

Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában

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

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Patológiai Intézet, Budapest

²I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Az utóbbi években egyre nagyobb érdeklődés övezi a mikro-RNS-eket, a génexpressziót többnyire negatívan szabályozó rövid RNS-molekulákat, amelyekből mintegy 1000-féle ismert jelenleg. Kimutatták, hogy a mikro-RNS-ek expressziója patológias állapotokban megváltozik a normális szinthez képest, ezért ezt eredményesen lehetne alkalmazni a betegségek pontosabb diagnosztizálásában. Májban azonosítottak egy májszövetre igen karakterisztikus, a hepatocyták működéséhez szükséges mikro-RNS-típust (miR-122), amelynek expressziós szintje májsérülés következtében általában csökken. Biomarkerként való alkalmazása is felvetődik, mivel acetaminofen indukálta toxicitás során a miR-122 szintje csökken a májszövetben, ugyanakkor növekszik a plazmában, sőt, plazmából a hagyományos májfunkciós enzimteszteknél érzékenyebb kimutatást tesz lehetővé. A miR-122-expresszió szintén csökkenő tendenciát mutat a karcinogenezis progressziójával. Emellett stimulálja a hepatitis C-vírus replikációját és transzlációját, valamint befolyásolja az interferonterápia eredményességét. Újabban számos olyan további mikro-RNS vált ismertté, amelyek speciális mintázatának jellegzetes változása úgy tűnik, hogy jellemez egyes kóros folyamatokat. A cikk összefoglalja a gyógyszer és alkohol indukálta, a nem alkoholos eredetű májbetegségek, fibrosis, hepatitisvírus-fertőzések, cirrhosis és hepatocellularis carcinoma során tapasztalt jelentősebb miRNS-változásokat.

Orv. Hetil, 45, 1843–1853.

Kulcsszavak: génexpresszió, mikro-RNS, hepatocellularis carcinoma, cirrhosis, hepatitis, acetaminofen, overexpresszió, downreguláció

Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases

In the past few years there has been growing interest for a type of short RNAs called microRNAs, which are involved in the regulation of gene expression mainly in a negative way. There are about 1000 known microRNA today. It has been demonstrated that expression level of microRNA may become altered from normal to diseased state, thus microRNAs could be employed as a reliable tool in the diagnosis of diseases. A liver-characteristic microRNA (miR-122) needed for functioning hepatocytes has been identified, which usually shows a decreased expression level upon liver injury. miR-122 has been suggested as a biomarker since it was downregulated in the liver tissue upon acetaminophen-induced toxicity and in turn elevated miR-122 level was detected in the plasma. Moreover, miR-122 level in the plasma was found to be more sensitive as compared with conventional assays based on the release of liver enzymes. Also, miR-122 expression tends to decrease as carcinogenesis progresses. In addition, miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus and its level seems to influence the efficiency of interferon therapy. Nowadays, many microRNAs are known whose distinctive alterations in their specific patterns seem to characterize individual pathological processes. In this article, the major alterations in microRNA expression patterns in liver diseases such as drug- and alcohol-induced liver diseases, non-alcoholic fatty liver diseases, fibrosis, viral infections (hepatitis), cirrhosis and hepatocellular carcinoma are summarized. Orv. Hetil, 45, 1843–1853.

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

(Beérkezett: 2010. szeptember 10.; elfogadva: 2010. október 5.)

Rövidítések

Ago = Argonauta; ALD = (alcoholic liver disease) alkoholos májbetegség; ECM = extracelluláris mátrix; FC = (flow cytometer) áramlási citométer; FFP = formalinfixált paraffinba ágyazott; FISH = fluoreszcens in situ hibridizáció, HB = hepatoblastoma; HBV = hepatitis B-vírus; HCA = hepatocellularis adenoma; HCC = hepatocellularis carcinoma; HCV = hepatitis C-vírus; HSC = (hepatic stellate cell) májcsillagsejt; iv. = intravénás; mRNS = (messenger) hírvivő RNS; miRNS = mikro-RNS; MLPA = (multiplex ligation-dependent probe amplification) többszörös, ligációval kapcsolt próbaamplifikáció; NAFLD = (non-alcoholic fatty liver disease) nem alkoholos eredetű zsírmájbetegség; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; PET = pozitronemissziós tomográf; qPCR = kvantitatív polimeráz láncreakció; RFLP = (restriction fragment length polymorphism) restriktációs fragmenthossz polimorfizmus; RT-PCR = reverz transzkripció-polimeráz láncreakció; siRNS = (small interfering) kis interferáló RNS; UTR = (untranslated) nem transzlálódó régió

Az élettudományok kitartóan kutatják azokat a markereket, amelyek alapján a betegségek megkülönböztethetők a normális állapottól, és a betegségek hasonló megnyilvánulási formái vagy az egyes stádiumok pontosabban és eredményesebben kategorizálhatóak. Számos olyan módszer ismert, amellyel a molekulákat közvetlenül vagy közvetve tudjuk vizsgálni (például immunhisztokémia, szérumenzim- és -hormonszintek meghatározása, csontvelősejtek áramlási citometriai elkülönítése, a striatum dopamin D2 receptor mennyiségének vizsgálata PET-tel), mégis azt a diagnosztikát tekintjük molekulárisnak, amelyet klasszikus molekuláris biológiai módszerekkel végeznek (például PCR, RT-PCR, qPCR/valós idejű PCR, RFLP, szekvenálás, MLPA, FISH, FC stb.). Ezek a módszerek a genomban található – elsősorban az exonokat érintő – pontmutációkat, deletiókat, amplifikációkat, transzlokációkat, kromoszóma számbeli eltéréseket tárják fel, de azt is, hogy egy adott gén expresszálódik-e, és hogy mekkora az expresszió mértékének változása. Ezek egyrészt a kezelőorvos számára szolgálnak fontos információval a személyre szabott terápia felállításában, másrészt a molekuláris patológusnak – a jövőben remélhetőleg egyre nagyobb mértékben – a differenciáldiagnosztikában. Jelenleg RNS-alapú molekuláris diagnosztika az RNS DNS-hez viszonyított nagyobb fokú lebomlási érzékenysége miatt a mindennapi gyakorlatban nem használatos. A jövőben ez változhat a rövid hosszúságú miRNS-ek vizsgálatával, mivel ezek megőrzöttsége a hírvivő RNS-hez (mRNS) képest jóval jobb, paraffinba ágyazott szövettani mintákból is jól detektálható.

Az elmúlt 5 évben napvilágot látott mikro-RNS-típusokkal (miRNS) foglalkozó közlemények mind gyakrabban tudósítanak e rövid RNS-molekulák expressziójának megváltozásáról kóros (elsősorban tumoros és gyulladós) állapotban. A normális szinthez képest fokozott vagy alulszabályozásról számolnak be [1, 2],

attól függően, hogy a gyulladás során milyen biológiai válaszgének expresszióját szabályozzák, illetve, hogy a tumorsejt túlélése szempontjából az adott miRNS jelenléte (a szabályozott onkogének vagy tumorszuppresszor gének függvényében) előnyös-e vagy sem. Érthető módon a tumorszuppresszor gének átíródásának gátlása az onkogének gátlásával ellentétes hatást fog kifejteni. A miRNS-expressziós mintázat alapján a kutatók kísérletet is tettek a betegségek kategorizálására [3]. A miRNS-ek a plazmából is kimutathatóak, vagyis egy szerv- vagy betegség-specifikus miRNS mennyiségének jelenléte és változása a plazmában segíthetné a diagnózis felállítását vagy a terápia hatásosságának követését. A molekulacsalád tehát mind diagnosztikai, mind terápiás célból ígéretesnek tűnik.

