

Derleme

Hepatit C Virusu İnfeksiyonunda ve Hepatit C Virusu İlişkili Komplikasyonlarda MikroRNA'ların Rolü

Role of MicroRNAs in Hepatitis C Virus Infection and Hepatitis C Virus-Related Complications

Zehra ÖKSÜZ¹, Mehmet Sami SERİN¹

¹Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Hepatit C virusu küremsi, lipid zarflı hepatotropik bir RNA virusudur. Dünyada yaklaşık 170-200 milyon kişinin bu virus ile kronik infekte olduğu tahmin edilmektedir. Hepatit C virusu enfeksiyonu kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma için majör risk faktörüdür. Hepatit C virusu enfeksiyonu için henüz koruyucu bir aşı geliştirilememiştir. Şu andaki standart tedavilerin, hastalardan virusun tam olarak temizlenmesinde yetersiz kaldığı, maliyetinin yüksek olduğu ve yan etkilerinin de çok fazla olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hepatit C virusu'nun tedavi ve tanısı için yeni biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son dönemde ilgi, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan RNA'lar, mikroRNA üzerine odaklanmıştır. MikroRNA'lar hepatit C virusu enfeksiyonunun oluşmasında ve onların infekte hepatositlerde yayılmasında önemli rol oynarlar. MikroRNA'ların virus ilişkili konak yollarına ve viral hayat siklusuna etkileri gösterilmiştir. Birçok mikroRNA profillemeye çalışmalarında hepatit C virusu enfeksiyonunun, insan mikroRNA'larının önemli bir kısmını anormal olarak düzenlediği ortaya konulmuştur. Son çalışmalar bazı mikroRNA'ların hepatit C virusu enfeksiyonuna karşı yeni terapötik hedefler olabileceklerini göstermiş ancak bu mekanizma henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Bu derleme mikroRNA'ların, hepatit C virusu hayat siklusundaki rolünü ve hepatit C virusu ile ilişkili karaciğer hastalıklarının ilerleyişinde düzenleyici rollerini içeren son araştırmaları özetlemektedir.

Anahtar Sözcükler: hepatit C virusu; fibrozis/siroz; hepatosellüler karsinoma; mikroRNA

Abstract

Hepatitis C virus is a spherical, lipid-enveloped, hepatotropic RNA virus. It is estimated that 170-200 million people have been chronically infected with this virus worldwide. Hepatitis C virus infection is a major risk factor for chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A protective vaccine for hepatitis C virus infection is not available yet. Besides being highly expensive and having strong side effects, current therapeutic options remain insufficient for the complete clearance of virus from the patients. Therefore, the development of new biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatitis C virus infection is urgently required. Recent interest in this research area focused on the non-protein coding RNAs approximately 22 nucleotides in length, in other terms, microRNA. microRNAs have an important role in the establishment of hepatitis C virus infection and their propagation in infected hepatocytes. microRNAs have been shown to influence viral life cycles and critical virus-associated host pathways. Several studies on microRNA profiling have demonstrated that hepatitis C virus infection abnormally regulates a number of significant human microRNAs. Moreover, recent studies have documented that some certain microRNAs could be novel therapeutic targets against hepatitis C virus infection. However, these mechanisms are poorly understood. In this review, we aimed to summarize the recent research investigating the role of microRNAs in the hepatitis C virus life cycle and their regulatory role in the progression of hepatitis C virus-induced liver disease.

Keywords: hepatitis C virus; fibrosis/cirrhosis; hepatocellular carcinoma; microRNA

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2014;7(1):1-11

Geliş tarihi : 23.09.2014

Kabul tarihi : 18.12.2014

Yazışma adresi : Arş. Gör. Zehra ÖKSÜZ, Mersin Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Mersin

Tel : 0324 3610001/1959

Faks : 0324 3413022

E-posta : zehraoksz@gmail.com

Giriş

Hepatit C virusu (HCV), non-A, non-B hepatit virus enfeksiyonu olarak bilinen hastalığın ana etkeni olarak 1989 yılında tanımlanmıştır (1). *Flaviviridae* ailesinin *hepacivirus* genusuna dahil edilen HCV; küremsi, lipid zarflı ve 30-60 nm büyüklüğünde hepatotropik bir RNA virusudur. HCV genomunun yaklaşık 9400 nükleotid uzunluğunda, pozitif polariteli, tek iplikçikli lineer bir yapısı vardır (2). HCV genomu 3 yapısal (kor, E1, E2) ve 7 yapısal olmayan (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, ve NS5B) en az 10 proteini kodlamaktadır. Bu proteinler HCV'nin yaşam döngüsünde ve replikasyonunda önemli görevler üstlenmektedir (3).

