

# Rola mikroRNA w mechanizmach oporności niedrobnokomórkowego raka płuca na inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR oraz perspektywy klinicznego wykorzystania tego zjawiska

## The role of microRNA in the molecular mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment in NSCLC and the current perspective on its clinical applications

*Adam Szpechciński  
Mateusz Florczuk*

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Praca powstała w ramach projektu badawczego prowadzonego pod kierunkiem dr. n. med Adama Szpechcińskiego w Zakładzie Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, finansowanego z grantu udzielonego przez Naukową Fundację Polpharmy w 2015 roku.

### Streszczenie

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest główną przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia tej choroby. Trwają również badania nad skuteczniejszym wykorzystaniem nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej, które umożliwią identyfikację określonych cech genetycznych i epigenetycznych nowotworu (biomarkerów predykcyjnych) i pozwolą dobrać najefektywniejsze metody leczenia dla konkretnego chorego (terapia spersonalizowana). Najpowszechniej stosowaną postacią terapii spersonalizowanej NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (IKT EGFR). Korzystna odpowiedź na leczenie IKT EGFR jest uzależniona od obecności somatycznych mutacji w genie EGFR. Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR w terapii spersonalizowanej NDRP jest oporność na te leki nabywana przez chorych w trakcie leczenia.

miRNA (mikroRNA) to klasa niekodujących RNA o stosunkowo małych cząsteczkach (od 19 do 22 nukleotydów), które funkcjonują w komórce jako epigenetyczne regulatory ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Oddziaływanie miRNA na transkrypty genów biorących udział w różnych procesach komórkowych obejmuje szeroki zakres aktywności: począwszy od kontroli różnicowania i wzrostu komórek, poprzez naprawę DNA, po kierowanie komórki na drogę apoptozy. Liczne badania potwierdziły zaangażowanie miRNA w procesy nowotworowe związane z rozwojem NDRP. W procesie kancerogenezy pewne miRNA mogą pełnić funkcję onkogenną, a inne onkosupresorową. Poznanie epigenetycznych mechanizmów regulujących zjawiska wrażliwości i oporności komórek NDRP na IKT EGFR może się okazać przełomem w terapii spersonalizowanej tego typu nowotworu. Z klinicznego punktu widzenia podwójna rola miRNA w rozwoju nowotworu może mieć decydujący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie. Ponadto stabilne postaci nowotworo-

Wpłynęło: 28-04-2017  
Zaakceptowano: 30-05-2017  
Opublikowano: 09-06-2017

---

#### Adres do korespondencji:

dr Adam Szpechciński  
Zakład Genetyki i Immunologii  
Klinicznej, Instytut Gruźlicy  
i Chorób Płuc  
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa  
tel.: +48 22 431 21 05  
e-mail: a.szpechcinski@igichp.edu.pl

wego miRNA wykrywa się nie tylko bezpośrednio w tkance guza, ale również w płynach ustrojowych chorego, zwłaszcza we krwi obwodowej, co stwarza dodatkowe możliwości bezinwazyjnego diagnozowania i monitorowania efektywności leczenia w czasie.

**Słowa kluczowe:** miRNA • niedrobnokomórkowy rak płuca • biomarkery • terapia ukierunkowana molekularnie • inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR • oporność lekowa

### Abstract

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

miRNAs (microRNAs) are small, non-coding RNA molecules that play a key role in the regulation of basic cellular processes, including differentiation, proliferation and apoptosis, by controlling gene expression at the post-transcriptional level. Deregulation of miRNA activity results in the loss of homeostasis and the development of a number of pathologies, including lung cancer. During lung carcinogenesis, miRNAs exhibit dual regulatory function: they act as oncogenes or as tumour suppressors. Better understanding of epigenetic mechanisms regulating either the sensitivity or the resistance of NSCLC cells to EGFR TKIs, through activity of miRNAs, may become a breakthrough in targeted therapy of lung cancer. The dual regulatory role of miRNA in cancer might drive the further development of personalised therapies in NSCLC. Furthermore, stable forms of tumour-related miRNAs are detectable in the peripheral blood of patients with NSCLC that offers the potential benefits of using extracellular miRNAs as part of the diagnostic evaluation of cancer.

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

### WPROWADZENIE

---

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów na choroby nowotworowe na świecie (1,59 mln przypadków śmiertelnych w 2012 roku) [1]. W Polsce jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim, po raku piersi, u kobiet. W 2013 roku w Pol-

sce liczba zachorowań na nowotwory złośliwe płuc wynosiła blisko 21 tys. przypadków, a zgonów nieco ponad 22 tys. (16 tys. mężczyzn i 6,5 tys. kobiet) [2]. Tak wysoka śmiertelność wynika z tego, że większość chorych jest diagnozowana w zaawansowanym stadium choroby, kiedy możliwość zastosowania skutecznego leczenia chirurgicznego jest ograniczona.

		Eksony			
		Ekson 18	Ekson 19	Ekson 20	Ekson 21
Mutacje oporności			D761Y		<b>T790 (3-5%)</b> D770_N771 (ins NPG) D770_N771 (ins SVQ) D770_N771 (ins G) N771T V769L D761Y S768I
			<1%		5%
Mutacje aktywujące		5%	45-50%	<1%	40-45%
		<b>G719X (3-4%)</b> V689M N709K/Q S720P	ΔE746-A750 ΔE746-T751 ΔE746-A750 (ins RP) ΔE746-T751 (ins A/I) ΔE746-T751 (ins VA) ΔE746-S752 (ins A/V) ΔL747- E749 (A750P) ΔL747-A750 (ins P) ΔL747-T751 ΔL747-T751 (ins P/S) ΔL747-S752 ΔL747-752 (E746V) ΔL747-752 (P753S) ΔL747-P752 (ins Q) ΔL747-P753 ΔL747-P753 (ins S) ΔS747-I759	V765A T783A	<b>L858R (40-45%)</b> <b>L861X (2%)</b> N826S A839T K846R G863D

Rycina 1. Najważniejsze z klinicznego punktu widzenia mutacje genu EGFR zlokalizowane w eksonach 18-21. Najwyższą częstość (proc.) występowania wśród chorych na NDRP prezentują delecje w obrębie eksonu 19. i mutacje punktowe w eksonie 21. genu [6].

Brak również satysfakcjonującej efektywności standardowej chemioterapii i radioterapii.

Niedrobnokomórkowy rak płuca jest trudnym celem diagnostycznym, zarówno ze względu na znaczące zróżnicowanie klonów komórek nowotworowych w guzie, jak i na utrudniony dostęp do dobrego jakościowo, informatywnego materiału diagnostycznego [3]. W miarę rozwoju nowotworu zmienia się również profil markerów molekularnych [4]. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia NDRP. Badania te opierają się głównie na identyfikacji potencjalnych markerów predykcyjnych nowotworu, jak również na typowaniu najodpowiedniejszej i najskuteczniejszej metody leczenia (rozwój terapii personalizowanej). Należy podkreślić, że analiza profilu zmian epi-/genetycznych w NDRP może dać wskazówki istotne nie tylko z perspektywy doboru najskuteczniejszych leków i efektywności prowadzonej terapii, ale również minimalizacji skutków ubocznych wynikających z nieuzasadnionego klinicznie zastosowania leku. Scharakteryzowanie zaburzeń molekularnych towarzyszących kolejnym stadiom rozwoju NDRP, mających jedno-

ześnie walor markera diagnostycznego, prognostycznego lub predykcyjnego, wciąż nastrocza wielu trudności mimo intensywnych poszukiwań prowadzonych przez wiele ośrodków na całym świecie. W przypadku leków ukierunkowanych molekularnie konieczność oznaczania molekularnych czynników predykcyjnych wpisana jest niemal w ich definicję.

