

Derleme

Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında MikroRNA'ların Rolü

The Role of MicroRNAs in the Hepatitis B Virus Infections

Gülay BÖREKÇİ¹, İrem BEKALP², Nurcan ARAS²

¹Mersin Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan mikroRNA (miRNA)'lar iyi derecede korunan DNA bölgelerinden kodlanan ancak translasyona uğramayan, küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar gelişme, farklılaşma, immun yanıtın düzenlenmesi, sağ kalım, apoptozis, yaşlanma ve metabolizma gibi hücre yaşamı için gerekli birçok süreçte önemli roller oynamaktadır. Araştırmalar insan gen ekspresyonunun üçte birinin miRNA'lar tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Son yıllarda miRNA'ların başta kanser olmak üzere bazı hastalıklarla ilişkisinin olabileceği bildirilmektedir. Akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya yol açan hepatit B virüs enfeksiyonlarında ise moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalar, viral patogeneze miRNA'ların önemli rol oynadığını ve hastalığın kronikleşmesi, siroz ve kansere yol açması sürecinde etkili olduğunu göstermektedir. Bazı çalışmalarda ise bu hastalıkların prognozunu belirlemede ve tedavide miRNA ekspresyon profillerinin biyomarkör olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. Bu derlemede miRNA'ların hepatit B virüs enfeksiyonlarındaki rolü irdelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: mikroRNA; hepatit B virüsü; patogeneze

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are the small and untranslated RNA molecules encoded by highly conserved DNA regions which play role in the regulation of gene expression. miRNAs have crucial importance in various significant biologic processes for cell survival such as development, differentiation, regulation of immune response, survival, apoptosis, senescence and metabolism. Some reports demonstrated that 1/3 of human genes are regulated by miRNAs. In the recent years, miRNAs have been associated to several diseases including cancer. The molecular mechanisms of acute and chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma leading to hepatitis B virus infection are still poorly understood. Recent studies demonstrated that miRNAs have high significance in the viral pathogenesis as well as they have effects on chronicity of the disease, cirrhosis and cancer process. Additionally, there are other studies which suggest that miRNA expression profiles can be used as a biomarker in the prognosis and treatment of these diseases. In this review, we investigate the role of miRNAs in Hepatitis B virus infection.

Keywords: microRNA; hepatitis B virus; pathogenesis

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg, 2013;6(3):1-9

Geliş Tarihi : 10.07.2014

Kabul tarihi : 07.09.2014

Yazışma adresi : Doç. Dr. Gülay BÖREKÇİ
Mersin Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Mersin

Tel : 0324 3610001-4223

Faks : 0324 3610571

E-posta : gulay_borekci@yahoo.com

Giriş

MikroRNA (miRNA)'lar, evrimsel süreçte iyi derecede korunmuş DNA bölgelerinden kodlanan fakat translasyona uğramayan yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan küçük tek iplikli RNA molekülleridir (1). miRNA'lar ilk kez 1993 yılında yuvarlak nematodlardan biri olan *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmiştir (2). Bu tarihten günümüze kadar belirlenen miRNA sayısı giderek artmış ve miRNA'lar canlı organizmaların iyi derecede korunmuş evrimsel bir bileşeni olarak düşünülmüştür. Bugüne kadar miRNA'lar hayvanlar ve bitkiler alevinin çok hücreli canlılarında tespit edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar miRNA'ların aynı zamanda, belirli tek hücreli ökaryotlar tarafından ve virüsler tarafından da kodlanabilir olduğunu göstermiştir. Şu ana kadar 940 tanesi insan miRNA'sı olmak üzere yaklaşık 14.197 miRNA geni tespit edilmiştir (3). Bazı miRNA'ların (aşırı eksprese edilen ve/veya amplifiye olmuş) onkogen, bazılarının (az eksprese edilen ve/veya delesyona uğramış) ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör gelişimi, metastazi ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir. miRNA'lar gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptozis, yaşlanma ve metabolizma gibi hücre yaşamı için gerekli birçok süreçte önemli roller oynamaktadır. miRNA'lar hücre için oldukça önemli olan birçok yolakta görev alırlar ve bundan dolayı, işlevlerini yerine getiremediklerinde başta kanser olmak üzere birçok hastalığa yatkınlık oluşturabilmektedirler (4).

Hepatit B virüsü (HBV) primer olarak karaciğerde hasar oluşturarak ölümlerle sonuçlanabilen ve her yıl milyonlarca insanı etkileyen küresel bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre tüm dünyada yaklaşık 2 milyar kişinin HBV ile enfekte olduğu, bu kişilerin yaklaşık 240 milyonunda hastalığın kronikleştiği ve 500.000 ile 780.000 kişinin HBV enfeksiyonu nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir (5). HBV enfeksiyonunu takiben akut veya kronik hepatit gelişebilmekte ve karaciğerde fibrozis, siroz, hepatosellüler karsinoma (HCC) gibi önemli klinik komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Her yıl yaklaşık 1.000.000 kişi (~tüm ölümlerin %2.7) karaciğer kanseri de dahil olmak üzere viral hepatitlerle ilgili sebeplerden dolayı ölmektedir. Karaciğer sirozunun yaklaşık olarak %57'si karaciğer kanserinin ise yaklaşık %78'i hepatit enfeksiyonu sonucu gelişmektedir (6). HCC vakalarının yaklaşık %80'i ise HBV enfeksiyonlarından ileri gelmektedir (7).

