

MikroRNS-ek a hepatocarcinogenesisben

Lendvai Gábor dr.¹ ■ Kiss András dr.¹
Kovalszky Ilona dr.² ■ Schaff Zsuzsa dr.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,
¹II. Patológiai Intézet, ²I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Ma még nem ismert a hepatocarcinogenesis során bekövetkező molekuláris szintű változások minden részlete, azonban bizonyossá vált, hogy a génexpressziót többnyire negatívan szabályozó rövid RNS-molekulák, a mikroRNS-ek (miRNS) is érintettek ebben a folyamatban. Hiszen, a többi betegséghez hasonlóan, májbetegségekben is megváltozik e molekulák szintje a normális szinthez képest aszerint, hogy az adott miRNS által szabályozott gének – például az onko- és tumorsuppresszor gének – aktiválása vagy gátlása előnyös-e a betegség szempontjából. Feltételezhetően a hepatocellularis carcinoma miRNS-expressziós mintázata különbözik leginkább a normális állapotban mért mintázattól, azonban a májtumorhoz vezető út korai stádiumaiban, fibrosisos és krónikus hepatitiszes mintákban is jelentős miRNS-szintbeli eltéréseket írtak le: például a hepatocellularis carcinomára jellemző erős eltérést mutató miR-21, miR-221, miR-222 és miR-199a expressziója már e két korai stádiumban megváltozott. A májszövetre karakterisztikus miR-122 expressziós szintje májsérülés következtében általában csökken, illetve szintje csökkenő tendenciát mutat a carcinogenesis progressziójával. Emellett a miR-122 pozitívan hat a hepatitis C-vírus replikációjára, és az interferonterápiát megelőző miR-122-expresszió alacsony vagy magas szintje befolyásolni látszik a terápia eredményességét. Újabban szignifikáns különbségeket detektáltak több miRNS expressziójában krónikus hepatitiszes, cirrhoticus és hepatocellularis carcinomás betegek szérumban a kontrollmintákhoz képest, amely így felvetheti a szérumban miRNS-ek biomarkerként való alkalmazhatóságát. A dolgozat összefoglalja a hepatocarcinogenesis felé tartó májkárosodásokban – úgymint fibrosis, a hepatitisvírus-fertőzések, cirrhosis és hepatocellularis carcinoma – tapasztalt újabb és jelentősebb miRNS-változásokat. *Orv. Hetil.*, 2012, 153, 978–989.

Kulcsszavak: génexpresszió, mikroRNS, hepatocellularis carcinoma, cirrhosis, hepatitis, fibrosis, overexpresszió, downreguláció

MicroRNAs in hepatocarcinogenesis

The details of molecular alterations occurring during hepatocarcinogenesis have not been revealed yet. Nevertheless, it is known that microRNAs (miRNA), these short RNA molecules regulating gene expression mainly in a negative way, are also involved in this process. Altered miRNA expression levels are present in liver diseases when compared with normal liver tissue, and the observed alterations depend mainly on which is more advantageous for the disease: activation or inhibition of the genes (e.g. oncogenes or tumor suppressor genes) regulated by the altered miRNAs. The miRNA expression pattern described in hepatocellular carcinoma seems to differ the most from that found in the normal liver; however, remarkable alterations at miRNA levels have been published in early stages of hepatic tumor progression such as fibrosis and chronic hepatitis. For example, the expression of miR-21, miR-221, miR-222 and miR-199a showing characteristic alterations in hepatocellular carcinoma also displayed deregulated expressions in these two early stages. The liver characteristic miRNA, miR-122, usually exhibits a decreased expression level upon liver injury as well as miR-122 expression tends to decrease as hepatic carcinogenesis progresses. Besides, miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus and the initial low or high level of miR-122 seems to influence the efficiency of interferon therapy. Recently, statistically significant differences have been detected in the expression of several miRNAs being present in the serum of patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma

when compared with normal controls. It suggests that serum miRNAs could be potential biomarkers. In this article, the major and recent alterations of microRNA expression patterns in stages of hepatocarcinogenesis such as fibrosis, viral infections (hepatitis), cirrhosis and hepatocellular carcinoma are summarized. *Orv. Hetil.*, 2012, 153, 978–989.

Keywords: gene expression, microRNA, hepatocellular carcinoma, cirrhosis, hepatitis, fibrosis, overexpression, downregulation

(Beérkezett: 2012. április 13.; elfogadva: 2012. május 10.)

A Prof. Fehér János Emlékére Alapítvány 2012. évi pályázatának díjnyertes közleménye.

Rövidítések

Ago = argonauta; ECM = extracelluláris mátrix; FFP = formalinfixált, paraffinba ágyazott; HB = hepatoblastoma; HBV = hepatitis B-vírus; HCA = hepatocellularis adenoma; HCC = hepatocellularis carcinoma; HCV = hepatitis C-vírus; HGF = (hepatocyte growth factor) hepatocytá növekedési faktor; HSC = (hepatic stellate cell) májcsillagsejt; IFN = interferon; LOH = (loss of heterozygosity) heterozigotáság elvesztése; mRNS = (messenger) hírvivő RNS; miRNS = mikroRNS; PDGF = (platelet-derived growth factor) trombocytáeredetű növekedési faktor; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; siRNS = (small interfering) kis interferáló RNS; TGF- β = (transforming growth factor β) transzformáló növekedési faktor β ; UTR = (untranslated) nem transzlálódó régió

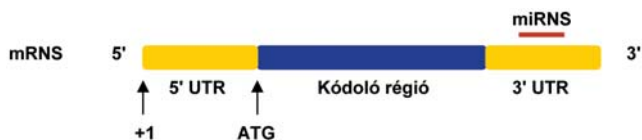
A májsejtek malignus neoplasiája többnyire krónikus májgyulladás következtében alakul ki. Az évekig, akár évtizedekig perzisztáló májgyulladás következtében a májszövet regenerálódóképessége fokozatosan kimerül és ez strukturális változásokat okoz a májban, fibrosishoz és cirrhosishoz vezet. A *fibrosis* megnövekedett extracelluláris mátrix termeléssel és rostok lerakódásával, míg a *cirrhosis* stromalis expanzióval és a májszövet nodularis szerkezeti átrendezésével (ahol osztódó és pusztuló hepatocyták találhatók nagy számban) idéz elő májfunkció-csökkenést. A *krónikus májgyulladás* sokféle etiológiájú lehet, leggyakoribb például a hepatitis B- és C-vírus (HBV, HCV), túlzott alkoholfogyasztás és metabolikus megbetegedések (elsősorban diabetezből eredő). Ezen gyulladáások a májszövet károsodása és a folyamatos regenerációs/proliferációs hatások (NF- κ B-aktiváció, fokozott TGF- β -út, MYC-overexpresszió) következtében elősegítik a transzformációt, és a cirrhoticus májban megjelenő magas fokozatú *dysplasticus nodulusok* körülbelül 30%-ából hepatocellularis carcinoma (HCC) alakul ki [1, 2, 3].

A barcelonai klinikai beosztás (BCLC) alapján a HCC prognózisa előre jelezhető és a terápia kiválasztható [1], azonban a HCC részletes patogenezise, főként molekuláris szinten, nem teljesen ismert. Többek között azért, mert a *dysplasticus* átalakulás minden betegnél eltérő,

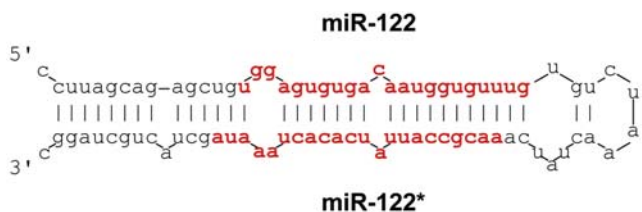
és ebből eredően a májrákká alakulás paraméterei sem egyértelműen előre jelezhetőek [3]. Viszont a májszövetben expresszált RNS-ek (transzkriptum) microarray-analíziséből úgy tűnik, hogy a cirrhoticus és a HCC-s májszövet transzkriptuma nagyobb hasonlóságot mutatott a normális májjal szemben [4]. Ez azt jelentené, hogy a cirrhoticus májban már megtalálható lenne a rák-képződéshez szükséges molekuláris háttér. A cirrhoticus és HCC-s szövetben eltérően expresszált RNS-ek között egyedül a Wnt/ β -katenin és a MAPK-út vonalak egyes tagjainak eltérő expressziója utalt a hepatocarcinogenesis folyamatára.