## LECZENIE UKIERUNKOWANE MOLEKULARNIE

Koncepcja personalizowanej terapii NDRP zakłada dobór optymalnego leczenia dla konkretnych grup pacjentów opierający się na zrozumieniu różnic w przebiegu procesu nowotworowego na poziomie molekularnym między osobami chorującymi na tę samą chorobę. Medycyna personalizowana wymaga zintegrowanego podejścia klinicznego, łączącego precyzyjne diagnozowanie choroby na poziomie molekularnym i terapię z użyciem selektywnych leków, działających specyficznie na komórki nowotworowe obciążone konkretną zmianą genetyczną. Obecnie najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie.

larnie (ang. *targeted therapy*, terapia celowana) z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT), które w odróżnieniu od standardowej chemioterapii wybiórczo hamują wzrost komórek nowotworu poprzez swoiste oddziaływanie na domenę wewnątrzkomórkową receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) [5].

Szlak sygnałowy EGFR jest istotnym elementem w powstawaniu i progresji wielu chorób nowotworowych. Aktywacja EGFR poprzez przyłączenie swoistego liganda lub mutację genu promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, zwiększając ich inwazyjny potencjał, oraz hamuje sygnały apoptotyczne [6].

W leczeniu NDRP korzystna odpowiedź na IKT EGFR warunkowana jest obecnością somatycznych mutacji w genie *EGFR* [7, 8]. Obecność mutacji aktywujących związana jest ze zwiększonym powinowactwem receptora do cząsteczki inhibitora i indukcją wzmożonej apoptozy komórek guza w odpowiedzi na terapię IKT. Mutacje aktywujące występują w obrębie eksonów 18-21 genu *EGFR* kodujących domenę kinazową receptora i powodują jego konstytutywną aktywację. Zidentyfikowano ponad 188 różnych mutacji *EGFR*, lecz u 85 proc. chorych na NDRP, którzy odpowiadają na leczenie IKT EGFR, wykrywa się 2 najczęstsze typy mutacji: niewielkie delecje w obrębie eksonu 19. (45-50 proc.) oraz mutację punktową L858R w eksonie 21. (40-45 proc.; rycina 1) [6]. Mutacje w genie *EGFR* dotyczą głównie chorych na raka gruczołowego płuca, niepalących, nieznacznie częściej kobiet i osób po 65. roku życia [9-11]. Mutacje występują też znacznie częściej u chorych rasy azjatyckiej (40 proc.) niż kaukaskiej (10 proc., z czego 3-25 proc. w populacji amerykańskiej, a 10-24 proc. w populacji południowoeuropejskiej).

### Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR

Standardem klinicznym w personalizowanym leczeniu chorych z miejscowo zaawansowanym lub rozsiazanym NDRP jest terapia ukierunkowana molekularnie z użyciem IKT wiążących EGFR w sposób odwracalny (erlotynib i gefitynib) bądź nieodwracalny (afatynib, ozymertynib) [12, 13]. Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR pierwszej generacji są związkami o małej masie cząsteczkowej, które odwracalnie, lecz selektywnie wiążą się z wewnątrzkomórkową domeną EGFR o aktywności kinazy tyrozynowej, zapobiegając fosforylacji tyrozyny i aktywacji szlaku przekazu sygnału. Prowadzi to do zahamowania przekazywania sygnału komórkowego szlakami kinazy serynowo-treoninowej (AKT), aktywowanej mitogenem kinazy białkowej (MAPK), czynników

transkrypcyjnych (STAT), zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 oraz nasilenia apoptozy [14].

Nieodwracalne inhibitory EGFR różnią się chemicznie od odwracalnych, przez co formują kowalentne połączenie z wewnątrzkomórkową domeną receptora EGF. W związku z tym przełamanie działania hamującego receptor możliwe jest tylko na drodze syntezy nowych białek. Afatynib, inhibitor drugiej generacji, oprócz zmutowanego EGFR hamuje równocześnie inne receptory, o których wiadomo, że odgrywają kluczową rolę we wzroście i rozprzestrzenianiu się najbardziej rozpowszechnionych nowotworów, np. HER2, lub też wszystkie receptory z rodziny ErbB (tzw. inhibitor pan-ErbB) [15]. Obserwacje modeli komórkowych *in vitro* oraz przedklinicznych modeli zwierzęcych poddawanych działaniu afatynibu sugerują potencjalną skuteczność tego inhibitora w blokowaniu ścieżki sygnałowej pochodzącej od EGFR z mutacją T790M [16]. Wyniki wczesnych faz badań klinicznych z zastosowaniem kombinacji afatynibu i cetuksymabu (monoklonalne przeciwciało blokujące EGFR) również wskazują na możliwość przełamania nabytej oporności na IKT EGFR u chorych leczonych wcześniej erlotynibem lub gefitynibem, choć podwójna blokada EGFR znacząco nasila działania niepożądane i toksyczność leków [17].

Ozymertynib jest nieodwracalnym inhibitorem najnowszej generacji, który wykazuje wysokie powinowactwo do EGFR zawierającego zarówno mutacje aktywujące, jak i mutację oporności T790M [18]. Ozymertynib jest metabolizowany w organizmie do co najmniej 2 krążących metabolitów, z których każdy nadal wykazuje aktywność wobec zmutowanego EGFR [19]. Ozymertynib był dotychczas badany wyłącznie jako lek drugiej linii u pacjentów z mutacją T790M, którzy byli wcześniej leczeni inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR [18]. Można oczekiwać, że będzie on również skuteczny u pacjentów z pierwotną mutacją T790M, którzy nie otrzymywali wcześniej IKT EGFR [20].

### Mechanizmy pierwotnej i nabytej oporności na IKT EGFR

Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR jest oporność na te leki. Może ona mieć charakter pierwotny, warunkowany głównie przez tzw. mutacje oporności od początku obecne w komórkach guza i równoległe do mutacji aktywujących, albo charakter nabyty, kiedy mutacje oporności i inne zmiany epi-/genetyczne rozwijają się w trakcie terapii IKT EGFR (tabela 1) [21, 22]. Szacuje się, że u 30 proc. chorych mechanizmy nabytej oporności na IKT EGFR są wciąż nieznanne [23]. Niemal wszy-



**Tabela 1.** Mechanizmy pierwotnej i nabytej oporności na IKT EGFR u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Podano częstość występowania danego zjawiska oszacowaną na podstawie badań klinicznych z udziałem chorych na NDRP oraz leki z grupy IKT EGFR, których związek z danym typem oporności jest najlepiej udokumentowany.