HBV enfeksiyonlarının patogenezi mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamakla birlikte virüse karşı konağın immün yanıtının önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonunun nasıl geliştiğinin anlaşılması ve etkili bir tedavi uygulanabilmesi için, enfeksiyon esnasında karaciğer hücrelerinin nasıl çoğaldığını ve virüsün yaşam siklusunun nasıl

etkilediğinin bilinmesi önem taşımaktadır (8). Ancak HBV enfeksiyonlarında birçok konunun hala aydınlatılmamış olması nedeniyle son yıllarda araştırmacılar miRNA üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Viral hepatitlerle ilgili yapılan son araştırmalar, miRNA'ların hastalığın kronikleşmesi, siroz ve kansere yol açması sürecinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu derlemede miRNA'ların biyogenezi, işlevleri ve hepatit B hastalığındaki rolü irdelenmiştir.

MiRNA'ların Biyogenezi

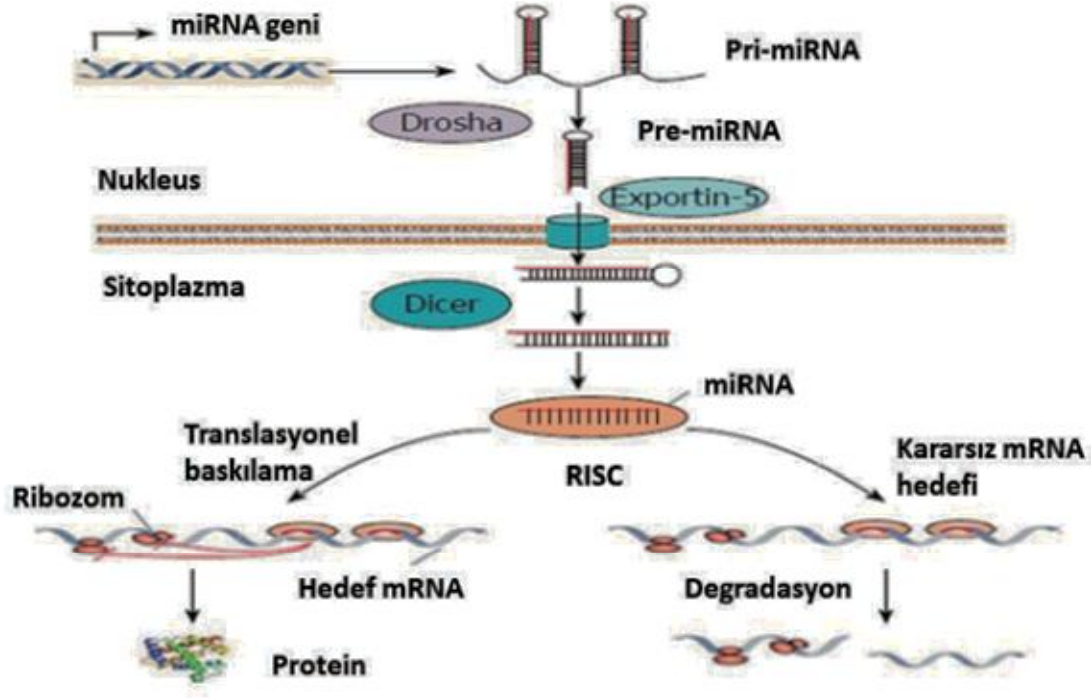
miRNA'ların biyogenezi üç önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlar *i.* primer transkript olan pri-miRNA'nın RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu, *ii.* nükleusta prekürsor miRNA'nın kısmen olgunlaştırılması ve *iii.* sitoplazmada fonksiyonel miRNA'nın oluşturulmasıdır. miRNA'lar ilk olarak pri-miRNA adı verilen 5'cap ve 3'poli A kuyrukları taşıyan 1kb'dan daha büyük diziler halinde transkribe olurlar. Pri-miRNA transkriptleri iki aşamalı bir süreçten geçerek olgun ve fonksiyonel miRNA halini alırlar (9). miRNA'lar miRNA genlerinden RNA polimeraz II tarafından farklı boyutlarda, uzun primer miRNA kopyaları (pri-miRNA) şeklinde sentezlenirler. Pri-miRNA'lar nükleusta bulunan mikroşilemci kompleks olarak bilinen RNAaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Drosha ve kofaktörü çift zincirli RNA bağlama proteini DGCR8 (Di George syndrome critical region gene 8) tarafından kesilerek yaklaşık 60-70 nükleotidlik saç tokası yapısında pre-miRNA'ya dönüştürülürler. Oluşan pre-miRNA'lar bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve Ran-GTP tarafından sitoplazmaya taşınırlar (10). Taşınan pre-miRNA'lar RNaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer ile kesilerek 18-24 nükleotidlik çift zincirli miRNA dubleksine çevrilir. Bununla birlikte Dicer, RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır. RISC kompleksine dahil bir RNaz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Dicer, pre-miRNA'nın sap-ıllığını kestikten sonra, çift zincirli miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. Komplekse dahil olmayan diğer zincir ise yıkılır (Şekil 1). miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (1).