A betegségek molekuláris szintű okait és eltéréseit feltérképező genetikai, epigenetikai és génexpressziós vizsgálatok az utóbbi években kibővültek a mikroRNS-ek (miRNS) expressziójának vizsgálatával. Ennek egyik oka az, hogy e molekulák expressziós szintje patológiás (elsősorban tumoros és gyulladákos) állapotokban a normális szinthez képest megváltozik, fokozódik vagy csökken [5, 6], a másik pedig az, hogy ezeket a „kicsi” RNS-molekulákat (az érett miRNS 19–23 nukleotidhosszú) nemcsak szövetekből, hanem plazmából és szérumból is ki lehet mutatni [7]. Vagyis a megfelelő miRNS-markerek fontos szerepet tölthetnének be a betegségek pontosabb diagnosztizálásában, a szövetekben végbemenő patológiás folyamatok nyomon követésében, valamint a terápia hatásosságának követésében.

További előnyt jelent, hogy a patológiai gyakorlatban fontos formalinfixált, paraffinba ágyazott (FFP) minták is alkalmasak miRNS-vizsgálatokra, mivel a rövid miRNS-molekulák kevésbé töredeznek, szemben az mRNS-ekkel [8, 9], az FFP- és fagyasztott mintákban a miRNS-ek expressziója 95%-os korrelációját mutatott (míg ugyanez mRNS esetén csak 28% volt), és a miRNS-expressziót 10 évre visszamenő archív mintákban is stabilnak találták. A miRNS-ek tehát ígéretes molekuláknak tűnnek, és az FFP-mintákban való szinte korlátlan vizsgálhatóság igen értékes forrása lehet az egyes betegségek tanulmányozásának és korszerű diagnosztikájának.



1. ábra A miRNS a 3'-UTR-hez (nem translálódó régió) kötődik az mRNS-molekulán



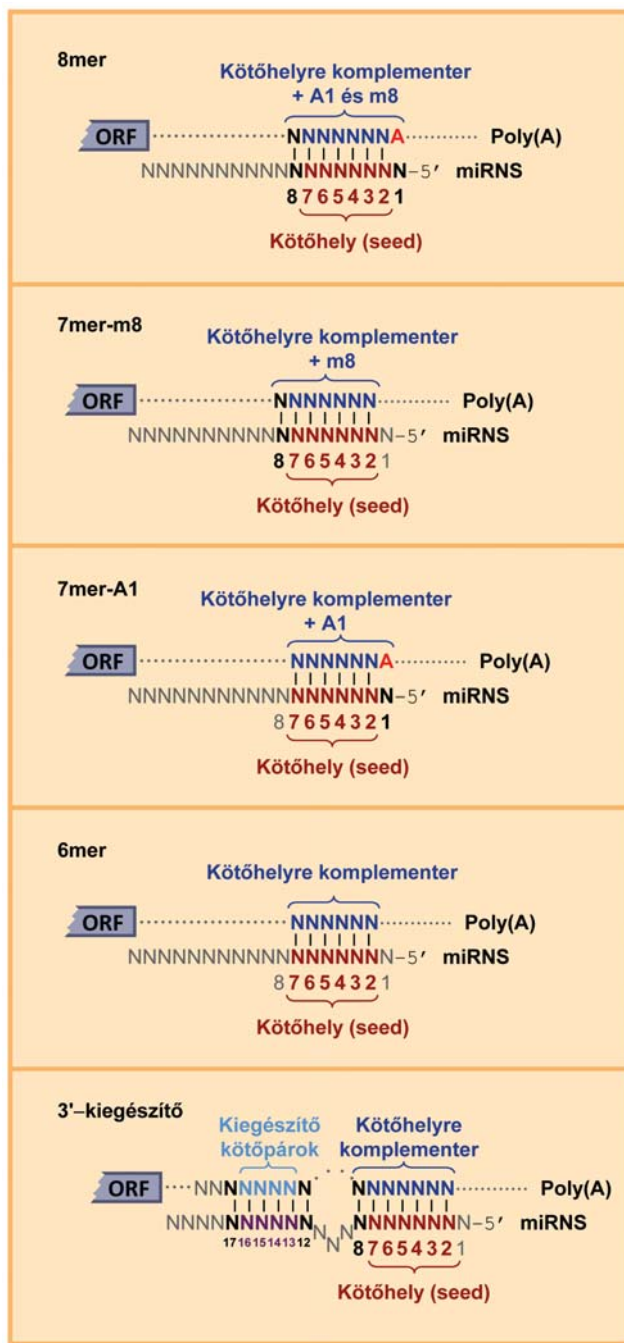
2. ábra A 85 nukleotid hosszú humán pre-miR-122 szekvenciája, kiemelve a 22 nukleotid hosszú érett miR-122 (5' vég) és a szemben lévő, többnyire inaktív miR-122* (3' vég) látható

A miRNS-ek és a génexpresszióra kifejtett hatásuk

A miRNS-ek már több mint tíz éve ismertek, számuk egyre bővül és mind a növény-, mind az állatvilágban univerzálisan megtalálhatóak. Olyan RNS-molekulák, amelyek fehérjét nem kódolnak, viszont befolyásolják adott mRNS-ek translációját azáltal, hogy az mRNS-molekula 3' UTR (untranslated region) részéhez kötődve (1. ábra) többnyire gátolják a fehérje szintézisét [9]. Vagyis a miRNS-ek a génexpresszió poszttranszkripció szintű negatív regulátorainak tekinthetők. Ismert pozitív szabályozás is, például a miR-122 stimulálja a HCV replikációját in vitro, bár a jelenség nem gyakori. A pozitív szabályozás feltételezhetően inkább indirekt úton valósul meg.

A miRNS-ek génei megtalálhatóak önálló transzkripció egységekben, míg másoké egy fehérje génjének kivágásra kerülő, fehérjét nem kódoló intronjában (mirtron) bújik meg (a miRNS-gének körülbelül 50%-a ilyen), végül léteznek szekvenciálisan megtalálható, úgynevezett miRNS clustererek (például a miR-17-92 vagy a miR-106b-25 cluster), ahol három-hat miRNS-szekvencia 1–5 kb távolságon belül található, és amelyek egyetlen, polisztronos transzkriptummá íródnak át [7, 10].

A transzkripciót követően a miRNS-ek érési folyamaton mennek keresztül, ahol a hosszú, sokszor több száz-tól ezer bázispárig terjedő, visszahajló és önmagával részben kettős szálú láncot képező, hajtúszerű elsődleges miRNS (pri-miRNS, primary) molekula két lépésben 19-23 nukleotid hosszú kettős szálú termékre hasítódik (2. ábra). Helikázaktivitás hatására a citoplazmában egyláncúvá bomlik fel és a RISC-Ago2 fehérjekomplex részévé válik (RISC: RNA-induced silencing complex, Ago: argonauta), az mRNS célmolekulákhoz kötődve akadályozzák annak translációját [7, 11].



3. ábra A miRNS kötőhelyének különböző típusai a transláció gátlásának hatásossága szerinti rangsorban. A leghatásosabb a 8mer (a 2–8. nukleotidok képeznek bázispárt a mRNS-sel, valamint egy adeninnel szembeni nem komplementer bázispár, amely a megfigyelések alapján eredményesebb translációgátlást idéz elő). Ennél gyengébb a 7mer-m8 (a mRNS-sel a 2–8. nukleotidok képeznek bázispárokat), majd még gyengébb a 7mer-A1 (a 2–7. nukleotidok vesznek részt a bázispárok képzésében, valamint az adeninnel szembeni nem komplementer bázispár). Ezeket kanonikus kötőhelyeknek nevezik (a seed 7–8 nukleotid-hosszú). Ezeknél is gyengébb a 6mer, ahol csak a 2–7. nukleotid képez bázispárt a mRNS-sel, viszont sokkal gyakrabban bizonyul a fajok között konzerváltnak, mint a hosszabb kötőhelyek. A 3'-kiegészítő kötőhelyben többnyire a miRNS 13–16. nukleotidja vesz részt, megtalálható mind a négy előbb felsorolt kötőhelytípus kiegészítőjeként, és ezen 3–4 nukleotid hosszú bázispárok általában növelik a miRNS hatékonyságát. Továbbá ezek a kiegészítő helyek kompenzálhatják a miRNS 2–7 nukleotidjával (seed) szembeni egy-két nem komplementer bázispárt is

A miRNS-ek hivatalos portálján (www.mirbase.org [12]) a legújabb frissítésben (2011. november) már 1898 egyedi humán miRNS adatait, szekvenciáját találjuk meg. A microRNA.org (www.microorna.org) weboldalon pedig a miRNS-mRNS közötti target kapcsolatokra kereshetünk rá, ahol jelenleg 1100 humán miRNS szoftveresen megjósolt target kötőhelyei érhetőek el, valamint 19 900 humán gént potenciálisan befolyásolni képes miRNS-ek listája és kötőhelyei kereshetők ki.

