfoproliferativních malignit), patří do kategorie agresivních lymfomů a vyznačuje se velkou morfologickou, fenotypovou a molekulární heterogenitou. Efektivita léčby DLBCL je nízká, cca 50%.

DLBCL může vznikat také intracerebrálně, jako tzv. primární lymfom centrálního nervového systému (PCNSL). Agresivitu popsaných systémových lymfomů výrazně zvyšuje depozice - infiltrace nebo relaps lymfomu do CNS (tzv sekundární CNS lymfom). Primární i sekundární CNS lymfomy mají velmi špatnou prognózu.

Mezi méně agresivní lymfomy patří např. folikulární lymfom, lymfom marginální zóny a lymfom pláštěvých buněk [82].

4.2. Role mikroRNA při vývoji nádorů

Každá buňka má svůj specifický profil genové exprese a také typické spektrum exprese mikroRNA. V nádorových buňkách je exprese některých genů potlačena nebo zesílena, což platí i pro geny kódující mikroRNA, a stejně jako u protein kódujících genů, i mezi mikroRNA geny lze najít onkogeny (tzv. onkomiry) či onkosupresory. Celogenomové analýzy mikroRNA exprese prokázaly, že téměř každý typ nádoru má specifický profil deregulovaných mikroRNA [83].

V roce 2002 byla poprvé popsána deregulace mikroRNA genů u pacientů s chronickou lymfoidní leukémií. V nádorových buňkách byly detekovány snížené hladiny miR-15 a miR-16 a ukázalo se, že tyto mikroRNA mají funkci tumor-supresorů, protože svou aktivitou inhibují translaci onkogenu BCL2, který kóduje protein důležitý pro přežívání buňky [84]. Naopak jako příklad onkomiru můžeme uvést miR-21, která je nadprodukována ve většině nádorů včetně lymfomů a leukemických buněk a může podporovat růst nádoru a jeho přežívání *in vivo* [85].

Působení mikroRNA v nádorových buňkách je často velmi komplikované. Jedna mikroRNA totiž může inhibovat expresi stovek odlišných mRNA, je zapojena v mnoha, často nezávislých buněčných procesech a mezi cílové mRNA jedné mikroRNA tak mohou patřit

zároveň onkogeny i onkosupresory. Na jedné mRNA se také nachází vazebná místa pro množství různých mikroRNA a výsledná změna exprese určitého genu je proto součtem působení více mikroRNA najednou [86]. V poslední řadě je celý efekt dané mikroRNA podmíněn typem tkáně, ve které je exprimována – např. miR-29 má tumor-supresorový efekt v buňkách plicních nádorů, zatímco při vývoji nádoru prsu působí prokazatelně jako onkogen [87, 88].

Deregulace genů pro mikroRNA úzce souvisí s deregulací genů kódujících transkripční faktory (TF). Onkologicky významné TF mohou modulovat expresi konkrétních mikroRNA a využívat tak jejich funkčního mechanismu. Jako příklad můžeme uvést onkogen MYC, který transkripčně aktivuje onkogenní cluster miR-17-92 (oncomiR 1). MikroRNA vznikající transkripcí miR-17-92 mají schopnost potlačovat expresi řady tumor-supresorových genů a regulátorů buněčného cyklu a tím stimulovat proliferaci a přežívání nádorové buňky [89]. Kromě toho MYC potlačuje transkripci mnoha tumor-supresorových mikroRNA, včetně mikroRNA z rodiny let-7 [90], které inhibují onkogen RAS [91].

Překvapivé množství mikroRNA genů je kontrolováno produkty svých cílových mRNA. Například miR-17-92 klastr inhibuje myeloidní pro-diferenciační transkripční faktor EGR2 („Early growth response 2“, Krox20) v proliferujících myeloidních progenitorech a nádorových buňkách. EGR2 naopak transkripčně reprimuje miR-17-92 v diferencujících makrofázích. Vzniká tak dvojité negativní vazba, která je charakteristická pro tzv. bistabilní stavy, jako je diferenciace, kdy je buňka exkluzivně buď ve stavu diferencovaném nebo ve stadiu proliferujících progenitorů [92].

4.3. MikroRNA u hematologických malignit

Jako první byly u chronické lymfatické leukemie popsány deregulace miR-15 a miR-16, jejichž geny jsou v 50% případů deletovány a u 60% zbylých případů jsou tyto geny alespoň down-regulovány [93]. miR-155 je naopak v buňkách CLL nadexprimovaná, což zřejmě souvisí s deregulací transkripčního faktoru MYB [94].

U širokého spektra hematologických malignit, včetně Hodgkinových i non-Hodgkinových lymfomů [95], chronické lymfoidní leukémie [96], DLBCL [97] aj. byla detekována zvýšená exprese miR-21. Medina *et al.* připravili za pomoci Tet-Off a Cre-rekombináz myší model s kondicionálně zapínatelným genem pro miR-21, jehož aktivace vedla ke spontánnímu vzniku maligních prekurzorů B-lymfocytů. Zajímavé je, že deaktivace

miR-21 pomocí doxycyklinu indukovala v nádorových buňkách apoptózu a do jednoho týdne došlo ke kompletnímu vymizení nádoru [85].