A patológiai gyakorlatban fontos szempont, hogy a leginkább alkalmazott archiválási mód, a formalinfixált, paraffinba ágyazott (FFP) minták alkalmasak-e miRNS-vizsgálatokra. Hiszen ismert, hogy ez a fixálási-kezelési módszer jelentős mértékben keresztközi és kevesebb mint 300 bp hosszú fragmentekre töri az RNS-molekulákat [4]. Az RNS-izolálás során a proteináz-K-emésztés sem tudja maradéktalanul eltávolítani a keresztköteket, és ez annál valószínűbb, minél hosszabb az RNS-molekula, így ezek az RNS-ek az izolálás során elvesznek. Viszont FFP-mintákban a miRNS-ek rövidegük miatt az mRNS-nél stabilabbak és eredményesen izolálhatók [5, 6]. Egy összehasonlítás az FFP és fagyasztott mintákban vizsgált miRNS-ek expressziója 95%-os korrelációját mutatta ki (míg ugyanez mRNS esetén csak 28% volt). A vizsgált miRNS-ek 65,6%-a mutatott ± 1 eltérést a relatív expresszióban, ami azt jelenti, hogy gyakorlatilag a két minta ugyanaz volt. Továbbá a miRNS-expressziót 10 évre visszamenő archiv mintákban is stabilnak találták [6]. Mindezen adat azt igazolja, hogy a miRNS-expresszió az FFP-mintákban szinte korlátlanul vizsgálható, így igen értékes forrása lehet az egyes betegségek tanulmányozásának és korszerű diagnosztikájának.

A miRNS molekulacsalád

A miRNS-ek a génexpressziót posztranszkripció szinten általában negatívan szabályozó molekulák. Az első miRNS-t (*lin-4*, az egyedfejlődés kontrolljában játszik szerepet) 1993-ban írták le *Caenorhabditis elegans*-ban, és a jelenséget akkor a fonálféreg különlegességének tekintették. Igazán akkor kezdték felismerni, hogy ennek az új RNS-molekulának a biológiai folyamatokban sokkal fontosabb szerepe van, amikor 2000-ben ugyanabban a fonálféregben egy újabb, ugyanolyan szabályozómechanizmussal működő miRNS-t (*let-7*, egyedfejlődést és sejt differenciációt kontrollál) találtak, amelynek mind a szekvenciája, mind az egyedfejlődési expressziós mintázata gerincesekben is nagyon hasonlóan bizonyult. Egy évre rá számos új miRNS-t azonosítottak gerinctelenekben és gerincesekben is, és ezzel

nyilvánvalóvá vált, hogy egy új kis molekulájú RNS-csoportról, a miRNS-ekről van szó [7]. Ma már több mint 800 [8] humán miRNS-t sikerült azonosítani, és a számuk az elkövetkezendő években biztosan növekedni fog. A miRNS-ek adatai megtalálhatóak két internetes portálon (www.microrna.org, www.mirbase.org) [9].

Az érett miRNS-ek mindössze 19–23 nukleotid hosszú, fehérjét nem kódoló RNS-molekulák. Egyes miRNS-ek génje önálló transzkripciós egységekben található a genomban, míg másoké egy fehérje génjének kivágásra kerülő, fehérjét nem kódoló intronjában bújik meg (a miRNS-gének körülbelül 80%-a ilyen), és így expressziójuk gyakran korrelál a gazdagén expressziójával [10, 11]. A miRNS-ek szekvenciálisan is megtalálhatóak a genomban (a két legismertebb: a miR-17-92 és a miR-106b-25 cluster), ahol 3–6 miRNS-szekvencia egymás közelségében, 1–5 kb távolságon belül található, amelyek egyetlen (policisztronos) transzkriptummá íródnak át [12].

A transzkripciót követően a miRNS-ek érési folyamaton mennek keresztül, amelyet *Tömböl Zsófia és mtsai az Orvosi Hetilapban* nemrégiben publikált cikkükben részletesen ismertettek [13]. A hosszú, sokszor több száztól ezer bázispárig terjedő, visszahajló és önmagával részben kettős szálú láncot képező hajtúszerű elsődleges miRNS [pri-miRNS, primary, – 5' végén sapka (cap), a 3' vége poliadenilált] molekulát a *Drosophila* endonukleáz 60–70 bp hosszúságú pre-miRNS-re hasítja, megőrizve a hajtú formát (5' foszfát vég, a 3' végén 2 nukleotidos túllógás). A citoplazmába kerülve (Exportin-5) válik érett miRNS-hosszúságúvá a *Dicer* endonukleáz által (1. ábra), majd a 19–23 nukleotid hosszú kettős szálú RNS a helikázaktivitás hatására egyláncúvá bomlik fel és a *RISC-Ago2* (RISC: RNA-induced silencing complex, Ago: Argonauta) komplexben az mRNA célmolekulához kötődve kifejti mRNA-poszttranszkripciós gátlását [14]. A *Dicer* és *RISC-Ago* nevek már ismerősen csenghetnek, hiszen e családok fehérjéi vesznek részt az siRNS-ek feldarabolásában, mRNA-hez kötődésében és annak elhasításában is [10].

A kötődés helyét és így a transláció gátlását tekintve jelentős különbség van a miRNS-ek és az siRNS-ek között (2. ábra). Amíg az utóbbiak teljes komplementaritás mellett az mRNA fehérjekódoló régiójához kötődnek (open reading frame, ORF) és ezzel kiváltják az mRNA elhasítását, addig a miRNS-ek az úgynevezett 3' UTR-hez (untranslated region) kötődnek, és a teljes komplementaritás nem feltétele a gátlásnak [10].

Nagy valószínűséggel a miRNS-ek nagyfokú hatékonysága a lazább komplementaritással együtt azért lehetséges, mert a legtöbb miRNS láncvégei, kicsi variáció mellett, nagyon pontosan végződnek, míg az siRNS-ek láncvégei sokkal heterogénebbek [10]. Úgy tűnik, egy 7 nukleotid hosszú (a miRNS 5' vég 1–7. és 2–8. nukleotidja közötti szakasz) úgynevezett mag- (seed) régió teljesen komplementer kapcsolódása, valamint a miRNS 3'

végén valahány bázispár (valószínű, hogy minél több, annál hatásosabb) kötődése elegendő [15] (3. ábra).

Feltételezhetően a miRNS-mRNA komplementaritás százalékos aránya meghatározza a gátlás típusát. Ha 100%-os, akkor megtörténik az mRNA endonukleáz általi hasítása (*Ago* által katalizált). Ugyanakkor a miRNS középső részén fennálló rossz párosítások (mismatchek) az mRNA translációjának gátlását idézik elő. A transláció gátlásának mikéntjére több hipotézis született: 1. az mRNA sapkaja (cap) a miRNS-RISC fehérjekomplexhez kötődik, meggátolva a transláció megkezdését; 2. a miRNS előidézi az mRNA deadenilációját, amelynek következtében az mRNA nem tudja a translációhoz szükséges cirkuláris formát felvenni; 3. a miRNS a riboszómaegységek (unitok) leválását idézheti elő röviddel a transláció megkezdése után [10].