Az siRNS-ekkel ellentétben a miRNS-ek esetében a teljes komplementaritás nem feltétele a gátlásnak [10]. A miRNS komplementer szakasza csupán egy úgynevezett *mag- (seed) régióra* korlátozódik, amely az emlősök miRNS-ére általános érvényű [13]. Ez egy 6–8 nukleotidhosszú szakasz a miRNS 5' végi 1–8. nukleotidja között, amelyhez ettől 1–5 nukleotid távolságra egy újabb, 3–4 nukleotidhosszú kiegészítő kötőhely csatlakozhat a miRNS 13–16. nukleotidja között, amely erősíti a miRNS hatékonyságát (3. ábra).

A transláció gátlásának folyamatára több hipotézis született: 1. az mRNS sapkája (cap) a miRNS-RISC fehérjekomplexhez kötődik, meggátolva a transláció megkezdését; 2. a miRNS előidézi az mRNS deadenilációját, amelynek következtében az mRNS nem tudja a translációhoz szükséges cirkuláris formát felvenni; 3. a miRNS a riboszómaalegységek (unitok) leválását idézheti elő röviddel a transláció megkezdése után [10]. Előfordul azonban 100%-os komplementaritás is, amely az mRNS endonukleáz általi hasítását eredményezi (*Ago* által katalizált). Nagy valószínűséggel a transláció gátlása is az mRNS lebomlásával jár (P-bodies – processing-bodies), nincs viszont egyértelmű információ a miRNS sorsáról, feltételezhetően újra hasznosul.

Mivel a gátláshoz elegendő a részleges komplementaritás, egy miRNS-nek több száz különféle mRNS-célmolekulája is lehet (például a humán miR-122 esetén a microRNA.org targetkereső szoftver 7204 célmolekulát jósol). Másrészt egy mRNS 3' UTR régiójában több száz különféle miRNS-kötő hely is megtalálható (a TP53 esetén 29, a PTEN esetén 185 miRNS-kötő hely, www.microorna.org). Néhány miRNS többszörös (2–3) kötőhellyel is rendelkezik ugyanazon az mRNS 3' UTR-en [14]. Azt is megfigyelték, hogy a háztartási gének rövidebb 3' UTR-rel rendelkeznek, amely így kevesebb miRNS-kötő helyet enged meg, szemben a hosszú 3' UTR-rel rendelkező mRNS-ekkel, például egy adott fejlődési szakaszban jelentősen csökkenő expressziót mutató mRNS-ek, amelyek viszont eredményesen szabályozhatók miRNS-ekkel [15]. Mindezek igencsak nehézzé teszik a génműködés miRNS-ek általi szabályozásának kibogozását, de a szövetek miRNS-profiljának ismerete közelebb vihet a biológiai folyamatok megértéséhez.

A miRNS-ek által szabályozott gének fontos életműködésekkel kapcsolatos folyamatokat regulálnak, mint

például az egyedfejlődés pontos időbeli lefolyása, sejt-differenciáció, a szervek kialakulása, az őssejtek osztódása, a sejtek sorsának meghatározása, apoptózis, jelátviteli utak enzimei, haematopoieticus vonal differenciálódása, a gazda-vírus interakció [16, 17].

Mivel a miRNS-ek többek között a differenciációban, sejtosztódásban, apoptózisban és jelátviteli utakban szerepet játszó gének expresszióját befolyásolják, szerepet játszanak a daganatok kialakulásában és progressziójában. Az *onkogén hatású miRNS-ek* (expressziójuk az egészségeshez képest fokozódik) lecsökkentik a tumorszuppresszorok vagy más, sejt-differenciációban részt vevő gének kifejeződését a daganatszövetekben, ezáltal az osztódás, érésképződés és invázió serkentésével hozzájárulnak a tumorképzéshez, ugyanakkor a *tumorszuppresszorként viselkedő miRNS-ek* (expressziójuk egészségeshez képest csökkent) célmolekulái között főként az onkogenikus aktivitású fehérjék mRNS-eit találjuk [9, 11].

A miRNS-ek vizsgálatát a sejtekben hibridizációs technikákkal (Northern blot, microarray, *in situ* hibridizáció) vagy valós idejű PCR-rel, legújabban pedig új generációs szekvenálással (next generation sequencing) lehet kivitelezni, attól függően, hogy minőségi, mennyiségi meghatározás vagy rövid idő alatt nagy mintaszámú vizsgálat, illetve új miRNS-ek felfedezése a kívánt cél [7].

MikroRNS-expresszió az egészséges májban

A máj parenchymalis hepatocytákból, biliaris sejtekből és nem parenchymalis sejtekből (endothelsejtek, csillagsejtek, Kupffer-sejtek, pit sejtek) áll. Feltételezhetően mindegyik sejtípusnak más egyéni miRNS-expressziós profilja lehet [18], amelyet eddig teljes mértékben még nem vizsgáltak. Nagy valószínűséggel a hepatocyták adják a miRNS-profil nagy részét, amely körülbelül 100 különféle miRNS-ből állhat. Ezek között is van néhány kifejezetten erősen expresszálandó, mint például miR-122, let-7a, miR-22, miR-125b, miR-143, miR-194, miR-24, miR-199a, miR-21, miR-3c, miR-321 [18, 19]. Ezen miRNS-típusok között a miR-122 tekinthető kifejezetten máj-specifikusnak, valamint a miR-192 és miR-194, habár ez utóbbi kettő a májon kívül más, endodermából származó szövetekben (tüdő, gastrointestinalis traktus) is megtalálható [19]. A miR-122 adja a máj teljes miRNS-készletének mintegy 70%-át, ez a leginkább máj-specifikus miRNS, körülbelül 66 000 kópia van egy átlagos májsejtben [20]. A májon kívül még az agyban (200-szor kevesebb) és a thymusban (300-szor kevesebb) található miR-122 nagyon alacsony kópia-számban [10]. A miR-122 pozitívan szabályozza a koleszterol- és trigliceridszintet, gátolja a zsírsav-oxidációt [21, 22], valamint jelenléte elősegíti a HCV virális RNS-ének replikációját és translációját [23].

MikroRNS-expressziós változások a hepatocarcinogenesis során

Fibrosis

Krónikus gyulladás a májban fibrosishoz vezet, amit a hepaticus csillagsejtek (HSC – hepatic stellate cell) és fibroblastok által termelt *extracelluláris mátrix* (ECM) és *rostok* (kollagén, proteoglikán, fibronektin) *lerakódása* jellemez. Fibrosist okoz a nekrozis vagy infiltráló immunsejtek jelenléte miatti normális sejt-sejt és sejt-mátrix közti kapcsolatok megváltozása és újak keletkezése, amelynek eredménye, hogy a májsejtgerendák közti Disse-térben az ECM kollagénrostokban és fibronektinben gazdag mátrixra alakul át [16, 24]. Ennek következtében a májfunkciók is fokozatosan károsodnak, mivel a hepatocyták sem tudják feladatukat ellátni, az endothelsejtek átteresztőképessége csökken és a szomszédos sejtek kevésbé képesek az oldott anyagok cseréjére. A fokozott TIMP-1- (tissue inhibitor of metalloproteinase) és a gátolt MMP-1- (mátrixmetalloproteináz-) expresszió előidéz az ECM felhalmozódását, a csillagsejtek aktiválásában pedig főként a Kuppfer-sejtek által termelt TGF- β (transzformáló növekedési faktor β) és PDGF (thrombocytaredetű növekedési faktor) játszik fontos szerepet, míg a fibrosist aktiváló citokinek a c-myc és rac-1 aktivitásával fejtik ki hatásukat [24, 25].