Mechanizm	Częstość występowania		Leczenie IKT EGFR	Cytacja
	Oporność pierwotna	Oporność nabyta		
Mutacje oporności w genie EGFR				
T790M	3-5%	50%	gefitynib, erlotynib, afatynib	[24-26]
D761Y, L747S, T854A	<1%	<5%	gefitynib, erlotynib	[6, 27]
C797S		20-40%	ozymertynib	[28]
Zmiany w szlaku sygnałowym MAPK/ERK				
Mutacja w 2. eksonie genu KRAS	20-30%			[29]
Mutacje genu BRAF	7%	1%		[30]
Oboczne ścieżki sygnałowe				
Amplifikacja MET	4%	20%	gefitynib, erlotynib	[27, 31]
Nadekspresja HGF	30%	60%	gefitynib, erlotynib, afatynib	[32, 33]
Amplifikacja HER2	2%	12%		[34]
Mutacje w genie PIK3CA	2-3%	5%	gefitynib, erlotynib	[35, 36]
Utrata PTEN (brak ekspresji białka)	bardzo rzadko	bardzo rzadko	gefitynib, erlotynib, ozymertynib	[37]
Nadekspresja IGF-R1	42%*	in vitro	gefitynib, erlotynib, afatynib	[38]
Fuzja genów EML4-ALK	2-7%			[39]
Zmiany fenotypowe				
Transformacja NDRP do raka drobnokomórkowego	<1%	3-14%	gefitynib, erlotynib	[25, 35]
Przemiana nabłonka w mezenchymę (EMT)	<1	20-44%	gefitynib, erlotynib	[40, 41]
Inne, dotąd niepoznane mechanizmy oporności		30%		[39]

\*W grupie chorych na NDRP z potwierdzoną mutacją genu EGFR.

scy chorzy na NDRP, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na IKT EGFR, z czasem nabywają oporność na te leki, zwykle między 9. a 12. miesiącem leczenia. Zrozumienie mechanizmów oporności nabywanej przez chorych w trakcie pierwszej linii leczenia IKT EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib) ma szczególne znaczenie dla wyboru późniejszej strategii terapeutycznej.

Guz pierwotny płuca jest tworem genetycznie heterogennym. Oznacza to, że możliwe jest współistnienie klonów komórek nowotworowych z mutacją aktywującą EGFR i z natywną formą genu (*wild-type*), a nawet komórek wrażliwych i opornych na leczenie IKT EGFR. Prowadzenie terapii ukierunkowanej molekularnie powoduje eliminację klonu wrażliwego i selekcję komórek bez mutacji aktywujących lub mutacji warunkujących oporność, co klinicznie daje obraz częściowej remisji/wznowy lub ograniczonej

odpowiedzi na leczenie – w zależności od udziału odsetkowego poszczególnych populacji komórkowych w guzie.

Obecnie określenie momentu nabycia oporności na IKT EGFR w trakcie leczenia jest w praktyce klinicznej bardzo trudne z uwagi na to, że ponowna operacja i/lub biopsja w celu pobrania materiału tkankowego do analizy molekularnej jest niemożliwa do przeprowadzenia u większości pacjentów. W tym przypadku analiza krwi obwodowej chorego zawierającej pozakomórkowy materiał genetyczny pochodzący z komórek guza mogłaby umożliwić śledzenie rozwoju choroby w czasie i monitorowanie przebiegu leczenia [42]. Uważa się, że miRNA, ogrywające kluczową rolę w mechanizmach nowotworzenia, mogłyby stanowić nową klasę epigenetycznych biomarkerów, pomocnych w ocenie statusu choroby i skuteczności leczenia.

## miRNA

miRNA (microRNA) to klasa niekodujących, endogennych i jednoniciowych RNA o stosunkowo małych cząsteczkach o długości 19-22 nukleotydów. miRNA funkcjonują jako regulatory ekspresji genów zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt [43, 44]. W przypadku ssaków, w tym człowieka, zakłada się, że miRNA mogą regulować ponad 50 proc. wszystkich genów kodujących białka [45]. Od czasu ich odkrycia liczba nowo zidentyfikowanych ludzkich miRNA stale wzrasta i obecnie sięga ponad 2,5 tys. znanych sekwencji [46]. Odpowiada to 1-4 proc. wszystkich genów ulegających ekspresji u człowieka, przez co miRNA są uważane za jedną z najliczniejszych klas genowych regulatorów [47-49].

Cząsteczki miRNA są zdolne do regulacji genów na poziomie posttranskrypcyjnym poprzez specyficzne rozpoznawanie i oddziaływanie na matrycowe RNA (mRNA) [50]. Proces wyciszania genów może przebiegać na dwa sposoby, w zależności od stopnia komplementarności pomiędzy cząsteczkami miRNA i mRNA. Aby miRNA mogło się przyłączyć do odpowiedniej sekwencji mRNA, wystarczy jedynie 2-7 komplementarnych nukleotydów. Dzięki temu pojedyncza cząsteczka miRNA wpływa na tysiące różnych transkryptów mRNA, a jedno mRNA podlega regulacji przez wiele rodzajów miRNA. U człowieka i zwierząt miRNA spełniają swoją funkcję regulatorową, przyłączając się najczęściej na zasadzie niepełnej komplementarności do końca 3' nici mRNA w regionie nieulegającym translacji (3'-UTR), który odpowiada za poliadenylację, translację i stabilność mRNA [51-53]. W tym przypadku ekspresja białka jest hamowana przez zatrzymanie translacji lub przez deadenylację cząsteczki mRNA [54].

### Pozakomórkowe miRNA

Badania naukowe wielu grup potwierdziły występowanie miRNA w różnych płynach ustrojowych człowieka, m.in. surowicy [55-57] i osoczu krwi [55, 56], ślinie [58], moczu [59], mleku [60], płynie mózgowo-rdzeniowym [61] oraz płynie nasiennym [62].

Dotychczas poznane mechanizmy uwalniania miRNA poza komórkę obejmują udział procesów śmierci komórkowej (nekrozy i apoptozy) oraz aktywnej sekrecji [54]. W tym ostatnim mechanizmie miRNA jest wydzielane wewnątrz egzosomów i innych pęcherzykowatych struktur lub w postaci kompleksów z białkami wiążącymi RNA z rodziny argonautów lub lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Badania nad miRNA obecnym we krwi potwierdziły jego wysoką stabilność zarówno w osoczu, jak i w surowicy [63].