V B-cell lymfomech miR-21 inhibuje expresi tumor supresorových genů ANP32A (acidic nuclearphosphoprotein 32 family, member A) a SMARCA4, které se oba účastní remodelace chromatinu. Po vyřazení genu ANP32A byl v buňkách nádoru prostaty (LNCaP) navozen stav připomínající nadprodukcí miR-21, a buňky mnohem lépe přežívaly. Dalším cílem miR-21 je např. protein TGFB1 (transforming growth factor β 1) a množství dalších proteinů, které se účastní apoptických a tumor-supresorových drah [98].

U Burkittova lymfomu (BL) byla zjištěna snížená exprese miR-155, což má za následek zvýšení hladiny cílového proteinu miR-155 AICDA (activation-induced cytidine deaminase gene). AICDA je klíčovým regulátorem somatické hypermutace v terminálních centrech [99].

Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) je z hlediska exprese mikroRNA asi nejlépe popsáným hematologickým nádorovým onemocněním. V buňkách DLBCL byly detekovány zvýšené hladiny mikroRNA z clusteru miR-17-92. miR-17-92 kóduje šest různými mikroRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b a miR-92), které jsou nadměrně exprimované v mnoha hematologických malignitách. Tyto mikroRNA negativně regulují významné regulátory buněčného cyklu a nádorové supresory, jako inhibitor cyclin-dependentních kináz CDKN1A (p21CIP1), retinoblastoma-like 2 protein (p130, Rb12), nebo transforming growth factor β 1 (TGF β 1), čímž stimulují proliferaci buněk. miR-17-92 zároveň potlačuje apoptózu, což usnadňuje přežívání nádorových buněk. Represe apoptózy je způsobena tím, že miR-17-92 přes protein PTEN aktivuje signální dráhu PI3K (phosphoinositide 3 kinase)/AKT [89] a zároveň potlačuje expresi proapoptického proteinu BIM (BCL2 interacting mediator of cell death) [100]. miR-17-92 je nadprodukován u většiny ostatních typů lymfomů a leukémií. Uměle navozená exprese miR-17-92 v transgenních myších vedla se 100% penetrací k myeloproliferaci nebo vývoji lymfomů.

Dále lze u DLBCL detekovat snížené hladiny miR-143 a miR-145, stejně jako u BL nebo CCL [101]. V poslední době bylo také identifikováno několik dalších mikroRNA, jejichž deregulace se pojí se špatnou prognózou DLBCL, jako např. vysoké hladiny miR-200c [102], nebo snížené hladiny miR-129-5p [103].

Na rozdíl od BL vykazují buňky DLBCL zvýšenou hladinu miR-155, což vede k nižší aktivitě růst inhibujících faktorů (TGF β -1, BMP2/4) [104]. Několik studií (*in vitro* a *in vivo*) dále prokázalo, že miR-155 přímo reguluje fosfatázu SHIP1 (Src homology 2 domain-

containing inositol-5-phosphatase 1), jejíž snížená hladina v CLL a DLBCL indukuje TNF α -dependentní buněčnou proliferaci. Různá hladina SHIP1 od sebe také odlišuje dva subtypy DLBCL (nádorové buňky odvozené buď z aktivovaných B-buněk (ABC), nebo buněk germinálních center (GCB)) [105]. V nedávné době byl ke studiu funkce miR-155 využit myší model s podmíněně indukovanou expresí miR-155 v lymfoidních tkáních (pod kontrolou enhanceru genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (E μ)). Takto regulovaná miR-155 vedla k vysoké proliferaci nezralých B-lymfocytů a následně ke vzniku difuzního lymfomu. Zajímavé ale je, že po deaktivaci genu pro miR-155 byl pozorován ústup onemocnění a stejně jako u pokusu s miR-21 u CLL došlo k úplnému vymizení symptomů [106]. V tomto případě byla miR-155 nadexprimovaná v pozdních pro B-lymfocytech, což vedlo k vysoké proliferaci nezralých B-lymfocytů a následně ke vzniku širokého spektra lymfoidních malignit, připomínajících pokročilá stádia. Tento stav byl zřejmě podmíněn miR-155-zprostředkovanou inhibicí fosfatázy SHIP1 a transkripčního faktoru CEBPB (CCAAT enhancer-binding protein beta), jež jsou oba významnými regulátory signální kaskády interleukinu-6 (IL6) .

5. Extracelulární mikroRNA u hematologických malignit

Jak je popsáno v předešlé kapitole, hematologické malignity jsou často asociované se změněnou expresí mikroRNA [107]. Současně s objevem extracelulárních mikroRNA vyvstala otázka, zda je deregulace v mikroRNA nádorech doprovázena také změněnými hladinami specifických mikroRNA v tělních tekutinách jako je např. plazma a sérum a zda by takové mikroRNA bylo možné využít pro diagnózu nádorů.