Hepatit C enfeksiyonu ciddi bir küresel sağlık sorunu olup tüm dünyada 170-200 milyon kişinin bu virus ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Bu patojene maruz kalmış bireylerin %80'inde kronik hepatit C (KHC) enfeksiyonu gelişmekte, buna bağlı olarak ileri evrelerde siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi ciddi son aşama karaciğer komplikasyonları gelişebilmektedir (4). HCV'nin ülkemizdeki yaygınlığı kan donörleriyle yapılan çalışmalarla saptanmış ve anti-HCV pozitiflik oranı %0.54 olarak tespit edilmiştir (5). Mevcut tedavi seçenekleri henüz yetersiz olup günümüze kadar etkili bir aşı geliştirilememiştir. Son zamanlarda pegyated interferon alfa (peg-IFN- α) ve ribavirin (RBV)'den oluşan standart tedavide HCV NS3/4A proteaz inhibitörlerinin kullanılması HCV ile enfekte hastalarda kalıcı virolojik cevabı arttırdığı gösterilmiştir (6). Günümüzde HCV enfeksiyonunun tedavisinde, RBV ve IFN gibi klasik antiviral tedavi yöntemlerinin yanı sıra, NS3/4A proteazı inhibe eden doğrudan etkili telaprevir ve boceprevir gibi antivirallerin uygulandığı klinik araştırmalar da vardır (7,8). Bu gelişmelere rağmen henüz yeterince etkili bir tedavi stratejisi bulunmamaktadır. Bu nedenle virolojik kalıcı yanıtı daha yüksek olması istenen alternatif tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. Son dönemlerde viral yaşam döngüsünde HCV RNA'nın 5'UTR bölgesine bağlanarak viral yaşam döngüsünü pozitif yönde düzenleyen mikroRNA (miRNA)'lardan biri olan miR-122'nin inhibe edilmesi temeline dayalı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir (9).

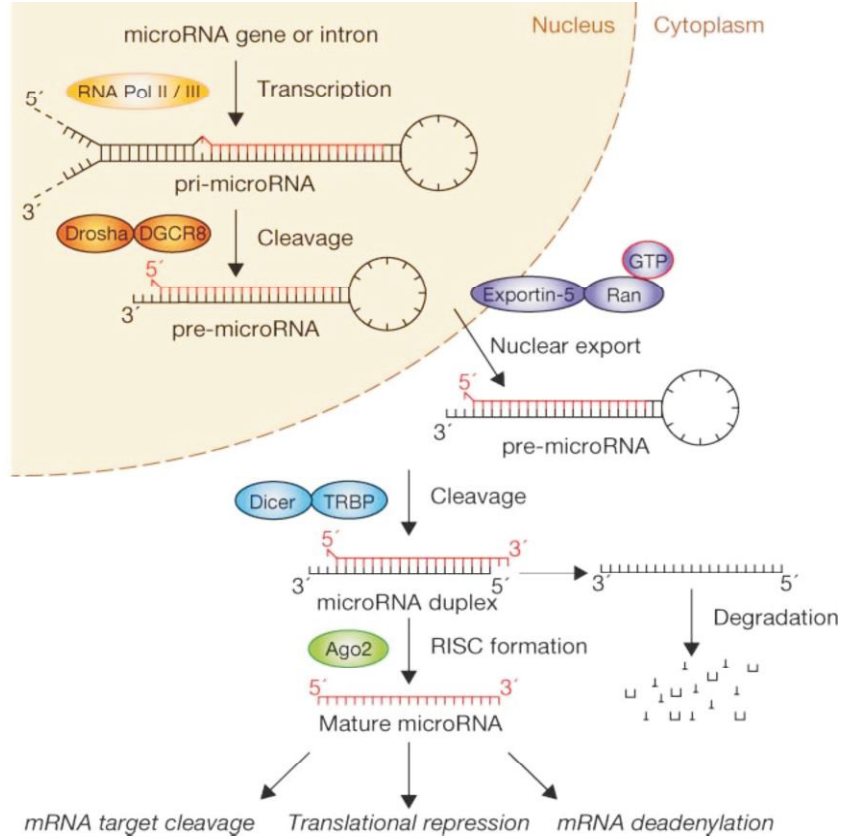
HCV enfeksiyonu ciddi sonuçları olan tedavisi güç bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyonun teşhis ve tedavisinde mevcut seçenekler yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden HCV enfeksiyonuyla mücadelede yeni markırlara, ilaçlara ve aşı çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç doğrultusunda son dönemde keşfedilen miRNA'ların HCV tanı ve tedavisinde umut verici olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle HCV ve miRNA'lar arasındaki ilişkinin iyi anlaşılması gerekmektedir (4,9). Bu derlemenin amacı HCV miRNA ilişkisinin anlaşılmasına katkı sağlamak için son dönemde yapılmış olan

makale ve derlemeleri bir araya getirerek bu konu hakkındaki son bilgileri toplamaktır.