Fibrosismodellben a miR-150 és miR-194 jelentős alulszabályozását tapasztalták, amelyekről kiderült, hogy a c-myc az előbbi, míg a rac-1 az utóbbi target mRNS-ei között megtalálható. E két miRNS overexpressziója pedig nemcsak a proliferációt csökkentette, hanem az ECM- (kollagén I-) felhalmozódást is [25]. A miR-27a és miR-27b alulszabályozottsága esetén a csillagsejtek nyugalmi állapotba kerültek, osztódásuk csökkent és a lipidcseppek is újra megjelentek a sejtekben [26]. Aktivált HSC-sejteken végzett vizsgálat a miR-29a és miR-29b csökkent expresszióját mutatta ki a kollagén I és IV akkumulációja során, míg a sejtekben létrehozott fokozott miR-29a- és miR-29b-expresszió jelentősen csökkentette e két kollagén szintézisét. A két miR-29-szintet a kísérletben a profibroticus TGF- β csökkentette, míg az antifibroticus HGF (hepatocytanövekedési faktor) emelte [27]. A csökkent miR-29-szintet mind HCV-fertőzött humán mintákban, mind HCV-vel fertőzött sejtekben is megfigyelték [28]. Sikertült azonosítani egy, a TGF- β -jelátviteli útra (TGF- β -receptor-II és SMAD3) negatívan ható miRNS-t, a miR-19b-t, amely valóban csökkentette a kollagén I-szintet. A miR-19b a miR-17-92 cluster (miR-17, -18a, -19a/b, -20a, miR-92a) része, amelynek minden tagja csökkent expressziót mutat aktivált csillagsejtekben. Fibroticus humán mintákban is igazolták a miR-19b jelentős csökkenését egészséges májmintákkal összevetve [29]. A fibrosis súlyosságával korreláló négy miRNS-t – miR-199a, miR-199a*, miR-200a és miR-200b – is sikerült azonosítani HCV-fertőzött biopsziás mintákban, ahol a súlyos fibrosis (F3)

szignifikáns különbséget mutatott az enyhébb fibrosissal (F0-F2) az első három miRNS esetében [30]. Míg az utolsó két miRNS a közepesen súlyos fibrosis (F2) és az enyhébb fibrosisok (F0, illetve F1) között is szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Hasonlóan a fibrosis súlyosságával fokozatosan emelkedő miR-199a-5p-, miR-199a-3p-, miR-221- és miR-222-expressziót írtak le HCV-fertőzött biopsziás mintákban. Szignifikáns különbséget egyedül az enyhe (F1) és legkifejezettebb (F4) fibrosis között találtak mind a négy miRNS esetében [31]. Aktivált HSC-kultúrában viszont csak a miR-221- és miR-222-expresszió emelkedett, méghozzá a kollagén I-mRNS-szint emelkedésével együtt.

Az ismertetett expressziós különbségek – főleg a fibrosis mértékével változók – reményt keltőek a jövőbeni pontosabb fibrosisdiagnosztikát tekintve, ugyanakkor a szabályozási folyamatok és a fibrosist indukáló és gátló miRNS-ek ismerete a jövőbeni terápia szempontjából kínál lehetőségeket.

Hepatitis B-vírus- (HBV-) és hepatitis C-vírus- (HCV-) fertőzés

A HBV- és HCV-fertőzések körülbelül 5–10%-a, illetve 70–80%-a krónikus gyulladássá alakul, amelynek legrosszabb prognózisa az, hogy 20–40 éven belül cirrhosis-hoz és HCC-hez vezethet. Ezért a rák felé progresszióba lépő molekuláris történések megismerése lehetőséget adhatna arra, hogy a malignus folyamatokat még idejében meg tudjuk előzni.

Vírusetiológiától függetlenül emelkedett miR-21-, miR-221-, miR-222- és csökkent miR-122-, miR-199-, miR-200-szintet találtak HCC és krónikus hepatitis összehasonlításakor, amely a HBV és HCV talaján kialakult hepatocarcinogenesis közös mechanizmusára utal [32]. Ugyanakkor 19 miRNS esetén mértek expressziós különbséget a HBV- és HCV-pozitív (beleértve a krónikus hepatitis és HCC-t is) betegcsoportok között [33]. Ezek közül HBV esetén hat miRNS (miR-23a, miR-142-5p, miR-34c, miR-124b, let-7a, miR-27a), HCV esetén 13 miRNS (miR-190, miR-134, miR-151, miR-193, miR-133b, miR-324-5p, miR-182, miR-105, miR-211, miR-20, miR-191, miR-340, miR-194) mutatott csökkent expressziót. A hat HBV-t érintő miRNS-ek apoptózis, DNS-hiba és DNS-rekombináció, valamint transzkripció szignálgének mRNS-eit szabályozzák, míg a 13 HCV-hez köthető miRNS az immunválaszban, antigén-bemutatásban, sejtciklusban, proteaszóma- és lipidanyagcserében részt vevő gének mRNS-eit regulálja. További 23 miRNS mutatott különbséget HCC (HBV- vagy HCV-eredettől függetlenül) és krónikus hepatitis között (például miR-130a, miR-223, miR-200a, miR-125b, miR-199a*, miR-122, miR-199a csökkent és miR-221, miR-222, miR-301, miR-21 emelkedett HCC-ben). HCC-ben a krónikus gyulladáshoz képest az a 17 miRNS vált alulszabályozottá (például miR-130a, miR-223, miR-200a, miR-125b, miR-199a),

amelyek ezzel a sejtciklusban, sejtadhézióban, proteolízisben, transzkripcióban, translációban és Wnt-jelátviteli útban szereplő tumorképző fehérjék overexpresszióját idézték elő. Ugyanakkor hat miRNS mutatott fokozott expressziót HCC-ben (miR-221, miR-222, miR-301, miR-21, miR-183, miR-98), amelyek mindegyike gyulladásban aktív jelátviteli utakat gátol és valószínűleg funkcióképtelen antitumoros immunválaszt eredményezhet [33].

Feltételezhetően akut és krónikus gyulladás között is vannak olyan mechanizmusok, amelyek azonosan változnak mindkét állapotban és olyanok is, amelyek specifikusak. Ezt látszik igazolni az akut és krónikus HBV májminták összevetésekor megfigyelt 14 olyan miRNS, amelyek expressziója mind a két állapotban azonosan változott (például miR-17, miR-18a, miR-26b, miR-106a, miR-130a csökkent, míg miR-196b emelkedett). Ezzel szemben 11 miRNS expressziója, érdekes módon, ellentétesen változott meg a két állapotban (például let-7a, miR-23a, miR-29b, miR-146a, miR-181a csökkent akut, de emelkedett krónikus HBV-ben) [34].

Miután kiderült, hogy a májkarakterisztikus miR-122 pozitívan szabályozza, stimulálja a HCV-RNS replikációját *in vitro* [23], intenzív kutatás vette kezdetét. Két miR-122-célhelyet is azonosítottak a HCV genom 5'-UTR régiójában, és a replikációt fokozó hatás, úgy tűnik, egyrészt abból ered, hogy a miR-122 elősegíti a riboszómák kapcsolódását a vírus RNS-sel a transláció iniciációjakor [35], illetve, hogy a bekötődés védi a vírusgenomot az exonukleázokkal szemben, lebontását lassítja [36]. A stabilizációt feltehetőleg a RISC-komplexben az Ago2 és a miR-122 teremti meg, és nem szükséges, hogy a virális RNS éppen replikálódjon.

In vivo azonban a miR-122-szint pozitív korrelációját sem az intrahepaticus, sem a szérumbeli vírustiter között nem sikerült kimutatni [37]. Elég nagyszámú (185) minta vizsgálata gyenge pozitivitáshoz vezetett az intrahepaticus miR-122 és szérum-HCV-titer között [38]. Az interferon- (IFN-) terápiát követően szintén nem találtak korrelációt a miR-122 és a víruszám között. Azonban meglepően alacsony miR-122-szintet figyeltek meg azon betegek kezelés előtti mintáiban, akiknél az interferonkezelés víruszámcsökkenést nem okozott [37]. Kiderült, hogy az IFN- β negatívan hatott a miR-122-szintre májrakos sejtvonalon, vagyis az alapállapotban már alacsony miR-122 következtében az IFN-rendszer preaktivált állapotban van és a terápiás peg-IFN- α már nem tud jelentős változást előidézni.

Ugyanakkor HCV-fertőzött csimpánzoknak *in vivo* beadott anti-miR-122 (a miR-122-vel komplementer antiszenz oligonukleotid) hatásosan csökkentette a viraemiát – a HCV RNS-ének mennyisége csökkent a szérumban és a májban egyaránt –, emellett ugyancsak csökkent az állatok koleszterinszintje [39]. Kiemelendő, hogy a miRNS-gátló kezelésre nem tapasztaltak rezisztenciát a kezelés ideje alatt. A viraemia csökkenése a legtöbb interferon indukálta gén expresszióját is mér-

sékelte (amit az IP-10 kemokin csökkenése is jelzett a szérumban). Ez azért meglepő eredmény, mert a csimpánzok nem reagálnak az IFN-re, mégis az IFN jelátviteli út normalizálódni tudott anti-miR-122 hatására még akkor is, ha a terápia nem tudta teljesen eltüntetni a vírus-RNS-t. Ez ígéretesnek hangzik, ha az anti-miR-122 terápiás alkalmazásával elérhető lenne az interferon indukálta gén expressziós gátlása, vagyis a nem reagáló betegek INF-érzékennyé válhatnának [39].