Hematologické malignity mají úzký kontakt s krví a dalšími tělními tekutinami, takže lze předpokládat, že zastoupení extracelulárních mikroRNA bude dobře korelovat s probíhajícími patologickými procesy v nich. Přesto bylo v tomto směru provedeno zatím jen několik pionýrských studií.

První tumor-specifické extracelulární mikroRNA byly identifikovány v séru pacientů s DLBCL v r. 2008. Lawrie *et al.* zjistili že hladiny tří mikroRNA dříve popsaných jako deregulovaných v lymfomech (miR-155, miR-210 a miR-21) jsou charakteristicky zvýšeny v séru pacientů v porovnání se zdravými kontrolami. Dále popsali zvýšení hladiny miR-21 u pacientů s delší dobou přežívání a upozornili na možné využití extracelulárních mikroRNA při diagnostice a prognostice onemocnění [3]. V obdobné studii mikroRNA byly popsány miR-15a, miR-16-1, miR-29c, miR-34a a miR-155 (všechny známé nádorově asociované mikroRNA) jako časně detekční markery DLBCL, přičemž pouze miR-155 bylo společná pro obě tyto studie. Hladina tumor-supresorové miR-34a byla naopak oproti kontrolám snížena. [108].

V jiné studii bylo hodnoceno relativní zastoupení mikroRNA v plazmě pacientů s AML a byla detekována výrazně snížená hladina miR-92a oproti zdravým kontrolám. Na základě těchto výsledků označili autoři miR-92a jako slibný marker pro diagnózu a sledování pacientů po chemoterapii [109]. V letošním roce se objevily další dvě studie, zabývající se extracelulárními mikroRNA u AML. Zhi *et al.* využili hlubokého Solexa sekvenování k analýze celého miRnomu (tento termín je obdobou genomu) ve vzorcích séra 140 nově diagnostikovaných pacientů s AML a identifikovali deregulaci hodnot šesti extracelulárních mikroRNA (miR-10a-5p, miR-93-5p, miR-129-5p, miR-155-5p, miR-181b-5p a miR-320d), přičemž u miR-181-5p popsali dobrou korelaci s celkovou dobou přežívání pacientů [110]. Druhá studie pracovala s miRNA mikroereji a qRT-PCR a ve vzorcích plazmy pacientů s AML zaznamenala výrazný pokles hodnot let-7d, miR-150, miR-339 a miR-342 a zároveň zvýšené hladiny let-7b a miR-523 oproti hodnotám zdravých kontrol. Jako diagnosticky nejpřesnější se jevila kombinace měření miR-150 a miR-342, které mají zřejmě i

prognostický význam, protože pacienti v kompletní remisi vykazovali opětovné zvýšení hladin těchto mikroRNA [111].

Moussay *et al.* detailně charakterizovali spektrum extracelulárních mikroRNA v plazmě pacientů s CLL. 14 mikroRNA vykazovalo odlišnou expresi mezi vzorky CLL a zdravými kontrolami a mezi nimi se miR-222, miR-29a a miR-129 ukázaly jako vhodné markery schopné odlišit pacienty od kontrol. Podle hladin extracelulárních mikroRNA navíc bylo možné od sebe odlišit různé hematologické malignity (CLL, MM, HCL). Moussay *et al.* dále porovnali výskyt deregulovaných hladin mikroRNA s přítomností mutace genu pro protein ZAP70, což je risk určující faktor u CLL, a detekovali šest plazmatických mikroRNA (miR-29a, miR-483-5p, miR-195, miR-185, miR-135a a miR-15a), jejichž hodnoty se výrazně lišili mezi ZAP70+ a ZAP70- skupinami.

Ohyashiki *et al.* měřili hodnoty miR-92a ve vzorcích plazmy pacientů s non-Hodgkinovými lymfomy (DLBCL, folikulární lymfom) v porovnání se zdravými kontrolami, přičemž u patientských vzorků byl prokázán významně nižší výskyt miR-92a ($P < .0001$). Hladiny miR-92 se téměř normalizovaly během kompletní remise onemocnění, ale opět poklesly během relapsu [112]. Obdobné změny hladin mimobuněčné miR-92a byly stejnou skupinou popsány i u mnohočetného myelomu [113]. Zajímavé je, že intracelulárně je v nádorových buňkách miR-92a přepisována a nadprodukována společně s ostatními mikroRNA z miR-17-92 klastru. Druhotná represe exprese miR-92a může být způsobena různými post-transkripčními úpravami, např. vazbou na nějaký RNA vazebný protein, nebo během processingu enzymem Drosha [114]. Ačkoliv je nutné tento fenomén dále podrobit experimentálními studiím, mohl by tento fakt naznačovat, že nádorové buňky cíleně zamezují expresi, nebo exportu miR-92a.