Virüs Enfeksiyonlarında miRNA'lar

Özellikle insan patojenlerine tepki olarak, miRNA ekspresyon profilleri değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlikler virüs replikasyonuna yardımcı olma ya da baskılama niteliğindedir, ayrıca gen ekspresyonunda değişikliklere de neden olmaktadır. Virüs enfeksiyonu sırasında gözlenen miRNA ekspresyon değişiklikleri,

konak hücre miRNA'ları dahil virüsün replikasyonunu düzenlemede etkilidirler. miRNA'ların oluşumunu düzenleyen genlerdeki değişikliklerin viral patogeneze veya insan patojenlerine karşı konak hücrenin immun yanıtının belirlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (12). Yapılan ilk çalışmalarda, miRNA biyogenezi için gerekli olan Dicer ekspresyonunun azalması ile viral replikasyon ve enfeksiyonda RNA interferens mekanizmalarının

önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Dicer susturulması hem HIV-1 ile enfekte donörlerden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde, hem de latent olarak enfekte olan hücrelerde HIV-1 replikasyonunun bastırılması ile sonuçlanmıştır. Moleküler mekanizması tam olarak bilinmese de, HIV-1 çoğalmasına polisistronik miRNA kümelerinden miR-17/92'nin azalan ekspresyonunun neden olduğu düşünülmektedir (13).



Şekil 1. miRNA biyogenezi ve fonksiyonu (11).

Konak hücre miRNA'ları ile viral hedef sekansları etkileşiminin konak-patojen etkileşimi üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. İnsan hücrelerindeki miRNA'ların bir retrovirüs olan primat köpüksü virüs tip-1 (primate foamy virus type 1) replikasyonunu kısıtlayabildiği belirtilmektedir (12). Son yapılan çalışmalar, viral patogenezin yeni düzenleyicisi olarak, viral miRNA ve hücre miRNA'lar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yapılan deneylerde viral miRNA'ların konak hücre genlerinin ekspresyonunu değiştirdiği gibi konak miRNA'larının da viral genlerin ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Örneğin; Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonunda hücre miR-122'nin viral genomun replikasyonunu düzenlediği bildirilmiştir (14). Batı Nil virüsü ile yapılan başka bir çalışmada da miR-196a, miR-202-3p, miR-449c ve miR-125a-3p gibi miRNA'ların enfekte bireylerde farklı ekspresyon olduğu belirlenmiştir (15). Human papilloma virüs (HPV) ile yapılan çalışmalarda ise miR-16, miR-25, miR-92a ve miR-378'in ekspresyon artışının, miR-22, miR-27a, miR-29a ve miR-100'ün ekspresyon azalışının viral

onkoproteinleri (E6, E7) ve onların hücresel hedeflerini etkilediği belirtilmektedir (16).

HBV Enfeksiyonu ve miRNA'lar

Hepadnaviridae ailesinin *Orthohepadnavirus* genusunda yer alan HBV, 42 nm çapında, sferik ve zarflı bir virüsdür ve hepatositlerde replike olarak karaciğer fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. HBV biyolojisi ve patolojisinin anlaşılması HBV'nin kontrolü ve tedavisi için oldukça önemlidir. Bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genoma sahip olan HBV kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüsdür. HBV kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA genomu içerir. HBV-DNA, 3.200 nükleotid içeren uzun (L veya negatif) ve 1800-2700 nükleotid içeren kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere 2 sarmaldan meydana gelir. İki sarmal arasında değişik uzunlukta tek sarmallı bir bölge vardır. Virüs DNA'sının yapısal bütünlüğü her iki

zincirin 5' uçlarında bulunan yapışkan bölgelerden birbirlerine tutunmaları ile sağlanır. Direkt tekrarlar (direct repeats, DR) olarak adlandırılan bu bölgeler sabit olup, 10-12 nükleotidlik yinelenen dizinlerden meydana gelir. HBV'de DR1 ve DR2 olmak üzere iki adet DR vardır. Genetik bilginin tamamı genomik DNA'nın uzun sarmalı üzerinde kodlanmıştır ve bu sarmal S, C, X ve P olarak kısaltılmış olan ve açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) olarak adlandırılan dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine sahiptir. Her biri eksi DNA üzerinde kodlanmıştır ve birbirleri ile üst üste gelmektedir. Ayrıca aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunmaktadır. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezi sağlanır. HBV 4 adet ORF'ye sahip olmasına rağmen 7 değişik polipeptid üretir. Genom içerisinde bu proteinleri kodlayan genlerden, S geni: büyük (39 kD), orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini; C geni: 21 kD'luk çekirdek proteinini (HBcAg) ve 30 aminoasitlik preC ürününü taşıyan 16 kD'luk infektivite proteinini (HBsAg), P geni: DNA polimeraz, reverstranskriptaz ve RNaz H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini, X geni ise X proteinini kodlamaktadır (8).

HBV'nin hepatositlere giriş mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, büyük zarf proteininin N-terminalinin yapışma ve hücre içine girmeden sorumlu olduğu, viral ve hücrel membran füzyonunu takiben viral kapsidin konak hücrenin nükleer porlarından taşındığı bilinmektedir (14,8). Sitoplazma içine taşınan kapsid parçalanır ve viral genomik DNA ve polimeraz enzimi çekirdeğe taşınır. Replikasyon sırasında HBV-DNA'sı konak genomuna integre olmaz. Nükleokapsit nükleer pora ulaştığında içindeki gevşek sirküler DNA (relaxed circular DNA=rcDNA) nüklusa geçer. Nükleusta, pozitif iplikçik, 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden itibaren viral polimeraz enzimi tarafından tamamlanır ve polimeraz, oligonükleotid RNA ve negatif iplikçikteki 8 nükleotidlik fazla diziler molekülden ayrılır. Her iki iplikçik 3' ve 5' uçlarından birbirine bağlanır ve kovalent olarak kapalı sirküler DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) yapısı oluşur. cccDNA'dan hücrel RNA polimeraz II enzimi sayesinde viral pregenomik RNA (pgRNA) ve mRNA'lar oluşturulur. Bu mRNA'lar virüs proteinlerinin sentezinde kullanılır (17,18).