Mivel a gátláshoz elegendő a részleges komplementaritás, egy miRNS-nek akár 200 különféle mRNA-célmolekulája is lehet (például a humán miR-122 esetén a targetkereső szoftverek körülbelül 1000 célmolekulát jósolnak, www.mirbase.org [9]), másrészt egy mRNA 3' UTR régiójában több száz különféle miRNS-kötőhely is megtalálható (a TP53 esetén 8, a BCL2 esetén körülbelül 400 miRNS-kötőhely, www.microrna.org). Néhány miRNS többszörös (2–3) kötőhellyel is rendelkezik ugyanazon az mRNA 3' UTR-en [16]. Mindezek igencsak nehezítik a génműködés miRNS-ek általi szabályozásának kibogozását, de a szövetek miRNS-profiljának ismerete közelebb vihet a biológiai folyamatok megértéséhez.

Újabban a miRNS-ek további szerepéről is szó esik, mint például szabályozófunkció a cél-mRNA 5' UTR régiójában, DNS-metiláció szabályozása, valamint az érett miRNS-ek sejtmagba történő importálása, kromatin módosítása [17].

A miRNS-ek által szabályozott gének fontos életműködésekkel kapcsolatos folyamatokat regulálnak, mint például az egyedfejlődés pontos időbeli lefolyása, sejtdifferenciáció, a szervek kialakulása, az őssejtek osztódása, a sejtek sorsának meghatározása, apoptózis, jelátviteli utak enzimeit, haematopoieticus vonal differenciálódása, a gazda és vírus interakció, de a betegségek, többek között a rák kialakulása is [14, 17].

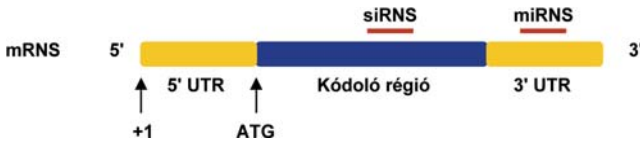
A miRNS-ek vizsgálatát a sejtekben Northern blot, microarray-technikával, *in situ* hibridizációval, multiplex hibridizációval vagy valós idejű PCR-rel tudjuk kivitelezni, attól függően, hogy minőségi, mennyiségi meghatározás vagy rövid idő alatt nagy mintaszámú vizsgálat a kívánt cél.

miRNS-expresszió a humán betegségekben

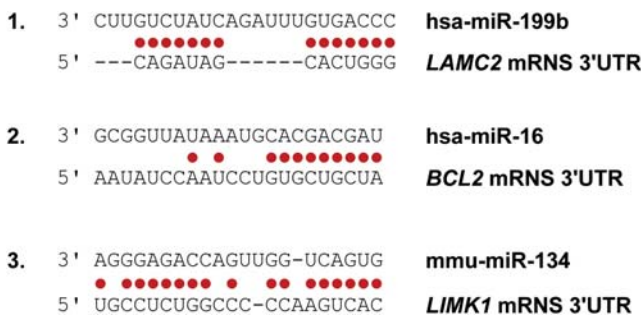
Ahogy a sejtek az őket érő hatásokra egyes génjeik aktivitásának megváltoztatásával válaszolnak, úgy nagyon valószínű, hogy az egyes miRNS-ek expressziója is meg-



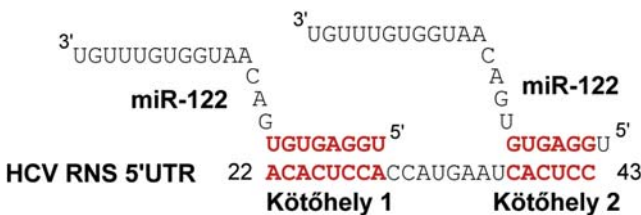
1. ábra | A humán pre-miR-122 szekvenciája, kiemelve a 22 nukleotid hosszúságú érett miR-122 látható



2. ábra | A miRNS és az siRNS kötődésének helyei az mRNS-molekulán



3. ábra | A miRNS részlegesen komplementer kötődésének variációi az mRNS-hez



4. ábra | A miR-122 kötőhelyek a HCV 5' UTR régiójában

változik a behatás következményeként. Ezen miRNS-expressziós szintváltozások segíthetnek a betegségek biológiai folyamatainak megértésében, feltárásában. A kutatóknak sikerült is azonosítani néhány miRNS-t, amelyek expressziója speciálisan megváltozik egy adott megbetegedésben. Szívhypertrophiában például a normális értéknél alacsonyabb miR-1- és miR-133-szintet találtak, és kiderült az is, hogy e két miRNS képes a szív hypertrophiáját gátolni. Egyes miRNS-ek elvesztése vagy alulszabályozása veszélyezteti az immunrendszer fejlődését, az immunválasz kialakulását és autoimmunitáshoz vagy rákhoz vezethetnek [18]. Vírusok is felhasználhatják a miRNS-eket egyrészt, hogy fokozzák a saját kifejeződésüket (például EBV, Epstein-Barr-vírus, serkenti a miR-146a-t, amely feltehetően negatívan hat az interferonválasz intenzitására és hosszára), másrészt, hogy miRNS-ortológokat juttassanak a fertőzött sejtekbe – például a KSHV (Kaposi-szarkóma, herpesz-

vírus), miR-K12-11 a humán miR-155 homológja, ezzel sejtnövekedést szabályozó gének alulműködését idézi elő. Gyulladásos megbetegedésekben – például psoriasis, atopicus ekcéma, asztma – is kimutattak alulszabályozott miRNS-eket, és feltételezhetően szerepük van rheumatoid arthritisben és a bél gyulladásos megbetegedéseiben is [18]. Ismert továbbá, hogy miRNS-ek szabályozzák az adipocytadifferenciációt (az emelkedett miR-143-szint fenntartja a differenciált állapotot, feltételezhetően a MAP-kináz út ERK5 alulszabályozásával [19]) és inzulinszekréciót (miR-375 gátlása elősegítette a glükózindukált inzulinszekréciót).

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-eknek (expressziójuk az egészségeshez képest csökken) különböző onkogenikus aktivitású fehérjék a célmolekulái. A miR-155-szint jelentős mértékű növekedését írták le különböző malignus daganatokban, mint például Burkitt-lymphoma, klasszikus Hodgkin-kór, mediastinalis diffúz nagy sejt lymphoma, tüdő-, emlő- és újabban hasnyálmirigyrákokban is, feltételezhetően azért, mert sejt kultúra-vizsgálatokban a miR-155 gátolta a TP53INP1 (p53-indukált nukleáris protein 1) proapoptotikus aktivitású fehérjét [18]. Emlőrákokban az egészséges szövethez viszonyítva jelentősen nagyobb miR-21-szintet találtak, amelynek kiütése csökkentette az MCF-7 sejtek növekedését és gátolta a proliferációját [18]. A miR-21 targetje az aktin mikrofilamentumkötő, tumorszuppresszor tropomiozin-1 (TMP1), amelynek expressziós gátlása növeli a kihorganyzásfüggetlen mikrofilamentumok átszerveződését és a kihorganyzásfüggetlen növekedést. Ugyanakkor a miR-21-overexpresszió antia-poptotikus hatása és a PTEN targetjének az Akt fokozott expressziójával szintén elősegíti a növekedést és a túlélést [20].