Velmi zajímavým je objev tumor-specifických mikroRNA v mozkomíšním moku (CSF) pacientů s PCNSL. Baraniskin *et al.* detekovali v CSF pacientů s PCNSL vysokou hladinu miR-21, miR-19b a miR-92a, které již předtím vykazovaly aberantní expresi ve vzorku nádorové tkáně. Pomocí hodnot extracelulárních miR-21, miR-19b a miR-92a v mozkomíšním moku je možné s vysokou specificitou odlišit vzorky CSF pacientů s PCNSL od pacientů s jinými neurologickými onemocněními [115]. miR-21 je jedním z klíčových onkogenů při vzniku B-buněčných lymfomů (popsáno *in vivo*) a jak už bylo zmíněno, zvýšená hladina plazmatické miR-21 je asociována se zhoršenou prognózou u pacientů s DLBCL [85]. V navazující studii stejná skupina prokázala, že hladina uvedených mikroRNA se snížila během terapie vybraných PCNSL pacientů [116].

Zajímavý je objev, že i některé viry kódují mikroRNA, kterou lze považovat za mikroRNA mimobuněčného původu. Virové mikroRNA mají sekvence podobné jako savčí mikroRNA a jsou schopné inhibovat expresi vnitrobuněčných mRNA. Vir pro EBV virózu (Epstein-Barr virus) např. kóduje nejméně 44 maturovaných mikroRNA a bylo prokázáno, že tyto virové mikroRNA jsou nezbytné pro tvorbu EBV iniciovaných lymfomů (BL,HD,DLBCL) [117].

6. Využití extracelulární mikroRNA při diagnóze a léčbě

Mezi hematologické malignity patří řada agresivních onemocnění s rychlým postupem a účinnost léčby tak závisí především na včasné diagnostice. Nedílnou součástí diagnostické analýzy u solidních nádorů je však odběr vzorku postižené tkáně pomocí biopsie, což je často velmi invazivní procedura. Ideální screeningová metoda by měla využívat takový biomarker, který je přístupný neinvazivní cestou, vykazuje vysokou senzitivitu a specificitu k danému typu malignity a zároveň je přítomen pouze ve velmi nízkých koncentracích při normálním stavu.

Extracelulární mikroRNA splňují většinu těchto požadavků – jsou detekovatelné v tělních tekutinách, ve kterých se nachází ve stabilní formě, jsou tvořené krátkou specifickou sekvencí a podle expresních profilů specifických extracelulárních mikroRNA lze odlišit jednotlivá stadia rozvoje nádorového onemocnění, včetně těch velmi raných [118].

Kromě diagnostického významu mohou mít extracelulární mikroRNA také využití v predikci dalšího vývoje onemocnění. V r. 2011 byla dokončena rozsáhlá studie, ve které byly hodnoceny vzorky plazmy průběžně odebírané pacientům během 12 – 28 měsíců před detekcí plicního nádoru. Výsledné hodnoty extracelulárních mikroRNA odhalily 21 specifických mikroRNA, jejichž pozmeněná exprese předcházela vzniku onemocnění, což indikuje možnou využitelnost těchto mikroRNA pro preventivní diagnostiku u ohrožených pacientů [119].

Extracelulární mikroRNA by mohly rovněž být využitelné pro predikci reakce na terapii. Mnohé klinické studie již prokázaly korelaci mezi expresí specifických mikroRNA ve tkáních a senzitivitou nádorových buněk k radioterapii či chemoterapii [120, 121]. Zhang *et al.* detekovali zvýšenou hladinu miR-21 v séru pacientů s nádorem prostaty, přičemž popsali rozdíl mezi hodnotami miR-21 u pacientů rezistentních vůči terapii (Docetaxel) a pacientů s chemosenzitivními nádory [122]. Stejně výsledky prokázala v letošním roce skupina, která vyšetřovala hodnoty miR-21 u pacientů s nádory slinivky, kde popsali vyšší hladiny miR-21 u pacientů s rychlejším vývojem onemocnění a menší senzitivitou k léčbě (Gemcitabin) [123].

S vývojem nových diagnostických metod se klasifikace nádorových onemocnění stále více diverzifikuje a to umožňuje do značné míry přizpůsobit terapii každému jednotlivému pacientovi. Je tedy neustálý tlak na vývoj nových terapeutických postupů, k čemuž by mohlo významně přispět využití extracelulárních mikroRNA.

Ukazuje se, že léčba pomocí mikroRNA by mohla probíhat na principu systémové aplikace nádorově supresivních mikroRNA, nebo inhibitorů onkogenních mikroRNA (což

jsou modifikované k mikroRNA komplementární oligonukleotidy. Stále však není jasné, jakou metodu použít pro dopravu konkrétní mikroRNA, jelikož samotné syntetické mikroRNA jsou v tělních tekutinách velmi nestabilní a rychle degradují [45]. Tang *et al.* provedli sérii pokusů na myších s plicním nádorem, kterým systémově podávali onkosupresorové mikroRNA miR-34a a let-7. Obě tyto mikroRNA jsou v buňkách plicního nádoru snižené. Jako přenašeč byla použita neutrální lipidická emulze. Po systémovém podání miR-34a byla pozorována 60% redukce nádorové oblasti oproti kontrolním myším a podobné výsledky měla i aplikace let-7.