Úgy tűnik újabban, hogy a HBV-fertőzés és a miR-122-expresszió is szorosan összefügg, mivel ez utóbbi negatívan korrelált az intrahepaticus víruszámmal [40], továbbá miR-122 is kötődik a HBV polimerázának és core fehérjéjének mRNS-éhez, amellyel gátolja a génextpressziót és a -replikációt [41].

Arra is ismerünk adatokat, hogy a miR-122-szint negatív korrelációt mutat a májszövetben a HCV által indukált fibrosis mértékével, és hogy a miR-122 emelkedett értéket mutat krónikus HCV-fertőzöttek szérumban [42]. A HCV-fertőzött humán májbiopsziákban a miR-21 korrelált a vírustiterrel, a fibrosis mértékével és a szérumtranszaminázok szintjével, míg a miR-122 negatívan korrelált a transzaminázok szintjével [43]. Egy másik vizsgálatban a szérum miR-122 korrelált a HBsAg-, HBV-DNS- és ALT-értékekkel, és az expressziós szintek alapján elválaszthatóak voltak egymástól a HBV-fertőzöttek és az egészségesek, valamint a magas és alacsony HBsAg-szintet mutató betegek [44]. HCV-fertőzött szérumban a miR-122, miR-34a és miR-16 szignifikánsan magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollszérumhoz képest, viszont egyik miRNS sem mutatott korrelációt a HCV-víruszámmal [45].

A fenti adatok arra utalnak, hogy az antivirális szerek sora talán a jövőben az anti-miRNS-kezeléssel is kiegészülhet a hagyományos terápiára nem reagáló betegekben.

Cirrhosis

Huzamosabb ideig fennálló májgyulladás a fibrosison túl már súlyosabb fokú májkárosodáshoz, cirrhosishoz vezet, amelyre jellemző a visszafordíthatatlan stromalis expanzió (hegszövet) és a nodularis szöveti szerkezet megjelenése [46]. A cirrhosis a HCC egyik fő rizikófaktora.

Cirrhosis májmintákon a májkarakterisztikus miR-122 31%-os csökkenését, illetve a miR-23a, miR-27 és miR-24 jelentős emelkedését tapasztalták normális májmintákhoz viszonyítva [21, 47]. Cirrhosis és krónikus hepatitis minták összehasonlítása hét miRNS expressziójának növekedését (miR-28, miR-342, miR-125b, miR-199a, miR-145b, miR-143, miR-368) és három miRNS csökkenését (miR-182, miR-224 és miR-15b) eredményezte cirrhosisban [48]. Cirrhosis és cirrhosis talaján kialakult HCC között 35 eltérő expressziójú miRNS-t figyeltek meg. A HCC-k 83%-ában fokozott miR-221, 70%-ában alulszabályozott let-7a és

miR-122 volt jelen a cirrhoticus szövetpárhoz képest [49]. A további alulszabályozott miRNS-ek HCC-ben cirrhotishoz képest a let-7a, let-7c, miR-130a, miR-145, miR-150, miR-195, miR-199a, miR-214, miR-223 voltak. Ugyanakkor cirrhoticus és hepatitisvírus-fertőzött HCC-májmintákban szignifikáns miR-195-, miR-222-, miR181b-, miR-200c- és let-7a-emelkedést találtak a nem cirrhoticus és nem hepatitis HCC-mintákkal szemben, míg normális májszövetrel összehasonlítva 61 miRNS szintje mutatott emelkedett értéket [46].

Tumorprogresszió során miR-106b-, miR-21-, miR-210-, miR-221-, miR-222-, miR-224-, miR-34a-, miR-425-, miR-519a-, miR-93- és miR-96-expresszió növekedett a normális májszövet → cirrhosis → HCC irányban, illetve a let-7c expressziója csökkent [50], míg hét olyan miRNS-t találtak, amelyek expressziója hepatitis, cirrhosis és HCC állapotban is egyaránt fokozódott (miR-21, miR-106b, miR-130b, miR-221, miR-301) vagy csökkent (miR-199a-5p, miR-199b) [51].

Az ismertetett eredmények azt sugallják, hogy a cirrhosis és hepatitisvírus-fertőzés fontos változásokat idéz elő a miRNS-expresszióban, viszont a cirrhosis–HCC átmenet már nem tűnik ennyire markánsnak miRNS-szinten [46].

További, cirrhotisra jellemző miRNS-expressziós eltérést találtak HCC-mintákban, ahol a magasabb miR-21-, miR-31-, miR-122- és miR-221-expresszió korrelált a cirrhosis jelenlétével (a különbségek szignifikánsak voltak) [52], míg szérumban a miR-885-5p-expresszió szignifikánsan magasabbnak bizonyult HCC-, cirrhotikus és krónikus HBV-fertőzéses betegek mintáiban egészséges kontrollokhoz képest [53].

A fenti eredmények azt feltételezik, hogy miRNS-szinten a cirrhosis egy köztes állapot a hepatocarcinogenesis folyamatában. Még nem ismerünk olyan miRNS-markereket, amelyek megjósolnák a cirrhotisból HCC-vé fejlődést, de valószínűleg ilyen miRNS-változásokat a cirrhotist megelőző stádiumban kell keresni.

Hepatocellularis carcinoma (HCC)

A HCC az ötödik leggyakoribb malignus daganat a világon és a harmadik leggyakoribb daganatos halálok. A HCC etiológiáját tekintve igen heterogén, amely feltehetőleg az adott rizikófaktorra jellemző (például HBV-, HCV-fertőzés következtében kialakult krónikus gyulladás, alkoholos steatohepatitis, metabolikus betegségek, mint például inzulinrezisztencia, nem alkoholos steatohepatitis, valamint genetikai rendellenességek [1, 16, 21]) mikroRNS-expressziós profilokban is megmutatkozik. Azonban „tisza” etiológiájú csoportok felállítása és vizsgálata többnyire nehezen kivitelezhető, ezért jelenleg eredményesebb a szövettani struktúra szerint összehasonlítani a miRNS-expressziós változásokat. A publikált adatokban sokszor csak részleges átfedéseket tapasztalunk, amely egyrészt az említett heterogén etiológiával rendelkező beteganyaggal, másrészt

a miRNS-profil meghatározásához alkalmazott különböző érzékenységgű módszerekkel (például valós idejű vagy kvantitatív PCR szemben az alacsonyabb szenzitivitású microarray) magyarázható.

Benignus (hepatocellularis adenoma és fokális nodularis hyperplasia) és malignus májtumorok összehasonlításakor azt tapasztalták, hogy miR-224 mindkettőben túltermelődik (N<B<M sorrendben; normális, benignus, malignus), míg a miR-122 és miR-422b mindkettőben alacsonyan expresszálódik (N>B>M) a normális májszövethez, illetve a nem tumoros májszövethez viszonyítva [54]. Szignifikáns különbséget egyrészt a miR-200c és miR-203 mutatott, amely benignus tumorokban alul-expresszált (N>M>B), másrészt a miR-21, miR-222 és miR-10b esetén találtak, amely HCC-ben túltermelt (N<B<M), harmadrészt a miR-224 szintén szignifikánsan magasabb expressziót mutat HCC-ben a benignus tumorokhoz képest.

A hepatoblastoma (HB) többnyire 15 éves kor alatt jelentkező májtumor, amelynek miRNS-profilanalízise eltérést tárt fel a HCC primer tumorról szemben: a miR-214, miR-199a, miR-150 és miR-125a általában alulszabályozott HCC-ben, viszont HB-ben túlszabályozott, és ellenkezőleg, a miR-148a fokozottan expresszált HCC-ben, viszont csökkent expressziót mutat HB-ben [55].