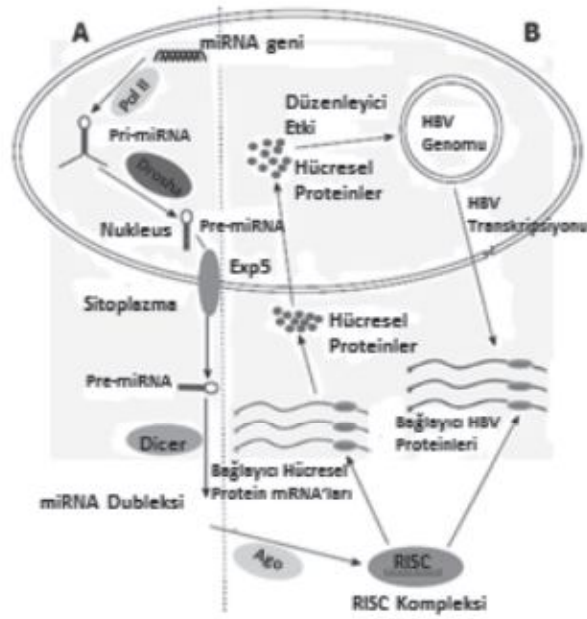
HBV enfeksiyonunda karaciğerde hasar oluşmasının nedeninin viral faktörlerden çok konağın immun yanıtı nedeniyle olduğu bilinmektedir. Virüs replikasyonu yüksek olup, normal karaciğer enzim düzeyi ve

histopatolojisine sahip olan kronik taşıyıcılar, virüsün direkt sitopatik etkisi olmadığını göstermektedir (19). HBV'nin vücuttan uzaklaştırılması güçlü bir CD4+ ve CD8+ T hücre koordinasyon ve etkili hümmoral bağışıklık gerektirmektedir. Doğal bağışıklığın HBV enfeksiyonu patolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. HBV enfeksiyonlarında kanda HBV DNA ve antijenleri olmasına rağmen HBV enfeksiyonu belirtileri ortaya çıkmamakta ve enfekte kişilerde son derece değişik sonuçlar gözlenebilmektedir. Ancak bu farklılıkların nedeni henüz açıklanamamıştır (7).

Son yıllarda HBV enfeksiyonlarının patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalar miRNA'lar üzerine yoğunlaşmaktadır. HBV ile ilişkili çok sayıda hücrel miRNA tanımlanmakla birlikte, şimdiye kadar HBV tarafından kodlanmış miRNA'lar belirlenememiştir. Yapılan çalışmalar hücrel miRNA'ların ekspresyon paternlerinin, siroz ve HCC gibi HBV enfeksiyonlarının tanısı için girişimsel olmayan bir biyomarkır olabileceğini göstermektedir (7,20,21). Hücrel miRNA'ların HBV gen ifadesi için hücredeki transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek veya direkt HBV transkriptine bağlanarak HBV gen ekspresyonuna etki ettiği belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda HBV'li hastalar ve kontrol gruplarının serumları karşılaştırılarak, HBV'li hastalarda 3 kat daha fazla eksprese olan miRNA'lar belirlenmiş ve bazı miRNA'ların hepatit B'nin kronikleşmesi, siroz ve HCC gelişmesinden sorumlu olabileceği saptanarak, bu hastalıkların ayırımında bu miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda; Liu ve ark. (14), miR-122 ve miR-21 gibi miRNA'ların, Li ve ark (7) ise miR-10a, miR-12b'nin ekspresyon farklılıkları dikkate alınarak HBV pozitif gruplar ve HCC gruplarını ayırmada biyomarkır olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Hücrel miRNA'lar doğrudan veya dolaylı olarak HBV replikasyonunu ve transkripsiyonunu düzenleyebilirler. Hücrel miRNA'lar, HBV yüzey antijeni, HBV X proteini ve DNA polimerazı kodlayan mRNA'lar gibi HBV transkriplerini hedefleyerek HBV ekspresyonunu değiştirebilirler. Ayrıca karaciğer transkripsiyon faktörleri, nükleer reseptörler, hemoksijenaz-1 (HO-1), DNA metiltransferaz gibi HBV replikasyonu ve transkripsiyonunda görevli düzenleyici proteinleri hedefleyerek de HBV ekspresyonunu değiştirebilirler (22)(Şekil 2).

HBV ilişkili bazı miRNA'lar Tablo 1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Hücresel miRNA'ların biyogenezisi (A) ve HBV enfeksiyonunda transkripsiyon ve replikasyon mekanizması (B) (22).

Tablo 1. HBV'de etkili bazı miRNA'lar ve biyolojik işlevleri (14).