Další skupina demonstrovala terapeutický efekt tumor-supresorových mikroRNA miR-34a a miR-143/145 na myších modelech, kterým byly subkutánně injektované buňky lidského pankreatického nádoru (linie MiaPaCa-2). K přenosu mikroRNA byly vytvořeny lipidické nanovektory a ty byly aplikovány do ocasní žíly. Po aplikaci obou mikroRNA byla pozorována inhibice růstu nádoru, doprovázená zvýšenou apoptózou a sníženou proliferací. V nádorové tkáni byl navíc detekován úbytek proteinů, jejichž expresi miR-34a a miR-143/145 regulují (SIRT1, CD44 a aldehyd dehydrogenáza pro miR34a; proteiny KRAS2 a RREB1 pro miR-143/145) [124].

Myší modely v předchozích studiích nevykazovaly žádné nepříznivé vedlejší účinky po aplikaci mikroRNA. Tyto studie tak představují první stupně při vývoji nové terapeutické metody, která – pokud úspěšná – by mohla být aplikována i při léčbě hematologických malignit.

7. Závěr

Během poslední dekády byla popsána nová třída malých nekódujících RNA – mikroRNA, které negativně regulují genovou expresi (inhibicí stability nebo translace mRNA) a společně s transkripčními faktory vytváří komplexní genově regulační síť. V nádorových buňkách, a tedy i u hematologických malignit, jsou mikroRNA často deregulované a podílí se tak na probíhajících patologických procesech.

Nádorově specifické mikroRNA je možné detekovat extracelulárně v tělních tekutinách, např. v plazmě, séru, nebo mozkomíšním moku. Jejich překvapující stabilita je zajišťována různými mechanizmy. Většina extracelulárních mikroRNA je asociována s proteinem, který ji chrání před degradací RNázami, pravděpodobně se jedná hlavně o proteiny z rodiny Argonaute (především Ago-2). Minoritní populaci extracelulárních mikroRNA tvoří mikroRNA nahromaděné v mikrovezikulech. Podle posledních studií (převážně *in vitro*) mohou extracelulární mikroRNA pronikat do okolních buněk a potlačovat v nich expresi svých cílových mRNA, nebo se mohou vázat na buněčné receptory, jak bylo ukázáno na TLR receptorech imunitních buněk. Vzhledem ke změně hladin nádorových mikroRNA by tedy extracelulární mikroRNA mohly hrát důležitou roli v komunikaci nádorových buněk s okolními tkáněmi a tím ovlivňovat vývoj onemocnění popřípadě napomáhat metastázi. Na základě abnormálních hladin extracelulárních mikroRNA lze s poměrně velkou specificitou a senzitivitou diagnostikovat typ nádoru, jeho stádium a popř. předpovědět jeho další vývoj. Extracelulární mikroRNA se tedy ukazují jako vhodné biomarkery, nicméně aby bylo možné je využít v klinické praxi, je potřeba nejprve detailně popsat chování jednotlivých populací mikroRNA u konkrétních nádorů. Je paradoxní, že hematologickým malignitám, jejichž stav se velmi dobře odráží v profilu mikroRNA v tělních tekutinách, se zatím věnovalo pouze několik studií, které jsou zde stručně popsány. Také se objevily první experimentální studie zabývající se možnou aplikací mikroRNA nebo jejich inhibitorů v protinádorové terapii a ačkoliv mají mikroRNA v tomto směru pravděpodobně velký potenciál, zatím nebyl nalezen spolehlivý způsob, jak syntetické mikroRNA nebo jejich inhibitory dopravit k postižené tkáni. Největší výzvou proto zůstává zmapovat chování tumor-specifických extracelulárních mikroRNA a popsat jejich deregulace u různých typů malignit.

Praktická část méj diplomové práce, na které budu v budoucnosti pracovat, bude zaměřena na mechanismus přenosu mikroRNA mezi tkáněmi *in vivo* a možném diagnostickém využití specifických mikroRNA v mozkomíšním moku a séru pacientů s lymfomy s postižením centrální nervové soustavy.

Použitá literatura

1. Bartel DP: **MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
2. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Research* 2009, **19**(1):92-105.
3. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS *et al*: **Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *British Journal of Haematology* 2008, **141**(5):672-675.
4. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A *et al*: **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(30):10513-10518.
5. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G: **A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer.** *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* 2010, **28**(6):655-661.
6. Li HG, Huang SY, Guo CC, Guan HT, Xiong CL: **Cell-Free Seminal mRNA and MicroRNA Exist in Different Forms.** *Plos One* 2012, **7**(4):8.
7. Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM: **Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells.** *Plos One* 2010, **5**(10):13.
8. Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K: **The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids.** *Clinical Chemistry* 2010, **56**(11):1733-1741.
9. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B: **Characterization of extracellular circulating microRNA.** *Nucleic Acids Research* 2011, **39**(16):7223-7233.
10. 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):843-854.
11. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
12. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P *et al*: **Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.** *Nature* 2000, **408**(6808):86-89.
13. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T: **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.** *Science* 2001, **294**(5543):853-858.
14. Lee RC, Ambros V: **An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.** *Science* 2001, **294**(5543):862-864.
15. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP: **Intronic microRNA precursors that bypass Droscha processing.** *Nature* 2007, **448**(7149):83-86.
16. Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, Wood MJA: **The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin.** *Nucleic Acids Research* 2012, **40**(1):438-448.
17. Mendell JT: **miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease.** *Cell* 2008, **133**(2):217-222.
18. Lee Y, Kim M, Han JJ, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *Embo Journal* 2004, **23**(20):4051-4060.