miRNA'lar ve miRNA'ların Biyogenez

miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmiştir. Bu güne kadar insan miRNA ailesinde 2000'den fazla olgun miRNA bulunduğu ve insan mRNA'sının yaklaşık %60'ının miRNA'nın hedefi olabileceği tahmin edilmektedir (10). miRNA'lar yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynayan ve protein kodlamayan RNA'ların bir sınıfını oluşturmaktadır (11). Konak genlerin düzenlenmesine ek olarak hücre gelişim, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, immünite ve ölüm gibi oldukça geniş biyolojik yollar aralığındaki birçok olayla ilişkilendirilen miRNA'ların biyogenez çeşitli işlem aşamalarını gerektirmektedir (12).

miRNA'lar ilk olarak nükleusta büyük RNA polimeraz II transkriptleri olarak sentezlenir. Primer miRNA'lar (pri-miRNA), 200 nükleotid ile bir kaç bin nükleotid uzunluğunda olup stem loop yapısına sahiptirler. Selüler RNase III enzim "Drosha" bu stem loop yapısını omurgasızlarda "Pasha" olarak bilinen kofaktör nükleer protein "DiGeorge syndrome critical region 8" (DGCR8) yardımıyla keser. Bu bölünme karakteristik iki nükleotid 3' çıkıntısına sahip prekürsör miRNA (pre-miRNA) olarak bilinen yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda, saç tokası formunda, bir RNA ara ürün oluşumuna neden olur (13). miRNA biyogenezdeki bir sonraki adım pre-miRNA'nın 2 nükleotidlik 3' çıkıntısını tanıyan ve bağlayan kofaktör "Ras ile ilişkili nükleer protein" (RAN)'nın GTP bağlı formu ve exportin 5'den (Exp5) oluşan bir heterodimer ile nükleustan sitoplazmaya geçmesidir. Sitoplazmada, "Dicer" adlı başka bir selüler RNase III enzimi ikinci kesimi gerçekleştirmek için kofaktör transaktivasyonundan sorumlu yanıt RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile yapısal DNA'ya bağlanır. Son ürün yaklaşık 17-22 nükleotid uzunluğundaki olgun dupleks miRNA'dır. Bu olgun saç tokası formundaki miRNA yapısı hedef mRNA'ya komplementer fonksiyonel bir rehber zinciri ve daha sonra degrade olan bir yolcu zincir yapısı taşır. Rehber zincir selektif olarak RNA ile indüklenen susturma kompleksi RNA-induced silencing complex (RISC veya miRISC)'nin çekirdeğini oluşturmak üzere Argonaute 2 (Ago-2) proteini ile etkileşir (14). Ago-2 protein katalitik olarak aktif ribonükleoproteindir ve RISC'in anahtar komponentidir. Olgun miRNA RISC kompleksine yüklendiğinde, hedef mRNA'nın 3'UTR'si ile etkileşmek üzere komplekse rehberlik eder (Şekil 1). Bu süreç ya tam olmayan baz eşleşmesi olduğunda mRNA translasyonunun baskılanması ya da tam komplementer bağlanma olduğunda mRNA'nın klevajı ve degradasyonu ile sonuçlanır (15) (Şekil 1).

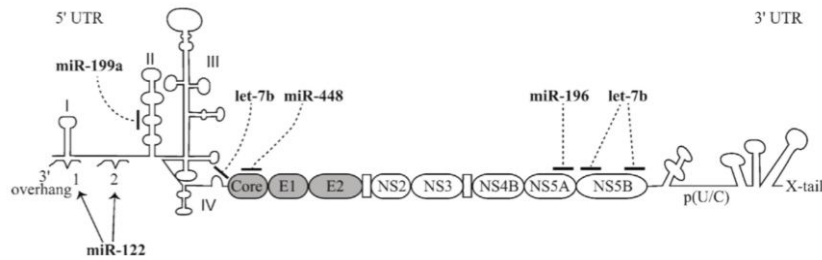


Şekil 1. miRNA'nın biyogenezi (15).