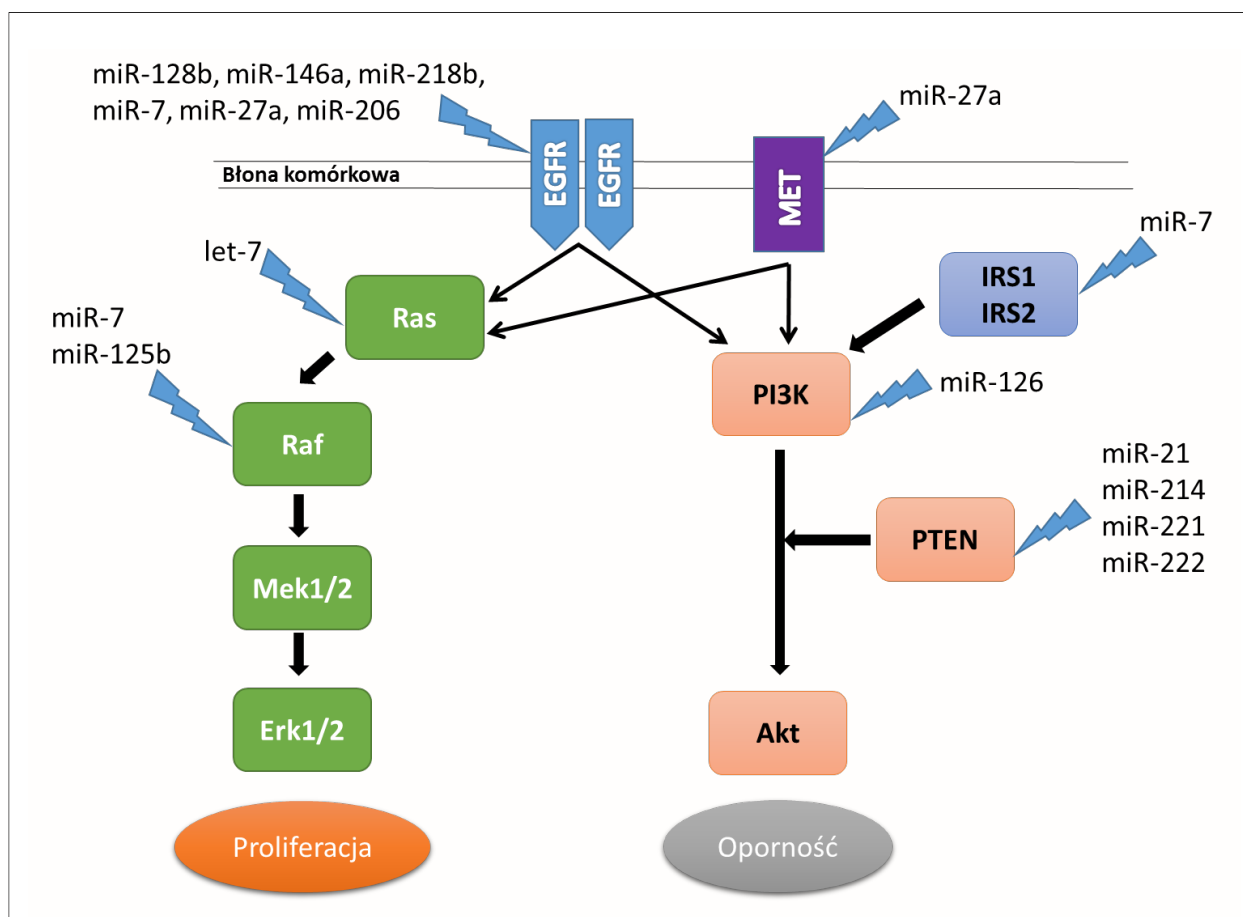
Analizy biochemiczne wykazały, że pozakomórkowe miRNA obecne we krwi jest odporne na działanie RNaz, a także wyjątkowo trwałe w środowisku o skrajnych wartościach pH i temperatury [55, 56].

### miRNA jako regulatory kluczowych szlaków sygnałowych w kancerogenezie

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

Ponadto aktywacja/inaktywacja miRNA podlega regulacji przez czynniki transkrypcyjne lub mechanizmy epigenetyczne (metylacja promotora genu miRNA, acetylacja histonów). Opisano również mutacje w sekwencjach miRNA oraz sekwencjach 3' regionów UTR genów docelowych rozpoznawanych przez miRNA. W obydwu przypadkach specyficzność rozpoznania miRNA-mRNA zostaje zmieniona: miRNA „nabywa” zdolność rozpoznawania nowego mRNA bądź dany gen docelowy wymyka się spod negatywnej kontroli miRNA [64]. Zatem niektóre miRNA mogą działać onkosupresorowo, a inne onkogennie, stymulując rozwój nowotworów [65].

Zaburzona ekspresja konkretnych sekwencji lub rodzin miRNA ma swoje poważne konsekwencje w postaci nieprawidłowej regulacji aktywności kluczowych komponentów najważniejszych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworu (ryc. 2). Podwójna, onkogenna lub supresorowa aktywność miRNA w kancerogenezie wydaje się mieć znaczący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie, w tym IKT EGFR w raku płuca. Nieprawidłowa regulacja ekspresji genów przez miRNA prowadzi do uruchomienia alternatywnych (obocznych) ścieżek sygnałowych lub aktywacji kolejnych mediatorów sygna-



Rycina 1. Najważniejsze z klinicznego punktu widzenia mutacje genu EGFR zlokalizowane w eksonach 18–21. Najwyższą częstość (proc.) występowania wśród chorych na NDRP prezentują delecje w obrębie eksonu 19. i mutacje punktowe w eksonie 21. genu [6].

łu, omijając szlak zablokowany przez inhibitor IKT EGFR. Sprzężenie zwrotne pomiędzy poziomem miRNA a aktywnością pewnych genów docelowych (rozpoznawanych przez dane miRNA), w tym onkogenów i supresorów nowotworu, powoduje dynamiczne zmiany ekspresji miRNA, których pomiar umożliwiłby ocenę aktualnego statusu aktywności genetycznej komórek. Identyfikacja profilu miRNA zaangażowanych w mechanizmy odpowiedzi komórkowej na IKT EGFR może stworzyć nowy kierunek badań nad opracowaniem skuteczniejszej terapii personalizowanej dla chorych na NDRP, jak również w znaczący sposób zwiększyć efektywność monitorowania przebiegu choroby oraz samego leczenia.

#### UDZIAŁ miRNA W MECHANIZMACH WRAŻLIWOŚCI I OPORNOŚCI NA IKT EGFR W RAKU PŁUCA

##### Profile ekspresji miRNA u chorych na NDRP z różnym statusem mutacji genu EGFR

Liczne badania potwierdzają potencjalną użyteczność poszczególnych sekwencji miRNA jako biomar-

kerów nowotworowych ze względu na ich dużą stabilność zarówno w utrwalonych preparatach tkanki nowotworowej (zwłaszcza w postaci bloczków parafinowych), jak i płynach ustrojowych. Zaletą potencjalnego wykorzystania miRNA w diagnostyce onkologicznej jest możliwość ich ilościowej i jakościowej z użyciem real-time PCR jako powszechnie dostępnej techniki laboratoryjnej oraz zwalidowanych, dostępnych komercyjnie zestawów odczynnikowych. Wobec ścisłego powiązania między szlakiem sygnałowym EGFR i ekspresją pewnych miRNA wysunięto hipotezę, że cząsteczki te mogłyby uzupełnić aktualne biomarkery predykcyjne dla terapii z użyciem IKT EGFR.

Zhang i wsp. [66] obserwowali niższy poziom ekspresji miR-195 i miR-122 u chorych na NDRP z potwierdzoną obecnością mutacji aktywujących w genie EGFR w stosunku do chorych bez mutacji. Badania przeprowadzono na próbkach osocza pobranych od 105 niepalących kobiet chorujących na NDRP typu gruczolowego. Poziom ekspresji obu tych sekwencji miRNA był istotnie związany z obecnością mutacji w genie EGFR u chorych z gruczolakorakiem płuca, zwłaszcza u pacjentek z zaawansowaną postacią

NDRP. Obniżony poziom ekspresji miR-122 i miR-195 w osoczu korelował także z dłuższym czasem całkowitego przeżycia u pacjentek w zaawansowanym stadium choroby (HR=0,23; 95% CI 0,07-0,84; oraz HR=0,22; 95% CI 0,06-0,77).

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na liniach komórkowych NDRP wytypowano kilka sekwencji miRNA, których poziom ekspresji istotnie korelował z obecnością mutacji w genie EGFR (miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-203, miR-3182, miR-934 i miR-3196) [67]. W dalszej części doświadczeń przeprowadzono analizę 3 wybranych sekwencji miRNA (miR-200c, miR-203 i miR-3196) w próbkach surowicy pobranych od kobiet niepalących z NDRP, u których wykryto mutację aktywującą w genie EGFR w porównaniu z chorymi bez mutacji. Obniżony poziom ekspresji miR-3196 w surowicy korelował dodatnio z obecnością delekcji w eksonie 19. genu EGFR.