miRNA'lar	Bilinen Fonksiyonları	HBV Biyolojisi ve Patolojisindeki Etkisi
miR-1	Hücre proliferasyonunun inhibisyonu sağlar	HBV replikasyonunu artırır
miR-10b	Göğüs kanserinde metastazı sağlar	Sirozda artış gösterir
miR-18a	HCC'da proliferasyonu artırır	HCC'da artış gösterir
miR-21	Proliferasyon ve metastazı destekler	HCC'da artış gösterir
miR-26	NFκB ve IL 6 ile ters bağlantılıdır	HCC'de azalır
miR-34a	Metastazı baskılar	HCC'de anormal ekspresyon
miR-122	HCV replikasyonunu artırır HCC'yi bastırır	HO-1 inhibisyonunu sağlayarak HBV ekspresyonunu düzenler
miR-125a	Hücre proliferasyonunun inhibisyonu sağlar	HBsAg ekspresyonunu baskılar
miR-152	Anormal DNA metilasyonunu indükler	HCC'de azalır
miR 155	HCC hücre büyümesini destekler	HCC'de yüksektir
miR-199	Karaciğer fibrozunu destekler	HBV replikasyonunu baskılar
miR-210	Kolanjiokarsinomun ilerlemesini hızlandırır	HBV replikasyonunu baskılar
miR-221	Hücre büyümesi ve apoptozisi düzenler	HCC'de yüksektir
miR-223	Hücre canlılığını inhibe eder	HCC'de anormal eksprese edilir
miR-224	Hücre proliferasyonu ve metastazı düzenler	HCC'de yüksektir
miR-449	Hücre farklılaşmasını destekler	HBV replikasyonunu artırır
miR-602	Hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenler	HCC ilerlemesini artırır
Let-7	Hücre proliferasyonunun inhibisyonunu sağlar Hücre ölümünü düzenler Metastazı düzenler	HBx tarafından bastırılır

HBV Replikasyonunda miRNA'lar

Hepatit B virüsünün replikasyonunda bazı miRNA'ların önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Örneğin, HBV ile enfekte karaciğer hücreleriyle yapılan çalışmalarda miR-373'ün karaciğer hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. HBV genomu ile transfekte edilmiş HepG2 hücrelerinde, miR-372/373'ün artmış ekspresyonunun nükleer faktör I/B aracılığıyla, HBV genom stimülasyonunu ve HBV proteinlerinin üretimini 1.3 kat arttırdığı belirlenmiştir. HBV üreten HepG2.2.15 hücreleri parental HepG2 hücreleri ile karşılaştırıldığında miR-199a-3p ve miR-210'un HBV üreten HepG2.2.15 hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. miR-199a-3p ve miR-210'un doğrudan, sırasıyla HBV S geni ve pre-S1 genlerini hedeflediği ve ekspresyonlarını değiştirebileceği düşünülmektedir. Bu miRNA'ların HBsAg ifadesini azaltmak ve HepG2.2.15 hücre çoğalmasını etkilemeden etkin viral çoğalmayı baskılamakta rol oynayabileceği belirtilmektedir (23).

Wang ve ark. (24) ise miR-155'in, hepatositlerde birlikte eksprese olan C/EBP (CAAT: enhancer binding protein) alfa ve beta'nın negatif düzenleyicisi olduğunu ve HBV transkripsiyonunu azalttığını belirtmişlerdir. Liu ve ark. (14)'nin yaptığı çalışmada ise miR-372'nin inhibe edilmesi durumunda, HBV genom ekspresyonunda viral enhancer I bölgesine bağlanarak transkripsiyonu sağlayan C-AMP-CREB (Cyclic Adenosine Monophosphate, C-AMP, response element binding, CREB) proteininin ekspresyonunun azaldığı ve dolayısıyla HBV genom ekspresyonunu da azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada miR-7, miR-196b, miR-433 ve miR-511'in viral polimeraz ve yüzey antijen genlerini, miR-205 ve miR-345'in ise HBx ve prekor genlerini hedeflediği gösterilmiştir. Bu miRNA'ların tüm viral RNA'larda ilgili bölgelere bağlanarak, pre-genomik RNA'dan replikasyonu inhibe edebileceği ve tüm HBV proteinlerinin transkripsiyonunu baskılayabileceği belirtilmektedir (14).

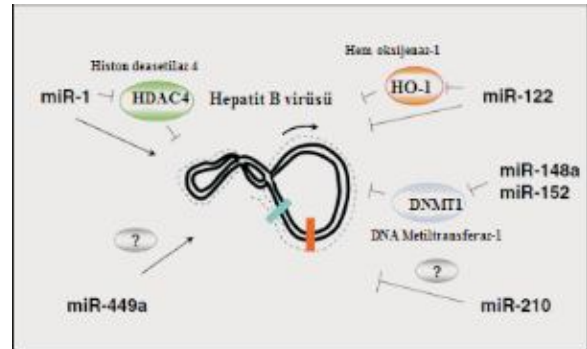
Zhang ve ark. (25) ise miR-1'in HBV genomu için bir pozitif transkripsiyon faktörü olan farnesoid X reseptör alfanın etkisini artırarak, HBV kor proteininin transkripsiyonunu arttırdığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise antisens oligonükleotidler kullanılarak sessizleştirilmiş miR-122'in, HBV ile transfekte Huh-7 hücrelerinde HBsAg ve HBeAg salınımını arttırdığı, bunun aksine fonksiyon kazanmış miR-122'nin ise HBV ile transfekte HepG2 hücrelerinde HBsAg ve HBeAg ekspresyonu azalttığı gösterilmiştir (26). miR-122 inhibitörünün, hem viral mRNA ve protein seviyesinde hem de hücresel HO-1 ifadesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. HO-1, HBV kor-proteininin stabilizasyonunu azaltarak, *in vitro* ve *in vivo* olarak HBV cccDNA seviyesinin azalmasını sağladığı ve genel olarak miR-122'nin HO-1 aracılığıyla HBV replikasyonunu baskıladığı belirtilmektedir (26).