Hepatit C Virus Replikasyonunda miRNA'ların Rolü

Son çalışmalarla HCV infeksiyonu sırasında virus replikasyonunun ve patogenezinin düzenlenmesinde, virüs-konak etkileşiminde anahtar rol oynayan birçok miRNA'ya belirlenmiştir. HCV hayat siklusunda yer alan bu miRNA'lardan birisi miR-122'dir. miR-122 karaciğer spesifik miRNA'dır ve HCV infekte hücrelerde HCV replikasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (17). Bu miRNA, HCV translasyonunu artırır ve viral RNA ile direkt etkileşim yoluyla HCV infeksiyonunu pozitif yönde düzenler. Bir miR-122 molekülü 3' çıkıntılı nükleotidi ile HCV RNA'nın 5' untranslated region (UTR) bölgesine bağlanarak bir oligomerik kompleks oluşturur ve HCV genomunun 5' terminal sekanslarını maskeler (Şekil 2). Böylece 5' terminal viral sekansları

nükleolitik degradasyondan korunmaktadır. Ayrıca HCV RNA'nın sürdürülebilmesi için miR-122 3' terminal nükleotidinin yanı sıra spesifik internal nükleotitlerde gerek vardır (18). Ago-2 proteinlerinin HCV 5'-UTR aracılı translasyon aktivitesinde miR-122 için gerekli olduğu bilinmektedir (19). miR-122'nin 5' ekzonükleaz Xrn1 hedefleyerek 5' bölgesinin bozulmasından HCV RNA'yı koruduğu da gösterilmiştir. miR-122'nin eksojen ekspresyonu etkili HCV RNA replikasyonu ve/veya non-permisif hücre hattında infeksiyöz virionun üretimine olanak tanır (20). Bunların dışında viral replikasyonu düzenleyen miR-122, hepatoma hücre hattında hücre döngü sürecine katılır. miR-122'in siklin G1'i hedeflediği bilinmektedir ve miR-122 inhibitörünün kullanımının, alkol kaynaklı HCV RNA ve protein seviyelerindeki artışı önlediği bildirilmiştir (21).



Şekil 2. HCV RNA genomu ile etkileşimde olan miRNA'ların HCV yaşam döngüsünü düzenlemesi (33).

miR-122'nin yanı sıra diğer birçok miRNA HCV replikasyonunda yer almaktadır. miR-448 ve miR-196 aşırı ekspresyonu, HCV genomunun sırasıyla kor ve NS5A kodlama bölgelerini direkt hedefleyerek viral replikasyonu azaltabilirler (Şekil 2). Yapılan çalışmalarda miR-196'nın viral replikasyonu %50-80 oranında engelleyebildiği gösterilmiştir (22). Buna ek olarak miR-196'nın anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar heme oksijenaz 1 (HMOX1)'in baskılayıcısı, Bach-1'i hedeflediği bilinmektedir. Fonksiyonel deneylerde mimik miR-196'nın eklenmesi ile HMOX1 seviyesinin arttığı bununla birlikte Bach-1 seviyesinin önemli ölçüde azalarak HCV ekspresyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (23). Let-7b direkt HCV genomunu hedefleyen ve anti HCV aktivite gösteren yeni selüler miRNA olarak tanımlanmıştır. Mutasyon analizlerinde HCV'nin 5'-UTR ve NS5B'nin kodlama dizilerinde let-7b bağlama bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 2). Let-7 miRNA'nın, Bach1'i hedefleyerek HMOX1 gen ekspresyonunu azalttığı böylece karaciğer hasarının zayıflatılmasına neden olduğu bilinmektedir (24). miR-199a birçok insan dokusunda orta düzeyde ekspresyon ediliyor iken insan karaciğer dokusunda oldukça düşük seviyede ekspresyon edilmektedir. miR-199a HCV 5'UTR bölgesini hedefleyerek HCV replikasyonunu baskılamaktadır. miR-199a-3p HCV RNA'nın 5'UTR internal ribosome entry site (IRES) bölgesine bağlanır ve HCV replikasyonunu %80-90 oranında önler (25). miR-29 aşırı ekspresyonu HCV ile infekte olmuş hepatositlerde viral RNA'yı inhibe etmektedir ve HCV ile infekte hastalarda miR-29'un düşük ekspresyon seviyeleri karaciğerde gözlemlenmiştir (26). miR-130a ekspresyonunun HCV infekte hastalardan alınan karaciğer biyopsi örneklerinde artmış olduğu tespit edilmiştir. miR-130a'nın ortadan kalkmasının hepatositlerde HCV replikasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu da HCV replikasyonunda miR-130a'nın faydalı olduğunu göstermektedir (27). hsa-miR-130a, hsa-miR-130b, hsa-miR-298, hsa-miR-193a-5p ve hsa-miR-371-5p'nin farkı artış oranları kontrol hücrelerine kıyasla HCV Con1 replikonlarda gözlemlenmiştir. Bu miRNA'lar HCV infekte hücrelerde PPARG, IRF1 ve STAT3 hedefleyen genler tarafından hücre büyümesi ile ilişkilendirilmiştir (28). Deleted in liver cancer (DLC-1)'in (Rho GTPaz aktive edici protein) miR-141 aracılı baskılanması, HCV ile infekte olmuş primer insan hepatositlerinde viral replikasyonu arttırmaktadır. Ayrıca yapay olarak infekte edilmiş hepatositlerle yapılan çalışmalarda virus replikasyonunun, intrasellüler miR-141 kaynaklı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Böylece miR-141'in HCV replikasyonundaki fonksiyonel önemi doğrulanmıştır (29). miR-24, miR-149, miR-638 ve miR-1181 gibi miRNA'ların farklı ekspresyonları HCV enfeksiyonu sırasında tespit edilmiştir ve bu miR'lerin HCV'nin girişi, replikasyonu ve yayılmasına katkıda buldukları gözlemlenmiştir (30). Son zamanlarda miR-27a'nın HCV replikasyonu üzerine olumsuz etkileri gösteril-