19. Han JJ, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho YJ, Zhang BT, Kim VN: **Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex.** *Cell* 2006, **125**(5):887-901.
20. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR: **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** *Genes & Development* 2003, **17**(24):3011-3016.
21. MacRae IJ, Zhou KH, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA: **Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer.** *Science* 2006, **311**(5758):195-198.
22. Tomari Y, Zamore PD: **Perspective: machines for RNAi.** *Genes & Development* 2005, **19**(5):517-529.
23. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ: **A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis.** *Nature* 2010, **465**(7298):584-U576.
24. Jinek M, Doudna JA: **A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference.** *Nature* 2009, **457**(7228):405-412.
25. Ender C, Meister G: **Argonaute proteins at a glance.** *Journal of Cell Science* 2010, **123**(11):1819-1823.
26. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T: **Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs.** *Molecular Cell* 2004, **15**(2):185-197.
27. Carthew RW, Sontheimer EJ: **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell* 2009, **136**(4):642-655.
28. Ding XC, Grosshans H: **Repression of C-elegans microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins.** *Embo Journal* 2009, **28**(3):213-222.
29. Bartel DP: **MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions.** *Cell* 2009, **136**(2):215-233.
30. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B: **MicroRNAs and their regulatory roles in plants.** *Annual Review of Plant Biology* 2006, **57**:19-53.
31. Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP: **MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing.** *Molecular Cell* 2007, **27**(1):91-105.
32. Shin C, Nam JW, Farh KKH, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP: **Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing.** *Molecular Cell* 2010, **38**(6):789-802.
33. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP: **The impact of microRNAs on protein output.** *Nature* 2008, **455**(7209):64-U38.
34. Guo HL, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: **Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.** *Nature* 2010, **466**(7308):835-U866.
35. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E: **P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007, **8**(1):9-22.
36. Castilla-Llorente V, Spraggon L, Okamura M, Naseeruddin S, Adamow M, Qamar S, Liu JD: **Mammalian GW220/TNGW1 is essential for the formation of GW/P bodies containing miRISC.** *Journal of Cell Biology* 2012, **198**(4):529-544.
37. Horman SR, Janas MM, Litterst C, Wang B, MacRae IJ, Sever MJ, Morrissey DV, Graves P, Luo B, Umesalma S *et al*: **Akt-Mediated Phosphorylation of Argonaute 2 Downregulates Cleavage and Upregulates Translational Repression of MicroRNA Targets.** *Molecular Cell* 2013, **50**(3):356-367.
38. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E: **MRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4 : NOT deadenylase and DCP1 : DCP2 decapping complexes.** *Genes & Development* 2006, **20**(14):1885-1898.
39. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD: **Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma.** *Clinical Chemistry* 2002, **48**(10):1647-1653.
40. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD: **Detection and characterization of placental MicroRNAs in maternal plasma.** *Clinical Chemistry* 2008, **54**(3):482-490.

41. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT: **Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection.** *Clinical Cancer Research* 2009, **15**(17):5473-5477.
42. Chen X, Ba Y, Ma LJ, Cai X, Yin Y, Wang KH, Guo JG, Zhang YJ, Chen JN, Guo X *et al*: **Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.** *Cell Research* 2008, **18**(10):997-1006.
43. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature Cell Biology* 2007, **9**(6):654-U672.
44. Hunter MP, Ismail N, Zhang XL, Aguda BD, Lee EJ, Yu LB, Xiao T, Schafer J, Lee MLT, Schmittgen TD *et al*: **Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles.** *Plos One* 2008, **3**(11):11.
45. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL *et al*: **Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**(12):5003-5008.
46. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O: **Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity.** *Nature Cell Biology* 2009, **11**(9):1143-U1223.
47. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT: **MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.** *Nature Cell Biology* 2011, **13**(4):423-U182.
48. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B: **Circulating miRNAs: cell-cell communication function?** *Front Genet* 2013, **4**:119.
49. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA: **Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm.** *Cell* 1989, **56**(3):379-390.
50. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan P-K, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE *et al*: **Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication.** *Cell* 2000, **103**(1):127-140.
51. Colombo E, Marine J-C, Danovi D, Falini B, Pelicci PG: **Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(7):529-533.
52. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CAJ, Delwel R, Löwenberg B *et al*: **Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance.** *Blood* 2005, **106**(12):3747-3754.
53. Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO: **Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids.** *Biochemistry* 1989, **28**(24):9495-9501.
54. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E *et al*: **Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection.** *Science Signaling* 2009, **2**(100):11.
55. Yang M, Chen JQ, Su F, Yu B, Su FX, Lin L, Liu YJ, Huang JD, Song EW: **Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells.** *Molecular Cancer* 2011, **10**.
56. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ: **ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids.** *Nucleic Acids Research* 2012, **40**(D1):D1241-D1244.
57. Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M: **Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors.** *Biochemical Pharmacology* 2011, **81**(10):1171-1182.
58. Simons M, Raposo G: **Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication.** *Current Opinion in Cell Biology* 2009, **21**(4):575-581.
59. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y: **Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication.** *Trends in cell biology* 2012, **22**(3):125-132.

60. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD: **Exosomes: Looking back three decades and into the future.** *The Journal of Cell Biology* 2013, **200**(4):367-371.
61. Raiborg C, Stenmark H: **The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.** *Nature* 2009, **458**(7237):445-452.
62. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M: **Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular Endosomes.** *Science* 2008, **319**(5867):1244-1247.
63. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T: **Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**(23):17442-17452.
64. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J: **Shedding microvesicles: artefacts no more.** *Trends in Cell Biology* 2009, **19**(2):43-51.
65. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *Journal of Cell Science* 2010, **123**(10):1603-1611.
66. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC: **Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro.** *Blood* 2004, **104**(9):2761-2766.
67. Grasedieck S, Sorrentino A, Langer C, Buske C, Dohner H, Mertens D, Kuchenbauer F: **Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives.** *Blood* 2013, **121**(25):4977-4984.
68. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T, Zeiher AM, Landmesser U, Dimmeler S: **Characterization of Levels and Cellular Transfer of Circulating Lipoprotein-Bound MicroRNAs.** *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2013, **33**(6):1392-+.
69. Kim SI, Shin D, Choi TH, Lee JC, Cheon GJ, Kim KY, Park M, Kim M: **Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I.** In: *Mol Ther.* vol. 15. United States; 2007: 1145-1152.
70. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B: **Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function.** *Trends in Biochemical Sciences* 2012, **37**(11):460-465.
71. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD *et al*: **Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury.** *Clinical Chemistry* 2009, **55**(11):1977-1983.
72. Wang K, Zhang SL, Weber J, Baxter D, Galas DJ: **Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells.** *Nucleic Acids Research* 2010, **38**(20):7248-7259.
73. Bail S, Swerdel M, Liu HD, Jiao XF, Goff LA, Hart RP, Kiledjian M: **Differential regulation of microRNA stability.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2010, **16**(5):1032-1039.
74. Vickers KC, Remaley AT: **Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication.** *Current Opinion in Lipidology* 2012, **23**(2):91-97.
75. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO: **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.** *Nature Cell Biology* 2008, **10**(12):1470-U1209.
76. Vaucheret H, Chupeau Y: **Ingested plant miRNAs regulate gene expression in animals.** *Cell Research* 2012, **22**(1):3-5.
77. Fabbri M: **TLRs as miRNA Receptors.** *Cancer Research* 2012, **72**(24):6333-6337.
78. Lehmann SM, Kruger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D *et al*: **An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration.** *Nature Neuroscience* 2012, **15**(6):827-U844.
79. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T: **Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker**

- potential and limitations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(11):4255-4260.
80. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ *et al*: **MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(31):E2110-E2116.
 81. Kozák T: **Chronická lymfocytární leukemie.** *Onkologie* 2008, **2**(3):156-162.
 82. Adam Z, Krejčí M: **Hematologie-přehled maligních hematologických nemocí.** Grada Publishing; 2008.
 83. Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, Marchesini J, Mascellani N, Sana ME, Abu Jarour R *et al*: **Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia.** *Genome Research* 2010, **20**(5):589-599.
 84. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M *et al*: **miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(39):13944-13949.
 85. Medina PP, Nolde M, Slack FJ: **OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma.** *Nature* 2010, **467**(7311):86-U119.
 86. Lujambio A, Lowe SW: **The microcosmos of cancer.** *Nature* 2012, **482**(7385):347-355.
 87. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C *et al*: **MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(40):15805-15810.
 88. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J: **miR-29a suppresses tristetruprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis.** *Embo Reports* 2009, **10**(4):400-405.
 89. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L: **miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92.** *Genes & Development* 2009, **23**(24):2839-2849.
 90. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, T Mendell J *et al*: **Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster.** *Nature Genetics* 2006, **38**(9):1060-1065.
 91. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M: **microRNAs in cancer management.** *Lancet Oncology* 2012, **13**(6):E249-E258.
 92. Pospisil V, Vargova K, Kokavec J, Rybarova J, Savvulidi F, Jonasova A, Necas E, Zavadil J, Laslo P, Stopka T: **Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation.** *Embo Journal* 2011, **30**(21):4450-4464.
 93. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K *et al*: **Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(24):15524-15529.
 94. Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A *et al*: **MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2011, **117**(14):3816-3825.
 95. Navarro A, Gaya A, Martinez A, Urbano-Ispizua A, Pons A, Balague O, Gel B, Abrisqueta P, Lopez-Guillermo A, Artells R *et al*: **MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2008, **111**(5):2825-2832.
 96. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, Castellano L, Magrelli A, Citarella F, Messina M *et al*: **Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2007, **109**(11):4944-4951.
 97. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, Cattan H, Enver T, Mager R, Boultonwood J *et al*: **MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma.** *International Journal of Cancer* 2007, **121**(5):1156-1161.

98. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS: **MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells.** *Cancer Research* 2008, **68**(19):8164-8172.
99. Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Bouwman E, Jacobs S, Poppema S, Kroesen BJ: **Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma.** *Oncogene* 2007, **26**(26):3769-3776.
100. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR *et al*: **Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 similar to 92 family of miRNA clusters.** *Cell* 2008, **132**(5):875-886.
101. Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T: **Downregulation of microRNAs-143 and-145 in B-cell malignancies.** *Cancer Science* 2007, **98**(12):1914-1920.
102. Berglund M, Hedstrom G, Amini RM, Enblad G, Thunberg U: **High expression of microRNA-200c predicts poor clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma.** *Oncology Reports* 2013, **29**(2):720-724.
103. Hedstrom G, Thunberg U, Berglund M, Simonsson M, Amini RM, Enblad G: **Low expression of microRNA-129-5p predicts poor clinical outcome in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).** *International Journal of Hematology* 2013, **97**(4):465-471.
104. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A: **BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas.** *Journal of Pathology* 2005, **207**(2):243-249.
105. Pedersen IM, Otero D, Kao E, Miletic AV, Hother C, Ralfkiaer E, Rickert RC, Gronbaek K, David M: **Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF alpha-dependent growth of B cell lymphomas.** *Embo Molecular Medicine* 2009, **1**(5):288-295.
106. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang XP, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ: **Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(26):E1695-E1704.
107. Zhang J, Jima DD, Jacobs C, Fischer R, Gottwein E, Huang G, Lugar PL, Lagoo AS, Rizzieri DA, Friedman DR *et al*: **Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation.** *Blood* 2009, **113**(19):4586-4594.
108. Fang C, Zhu DX, Dong HJ, Zhou ZJ, Wang YH, Liu L, Fan L, Miao KR, Liu P, Xu W *et al*: **Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma.** *Annals of Hematology* 2012, **91**(4):553-559.
109. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M: **Down-Regulation of miR-92 in Human Plasma Is a Novel Marker for Acute Leukemia Patients.** *Plos One* 2009, **4**(5).
110. Zhi F, Cao XS, Xie XB, Wang B, Dong WM, Gu WY, Ling Y, Wang R, Yang YL, Liu Y: **Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Myeloid Leukemia.** *Plos One* 2013, **8**(2).
111. Fayyad-Kazan H, Bitar N, Najar M, Lewalle P, Fayyad-Kazan M, Badran R, Hamade E, Daher A, Hussein N, ElDirani R *et al*: **Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia.** *Journal of Translational Medicine* 2013, **11**.
112. Ohyashiki K, Umezu T, Yoshizawa S, Ito Y, Ohyashiki M, Kawashima H, Tanaka M, Kuroda M, Ohyashiki JH: **Clinical Impact of Down-Regulated Plasma miR-92a Levels in Non-Hodgkin's Lymphoma.** *Plos One* 2011, **6**(2).
113. Yoshizawa S, Ohyashiki JH, Ohyashiki M, Umezu T, Suzuki K, Inagaki A, Iida S, Ohyashiki K: **Downregulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders.** *Blood Cancer J* 2012, **2**(1):e53.
114. Chakraborty S, Mehtab S, Patwardhan A, Krishnan Y: **Pri-miR-17-92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing.** *Rna-a Publication of the Rna Society* 2012, **18**(5):1014-1028.
115. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, Maghnouj A, Zollner H, Reinacher-Schick A, Schmiegel W *et al*: **Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for**

- primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system.** *Blood* 2011, **117**(11):3140-3146.
116. Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U, Schmiegel W, Hahn S, Schroers R: **MicroRNAs in cerebrospinal fluid as biomarker for disease course monitoring in primary central nervous system lymphoma.** *Journal of Neuro-Oncology* 2012, **109**(2):239-244.
117. Barth S, Meister G, Grasser FA: **EBV-encoded miRNAs.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 2011, **1809**(11-12):631-640.
118. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, Arlt D, Rath M, Sohn C, Benner A *et al*: **Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer.** *International Journal of Cancer* 2013, **132**(7):1602-1612.
119. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabro E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G: **MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(9):3713-3718.
120. Salter KH, Acharya CR, Walters KS, Redman R, Anguiano A, Garman KS, Anders CK, Mukherjee S, Dressman HK, Barry WT *et al*: **An Integrated Approach to the Prediction of Chemotherapeutic Response in Patients with Breast Cancer.** *Plos One* 2008, **3**(4).
121. Hummel R, Hussey DJ, Haier J: **MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types.** *European Journal of Cancer* 2010, **46**(2):298-311.
122. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhu YP, Shen YJ, Shi GH, Ye DW: **Serum miRNA-21: Elevated Levels in Patients With Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer and Potential Predictive Factor for the Efficacy of Docetaxel-Based Chemotherapy.** *Prostate* 2011, **71**(3):326-331.
123. Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z: **The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL.** *Molecular Oncology* 2013, **7**(3):334-345.
124. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, Maitra A: **Restitution of Tumor Suppressor MicroRNAs Using a Systemic Nanovector Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2011, **10**(8):1470-1480.