Ekspresja panelu 5 pozakomórkowych sekwencji miRNA (miR-21, miR-122, miR-195, miR-125b, miR-25) również korelowała ze statusem mutacji w genie EGFR u chorych na NDRP [68]. Potwierdzono to w badaniach *in vitro* na kilku liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca o różnym stopniu wrażliwości na gefitynib, dokonując selekcji panelu miRNA metodą mikromacierzową. Następnie ekspresję wyselekcjonowanych miRNA sprawdzono w 150 próbkach tkanki nowotworowej i osocza od chorych na NDRP. Panel 5 miRNA korelował z obecnością mutacji EGFR z czułością i swoistością około 87 proc.

Wang i wsp. [69] obserwowali istotnie wyższą ekspresję 3 miRNA (miR-21, miR-27a i miR-218; odpowiednio:  $p=0,011$ ;  $p=0,011$  i  $p=0,026$ ) w grupie chorych na zaawansowaną postać NDRP, którzy przestali odpowiadać na leczenie IKT EGFR, w porównaniu z grupą chorych prezentujących odpowiedź na leczenie.

Gasparini i wsp. [70] badali profile ekspresji miRNA w preparatach tkanki nowotworowej od 67 chorych na NDRP, które różniły się statusem mutacji kilku onkogenów: genu kinazy chłoniaaka anaplastycznego (ALK), EGFR i KRAS, w odniesieniu do 18 kontrolnych materiałów prawidłowej tkanki płuca. Analiza statystyczna danych metodą taksonomiczną (hierarchical clustering) pozwoliła wyodrębnić unikalne sygnatury ekspresji miRNA dla materiałów różniących się statusem rearanżacji genu ALK (rearanżacja genu versus typ natywny) oraz statusem mutacji genów EGFR i KRAS (mutacja genu versus typ natywny) wśród materiałów z natywnym wariantem ALK. Wysoki poziom ekspresji miR-504 korelował dodatnio

z obecnością mutacji w genie EGFR ( $p=0,04$ ). Sugeruje to możliwość wykorzystania cząsteczek miRNA jako nowych biomarkerów, które mogłyby uzupełnić metody molekularne stosowane obecnie w diagnostyce onkologicznej.

Należy podkreślić, że żadna z omawianych wyżej prac nie ma jeszcze charakteru aplikacyjnego, a jej wyniki nie mogą być wdrożone w praktyce klinicznej. Wskazana jest walidacja wytypowanych sygnatur miRNA w warunkach *ex vivo*, na podstawie zarówno nowotworowego materiału tkankowego, jak i krwi obwodowej (płynnej biopsji) od dużej liczby chorych na NDRP ze zróżnicowanym statusem mutacji genu EGFR, w celu jednoznacznej weryfikacji powyższych danych.

### miRNA regulujące szlak sygnałowy MAPK/ERK

Weiss i wsp. wysunęli hipotezę, że obniżona ekspresja lub utrata miRNA regulujących aktywność genu EGFR może powodować większą produkcję białka EGFR stanowiącego cel molekularny inhibitorów kinazy tyrozynowej [71]. Autorzy typowali miRNA o wysokiej homologii sekwencji do fragmentu 3'-UTR genu EGFR, których loci znajdowały się w regionach chromosomów szczególnie podatnych na delekcje w komórkach raka płuca. Po przeanalizowaniu danych wyselekcjonowano miRNA-128b, którego gen kodujący zlokalizowany jest na chromosomie 3p. Delekcję chromosomu 3p wykrywa się w 96 proc. przypadków raka płuca oraz 78 proc. próbek stanu przednowotworowego w nabłonku płuc. Utrata heterozygotyczności (delekcja jednego z alleli lub rearanżacja w regionie 3p22 chromosomu) miRNA-128b korelowała z lepszą odpowiedzią na gefitynib przez chorych leczonych IKT EGFR.

Edmonds i wsp. [72] obserwowali istotnie zwiększoną ekspresję miR-31 w preparatach tkanki nowotworowej od chorych na NDRP typu gruczolowego w I stadium w odniesieniu do prawidłowej tkanki płuc (5,7-krotny wzrost ekspresji). Co więcej, poziom ekspresji miR-31 istotnie wzrastał wraz z kolejnymi stopniami klinicznego zaawansowania nowotworu (13,5-krotny wzrost w stadiach II i II, 35-krotny wzrost w stadium IV;  $p=0,0001$ ). Indukowana nadekspresja miR-31 w tkance płuc transgenicznych myszy skutkowała rozwojem ognisk hiperplazji nabłonka płuc, prowadząc do rozwoju raka typu gruczolowego. Znacząco wyższy odsetek myszy z indukowaną transformacją nowotworową płuc obserwowano u zwierząt z jednoczesną nadekspresją miR-31 i zmutowanego genu *KRAS* (60 proc.) w stosunku do myszy z nadekspresją *KRAS* (40 proc.), co sugeruje synergizm działania obu czynników



w onkogenezie raka gruczołowego płuca. Następnie za pomocą analizy bioinformatycznej wytypowano geny, których regiony 3'-UTR w mRNA wykazywały wysokie powinowactwo do sekwencji miR-31. Cztery spośród wytypowanych genów: *RASA1*, *SPRED1*, *SPRED2*, *SPRY4*, to negatywne regulatory szlaku MAPK/ERK. Ekspresja tych genów na poziomie mRNA była istotnie obniżona w preparatach tkanki raka gruczołowego stosunku do wartości dla prawidłowej tkanki płuc oraz ujemnie korelowała z poziomem ekspresji miR-31. Potwierdza to onkogeną rolę miR-31 w rozwoju raka płuca typu gruczołowego poprzez regulację szlaku MAPK/ERK zależnego od EGFR.

W innych badaniach wywołanie nadekspresji 3 supresorowych miRNA (miRNA-126, miRNA-145, let-7) w liniach komórkowych raka płuca (H460, A549) z natywną formą genu EGFR oraz zmutowanym genem KRAS pozwoliło przełamać pierwotną oporność tych komórek na gefitynib [73]. W szczególności nadekspresja miRNA-126 zwiększyła aż 6-krotnie wrażliwość komórek linii H460 na cytotoksyczne działanie gefitynibu.

Webster i wsp. w badaniach *in vitro* linii raka płuca A549 zaobserwowali, że miR-7 jest zdolne do zablokowania ekspresji genów Raf1 i EGFR poprzez degradację ich mRNA [74]. Transfekcja komórek nowotworowych prekursorowym miR-7 (pre-miR-7) powodowała znaczące zmniejszenie ich żywotności, a w efekcie również ich liczebności. Dodatkowo spadek żywotności komórek linii A549 następował poprzez hamowanie ekspresji genu EGFR i indukację innych szlaków ekspresji genów wywołujących śmierć komórki.

#### Udział miRNA w aktywacji obocznych szlaków sygnałowych promujących oporność na IKT EGFR

Aktywacja obocznych (alternatywnych) szlaków sygnałowych, w szczególności szlaków HGF/Met oraz PI3K/AKT, należy do najczęstszych mechanizmów nabytej oporności na IKT EGFR zaraz po mutacjach oporności w genie EGFR. Identyfikacja miRNA regulujących aktywność genów zaangażowanych w szlaki sygnałowe promujące oporność komórek nowotworowych na IKT EGFR może stworzyć nowe kierunki badań nad rozwojem efektywniejszych terapii celowanych dla chorych na NDRP.