Hbx transgenik farelerde HBV ve DNA metiltransferaz (DNMT) ekspresyonu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada ise karaciğerde miR-

152'nin azaldığı gösterilmiştir (27). Yapılan başka bir çalışmada ise DNMT-1'in miR-148a ve miR-152'nin hedefi olduğu belirlenmiş ve miR-152 ekspresyonunun DNMT-1 ekspresyonu ve HBV ilişkili HCC ile ters bağlantılı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada miR-152'nin viral cccDNA ile ilişkili olarak konak hücre DNA'sının metilasyonunu düzenleyen bir faktör olabileceği belirtilmiştir (27).

miR-449a'nın ise HBV replikasyonunu arttırdığına dair kanıtlar mevcut olmakla birlikte, HBV genomu doğrudan miR-449a'nın hedefi değildir, bilinmeyen mekanizmalarla bu miRNA'nın HBV replikasyonunu arttırdığı bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında konak hücre miRNA'larının HBV replikasyonunu hücrel faktörler aracılığıyla, direkt viral genoma bağlanmadan düzenlediği görülmektedir (14).

miRNA'lar bazı önemli hücrel faktörler aracılığıyla HBV replikasyonunu düzenler (Şekil 3). miR-1 farnesoid X reseptörü alfa (FXAR)'yı aktive ederek ve histon deasetilaz 4 (HDAC4)'ü baskılayarak viral replikasyonu artırır. Genel olarak miR-122'nin HO-1 aracılığıyla HBV replikasyonunu baskılar. miR-210 bilinmeyen hücrel faktörlere etki ederek çoğaltmayı azaltırken, miR-449a ise HBV replikasyonu artırır. miR-152 ve miR-148a DNA metiltransferaz 1 (DNMT1)'i baskılayarak viral replikasyonu da baskılar (14).



Şekil 3. Bazı hücrel miRNA'ların HBV replikasyonu düzenlemedeki etkilerinin şematik gösterimi (14).

Konak-Virüs İlişkisini Etkileyen Hücrel miRNA'lar

Virüs ve konak arasındaki ilişkiyi etkileyen miRNA'lar hücrel miRNA'lar ve viral miRNA'lar olarak ikiye ayrılabilirler. Bazen virüsler hücrel miRNA'ları kendi yaşam sikluslarını düzenlemek için kullanabilmektedirler. Örneğin HCV virüsünün kullandığı karaciğere özgü miR-122 virüsün 5' kodlanmayan bölgelerini hedefleyerek replikasyonu kolaylaştırmaktadır. Bunun tam tersine ise miR-122, HBV yaşam siklusunda antiviral etki göstermektedir. Yapılan bir çalışmada HBV transfekte hücrelerde miR-122'nin aşırı ekspresyonu sonucunda HBV ekspresyonunun inhibe olduğu, endojen kaynaklı miR-122'nin

azalmasının ise HBV ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (26). Bir başka çalışmada ise miR-122'nin hedefi olan siklin G1'nin, p53 ile etkileşim içinde olduğu ve p53'ün HBV çoğaltıcı (enhancer) bölgelerine bağlanarak, p53 aracılı HBV transkripsiyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, herpes virüs, retrovirüs, iridovirüs, askovirüs, bakulovirüs ve adenovirüs gibi çok sayıda miRNA üreten virüs keşfedilmiş olup HBV tarafından kodlanan miRNA'lar henüz deneysel olarak ispatlanamamıştır. Bu bulgular, hücre miRNA'ların HBV transkriptlerini hedefleyerek HBV gen ekspresyonunu değiştirdiğini göstermektedir (24,28).

Sadece iki miRNA'nın miR-210 ve 199-miR-3p hücre kültürü içinde deneysel olarak HBV transkript için doğrudan bir bağlanma ile HBV gen ekspresyonu ve replikasyonu etkilediği gösterilmiştir. Bunun aksine, dolaylı olarak ilgili virüs-hücre proteinlerini etkileyerek HBV yaşam döngülerini düzenleyen birçok hücre miRNA vardır. Böyle miRNA'ların Hepatit B patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu miRNA'ların çoğu direk olarak HBV genomunu veya mRNA'yı hedeflemez, ancak bunların patolojik etkileri hücre miRNA'lardan daha fazladır. Aslında bu konuda yapılan çoğu çalışma konak hücre miRNA'larının HBV enfeksiyonu üzerine etkisini araştırmak ve özellikle HBV transkripsiyon seviyesine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu bilgilerin açığa çıkarılması RNA interferansı ile HBV enfeksiyonunu durdurmada yardımcı olacaktır (29).

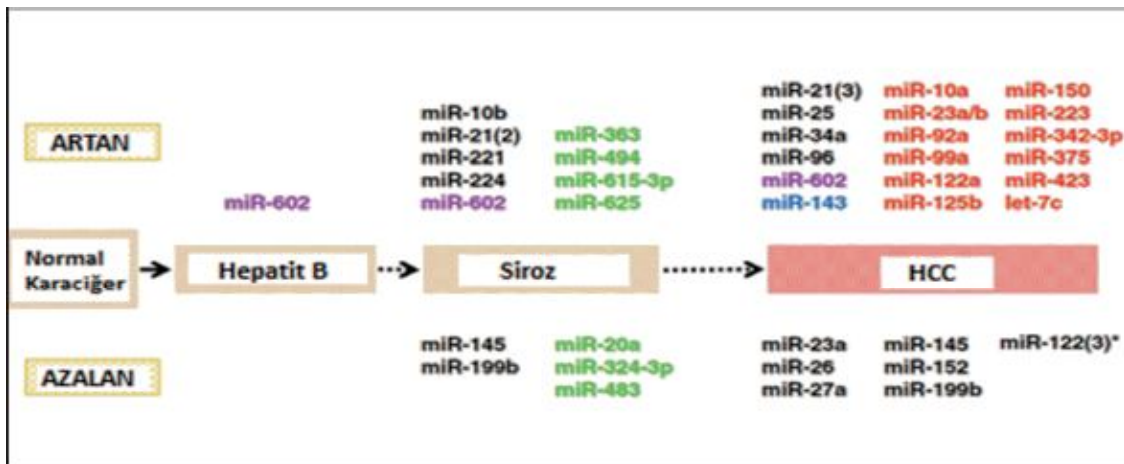
HBV İlişkili Hastalıklarda miRNA Profili