Ezzel szemben csökkent miR-34a-expressziót figyeltek meg hasnyálmirigysejtekben, amelyet a p53 indukál és még hatásában is hasonló, hiszen a miR-34a targetjei között találunk sejt ciklust, öregedést, apoptózist, DNS-hibajavítást és angiogenezist szabályozó géneket. Más carcinomákban (prostatata, emlő, tüdő, vastagbél, vese) miR34a-alulszabályozást figyeltek meg a promóter régió CpG-metilációja következtében [18]. A let-7 család (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f, let-7g) alulszabályozását írták le tüdőrákokban, amely csökkent túléléssel társult, ugyanakkor a RAS-fehérje-szint szignifikánsan magasabb. Talán nem meglepő, hogy a humán RAS-gének 3' UTR régióban több let-7 komplementer-

hely is található [18]. Her2-pozitív (amplifikált és overexpresszált) emlőrákos minták miRNS-expressziós mintázatának vizsgálata a miR-125a és miR-125b szignifikáns alulszabályozását mutatta ki. Igazolták, hogy mindkét miRNS „seed” (mag)szekvenciája megtalálható a Her2 és Her3 mRNS 3' UTR régiójában, valamint ezen két miRNS fokozott expressziója esetén csökkent a Her2- és Her3-expresszió emlőrákos sejtvonalon, és a sejtek ezzel párhuzamosan csökkent növekedést, migrációs és inváziós képességet mutattak, valószínűleg az ERK1/2- és AKT-szintek csökkenésének következtében [18].

miRNS-expresszió az egészséges májban

A máj parenchymalis hepatocytákból, biliaris sejtekből és nem parenchymalis sejtekből (endothelsejtek, csillagsejtek, Kupffer-sejtek, pit sejtek) áll. Feltételezhetően mindegyik sejt típusnak más egyéni miRNS-expressziós profilja lehet [21], 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 expresszáldó, mint például miR-122, let-7a, miR-22, miR-125b, miR-143, miR-194, miR-24, miR-199a, miR-21, miR-3c, miR-321, míg a foetalis májban a miR-92a, miR-483, miR-122, miR-192, miR-194, miR-106b és miR-451 expressziója igen magas [21, 22]. 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 [22]. A miR-122 adja a máj teljes miRNS-készletének mintegy 70%-át [23], ez a leginkább máj-specifikus miRNS, 50 000–82 000 kópia van egy átlagos májsejtben [24]. A májon kívül még az agyban (200-szor kevesebb) és a thymusban (300-szor kevesebb) található miR-122 nagyon alacsony kópiaszámban [11]. Termelése már az embrionális élet 13. napján elkezdődik [24]. A miR-122 pozitívan szabályozza a koleszterol- és trigliceridszintet, gátolja a zsírsavoxidációt [25, 26], valamint jelenléte elősegíti a HCV virális RNS-ének replikációját és transzlációját [27].

miRNS-expressziós változások a májbetegségekben

Az expressziós szintben megfigyelhető változást természetesen a normális állapothoz képest kell érteni, tehát adott miRNS esetében ez vagy fokozott, vagy csökkent expressziót jelent. A vizsgálatok nagy részében ezekre a különbségekre miRNS-profilanalízissel (microarray, valós idejű PCR) derült fény.

Gyógyszer indukálta májbetegségek

A különböző toxikus vegyületek súlyos májkárosodást okoznak. Az egyik leggyakoribb gyógyszer például az acetaminofen (AAP), amelynek túladagolása figyelmeztető tünetek nélkül 24 órán belül hirtelen heveny májelégtelenséget okozhat [8]. Ezért nagyon fontos lenne megbízható és érzékeny markert találni, amellyel az akut májkárosodás a vérből specifikusan kimutatható lenne. 2007-ben igazolták, hogy a májkárosító toxikus vegyületek (AAP, szén-tetraklorid) megváltoztatták a miRNS-expressziót a májban, méghozzá a toxicitás korai fázisában [28]. Például a miR-298 és a miR-370 expressziója csökkent még akkor is, amikor morfológiai változás nem volt látható a májban. A miRNS-expressziós változás akkor következett be, amikor a mitokondriális működés elégtelenné vált, még a sejt összeomlása előtt. Wang és mtsai egerekben igazolták a miRNS-expresszió különbségét egészséges és AAP-túladagolt állatok máj- és plazmamintáiban [8]. Érdekes módon a miRNS expressziója a májban és plazmában eltért: azok a miRNS-ek, amelyek expressziója AAP-kezelést követően csökkent a májban, megemelkedett a plazmában (például miR-15a, miR-21, miR-101b, miR-122, miR-148, miR-192) és fordítva (például miR-483, miR-710 és miR-711, miR-721, miR-1224). Ugyanis a májsejtek sérülése következtében a miRNS-ek nagy valószínűséggel szabadon vagy transzport útján, a májenzimekhez hasonlóan, a plazmába kerültek.

Az érintett miRNS-ek target mRNS-eit vizsgálva úgy tűnik, hogy AAP-túladagolás a szövet integritásának általános lebomlását, az immunválasz növekedését és következményesen a szövet helyreállítását eredményezi.

Ezen túlmenően, a máj-specifikus miR-122- és miR-192-szint változása a plazmában függött az alkalmazott AAP dózistól és a kezelés óta eltelt időtől [8]. Azt tapasztalták, hogy a miR-122 már 1 órával az AAP-injekció után jelezte a májkárosodást, korábban, mint az aminotranszferáz (ALT), ezért megbízhatóbb marker, és így a keringésben lévő miRNS-ek a gyógyszer indukálta májbetegségek érzékeny biomarkerei lehetnek.

Nem alkoholos eredetű zsírmájbetegség (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease)

Ebben a krónikus májbetegségben a zsírfelhalmozódás jellemzően nagymértékű alkoholfogyasztás nélkül alakul ki, amely az egyszerű steatosistól a steatohepatitisen át megnyilvánulhat, amely 8–10 év alatt az esetek 10–25%-ában cirrhosissá fejlődhet [17, 29, 30]. A kiváltó okok között elhízás és más metabolikus szindrómák, 2-es típusú diabetes, inzulinrezisztencia található. Továbbá az NAFLD abnormális lipidmetabolizmussal, apoptózis-aktivációval, fokozott sejtregenerációval és gyulladással jellemezhető [30].

Jin és mtsai vizsgálták a miRNS-profil NAFLD-patkánymodellben, ahol 14 miRNS-overexpresszált és 8 miRNS-downregulált volt steatosisban és steatohepatitisben, míg 7 miRNS-szintjét eltérőnek találták a két állapotban [31]. Az NAFLD progressziója során végig overexpresszált miR-29c-t és miR-122-t detektáltak, amely korrelálni látszik azzal, hogy az előbbi az inzulinrezisztenciával, az utóbbi a zsírmétabolizmussal hozható összefüggésbe. Az NAFLD progressziójával a miR-16 (CLL-ben apoptózist indukál a Bcl-2 onkogénre hatva) szintén fokozódó expressziót mutatott, amely aktív apoptózisra utalhat, míg a miR-146b (a természetes immunitásban játszik szabályozó szerepet) steatohepatitisben mutatott jelentős csökkenése hozzájárulhat az NAFLD-ben tapasztalt gyulladáshoz [31].