Szlak PI3K/AKT to jedna z głównych dróg przekazu sygnału od aktywowanego EGFR do wnętrza komórki, promującego jej proliferację i przeżycie [6, 75]. Badania wykazały, że szlak PI3K/AKT może

zostać aktywowany również przez sygnał pochodzący od IGF-1R (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1), w przypadku gdy EGFR został zablokowany [76]. Ponadto zwiększona aktywność kinazy w nowotworach może wynikać z amplifikacji genu PI3K lub obecności aktywujących mutacji w tym genie oraz utraty aktywności fosfatazy PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome).

Wykazano, że w raku płuca niska ekspresja genu PTEN, warunkująca oporność na IKT EGFR, jest wynikiem negatywnej regulacji przez miR-21. Li i wsp. [77] badali rolę miRNA w pierwotnej oporności na IKT EGFR u chorych na zaawansowane postaci NDRP, u których stwierdzono mutację w genie EGFR. W grupie 25 chorych na NDRP, którzy byli poddani leczeniu IKT EGFR, autorzy obserwowali istotny wzrost ekspresji miR-21 po nabyciu oporności na leczenie w porównaniu z wartościami początkowymi, przed leczeniem ( $p < 0,01$ ). Doświadczenia *in vivo* prowadzone na modelu mysim wykazały udział miR-21 w zjawisku nabywania oporności na IKT EGFR poprzez modulację ekspresji genów *PTEN* i *PDCD4* oraz aktywację ścieżki sygnałowej PI3K/AKT. W innych badaniach nadekspresja miR-21, indukowana w warunkach *in vitro*, znacząco zwiększała oporność linii komórkowej PC-9 na gefitynib poprzez obniżenie ekspresji PTEN, ale także stymulowała aktywację szlaku sygnałowego zależnego od AKT i ERK [78]. Natomiast knock-down genu miR-21 w linii niewrażliwej na IKT EGFR wywoływał proces odwrotny. U chorych na NDRP leczonych inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR wysoka ekspresja miR-21 korelowała z krótszym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby. Ponadto wysoka ekspresja miR-21 i niska ekspresja genu PTEN były istotnie związane ze słabszą odpowiedzią na leczenie IKT EGFR oraz krótszym całkowitym czasem przeżycia.

Ścieżka sygnałowa zależna od kinazy tyrozynowej c-Met, pełniącej funkcję receptora czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR), została zidentyfikowana jako potencjalny cel dla terapii ukierunkowanych molekularnie w wielu typach nowotworów, w tym NDRP [79]. W niedrobnokomórkowym raku płuca częstym zaburzeniem molekularnym jest nadekspresja genu HGF i/lub genu MET, kodującego receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów, które powiązane z nabytą opornością na IKT EGFR u 5-20 proc. chorych z mutacjami w genie EGFR poprzez zależną od ERBB-3 aktywację szlaku sygnałowego PI3K/AKT. Obecnie we wczesnych fazach badań klinicznych znajduje się kilka inhibitorów kinazy tyrozynowej oddziałujących na c-Met [80].

Dowodzono, że ekspresja genu MET podlega negatywnej regulacji ze strony trzech miRNA: miR-34a, miR-34b i miR-34c, stanowiących tzw. rodzinę miR-34 [81]. Transfekcja komórek nowotworowych syntetycznymi prekursorami miR-34b/c prowadziła do istotnego zmniejszenia białka c-Met w komórkach NDRP, nawet w tych, które uprzednio wykazywały nadekspresję i amplifikację genu MET [82]. W odpowiedzi na stymulację HGF transfekowane komórki wykazywały ograniczoną zdolność migracji i zrywania połączeń międzykomórkowych w stosunku do kontroli. Z kolei zablokowanie ekspresji endogennych miR-34b i miR-34c z użyciem syntetycznych „antagomiRów” (antagonistów miRNA) skutkowało zwiększeniem poziomu ekspresji MET.

Cząsteczki miRNA należące do klastra miR-221/222 pełnią funkcję onkogennych regulatorów genu MET [81]. Garofalo i wsp. [83] analizowali miRNA związane z mechanizmami oporności na IKT EGFR i wytypowali 8 cząsteczek (221/222, 30b/c, 21, 29a/c, 100), które podlegają zwrotnej regulacji ze strony zarówno EGFR, jak i MET. Autorzy wykazali, że gefitynib wywołuje apoptozę wrażliwej komórki NDRP poprzez hamowanie aktywności miR-30b/c oraz miR-221/222. Indukowana nadekspresja MET powodowała oporność komórek NDRP na gefitynib poprzez aktywację miR-30b/c i miR-221/222, przez co dalsze blokowanie EGFR za pomocą leku przestawało być skuteczne. Intryguje to, że jednoczesne stosowanie gefitynibu wraz z inhibitorami c-Met lub syntetycznymi antagonistami 221/222 i anti-30c pozwalało przełamać nabytą oporność na IKT EGFR w mysich modelach ksenograftów NDRP.

### Rola miRNA w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek NDRP

Cząsteczki miRNA odgrywają istotną rolę we wspomnianym już procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego, będącym jednym z mechanizmów nabytej oporności na IKT EGFR [84]. W procesie EMT komórki nabłonkowe przerywają połączenia międzykomórkowe i tracą właściwości adhezyjne, nabывая większej ruchliwości i zdolności do migracji. EMT komórek nowotworowych sprzyja progresji choroby i tworzeniu odległych przerzutów w organizmie.

Transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- $\beta$ 1) jest cytokiną o szerokim spektrum działania, która odpowiada m.in. za indukcję EMT poprzez aktywację wielu czynników transkrypcyjnych związanych z tym procesem, takich jak: Snail, Twist, ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1) [85]. Zdolność TGF- $\beta$ 1 do indukcji EMT potwierdzono zarówno

w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [86]. W badaniach nad epigenetyczną regulacją procesu EMT w niedrobnokomórkowym raku płuca wykazano udział miR-134 i miR-487b, które poprzez hamowanie ekspresji genu MAGI2 promowały fosforylację białka PTEN i utratę jego aktywności [87]. Utrata aktywności PTEN skutkowała nabyciem przez komórki NDRP oporności na gefitynib w warunkach *in vitro*.

W innej pracy dowiedziono, że miR-23a reguluje zależny od TGF- $\beta$ 1 proces EMT w komórkach NDRP poprzez hamowanie ekspresji E-kadheryny [88]. Nokaut genu miR-23a skutkował częściowym przywróceniem ekspresji E-kadheryny w warunkach stymulacji komórek TGF- $\beta$ 1. Natomiast indukowana nadekspresją miR-23a hamowała aktywność E-kadheryny, promując proces EMT, co z kolei istotnie wzmacniało oporność komórek na gefitynib.

Kolejnym miRNA zaangażowanym w mechanizm oporności na IKT EGFR jest miR-147 [89]. Poziom jego ekspresji jest znacząco obniżony zarówno w próbkach surowicy, jak i tkanek guza pobranych od chorych na NDRP [90]. W warunkach *in vitro* miR-147 wykazało zdolność do kontroli procesu przejścia mezenchymalno-epitelialnego komórek linii A549 i przywrócenia ich wrażliwości na IKT EGFR w komórkach nowotworowych pierwotnie opornych na ten typ terapii [89]. Indukcja nadekspresji miR-147 w transfekowanych komórkach NDRP skutkowała zmniejszeniem oporności na gefitynib. W innych badaniach indukowana nadekspresja miR-130a powodowała hamowanie proliferacji komórek NDRP i ich zwiększoną apoptozę po zastosowaniu gefitynibu, natomiast obniżenie ekspresji miR-130a wywoływało proces odwrotny [91].