Kronik hepatit ile ilgili yapılan çok sayıda çalışmada miRNA profilleri tartışmalı ve karmaşıktır. miRNA ekspresyon profilleri HBV ilişkili hastalık şiddeti ile birlikte değişkenlik gösterebilmektedir. Son yıllarda miRNA ekspresyon profilleri ve HBV'ye bağlı

kronik hepatit, siroz ve HCC arasındaki ilişki üzerine yoğunlaşmaktadır (23). Ura ve ark. (30) tarafından yapılan çalışmada sağlıklı bireylerin miRNA ekspresyon profilleri ile kronik hepatit B ve HBV ilişkili HCC hastalarının miRNA profilleri karşılaştırıldığında; her iki grupta da miRNA'ların farklı ekspresyona edildiği saptanmıştır. Roderburg ve ark. (31) kronik hepatit B ve siroz tedavisinde miRNA'ların etkilerini araştırdıkları çalışmalarında karaciğer fibrozisinde çoğu miRNA'nın ekspresyonunun anormal olduğunu belirlemiştir. Bu miRNA'lardan miR-29 ailesinin üç üyesinin siroz vakalarında azaldığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda HBV'ye bağlı HCC ile ilişkili miRNA profilinde de farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Ladeiro ve ark. (32) HBV negatif HCC ile HBV pozitif HCC'lı hastalarda miR-96'nın ekspresyon seviyelerini karşılaştırmış ve miR-96'nın HBV'ye bağlı HCC'da aşırı ekspresyona olduğunu belirlemiştir. HCC'lı hastalarla yapılan başka bir çalışmada ise 17 farklı miRNA'nın düzensiz ekspresyona olduğu ve HBV'li vakalarda kadın cinsiyetle ilişkili olmak üzere miR-18a ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur (33).

Son yıllarda sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında kronik hepatit B'li hastalarda plazma miRNA'ların anormal ekspresyonunun gösterilmesiyle birlikte HBV ilişkili HCC tanısı ve sonuçların tahmin edilmesi konusunda miRNA'ların antijen ve antikordlardan daha iyi bir biyomarkör olarak kullanılabileceği ve bu konuda yeni bir yol açacağı belirtilmektedir (34-36). HBV taşıyıcılarında plazma miRNA profillerinin belirlenmesinin de HBV enfeksiyonlarının erken dönemde tanımlanmasında faydalı olabileceğinden bahsedilmektedir (36). Araştırma sonuçları plazma miRNA profillerinin tanımlanmasının sadece HCC'ya dönüşüm fazının belirlenmesinde değil aynı zamanda kronik HBV enfeksiyonundaki fazları da ayırt etmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir (14,33,36). Şekil 4'de HBV ilişkili hastalıklarda bazı miRNA'lar gösterilmiştir.



Şekil 4. HBV ilişkili hastalıklarda bazı miRNA'lar.

Hastalığın kronikleşme, siroz ve HCC'ye doğru ilerlemesi sırasında miR-21, miR-199b, miR-145 ve miR-602 gibi miRNA'ların HCC'nin erken aşamalarında anormal eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu miRNA'lardan özellikle miR-145'in tümör olmayan dokularda aşırı eksprese olduğu ancak tümörün erken safhalarında ekspresyonunun birden azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Siyah renkli grup, HBV taşıyıcılarında normal karaciğere sahip olanlar ile HCC gelişen örnekler karşılaştırıldığında değişen miRNA'ları göstermektedir. Kırmızı renkli grup normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HBV serumundaki miRNA profillerini göstermektedir. miR-143 (mavi) ve miR-152 p21-HBx fare tümör dokusunda saptanmıştır. miR-602 (mor) normal karaciğer ile karşılaştırıldığında her fazda alınan doku örneklerinde yüksek olduğunu göstermektedir. Yıldız işareti belirtilen miRNA'lar için farklı gözlemlerden elde edilen sayıyı temsil etmektedir. miR-122'nin üç farklı çalışmada azaldığı, miR-21'in ise sirozun HCC aşamasında arttığı belirtilmektedir (14).