Az NAFLD-betegek májának miRNS-profilvizsgálata a miR-122 szignifikáns alulszabályozását mutatta ki az egészséges mintákhoz képest, míg a miR-146b jelentősen overexpresszáldott. A legmagasabb és legalacsonyabb expressziót mutató két miRNS a miR-224 és miR-617 voltak [30]. Ugyanakkor, ha a miR-122-t májsejtvonalakon antisense próbával csendesítették, akkor a lipogénikus gének mRNS- és fehérjeexpressziós mintázatát az NAFLD-betegek mintázatával hasonlónak találták. (Megjegyzés: A fibrosisos és cirrhotikus betegeket kizárták a vizsgálatból.)

A fenti vizsgálatokból látható, hogy a miRNS-mintázat NAFLD-ben valóban megváltozik és ebből következően további vizsgálatokra érdemes [17].

Alkoholos májbetegség

(ALD – alcoholic liver disease)

Az alkoholos steatohepatitis az NAFLD-hez hasonló patofiziológiai mechanizmussal és tulajdonságokkal jár, úgy mint abnormális zsírmétabolizmus, gyulladás és fibrosis [32]. Alkoholot tartalmazó és metionin-kolin hiányos étrenden tartott egerek miRNS-analízise 5 azonos miRNS-t tárt fel, amelyek expressziója mind a kétféle steatosisban (ALD és NAFLD) megváltozott. Amíg miR-705 és miR-1224 fokozottan expresszáldott mind a kétféle steatosisban az egészséges kontrollokhoz képest, addig miR-182, miR-183 és miR-199a expressziója csökkent ADL-ben, NAFLD-ben viszont fokozódott. (ADL-ben overexpresszáldott miRNS-ek: miR-320, miR-486, miR-705 és miR-1224, downregulálódott miRNS-ek: miR-27b, miR-214, miR-199a, miR-182, miR-183, miR-200a és miR-322.) Egy hipotézis a miR-212 szerepét feltételezte, amely miután alkoholfogyasztásra indukálódott, alulszabályozta a zonula occludens fehérjét az intestinalis barrierben, és ennek felbomlása következtében az intestinalis átteresztőképesség megnövekedett. Vagyis az ADL így az intestinalis barrier változása okán, a miR-212 közreműködésével alakulna ki [33], ami igen érdekes új feltételezés, azonban még további vizsgálatokat igényel.

Fibrosis

Krónikus gyulladás a májban fibrosishoz vezet, amit a hepaticus csillagsejtek (HSC – hepatic stellate cell) és fibroblastok által termelt extracelluláris mátrix (ECM) és rostok lerakódása jellemez. A májsejtgerendák közti Disse-térben található csillagsejtek sérülés hatására aktiválódnak, elveszítik a zsírcseppekben tárolt A-vitamin-készletüket, osztódni kezdenek és myofibroblastszerű sejtekké differenciálódnak [17, 34]. Fibrosis során a fokozott TIMP-1- (tissue inhibitor of metalloproteinase) expresszió, a gátolt MMP-1- (mátrixmetalloproteináz) expresszió mellett, előidézi az ECM felhalmozódását, a fibrosist aktiváló citokinek pedig c-myc és rac-1 aktiválásával fejtik ki hatásukat [34].

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- (collagen I) felhalmozódást is [34]. Fibrosisban további két miRNS (miR-187 és miR-207) expressziója csökkent, míg szignifikánsan emelkedett let-7a-, let-7b-, let-7c-szintet találtak. A miR-27a és miR-27b szerepére is fény derült, mivel ezek, ha alulszabályozottak, akkor a csillagsejtek nyugalmi állapotba kerültek, osztódásuk csökkent és a lipidcseppek is újra megjelentek a sejtekben [35]. Az átfogó microarray-analízis 12 miRNS fokozott és 9 miRNS (például miR-122) csökkent expresszióját detektálta [36]. Kimutatták továbbá, hogy patkány májban a HSC-aktiváció mitokondriális károsodással jár a túlszabályozott Bcl-2- és az alulszabályozott kaszpáz-9-szint következtében.

A fibrosis pontos mértékének megállapítása még jelenleg sem teljesen megoldott, beleértve a „gold standard” májbiopsziát is. A miRNS-mintázat jellegzetes változása segítheti a pontosabb fibrosisdiagnosztikát.

Hepatitis B-vírus- (HBV-)

és hepatitis C-vírus- (HCV-) fertőzés

A HBV- és HCV-fertőzés veszélye abban áll, hogy körülbelül 5–10%, illetve 70–80%-ban krónikus gyulladás alakul ki, amely cirrhotishoz és hepatocellularis carcinomához (HCC) vezethet. A génextpressziós profil krónikus HBV- és HCV-fertőzésben eltérő; az előbbi esetén proapoptotikus és DNS-hibajavítás irányú válaszok, az utóbbi esetén gyulladáshoz és antiapoptotikus válaszok dominálnak [37].

Egy japán munkacsoport HBV- és HCV-pozitív (mind krónikus hepatitis, mind HCC-s) mintákon 19 miRNS esetén talált expressziós különbséget a két víruscsoport okozta betegségcsoportok között [37]. Ezek közül HBV esetén 6 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. Ezen miRNS-ek HBV esetén apoptózis, DNS-hiba és -rekombináció, valamint transzkripció szignálgének mRNS-eit szabályozzák, míg HCV esetén az immunválasz, antigénbemutató, sejtciklus, proteaszóma- és lipidanyagcserében részt vevő gének mRNS-eit. Ugyanakkor 23 miRNS mutatott különbséget krónikus hepatitis és HCC között (HBV- vagy HCV-eredettől függetlenül). A krónikus gyulladáshoz képest HCC-ben 17 miRNS vált alulszabályozottá (például miR-130a, miR-223, miR-200a, miR-125b, miR-199a), amelyek olyan rákban aktív mechanizmusokban szereplő fehérjék overexpresszióját idézték elő, mint például sejtciklus, sejtadhézió, proteolízis, transzkripció, transzláció, Wnt jelátviteli út. Ugyanakkor 6 miRNS túlszabályozott HCC-ben (miR-221, miR-222, miR-301, miR-21, miR-183, miR-98), amelyek mindegyike a gyulladáshoz kapcsolt jelátviteli utakat gátolta ezzel, amely funkcióképtelen antitumor-immunválaszt jelezhet [37].

Néhány évvel ezelőtt megfigyelték, hogy a májspecifikus miR-122 pozitívan szabályozza, stimulálja a HCV replikációját [27]. A HCV genom 5'-UTR régiójában két célhelyet is azonosítottak (4. ábra), és úgy tűnik, hogy a miR-122 elősegíti a riboszómák kapcsolódását a vírus RNS-sel a transzláció iniciációjakor [38].