Rodzina miR-200 oraz miR-205 odpowiada za regulację ekspresji czynników transkrypcyjnych ZEB1 i ZEB2 zaangażowanych w procesie EMT. Badania wskazują, że rodzina miR-200 kontroluje ekspresję ZEB1/2, lecz transkrypcja tych miRNA jest zwrotnie regulowana przez czynniki ZEB1/2. Ten wzajemny wpływ zapewnia ścisłą kontrolę procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, a zaburzenie równowagi między oddziałującymi ZEB1/2 a cząsteczkami z rodziny miR-200 powoduje nabycie zdolności do inwazji i przerzutowania przez komórkę nowotworową [89].

Intrygujących wyników dostarczyła kliniczna praca Li i wsp. [92], którzy obserwowali wyższą skuteczność leczenia IKT EGFR wśród chorych na NDRP bez mutacji somatycznych EGFR i wysoką ekspresją miR-200c w tkance nowotworowej (n=26) w porównaniu z grupą chorych z niskim poziomem ekspresji tego miRNA

(n=40). Chorzy z wysoką ekspresją miR-200c prezentowali istotnie dłuższy czas życia wolny od progresji (5 miesięcy [95% CI 1,41-8,59] vs. 1,2 miesiąca [95% CI 0,89-1,51]; p=0,001) i całkowity czas przeżycia (9,6 miesiąca [95% CI 4,27-14,93] vs. 5 miesięcy [95% CI 3,90-6,10]; p=0,037) oraz liczbowo wyższy odsetek odpowiedzi na leczenie (11,5% vs. 2,5%; p=0,292) niż chorzy z niską ekspresją. Podobnej zależności nie obserwowano jednak w grupie chorych na NDRP z mutacją EGFR (n=73). Powyższe dane sugerują potencjalną przydatność miR-200c jako kolejnego obok mutacji EGFR biomarkera predykcyjnego w leczeniu ukierunkowanym molekularnie chorych na zaawansowane postaci NDRP. Obecnie jedynie chorzy prezentujący obecność mutacji aktywującej EGFR w nowotworowym DNA mogą korzystać z leczenia IKT EGFR. Wyniki tej pracy wymagają potwierdzenia w prospektywnym badaniu klinicznym.

## PODSUMOWANIE

W ciągu kilkunastu lat, które upłynęły od odkrycia miRNA, wiele badań poświęcono możliwości wykorzystania tych małych, regulatorowych cząsteczek jako biomarkerów przydatnych w diagnozowaniu i leczeniu NDRP. Z uwagi na zaangażowanie miRNA w procesy kancerogenezy na wszystkich jej etapach cząsteczki te mogłyby służyć nie tylko jako specyficzne indykatory choroby nowotworowej płuc (biomarkery diagnostyczne), ale również jako dynamiczne wskaźniki statusu tkanki guza przed leczeniem (bio-

markery prognostyczne) i w jego trakcie (biomarkery predykcyjne). Szczególną przydatność kliniczną zdają się prezentować pozakomórkowe miRNA, wydzielane w stabilnej formie przez komórki nowotworu do krwi i innych płynów ustrojowych już we wczesnych stadiach rozwoju raka płuca. Ich podstawową zaletą jest łatwość śledzenia zmian ilościowych i jakościowych na każdym etapie choroby bez narażania pacjentów na inwazyjne pobieranie materiału do badań. Obecnie ogromne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząsteczek miRNA jako biomarkerów w prognozowaniu skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie, zwłaszcza opartego na IKT EGFR.

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

## PIŚMIENNICTWO

1. Siegel R., Naishadham D., Jemal A., *Cancer statistics, CA Cancer J Clin*, 2013; 63(1): 11-30.
2. Wojciechowska U., Didkowska J., *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów*, 2013.
3. Chorostowska-Wynimko J., Szpechciński A., The impact of genetic markers on the diagnosis of lung cancer: a current perspective, *J Thorac Oncol*, 2007; 2(11): 1044-51.
4. Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechciński A., Markery molekularne we wczesnej diagnostyce raka płuca – fakty i nadzieje, *Onkologia Info*, 8(3): 152-159.
5. Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechciński A., Molekularne markery prognostyczne i predykcyjne w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca, *Onkologia Info*, 2011; 8(3): 160-167.
6. Sharma S.V. et al., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat Rev Cancer*, 2007; 7(3): 169-81.
7. Lynch T.J. et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med*, 2004; 350(21): 2129-39.
8. Uramoto H., Mitsudomi T., Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer?, *British Journal of Cancer*, 2007; 96(6): 857-863.
9. Kawaguchi T. et al., Japanese ethnicity compared with Caucasian ethnicity and never-smoking status are independent favorable prognostic factors for overall survival in non-small cell lung cancer: a collaborative epidemiologic study of the National Hospital Organization Study Group for Lung Cancer (NHSGLC) in Japan and a Southern California Regional Cancer Registry databases, *J Thorac Oncol*, 2010; 5(7): 1001-10.
10. Rosell R. et al., Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *N Engl J Med*, 2009; 361(10): 958-67.



11. Shigematsu H. et al., Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers, *J Natl Cancer Inst*, 97(5): 339-46.
12. Park K. et al., Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial, *The Lancet Oncology*, 2016; 17(5): 577-589.
13. Haaland B. et al., Meta-analysis of first-line therapies in advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR-activating mutations, *J Thorac Oncol*, 9(6): 805-11.
14. Kowalczyk A. et al., Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca, *Onkol Prak Klin*, 2005; 1(4): 217-224.
15. Solca F. et al., Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, *J Pharmacol Exp Ther*, 2012; 343(2): 342-50.
16. Regales L. et al., Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer, *J Clin Invest*, 2009; 119(10): 3000-10.
17. Janjigian Y.Y. et al., Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations, *Cancer Discov*, 2014; 4(9): 1036-45.
18. Sullivan L., Planchard D., Osimertinib in the treatment of patients with epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive metastatic non-small cell lung cancer: clinical trial evidence and experience, *Thor Adv Respir Dis*, 2016; 10(6): 549-565.
19. Cross D.A. et al., AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer, *Cancer Discov*, 2014; 4(9): 1046-61.
20. Ramalingam S. et al., LBA1\_PR: Osimertinib as first-line treatment for EGFR mutation-positive advanced NSCLC: updated efficacy and safety results from two Phase I expansion cohorts, *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4): 152.
21. Lin L., Bivona T.G., Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients, *Chemother Res Pract*, 2012; 817297.
22. Janne P.A., Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours, *Lung Cancer*, 2008; 60 suppl. 2: 3-9.
23. Majem M., Remon J., Tumor heterogeneity: evolution through space and time in EGFR mutant non-small cell lung cancer patients, *Translational Lung Cancer Research*. 2013; 2(3): 226-237.
24. Wu S.G. et al., The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients, *Oncotarget*, 7(11): 12404-13.
25. Yu H.A. et al., Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR mutant Lung Cancers, *Clinical Cancer Research*; an official journal of the American Association for Cancer Research, 19(8): 2240-2247.
26. Inukai M. et al., Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer, *Cancer Res*, 2006; 66(16): 7854-8.
27. Gainor J.F., Shaw A.T., Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer, *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3987-96.
28. Song H.-N. et al., Acquired C797S mutation upon treatment with a T790M-specific third-generation EGFR inhibitor (HM61713) in non-small cell lung cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4): e45-e47.
29. Mao C. et al., KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies, *Lung Cancer*, 2010; 69(3): 272-8.
30. Ohashi K. et al., Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109(31): E2127-33.
31. Engelman J.A. et al., MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling, *Science*, 2007; 316(5827): 1039-43.
32. Yano S. et al., Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations, *Cancer Res*, 2008; 68(22): 9479-87.
33. Yano S. et al., Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort, *J Thorac Oncol*, 2011; 6(12): 2011-7.
34. Mazières J. et al., Lung cancer that harbors an HER2 mutation: Epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives, *Journal of Clinical Oncology*, 2013; 31(16): 1997-2003.
35. Sequist L.V. et al., Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Sci Transl Med*, 2011; 3(75): 75ra26.
36. Wang L. et al., PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup, *PLoS One*. 2014; 9(2): e88291.
37. Sos M.L. et al., PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of AKT and EGFR, *Cancer Res*, 2009; 69(8): 3256-61.
38. Yeo C.D. et al., Expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) predicts poor responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer patients harboring activating EGFR mutations, *Lung Cancer*, 2015; 87(3): 311-7.
39. Huang L. Fu L., Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Acta Pharm Sin B*, 2015; 5(5): 390-401.
40. Shien K. et al., Acquired Resistance to EGFR Inhibitors Is Associated with a Manifestation of Stem cell-