HCC-specifikus miRNS-ek után kutatva a HCC és a tumor körül lévő, de nem tumoros 273 mintapár összehasonlítása alapján 17 miRNS fokozottan expresszálódott HCC-ben, amelyek közül az alábbiakat több mint két cikk is megerősítette: miR-18a, miR-21, miR-25, miR-130b, miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301 [7, 46, 48, 56, 57, 58, 59, 60, 61]. Ezzel szemben 15 miRNS-t alulszabályozottnak találtak. A több mint két cikkben is szereplő miRNS-ek a következők: miR-101, miR-122, miR-125b, miR-145, miR-195, miR-199a, miR-200a, miR-214, miR-223. (A további overexpresszált miRNS-ek: miR-9, miR-15b, miR-17-5p, miR-34a, miR-93, miR-96, miR-99a, miR-106b, miR-135a, miR-181b, miR-182, miR-207, miR-324; valamint a további alul-expresszált miRNS-ek: let-7a, let-7c, miR-29c, miR-125a, miR-126, miR-130a, miR-139, miR-143, miR-148a, miR-150, miR-155, miR-199b, miR-200b, miR-203, miR-422b, miR-451). Érdekes módon a miR-18a- és miR-301-szint magasabb volt női tumormintákban, legfőképpen HBV talaján kialakult tumorokban, viszont adenomákban és FNH-kban a miR-18a nem tér el jelentősebben a nemek között [56]. A vizsgált HCC-k etiológiájában többnyire HBV, HCV, ALD, haemochromatosis és ismeretlen eredet szerepelt. A HCV talaján kialakult HCC-s minták vizsgálata a miR-9-, miR-10a-, miR-100-, miR-125b-, miR-370-szint több mint kétszeres növekedését, valamint a miR-29c-, miR-145-, miR-198-, miR-368-szint több mint 2,5-szeres csökkenését eredményezte [62]. Ezenfelül a miR-122-expressziója szignifikánsan magasabb (p<0,005) volt HCC-ben a normális májszö-

vethez képest, amelyet a miR-122 HCV-vírus-transz-lációt stimuláló szerepe magyarázhat. Ugyanakkor a HBV-fertőzés-alapú HCC-k miR-122-expressziója csökkent ($p < 0,05$) a nem tumoros mintákhoz képest [63].

Budhu és mtsai 600 miRNS-t vizsgáltak 241 HCC és tumor környéki mintapárban és ugyan sikerült 20 miRNS-t találniuk, de ezen miRNS-ek expressziós szintje heterogénnek bizonyult, ami azt mutatja, hogy a tumorok biológiája és kialakulása minden tumornál egyedi úton zajlik [64]. Hasonló heterogenitásról számol be két további közlemény is, amelyben a vizsgált HCC-s minták 50%-ában tudták a miR-122-expresszió csökkenését megfigyelni [65], illetve a HCC-s minták 15%-ában a miR-122-expresszió emelkedett a környező szövethez képest [21]. Viszont tumormodell-kísérletben egyértelműen igazolható volt, hogy a miR-122-alulszabályozás a hepatocarcinogenesis következménye volt [65]. Ugyanakkor a miR-34a a tumorminták 76%-ában szignifikánsan alulexpresszálnak bizonyult [66]. Úgy tűnik, hogy a miR-122-alulszabályozás hátterében LOH is állhat, mivel az a kromoszómaregió, ahol a miR-122 található (18q21.31) HCC-ben gyakran elveszik. Viszont a miR-34-overexpresszió hipometiláció következménye is lehet [67].

A miR-122 expressziója szignifikánsan csökkent a T3 intrahepaticus metasztázisokat mutató HCC-tumorokban a T1 tumorokhoz, illetve a nem tumoros környéki szövethez képest [68], így a miR-122 alulszabályozódása valószínűleg szerepet játszik az agresszív, metasztatizáló tumor megjelenésében. A nem tumoros és a T1 között szignifikáns különbséget nem találtak. A dedifferenciálódás során további miRNS-eket figyeltek meg, amelyek expressziója a jól → moderáltan → rossz szul differenciált állapot irányában fokozatosan és szignifikánsan emelkedett (miR-18a, miR-17-5p, miR-20, miR-92, miR-106a, miR-222), illetve csökkent (miR-99a) [48].

HCC-ben p53, valamint β -katenin-aktiváló mutáció és az ennek megfelelő β -katenin nukleáris reakció viszonylag nagy százalékban észlelhető (30–40%). *Pineau és mtsai* kíváncsiak voltak, hogy ezek a mutációs HC-„altípusok” járnak-e miRNS-expressziós szintű eltérésekkel. Amíg p53-mutációval nem sikerült szignifikáns miRNS-expressziós eltéréseket összefüggésbe hozni, addig β -katenin-mutáció öt miRNS-ben mutatott kétháromszoros fokozódást a vad típussal szemben. Ezek között van a miR-34a, amely a p53 targetje, továbbá a miR-122, miR-148a, miR-148b és miR-204 [50]. Továbbá csökkent miR-375-expressziót figyeltek meg HCC-ben és hepatocellularis adenomában (HCA) talált β -katenin-mutációval összefüggésben, illetve csökkent miR-107-expressziót HCA-ban észlelt HNF-1- α -mutációval összefüggésben [69].

A miR-26 egy újonnan képbe került, a májrák kialakulásában mediátorként szerepet játszó tumorsuppresszor hatású miRNS, amely többek között a sejtciklus leállításáért felelős. Expressziója a nem tumoros májszö-

vetben magasabbnak bizonyult nőknél, amely magyarázatot adhat arra, hogy férfiakban miért nagyobb a HCC kialakulásának rizikója, habár a HCC szövetben mért miR-26-expresszióban már nincs különbség a nemek között. Az alacsony miR-26-expressziót mutató HCC-betegek túlélési ideje alacsony, így szerepe HCC prognosztikus markerként is felmerült, annál is inkább, mivel az alacsony miR-26-expressziót mutató HCC-k mRNS-expressziós profilja jelentősen eltért a magas miR-26-szintet mutató HCC-kétől. Megfigyelték továbbá a miR-26- és IL-6-expressziós szintek fordított arányát, vagyis az alacsony miR-26 növeli a gyulladást, amely a STAT3-, MAPK-út vonalak aktiválásával fontos szerepet játszik a hepatocarcinogenesisben [67].

A miRNS-ek plazmából vagy szérumból történő kimutatásáról egyre több publikáció jelenik meg [70]. Amennyiben igazolódik a miRNS-ek alkalmazása, úgy nagy jövő előtt állhat, hiszen a plazma ideális diagnosztikai forrás lenne. A sejtek miRNS-tartalmú vesiculumokat (microvesiculum, exosoma) bocsátanak a keringésbe, ezért feltételezhető, hogy a vírusfertőzés vagy rák következtében fennálló gyulladás következtében a hepatocytákból is jelentős mennyiségű miRNS jut a vérkeringésbe. Elképzelhető, hogy a krónikus hepatitis komolyabb hepatocytakárosodással jár, mint a HCC, ugyanis egy vizsgálat magasabb miR-223 szérumszintet talált krónikus HBV-betegeknél a HBV-alapú HCC-s betegekkel szemben. (HCC-ben a miR-223 expressziója csökken.) Ugyanakkor a miR-223-szint HCC-s betegek szérumban szignifikánsan magasabbnak bizonyult az egészséges kontrollmintákéhoz képest. Érdekes megfigyelés, hogy a HCC-s szérumban mért magas miR-122 a reszekciót követően az egészséges szintet közelítette meg. HCC-s szérumban egészséges kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett miR-122-, miR-222-, miR-223- és szignifikánsan csökkent miR-21-szintet találtak, míg a miR-221- és miR-301-szint ugyan emelkedett volt, de a különbség nem adódott szignifikánsnak [71]. Egy másik vizsgálat 46 HCC-s beteg szérumban kétszer nagyobb miR-221-szintet mért a negatív kontrollokhoz képest, míg a miR-21, miR-222 és miR-224 emelkedett értékű volt, de a különbség a szignifikanciaszintet nem érte el. A magas szérumban miR-221-szint korrelációt mutatott a tumormérettel, a cirrhosis mértékével és a tumor stádiumával. Továbbá a magas miR-221-szintet mutató betegek túlélése szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az alacsony miR-221-szérumszintet mutató betegekével szemben [72]. Egy munkacsoport a plazmamarkerek alkalmazását demonstrálta HCC-diagnosztikában, akik 105 HCC-s, 107 krónikus májgyulladásos (7% HBV és 55% HCV) és 71 egészséges kontroll szérumban vizsgáltak három miRNS-t, és szignifikáns miR-16-, miR-199a-szint-csökkenést találtak HCC-ben a krónikus gyulladáshoz és egészséges szérumhoz képest. A miR-16 érzékenyebb HCC-detektáló molekulának bizonyult, mint az AFP (α -fetoprotein), DCP (des- γ -karboxiprotrombin) vagy AFP-L3% (lens