Ugyanakkor a miR-122 szerepe ellentmondásosnak tűnik, mivel egy svájci munkacsoport HCV-pozitív krónikus hepatitiszes biopsziák vizsgálatánál megfigyelte, hogy az interferon- (IFN-) terápia semmilyen korrelációt sem mutatott a miR-122 és a vírusszám között [39]. Azonban, meglepetésre, igen alacsony, kezelést megelőző miR-122-szintet találtak azon betegek mintáiban, akik nem reagáltak vírusszámcsökkenéssel az interferonkezelésre. Egy újabb cikk viszont arról számol be, hogy az *in vivo* beadott anti-miR-122 (a miR-122-vel komplementer antisens oligonukleotid) a HCV-fertőzött csimpánzokban hatásosan csökkentette a viraemiát – a HCV RNS-ének mennyisége csökkent a szérumban és a májban egyaránt –, emellett ugyancsak csökkent az állatok koleszterinszintje. Kiemelendő, hogy a miRNS-gátló kezelésre nem tapasztaltak rezisztenciát a kezelés ideje alatt [40]. A viraemia csökkenése mellett a legtöbb interferon indukálta gén expressziója is csökkent (amit az IP-10 kemokin csökkenése is jelzett a szérumban). Ez meglepő eredmény, hiszen 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, hiszen az IFN- α -kezelésre nem reagáló betegekben éppen az interferon indukálta gének és a szérum-IP-10 magas, maximálisan indukált szintje okozza, hogy a kezelésként adott IFN-re már nem tudnak reagálni. Ezért az anti-miR-122 terápiás alkalmazásával elérhető lenne az interferon indukálta gének expressziós gátlása, vagyis a nem reagáló betegek INF-érzékennyé válhatnának [40].

Megfigyelték továbbá, hogy az IFN- β -kezelés szignifikánsan csökkentette a miR-122-szintet májsejtkultúrán, valamint IFN- α , - β , - γ -kezelés körülbelül 30 miRNS expressziós szintjét módosította [41]. Az IFN- β által indukált miRNS-ek között találtak 8 olyant, amely közel teljes komplementaritást mutat a HCV RNS-genomjával (miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448), és ezen miRNS-ek overexpressziója INF nélkül is képes volt gátolni a HCV replikációját. Arra is ismerünk adatokat, hogy a miR-122-szint a májszövetben csökken HCV indukálta fibrosis során, ellenben emelkedik a szérumban a krónikus HCV-betegek fibrogenézisével megegyezően [42].

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

A krónikus májgyulladás előbb-utóbb csökkenti a máj regenerálókapacitását, és fibrosishoz, stromalis expanszióhoz, nodularis szöveti szerkezethez, vagyis cirrhosishoz vezet [17, 43], amely a HCC egyik fő rizikófaktora.

Cirrhoticus májmintákon a májspecifikus miR-122 31%-os csökkenését, illetve a miR-23a, miR-27 és miR-24 jelentős emelkedését tapasztalták normális májmintákhoz viszonyítva [25, 44]. Egy másik vizsgálatban 14 miRNS (például miR-195, miR-222, miR181b, miR-200c és let-7a) fokozott expresszióját találtak cirrhoticus és hepatitisvírus-fertőzött májmintákban, szemben a nem cirrhoticus és nem hepatitiszes mintákkal, míg 61 miRNS szintje emelkedett normális májszövettel összehasonlítva [43]. Ezen miRNS-ek között vannak olyanok is, amelyeknek korábban stressz indukálta fokozott expresszióját írták le (például miR-222, miR-182b, miR-221). Ugyanakkor HCC és az azzal szomszédos benignus szövet összehasonlításakor 16 miRNS expressziójában találtak eltérést (overexpresszált: miR-18a, miR-21, miR-130b, miR-221, miR-301; downregulált: miR-101, miR-150, miR-199a, miR-214, miR-223). Vagyis az eredmények azt sugallják, hogy a cirrhosis és hepatitisvírus-fertőzés fontos változásokat idéz elő a miRNS-expresszióban, viszont a cirrhosis-HCC átmenet már nem ennyire markáns [43].

Végül cirrhoticus és krónikus hepatitiszes minták összehasonlítása 7 miRNS expressziójának növekedését (miR-28, miR-342, miR-125b, miR-199a, miR-145b, miR-143, miR-368) és 3 miRNS csökkenését (miR-182, miR-224 és miR-15b) eredményezte cirrhosisban [45].

Hepatocellularis adenoma (HCA)

Ezen ritka jóindulatú tumort néha nehéz megkülönböztetni a jól differenciált HCC-től, viszont a mutált

β -catenint hordozó HCA-k nagyobb valószínűséggel mennek át malignus transzformáción [46]. Ez utóbbi HCA-k tanulmányozásakor a miR-375 jelentős alulszabályozását találták, szemben a többi HCA-val (miR-375 szintén downregulált a β -catenin mutáns HCC-kben). A HNF (hepatocytá nukleáris faktor) 1 α -mutáns HCA-kban azonban a miR-107 alulszabályozása volt jelentős. Mindezek egyben a HCA heterogén voltát és az új molekuláris osztályozások jogosságát hangsúlyozták [47].

Hepatocellularis carcinoma (HCC)

A HCC az ötödik leggyakoribb malignus daganat a világon és a harmadik leggyakoribb daganatos halálok. A leggyakoribb rizikófaktorok közé a HBV-, HCV-fertőzés következtében kialakult krónikus gyulladás, alkoholos steatohepatitis, metabolikus betegségek (például inzulinrezisztencia, nem alkoholos steatohepatitis) és genetikai rendellenességek tartoznak [17, 25, 47]. A magas halálozásra a betegség késői felismerése, a limitált kezelési lehetőségek és a reszekciót követő magas rekurrencia adhat magyarázatot. Az 5 éves túlélés csak 5%-os [25].

Egy microarray-vizsgálat feltárta, hogy a 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 \rightarrow cirrhosis \rightarrow HCC irányban, illetve a let-7c expressziója csökkent [48]. Egy olasz munkacsoport cirrhosis és cirrhosis talaján kialakult HCC között vizsgálta a miRNS-mintázatot és 35 eltérő expressziójú miRNS-t talált: a miR-221 a HCC-k 83%-ában fokozottan expresszált volt, a let-7a és a miR-122 a HCC-k 70%-ában volt alulszabályozott a cirrhoticus szövetpárhoz képest [49]. További alulszabályozott miRNS-eket is találtak HCC-ben a cirrhosis-hoz képest: let-7a, let-7c, miR-130a, miR-145, miR-150, miR-195, miR-199a, miR-214, miR-223.

Benignus (HCA és FNH – fokális nodularis hyperplasia) és malignus májtumorok összehasonlításakor azt tapasztalták, hogy miR-224 mindkettőben túltermelődik (a sorrend: N<B<M; Normális, Benignus, Malignus), míg a miR-122 és miR-422b mindkettőben alacsony expresszáldódik (a sorrend: N>B>M) a normális májszövethez, illetve a nem tumoros májszövethez viszonyítva [46]. Szignifikáns különbséget egyrészt a miR-200c és a miR-203 mutatott, amely benignus tumorokban alulexpresszált (a sorrend: N>M>B), másrészt a miR-21, miR-222 és miR-10b esetén találtak, amely HCC-ben túltermelt (a sorrend: 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 tumorral 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 [50].

HCC-specifikus miRNS-ek után kutatva a HCC és a tumor körül lévő, de nem tumoros 273 mintapár összehasonlítása alapján 17 miRNS fokozottan expresszáldott HCC-ben, amelyek közül az alábbiakat több mint 2 cikk is megerősítette: miR-18a, miR-21, miR-25, miR-130b, miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301 [43, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56]. Ezzel szemben 15 miRNS-t alulszabályozottnak találtak. A több mint 2 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 8 overexpresszált miRNS: miR-9, miR-15b, miR-34a, miR-93, miR-96, miR-106b, miR-135a, miR-182; valamint a további 6 alulexpresszált miRNS: let-7c, miR-29c, miR-148a, miR-150, 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 [51]. A vizsgált HCC-k etiológiájában többnyire HBV, HCV, ALD, hemokromatózis 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 [57]. Ezenfelül a miR-122 expressziója szignifikánsan magasabb ($p<0,005$) volt HCC-ben a normális májszövethez képest, amelyet a miR-122 HCV-vírus transzlációt stimuláló szerepe magyarázhat. Ugyanakkor a HBV-fertőzés-alapú HCC-k miR-122-expressziója csökkent ($p<0,05$) a nem tumoros mintákhoz képest [58].