HBV'ye özgü miRNA profillerinin belirlenmesiyle HBV tedavisi içinde potansiyel yeni yollar ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir. Kohno ve ark. (37) HBV ile enfekte fare ve insan karaciğerinde hsa-miR-486-3p, hsa-miR-1908, hsa-miR-675 ve hsa-miR-1231'in ekspresyonunun arttığını belirlemişlerdir. HBV transkrite HepG2 hücrelerinde ise miR-1231'in aşırı ekspresyonunun HBV replikasyonunu baskıladığını belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada miR-1231 ile HBV arasında bir etkileşim bulunmuş olup, bu etkileşimin HBV tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizde Giray ve ark. (38) HBV pozitif HCC'li hastalarda yaptıkları çalışmada miR-223-3p ekspresyonunun kronik HBV, HBV pozitif siroz ve HBV pozitif HCC hastalarında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğunu, miR-125b-5p'nin ekspresyonunun ise yüksek olduğunu ancak bu yüksekliğin istatistiki açıdan anlamlı olmadığını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak HBV enfeksiyonlarının oluşumu ve klinik seyrinde pek çok miRNA tanımlanmakta olup bu konudaki çalışmalar oldukça yenidir. Bazı virüsler doğal immün sistemden kaçmak ve replikasyon potansiyelini artırmak için kendi miRNA'larını kodlarken HBV aynı etkiyi elde etmek için hücrel miRNA'ları kullanmaktadır. Yapılan çalışmalar miRNA'ların HBV'nin patogeneze mekanizmasına ışık tutabileceğini, HBV enfeksiyonlarının klinik seyrinde biyomarkör olarak kullanılabileceğini ve tedavi için yeni yaklaşımlar sunabileceğini göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar umut verici niteliktedir.

Kaynaklar

1. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38(1):113-20.

2. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2011;4(3):143-59.

3. Lin Z, Flemington EK. miRNAs in the pathogenesis of oncogenic human viruses. *Cancer Lett* 2011;305(2):186-99.

4. Konaç E, Önen Hİ, Sözen S. Üroonkolojide MikroRNA (miRNA)'ların yeri ve önemi. *Üroonkoloji Bülteni* 2010;9(1):3-13.

5. World Health Organization (WHO). Hepatitis B. Erişim: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Erişim Tarihi: 15.06.2014.

6. World Health Organization (WHO). Hepatitis C. Erişim: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> Erişim Tarihi: 15.06.2014.

7. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for HBV Infection and Diagnosis of HBV-Positive Hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010;70(23):9798-807.

8. Kıyan M. Hepatit B Virüsü. Kılıçturgay K, Badur S (eds): Viral Hepatit 2001 kitabı, 1. Baskı, Viral Hepatit Savaşım Derneği Yayını; İstanbul, 2001:88-120.

9. Tunali NE, Tiryakioğlu NO. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *J Med Sci* 2010;30(5):1690-700.

10. Mathieu J, Baker HR. Regulation of Stem Cell Populations by microRNAs. *Adv Exp Med Biol* 2013;786(18):329-51.

11. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15(14):1665-72.

12. Kumar A. MicroRNA in HCV infection and liver cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1809 (11-12):694-99.

13. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Bessia CC, Bennasser Y, Lebrigand K, Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Jeang KT, Benkirane M. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 2007;315(5818):1579-82.

14. Liu WH, Yeh SH, Chen PJ. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;11(12):678-85.

15. Kumar M, Nerurkar VR. Integrated analysis of microRNAs and their disease related targets in the brain of mice infected with West Nile virus. *Virology* 2014;452 (453):143-51.

16. Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, Briskin D, Meyers C, Chow LT, Xie X, Tuschl T, Zheng ZM. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(11):4262-7.

17. Çelik E. Direnç Mutasyonları Gösteren Hbv Mutantlarının Belirlenmesi ve Bu Mutantların Çeşitli Antivirallere Karşı Direnç profillerinin in Vitro Fenotipleme Yöntemi ile Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2011.
18. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2009;51(3):581-92.
19. Aşkar E. Sağlık Çalışanlarında Hepatit B ve Hepatit C Seroprevalansı. Uzmanlık Tezi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 2006.
20. Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. *Viruses* 2013;5(11):2690-703.
21. Sendi H. Dual role of miR-122 in molecular pathogenesis of viral hepatitis. *Hepat Mon* 2012;12(5):312-4.
22. Wei YF, Cui GY, Ye P, Chen JN, Diao HY. MicroRNAs may solve the mystery of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19(30):4867-76.
23. Zhang Q, Pu R, Dua Y, Han Y, Su T, Wang H, Cao G. Non-coding RNAs in hepatitis B or C-associated hepatocellular carcinoma: Potential diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Cancer Letters* 2012;321(1):1-12.
24. Wang B, Majumder S, Nuovo G, Kutay H, Volinia S, Patel T, Schmittgen TD, Croce C, Ghoshal K, Jacob ST. Role of miR-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology* 2009;50(4):1152-61.
25. Zhang X, Zhang E, Ma Z, Pei R, Jiang M, Schlaak JF, Roggendorf M, Lu M. Modulation of HBV replication and hepatocyte differentiation by microRNA-1. *Hepatology* 2011;53(5):1476-85.
26. Qiu L, Fan H, Jin W, Zhao B, Wang Y, Ju Y, Chen L, Duan YCZ, Meng S. miR-122 induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122 mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398(4):771-7.
27. Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology* 2010;52(1):60-70.
28. Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. *PLOS Pathog* 2012;8(12):e1003018.
29. Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res* 2011;39(12):5157-63.
30. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49(4):1098-112.
31. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmerman H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 2011;53(1):209-18.
32. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Sage PB, Pelletier L, Rebouissou S, Rossi JZ. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008;47(6):1955-63.
33. Liu WH, Yeh SH, Lu CC, Yu SL, Chen HY, Lin CY, Chen DS, Chen PJ. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology* 2009;136(2):683-93.
34. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010;70(23):9798-807.
35. Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, Farnik H, Berger A, Zeuzem S, Kronenberger B, Piiper A. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2012;19(20):58-65.
36. Tan YLJ, Chen WN. MicroRNAs as therapeutic strategy for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Current status and future prospects. *World J Gastroenterol* 2014;20(20):5973-86.
37. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat* 2014;21(9):e89-97
38. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* 2014;41(7):4513-9.