- like Properties in Cancer Cells, *Cancer Research*, 2013; 73(10): 3051-3061.
41. Uramoto H. et al., Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma, *Anticancer Res*, 2010; 30(7): 2513-7.
  42. Zandberga E. et al., Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer, *Genes Chromosomes & Cancer*, 2013; 52(4): 356-369.
  43. Baek D. et al., The impact of microRNAs on protein output, *Nature*, 455(7209): 64-71.
  44. Bartel D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 2004; 116(2): 281-97.
  45. Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B., Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function, *Trends in Biochemical Sciences*, 2012; 37(11): 460-465.
  46. Chou C.H. et al., miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database, *Nucleic Acids Res*, 2016; 44(D1): D239-47.
  47. Chang S. et al., MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode, *Nature*, 2004; 430(7001): 785-9.
  48. Lim L.P. et al., Vertebrate microRNA genes, *Science*, 2003; 299(5612): 1540.
  49. Berezikov E. et al., Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes, *Cell*, 2005; 120(1): 21-4.
  50. Giovannetti E. et al., Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012; 81(2): 103-22.
  51. Bartel D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009; 136(2): 215-33.
  52. Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D., Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements, *Cell Mol Life Sci*, 2012; 69(21): 3613-34.
  53. Pichon X. et al., RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation, *Curr Protein Pept Sci*, 2012; 13(4): 294-304.
  54. Schwarzenbach H. et al., Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer, *Nat Rev Clin Oncol*, 2014; 11(3): 145-56.
  55. Chen X. et al., Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases, *Cell Res*, 2008; 18(10): 997-1006.
  56. Gilad S. et al., Serum microRNAs are promising novel biomarkers, *PLoS One*, 2008; 3(9): e3148.
  57. Mitchell P.S. et al., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008; 105(30): 10513-10518.
  58. Park N.J. et al., Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection, *Clin Cancer Res*, 2009; 15(17): 5473-7.
  59. Hanke M. et al., 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.
  60. Kosaka N. et al., microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Silence*, 2010; 1(7).
  61. Cogswell J.P. et al., Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *Journal of Alzheimers Disease*, 2008; 14(1): 27-41.
  62. Hanson E.K., Lubenow H., Ballantyne J., Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Anal Biochem*, 2009; 387(2): 303-14.
  63. Lu J. et al., MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 2005; 435(7043): 834-8.
  64. Szaumkessel M., Szyfter K., mikro RNA w patogenezie płaskonabłonkowych raków głowy i szyi, *Biotechnologia*, 2010; 3(90): 64-74.
  65. Croce C.M., Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer, *Nat Rev Genet*, 2009; 10(10): 704-14.
  66. Zhang H. et al., Circulating microRNAs in relation to EGFR status and survival of lung adenocarcinoma in female non-smokers, *PLoS One*, 2013; 8(11): e81408.
  67. Ju L. et al., Exploration of genome-wide microRNA in lung adenocarcinoma with egfr exon 19 deletion: Mir-3196 as a potential biomarker, *Chest*, 2016; 149(4S): A329-A329.
  68. Zhao Q. et al., Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers, *American Journal of Cancer Research*, 2015; 5(5): 1692-1705.
  69. Wang S. et al., Identification of plasma microRNA profiles for primary resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EGFR activating mutation, *Journal of Hematology & Oncology*, 2015; 8: p. 127.
  70. Gasparini P. et al., microRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015; 112(48): 14924-9.
  71. Weiss G.J. et al., EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines, *Ann Oncol*, 2008; 19(6): 1053-9.
  72. Edmonds M.D. et al., MicroRNA-31 initiates lung tumorigenesis and promotes mutant KRAS-driven lung cancer, *J Clin Invest*, 2016; 126(1): 349-64.
  73. Zhong M. et al., MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer, *Chem Biol Interact*, 2010; 184(3): 431-8.
  74. Webster R.J. et al., Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7, *J Biol Chem*, 2009; 284(9): 5731-41.

75. Gandhi J. et al., Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines, *PLoS One*, 2009; 4(2): e4576.
76. Zhou J. et al., Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, 2015; 6(42): 44332-45.
77. Li B. et al., MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2014; 83(2): 146-153.
78. Shen H. et al., Alteration in Mir-21/P TEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer, *PLoS One*, 2014; 9(7): e103305.
79. Morgensztern D. et al., Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014, *J Thorac Oncol*, 2015; 10(1 suppl 1): 1-63.
80. Gelsomino F. et al., Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014; 89(2): 284-99.
81. Brighenti M. MicroRNA and MET in lung cancer, *Ann Transl Med*, 2015; 3(5): 68.
82. Migliore C. et al., MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth, *Cancer Res*, 2008; 68(24): 10128-36.
83. Garofalo M. et al., EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers, *Nat Med*, 2011; 18(1): 74-82.
84. Zhang J., Ma L., MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis, *Cancer Metastasis Rev*, 2012; 31(3-4): 653-62.
85. Miyazono K., Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009; 85(8): 314-23.
86. Zavadil J., Bottinger E.P., TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions, *Oncogene*, 2005; 24(37): 5764-74.
87. Kitamura K. et al., MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells, *Mol Cancer Ther*, 2014; 13(2): 444-53.
88. Cao M. et al., MiR-23a regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells, *Int J Oncol*, 2012; 41(3): 869-75.
89. Lee C.G. et al., MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance, *PLoS One*, 2014; 9(1): e84597.
90. Chu G., Zhang J., Chen X., Serum level of microRNA-147 as diagnostic biomarker in human non-small cell lung cancer, *J Drug Target*, 2016; 24(7): 613-7.
91. Zhou Y.M., Liu J., Sun W., MiR-130a overcomes gefitinib resistance by targeting met in non-small cell lung cancer cell lines, *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15(3): 1391-6.
92. Li J. et al., miR-200c overexpression is associated with better efficacy of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer patients with EGFR wild-type, *Oncotarget*, 2014; 5(17): 7902-16.