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 [59]. Hasonló heterogenitásról számol be két további közlemény is, amelyben a vizsgált HCC-s minták 50%-ában tudták a miR-122-expresszió csökkenését megfigyelni [60], illetve a HCC-s minták 15%-ában a miR-122-expresszió emelkedett a környező szövethez képest [25]. Viszont tumormodell-kísérletben egyértelműen igazolható volt, hogy a miR-122-alulszabályozás a hepatokarcinogenezis következménye volt [60]. Ugyanakkor a miR-34a a tumorminták 76%-ában szignifikánsan alulexpresszálnak bizonyult [61].

A miR-122 expressziója szignifikánsan csökkent a T3 intrahepaticus metasztázisokat mutató HCC-tumorokban a T1 tumorokhoz, illetve a nem tumoros környéki szövethez képest [62], így a miR-122 alulszabályozódása valószínűleg szerepet játszik az agresszív,

1. táblázat | A fontosabb miRNS-expressziós eltérések a májbetegségekben

Májbetegség	Fokozott expresszió	Csökkenett expresszió	Referencia
Gyógyszer indukálta (például acetaminofen)	miR-483, miR-710, miR-711, miR-721, miR-1224 Plazmában: miR-122, miR-192, miR-130a, miR-101b	miR-15a, miR-29c, miR-101b, miR-122, miR-130a, miR-192 Plazmában: miR-483, miR-710	[8, 28]
NAFLD	miR-10b, miR-16, miR-34a, miR-100, miR-122, miR-146b, miR-200a, miR-224	miR-26a, miR-107, miR-122?, miR-188, miR-617	[30, 31]
ALD	miR-320, miR-486, miR-705, miR-1224	miR-27b, miR-182, miR-183, miR-199a, miR-200a, miR-214, miR-322	[32]
Fibrosis	let-7a, let-7b, let-7c, miR-15b, miR-27a, miR-27b, 130b, miR-450	miR-122, miR-150, miR-187, miR-194, miR-207, miR-520b	[34, 35, 36]
HBV	miR-182, miR-193	let-7a, miR-23a, miR-27a, miR-34c, miR-124b, miR-142-5p	[37, 45]
HCV	miR-9, miR-122, miR-125b, miR-370	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	[37, 45, 57]
Cirrhosis	let-7a, miR-23a, miR-24, miR-27, miR-145b, miR-181b, miR-195, miR-199a, miR-200c, miR-222, miR-368	let-7c, miR-15b, miR-182, miR-224	[43, 44, 45]
HCA	miR-224	miR-107, miR-122, miR-200c, miR-203, miR-375, miR-422b	[46]
HB	miR-125a, miR-150, miR-199a, miR-214	miR-148a	[50]
HCC	miR-9 (HCV+), miR-10b, miR-15b, miR-18a, miR-21, miR-25, miR-34a, miR-93, miR-96 (HBV+), miR-106b, miR-130b, miR-135a, miR-182 (HBV+), miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301, miR-370 (HCV+), miR-122 (HCV és β -catenin+), miR-148a (β -catenin+)	let-7c, miR-29c (HCV+), miR-99, miR-101, miR-122, miR-125b, miR-126, miR-145 (HCV+), miR-148a (HBV+), miR-150, miR-195, miR-198 (HCV+), miR-199a, miR-200a, miR-210 (HBV+), miR-214, miR-223, miR-368 (HCV+), miR-422b, miR-451 (HBV+)	[43, 45, 46, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 63]

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 \rightarrow moderáltan \rightarrow 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) [45].

A miRNS „cluster” érintettségét is tanulmányozták HCC-ben, és meglepő módon a miR-106b-25 „cluster”, valamint a miR-18 (a miR-17-92 „cluster” tagja) a minták 50%-ában több mint kétszeres expressziós fokozódást mutatott a nem tumoros mintapárhoz viszonyítva [12]. Génkiütéses vizsgálatok kimutatták, hogy az előbbi „cluster”, amelyet miR-106b, miR-93 és miR-25 alkot, szükséges a proliferációhoz, és a sejtek kihorganyzása a független osztódáshoz, vagyis ezen miRNS-ek fokozott jelenléte a tumorszövetben csökkenti az apoptotikus aktivitású Bim és E2F1 expresszióját, vagyis ez a „cluster” onkogenikus hatásúnak tekinthető.

HCC-ben p53-, valamint β -catenin-aktiváló mutáció és az ennek megfelelő β -catenin nukleáris reakció viszonylag nagy százalékban észlelhető. *Pineau és mtsai* kíváncsiak voltak, hogy ezek a mutációs HCC-„altípusok” járnak-e miRNS-expressziós szintű eltérésekkel.

Amíg p53-mutációval nem sikerült szignifikáns miRNS-expressziós eltéréseket összefüggésbe hozni, addig β -catenin-mutáció 5 miRNS-ben mutatott 2–3-szoros 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 [48].

Következtetések

Az elmúlt 4–5 évben biztatónak tűnnek a májbetegségekben publikált miRNS-expressziós eltérések, még a tumorok biológiai diverzitását is figyelembe véve (*1. táblázat*). Például miR-222 és miR-223 egyértelműen megkülönbözteti a HCC-t a környező tumorszövetből vi rusetiológiára való tekintet nélkül, a malignus daganat megkülönböztethető az adenomától és fokális nodularis hyperplasiától (HCC-ben miR-21, miR-10b, miR-222, miR-224 növekszik, míg benignus daganatban miR-200c és miR-203 csökken). Alkoholos eredetű HCC-ben alacsony a miR-126-szint, valamint a miR-96-expresszió magas HBV-talajú HCC-ben [63]. Ugyanakkor a miR-125b magas szintje – amely azonban előrehaladott HCC-ben alacsony – kifejezetten jó túlélést jelent.

A miRNS-ek a plazmában is eredményes biomarkerként szolgálhatnak, mint szövet- vagy betegsége-

cifikus miRNS-ek. Például miR-141 segítségével prosztatarákot lehetett megkülönböztetni egészséges mintáktól, valamint a miR-122 az acetaminofen indukálta májtoxicitást mutatta [64], amely a hagyományos AST- és ALT-alapú detektálásnál érzékenyebbnek bizonyult.

A miRNS-ek terápiás célú alkalmazása is felvetődött. Többek között a miR-122 gátolta a tumorsejt malignus tulajdonságait csupasz egerekben, mint például sejtklonok túlélése, kihorganyzásfüggetlen sejtosztódás, migráció, invázió, epithelialis-mesenchymalis átalakulás. Ugyanakkor a miR-122 adása elősegítette a differenciált állapot fenntartását a májban, és gátolta az endothelsejtek angiogen tulajdonságait *in vitro* [25]. Az anti-miR-122 pedig csökkentette a hepatosteatosist magas zsírtartalmú étrenden tartott egerekben, amely NAFLD-betegek kezelésében nyújthatna segítséget [65]. Továbbá a miR-122 expressziója növelte a sejtek sorafenibérzékenységét *in vitro* [25], amely ma a HCC-s betegek egyetlen hatékony gyógyszeres kezelési módja.