1. táblázat | A fontosabb miRNS-expressziós eltérések hepatocarcinogenesis során

Májbetegség	Fokozott expresszió	Csökkenett expresszió	Referencia
Egészséges máj	miR-21, miR-22, miR-24, miR-122 [#] , miR-125b, miR-143, miR-194 [#] , miR-199a, let-7a		[18, 19]
Fibrosis	let-7a, let-7b, let-7c, miR-15b, miR-27a, miR-27b, 130b, miR-199a [§] , miR-200a [§] , miR-200b [§] , miR-221 [§] , miR-222 [§] , miR-450	miR-19b, miR-29a, miR-29b, miR-122, miR-150, miR-187, miR-194, miR-207, miR-520b	[25–31]
Krónikus hepatitis B- és C-vírus	miR-21, miR-221, miR-222	miR-122, miR-199, miR-200	[32]
HBV	miR-20a, miR-105, miR-133b, miR-134, miR-151, miR-182*, miR-190, miR-191, miR-193, miR-194, miR-211, miR-324-5p, miR-340	let-7a, miR-23a, miR-27a, miR-34c, miR-124b, miR-142-5p	[33]
HCV	miR-23, miR-27a, miR-34c, miR-124b, miR-142-5p, let-7a	miR-20, miR-29c, miR-105, miR-133b, miR-134, miR-145, miR-151, miR-182, miR-190, miR-191, miR-193, miR-194, miR-198, miR-211, miR-324-5p, miR-340, miR-368	[33]
HBV (szérum)	miR-122		[44]
HCV (szérum)	miR-16, miR-34a, miR-122		[45]
Cirrhosis	miR-21, miR-23a, miR-24, miR-27, miR-28, miR-34a, miR-93, miR-96, miR-106b, miR-125b, miR-130b, miR-143, miR-145b, miR-181b, miR-195, miR-199a, miR-200c, miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301, miR-342, miR-368, miR-425, let-7a	miR-15b, miR-122, miR-182, miR-199a-5p, miR-199b, miR-224, let-7c	[21, 46–48, 50, 51]
Benignus neoplasia	miR-122, miR-422b	miR-10b, miR-21, miR-200c, miR-203, miR-222, miR-224	[54]
Malignus neoplasia	miR-10b, miR-21, miR-200c, miR-203, miR-222, miR-224	miR-122, miR-422b	[54]
HB	miR-125a, miR-150, miR-199a, miR-214	miR-148a	[55]
HCC (szövet)	miR-9 (HCV+), miR-10a, miR-10b, miR-15b, miR-17-5p, miR-18a, miR-20, miR-21, miR-25, miR-34a, miR-92, miR-93, miR-96 (HBV+), miR-99a, miR-106a, miR-106b, miR-100, miR-125b, miR-130b, miR-135a, miR-181b, miR-182 (HBV+), miR-207, miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301, miR-324, miR-370 (HCV+)	miR-26, miR-29c (HCV+), miR-99a, miR-101, miR-122, miR-125b, miR-126, miR-130a, miR-139, miR-143, miR-145 (HCV+), miR-148a (HBV+), miR-150, miR-155, miR-195, miR-198 (HCV+), miR-199a, miR-199b, miR-200a, miR-200b, miR-203, miR-210 (HBV+), miR-214, miR-223, miR-368 (HCV+), miR-422b, miR-451 (HBV+), let-7a, let-7c	[7, 46, 48, 56–62, 67]
	miR-122 (HCV és β-catenin+), miR-148a (β-catenin+), miR-375 (β-catenin+)		[50, 69]
HCC (szérum)	miR-122, miR-201, miR-221, miR-222, miR-223, miR-224, miR-301	miR-16, miR-21, miR-199a	[7, 70, 71]

[#]Májkaraktisztikus miRNS-ek; [§]fibrosis súlyosságával korreláló miRNS-ek; *kevésbé aktív miRNS-szakasz (1. ábra)

culinaris agglutinin reaktív AFP). E három kombinációja a miR-16-tal együtt 92,4%-os érzékenységgel tudta detektálni a 3 cm-nél kisebb tumorokat. Ez a módszer csak 12%-ban adott fals pozitív reakciót krónikus hepatitisises betegeknek [7].

Következtetések

Májbetegségek miRNS-alapú diagnózisa és terápiája

A miRNS-ek biomarkerként és terápiás molekulaként történő alkalmazásához még nem értünk el. Az vi-

szont biztos, hogy a májbetegségek korai szakaszában már változások következnek be a miRNS-expressziós szintekben (1. táblázat). Ezt a kutatók arra alapozzák, hogy léteznek olyan miRNS-ek, amelyek expressziója stabil, míg másoké fluktuál a sejt metabolikus változásainak megfelelően. Az egyensúly felborulása a homeosztázisban bekövetkező időben elhúzódó problémákat okozhat, viszont ennek az egyensúlynak a felborulása még a következmények előtt mérhetővé válhatna például miRNS-szinten. Egyes feltételezések szerint körülbelül 200 miRNS vizsgálata elegendő lenne a daganatok típusának karakterizálásához.

Például a miR-10b, miR-21, miR-200c, miR-203, miR-222 és miR-224 expressziós szintjének ismerete

segítségét nyújthat a HCC diagnosztizálásában és a neoplazma agresszivitásának tisztázásában [73]. Továbbá egérhepatocarcinoma-modellben fokozott miR-21-, miR-155-, miR-221- és miR-222-expressziót találtak korai stádiumú HCC-mintákban, amelyet humán mintákon még ellenőrizni kell [15]. Ugyanakkor *Karakatsanis és mtsai* azt figyelték meg, hogy miR-21-, miR-31-, miR-122- és miR-221-expresszió pozitívan korrelált a HCC-mintákban jelen lévő cirrhosisal, valamint a miR-21- és miR-221-expresszió növekedése pozitívan korrelált a tumorprogresszióval (T1–T3), illetve a fokozott miR-21- és miR-221-overexpressziót mutató HCC-s betegek túlélése szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult [52].

Terápiás szempontból a HCV-fertőzés IFN-kezelésének hatékonyságát növelő anti-miR-122 (SPC3649, Miravirsén, Santaris Pharma) már sikeresen vette a fázis I akadályait, és jelenleg a fázis II vizsgálatok folynak. Kimutatták azonban, hogy HCV-RNS 5' UTR-én lévő egyik miR-122-kötő hely mutációja következtében csökkent az SPC3649-kezelés hatékonysága, vagyis a vírus mutációval ki tud bújni a replikáció ez úton elérendő gátlása alól [67].

A másik terápiás alkalmazási lehetőség a miR-26 visszajuttatása lenne. A miR-26 gyakran azért nem expresszált HCC-ben, mert a ciklin D2-re és E2-re hatva leállítaná a sejtciklust G1 fázisban. Az adenovírus-vektorban bejuttatott miR-26 azonban jelentősen csökkenti a tumorprogressziót, és apoptózisaktivációt okoz, igaz, még csak egér-HCC-modell-kísérletben. Viszont ez a kísérlet a tumorsuppresszor hatású miRNS-ek visszajuttatásának lehetőségével kecsegtet egy HCC-specifikus tumorelles terápia keretében [67].

Köszönetnyilvánítás

Munkánkhoz az OTKA T75468 és T101435 pályázatok nyújtottak támogatást.

Irodalom

- [1] Schaff, Z., Kovalszky, I., Lotz, G., et al.: Hepatocellular carcinoma – from macroscopy to molecular pathology. [A hepatocellular carcinoma – a makroszkópiától a molekuláris patológiáig.] *Orv. Hetil.*, 2010, 151, 982–989. [Hungarian]
- [2] Stauffer, J. K., Scarzello, A. J., Jiang, Q., et al.: Chronic inflammation, immune escape and oncogenesis in the liver: A unique neighborhood for novel intersections. *Hepatology*, 2012. doi: 10.1002/hep.25674. [Epub ahead of print.]
- [3] Van Malenstein, H., van Pelt, J., Verslype, C.: Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. *Eur. J. Cancer*, 2011, 47, 1789–1797.
- [4] Negrini, M., Ferracin, M., Sabbioni, S., et al.: Common molecular mechanisms shared by liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma microarray expression profiles. *J. Hepatol.*, 2005, 42, 128.
- [5] Cho, W. C.: MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010, 42, 1273–1281.
- [6] Schetter, A. J., Heegaard, N. H., Harris, C. C.: Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 2010, 31, 37–49.
- [7] Borel, F., Konstantinova, P., Jansen, P. L.: Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2012. [Epub ahead of print.]
- [8] Xi, Y., Nakajima, G., Gavin, E., et al.: Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, 2007, 13, 1668–1674.
- [9] Lendvai, G., Kiss, A., Kovalszky, I., et al.: Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases. [Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában.] *Orv. Hetil.*, 2010, 151, 1843–1853. [Hungarian]
- [10] Carthew, R. W., Southemier, E. J.: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136, 642–655.
- [11] Tömböl, Z., Szabó, P., Rácz, K., et al.: Relevance of microRNA-s in neoplastic diseases. [A mikro-RNS-ek jelentősége daganatos betegségekben.] *Orv. Hetil.*, 2007, 148, 1135–1141. [Hungarian]
- [12] Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., et al.: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, D140–144.
- [13] Bartel, D. P.: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136, 215–233.
- [14] Yu, Z., Baserga, R., Chen, L., et al.: MicroRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 2010, 176, 1058–1064.
- [15] Ciesla, M., Skrzypek, K., Kozakowska, M., et al.: MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 2051–2061.
- [16] Bala, S., Marcos, M., Szabo, G.: Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, 5633–5640.
- [17] Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., et al.: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 2007, 302, 1–12.
- [18] Chen, X. M.: MicroRNA signatures in liver diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, 1665–1672.
- [19] Tzur, G., Israel, A., Levy, A., et al.: Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development. *PLoS One*, 2009, 4, e7511.
- [20] Jopling, C.: Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.*, 2012 Feb 1, 9(2). [Epub ahead of print.]
- [21] Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., et al.: MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 32015–32027.
- [22] Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., et al.: MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell. Metab.*, 2006, 3, 87–98.
- [23] Jopling, C. L.: Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, 36, 1220–1223.
- [24] Mormone, E., George, J., Nieto, N.: Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.*, 2011, 193, 225–231.
- [25] Venugopal, S. K., Jiang, J., Kim, T. H., et al.: Liver fibrosis causes down-regulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells and their over-expression causes decreased stellate cell activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010, 298, G101–106.
- [26] Ji, J., Zhang, J., Huang, G., et al.: Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS Lett.*, 2009, 583, 759–766.
- [27] Kwiecinski, M., Noetel, A., Elfimova, N., et al.: Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One*, 2011, 6, e24568.
- [28] Bandyopadhyay, S., Friedman, R. C., Marquez, R. T., et al.: Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation down-regulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. *J. Infect. Dis.*, 2011, 203, 1753–1762.