Irodalom

- [1] Cho, W. C.: MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2010, 42, 1273–1281.
- [2] 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.
- [3] Lu, J., Getz, G., Miska, E. A. és mtsai: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435, 834–838.
- [4] Cronin, M., Pho, M., Dutta, D. és mtsai: Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am. J. Pathol.*, 2004, 164, 35–42.
- [5] Li, J., Smyth, P., Flavin, R. és mtsai: Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol.*, 2007, 7, 36.
- [6] Xi, Y., Nakajima, G., Gavin, E. és mtsai: Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, 2007, 13, 1668–1674.
- [7] Zhang, B., Wang, Q., Pan, X.: MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J. Cell. Physiol.*, 2007, 210, 279–289.
- [8] Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B. és mtsai: Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, 106, 4402–4407.
- [9] Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S. és mtsai: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, D140–144.
- [10] Carthev, R. W., Sontheimer, E. J.: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136, 642–655.
- [11] Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. és mtsai: Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 2007, 8, 166.
- [12] Li, Y., Tan, W., Neo, T. W. és mtsai: Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, 2009, 100, 1234–1242.
- [13] Tömböl Z., Szabó P., Rácz K. és mtsai: Relevance of microRNA-s in neoplastic diseases. *Orv. Hetil.*, 2007, 148, 1135–1141.
- [14] Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. és mtsai: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 2007, 302, 1–12.
- [15] Sethupathy, P., Megraw, M., Hatzigeorgiou, A. G.: A guide through present computational approaches for the identification of mammalian MicroRNA targets. *Nat. Methods*, 2006, 3, 881–886.
- [16] Yu, Z., Baserga, R., Chen, L. és mtsai: MicroRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 2010, 176, 1058–1064.
- [17] Bala, S., Marcos, M., Szabo, G.: Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 5, 5633–5640.
- [18] Shenouda, S. K., Alabari, S. K.: MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.*, 2009, 28, 369–378.
- [19] Mattick, J. S., Makunin, I. V.: Small regulatory RNAs in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14, R121–132.
- [20] Hui, A. B., Shi, W., Boutros, P. C. és mtsai: Robust global microRNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Lab. Invest.*, 2009, 89, 597–606.
- [21] Chen, X. M.: MicroRNA signatures in liver diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 5, 1665–1672.
- [22] Tzur, G., Israel, A., Levy, A. és mtsai: Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development. *PLoS One*, 2009, 4, e7511.
- [23] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A. és mtsai: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.*, 2002, 12, 735–739.
- [24] Chang, J., Nicolas, E., Marks, D. és mtsai: MiR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.*, 2004, 1, 106–113.
- [25] Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B. és mtsai: MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 32015–32027.
- [26] Esau, C., Davis, S., Murray, S. F. és mtsai: MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell. Metab.*, 2006, 3, 87–98.
- [27] Jopling, C. L.: Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, 36, 1220–1223.
- [28] Fukushima, T., Hamada, Y., Yamada, H. és mtsai: Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride – regulating role of micro-RNA for RNA expression. *J. Toxicol. Sci.*, 2007, 32, 401–409.
- [29] Musso, G., Gambino, R., Casader, M.: Emerging molecular targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu. Rev. Med.*, 2010, 61, 375–392.
- [30] Cheung, O., Puri, P., Eicken, C. és mtsai: Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*, 2008, 48, 1810–1820.
- [31] Jin, X., Ye, Y. F., Chen, S. H. és mtsai: MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig. Liver Dis.*, 2009, 41, 289–297.
- [32] Dolganin, A., Petrasek, J., Kodys, K. és mtsai: MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2009, 33, 1704–1710.
- [33] Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C. B. és mtsai: Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2008, 32, 355–364.
- [34] Venugopal, S. K., Jiang, J., Kim, T. H. és mtsai: 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, 101–106.
- [35] Ji, J., Zhang, J., Huang, G. és mtsai: Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS Lett.*, 2009, 583, 759–766.

- [36] Guo, C. J., Pan, Q., Cheng, T. és mtsai: Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J.*, 2009, 276, 5163–5176.
- [37] Ura, S., Honda, M., Yamashita, T. és mtsai: Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, 1098–1112.
- [38] Henke, J. L., Goergen, D., Zheng, J. és mtsai: MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.*, 2008, 27, 3300–3310.
- [39] Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I. és mtsai: Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat. Med.*, 2009, 15, 31–33.
- [40] Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A. és mtsai: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 2010, 327, 198–201.
- [41] Pedersen, I. M., Cheng, G., Wieland, S. és mtsai: Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 2007, 449, 919–922.
- [42] Dienes, H. P., Scheffler, M., Schievenbusch, S. és mtsai: MicroRNA: New biomarkers in chronic liver disease. *Global Antiviral Journal*, 2009, 5, S1/63 Abstract 66.
- [43] Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I. és mtsai: Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 419–427.
- [44] Huang, S., He, X., Ding, J. és mtsai: 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.
- [45] Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K. és mtsai: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, 25, 2537–2545.
- [46] Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C. és mtsai: MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, 2008, 47, 1955–1963.
- [47] Schaff Z., Kovalszky I., Lotz G. és mtsai: A hepatocellular carcinoma – a makroszkópiától a molekuláris patológiáig. *Orv. Hetil.*, 2010, 151, 982–989.
- [48] Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K. és mtsai: MiR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, 107, 264–269.
- [49] Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F. és mtsai: Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 2007, 67, 6092–6099.
- [50] Magrelli, A., Azzalin, G., Salvatore, M. és mtsai: Altered microRNA expression patterns in hepatoblastoma patients. *Transl. Oncol.*, 2009, 2, 157–163.
- [51] Liu, W. H., Yeh, S. H., Lu, C. C. és mtsai: MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2009, 136, 683–693.
- [52] Li, S., Fu, H., Wang, Y. és mtsai: 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.
- [53] Li, W., Xie, L., He, X. és mtsai: Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2008, 123, 1616–1622.
- [54] Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H. és mtsai: MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 2007, 133, 647–658.
- [55] Su, H., Yang, J. R., Xu, T. és mtsai: MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res.*, 2009, 69, 1135–1142.
- [56] Wang, Y., Lee, A. T., Ma, J. Z. és mtsai: 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.
- [57] Varnholt, H., Drebbler, U., Schulze, F. és mtsai: MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47, 1223–1232.
- [58] Coulouarn, C., Factor, V. M., Andersen, J. B. és mtsai: 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.
- [59] Budhu, A., Jia, H. L., Forgues, M. és mtsai: Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47, 897–907.
- [60] Kutay, H., Bai, S., Datta, J. és mtsai: Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J. Cell. Biochem.*, 2006, 99, 671–678.
- [61] Li, N., Fu, H., Tie, Y. és mtsai: MiR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 2009, 275, 44–53.
- [62] Tsai, W. C., Hsu, P. W., Lai, T. C. és mtsai: MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, 1571–1582.
- [63] Ji, J., Wang, X. W.: New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol. Ther.*, 2009, 8, 1686–1693.
- [64] Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-Engle, P. W. és mtsai: Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin. Chem.*, 2009, 55, 1977–1983.
- [65] Girard, M., Jacquemin, E., Munnich, A. és mtsai: MiR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J. Hepatol.*, 2008, 48, 648–656.

(Schaff Zsuzsa dr.,
Budapest, Üllői út 93., 1091
e-mail: schaff@korb2.sote.hu)