- [29] *Lakner, A. M., Steuerwald, N. M., Walling, T. L., et al.*: Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology*, 2012, Jan 25. doi: 10.1002/hep.25613. [Epub ahead of print.]
- [30] *Murakami, Y., Toyoda, H., Tanaka, M., et al.*: The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*, 2011, 6, e16081.
- [31] *Ogawa, T., Enomoto, M., Fujii, H., et al.*: MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*, 2012, Jan 20. [Epub ahead of print.]
- [32] *Elamin, B. K., Callegari, E., Gramantieri, L., et al.*: MicroRNA response to environmental mutagens in liver. *Mutat. Res.*, 2011, 717, 67–76.
- [33] *Ura, S., Honda, M., Yamashita, T., et al.*: Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, 1098–1112.
- [34] *Zhang, Z. Z., Liu, X., Wang, D. Q., et al.*: Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level. *World J. Gastroenterol.*, 2011, 17, 3353–3358.
- [35] *Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., et al.*: MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.*, 2008, 27, 3300–3310.
- [36] *Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R. K., et al.*: Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *PNAS*, 2012, 109, 941–946.
- [37] *Sarasín-Filipowicz, M.*: Interferon therapy of hepatitis C: molecular insights into success and failure. *Swiss Med. Wkly*, 2010, 140, 3–11.
- [38] *Morita, K., Taketomi, A., Shirabe, K., et al.*: Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver Int.*, 2011, 31, 474–484.
- [39] *Lanfard, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., et al.*: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 2010, 327, 198–201.
- [40] *Wang, S., Qiu, L., Yan, X., et al.*: Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1)-modulated P53 activity. *Hepatology*, 2012, 55, 730–741.
- [41] *Chen, Y., Shen, A., Rider, P. J., et al.*: A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J.*, 2011, 25, 4511–4521.
- [42] *Dienes, H. P., Scheffler, M., Schievenbusch, S., et al.*: MicroRNA: New biomarkers in chronic liver disease. *Global Antiviral J.*, 2009, 5, S1/63. Abstract 66.
- [43] *Marquez, R. T., Bandyopadhyay, S., Wendlandt, E. B., et al.*: Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab. Invest.*, 2010, 90, 1727–1736.
- [44] *Waidmann, O., Bibrer, V., Pleli, T., et al.*: Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Viral. Hepat.*, 2012, 19, e58–65.
- [45] *Cermelli, S., Ruggieri, A., Marrero, J. A., et al.*: Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 2011, 6, e23937.
- [46] *Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I., et al.*: Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 419–427.
- [47] *Huang, S., He, X., Ding, J., et al.*: Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2008, 123, 972–978.
- [48] *Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., et al.*: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, 25, 2537–2545.
- [49] *Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., et al.*: Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 2007, 67, 6092–6099.
- [50] *Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., et al.*: MiR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107, 264–269.
- [51] *Haybaeck, J., Zeller, N., Heikenwälder, M.*: The parallel universe: microRNAs and their role in chronic hepatitis, liver tissue damage and hepatocarcinogenesis. *Swiss Med. Wkly*, 2011, 141, w13287.
- [52] *Karakatsanis, A., Papaconstantinou, I., Gazouli, M., et al.*: Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol. Carcinog.*, 2011, Dec 27. doi: 10.1002/mc.21864. [Epub ahead of print.]
- [53] *Gui, J., Tian, Y., Wen, X., et al.*: Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2011, 120, 183–193.
- [54] *Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., et al.*: MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, 2008, 47, 1955–1963.
- [55] *Magrelli, A., Azzalin, G., Salvatore, M., et al.*: Altered microRNA expression patterns in hepatoblastoma patients. *Transl. Oncol.*, 2009, 2, 157–163.
- [56] *Liu, W. H., Yeh, S. H., Lu, C. C., et al.*: MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2009, 136, 683–693.
- [57] *Li, S., Fu, H., Wang, Y., et al.*: MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, 1194–1202.
- [58] *Li, W., Xie, L., He, X., et al.*: Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2008, 123, 1616–1622.
- [59] *Meng, F., Henson, R., Webbe-Janek, H., et al.*: MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 2007, 133, 647–658.
- [60] *Su, H., Yang, J. R., Xu, T., et al.*: MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res.*, 2009, 69, 1135–1142.
- [61] *Wang, Y., Lee, A. T., Ma, J. Z., et al.*: Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 13205–13215.
- [62] *Varnholt, H., Drebber, U., Schulze, F., et al.*: MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47, 1223–1232.
- [63] *Coulouarn, C., Factor, V. M., Andersen, J. B., et al.*: Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*, 2009, 28, 3526–3536.
- [64] *Budhu, A., Jia, H. L., Forgues, M., et al.*: Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47, 897–907.
- [65] *Kutay, H., Bai, S., Datta, J., et al.*: Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J. Cell. Biochem.*, 2006, 99, 671–678.
- [66] *Li, N., Fu, H., Tie, Y., et al.*: MiR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 2009, 275, 44–53.

- [67] Braconi, C., Henry, J. C., Kogure, T., et al.: The role of microRNAs in human liver cancers. *Semin. Oncol.*, 2011, 38, 752–763.
- [68] Tsai, W. C., Hsu, P. W., Lai, T. C., et al.: MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, 1571–1582.
- [69] Zucman-Rossi, J.: Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis.*, 2010, 42 (Suppl 3), S235–241.
- [70] Gocze, K., Gombos, K., Pajkos, G., et al.: Impact of microRNAs in molecular epidemiology. [Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában.] *Orv. Hetil.*, 2011, 152, 633–641. [Hungarian]
- [71] Qi, P., Cheng, S. Q., Wang, H., et al.: Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*, 2011, 6, e28486.
- [72] Li, J., Wang, Y., Yu, W., et al.: Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 406, 70–73.
- [73] Ji, J., Wang, X. W.: New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol. Ther.*, 2009, 8, 1686–1693.

(Schaff Zsuzsa dr.,
Budapest, Üllői út 93., 1091
e-mail: schaff.zsuzsa@med.semmelweis-univ.hu)

**A Pest Megyei Flór Ferenc Kórház (2143 Kistarcsa, Semmelweis tér 1.)
főigazgató főorvosa pályázatot hirdet az alábbi állások betöltésére:**

III. Belgyógyászati Osztály – *belgyógyász vagy kardiológus szakorvos*, vagy szakorvosjelölt;
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Osztály – *szakorvos* vagy szakorvosjelölt;
Gyermekgyógyászati Osztály – *szakorvos*;
Bőrgyógyászati Osztály – *szakorvos*.

A pályázat részeként benyújtandó iratok:

- szakmai önéletrajz;
- végzettséget igazoló okiratok másolata;
- működési nyilvántartásról igazolás;
- kamarai tagsági igazolás;
- hozzájáruló nyilatkozat a pályázati anyagban foglalt, a pályázati eljárással összefüggésben szükséges személyes adatok kezeléséhez.

Illetmény: a Kjt. alapján.

Pályázati határidő: **2012. július 9.**

A pályázat benyújtását *Dr. Trombitás Zoltán* főigazgató főorvosnak címezve, a fenti címre kérjük.