miştir. miR-27a'nın, insan hepatoma hücrelerinde lipid metabolizmasını düzenleme yoluyla HCV replikasyonunu baskıladığı belirlenmiştir (31). miR-21 ekspresyonu HCV enfeksiyonunu takiben karaciğer rejenerasyonunun erken aşamasında artış olmaktadır. Bu miR'in HCV kaynaklı interferon üretimini inhibe etmesi bir yana NF-κB yolağının aktivasyonu için gereken bir ubiquitin ligaz olan selüler hedef gen, Pellino-1 (peli1)'nin ekspresyonunu negatif yönde düzenleyerek NF-κB yolağını baskıladığı bilinmektedir (32). Tablo 1'de HCV replikasyonu ile ilişkili miRNA'lar özetlenmiştir.

Hepatit C Virus ile İlişkili Komplikeasyonlarda miRNA'ların Rolü

Henüz yeterince başarılı bir tedavi stratejisi bulunmayan HCV enfeksiyonu, hepatik steatoz, fibroz/siroz ve HSK gibi son derece ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir (4). HCV enfeksiyonunda miRNA'ların rolünün araştırıldığı son çalışmalar bu enfeksiyonda ciddi komplikasyonların gelişmesine neden olan moleküler mekanizmaların iç yüzünün anlaşılmasını sağlamıştır (4).

Hepatit C Virus ile İlişkili Hepatik Steatozda miRNA'ların Rolü

Hepatik steatoz, hepatositlerin sitoplazması içinde aşırı yağ birikimi olarak tanımlanmış ve ABD'de siroza katkıda bulunan önemli bir faktör olarak kabul edilmiştir (34). Hepatik metabolizma, HCV yaşam döngüsünün her aşamasıyla yakından bağlantılı bir yoldur. Virusun metabolik değişiklikleri sonucunda, HCV ile infekte hastaların %40'ından fazlasında steatoz gelişmektedir. Steatozun bu oranı HCV genotip 3a ile infekte hastalarda önemli derecede yüksektir (35). Çalışmalar miRNA'ların PTEN ekspresyonunun azaltılmasında önemli bir rol oynayabileceklerini göstermektedir (36). HCV kor proteini HCV ile transfeksiyona uğratılmış hücrelerin sitoplazması içindeki yağ damlacıklarının yüzeylerinde tespit edilmiştir. Ayrıca HCV kor ve NS4B proteinleri, HCV enfeksiyonunu takiben hepatik steatoz gelişmesine neden olan miR-27b'nin artışından sorumlu tutulmuştur. miR-27b'nin, trigliserit oluşumunun sürdürülmesinden sorumlu, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör alfa (PPAR)-α ve angiopoietin-benzeri protein 3 (ANGPTL3)'ün ekspresyonlarını baskıladığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. miR-27b aracılı PPAR-α ve ANGPTL3'ün baskılanması hepatositlerin sitoplazmalarında lipid birikimine katkı sağlamakta ve sonrasında hepatik steatoz gelişmektedir (37). miR-27a'nın ekspresyon seviyeleri HCV infekte hastalarda önemli ölçüde yükselmektedir. miR-27a'nın, lipid-fakir apolipoprotein A1 kolesterol ve fosfolipidlerin hücresel akışına aracılık eden ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı A1 (ABCA1) ve lipid sentetik transkripsiyon faktörü

RXRa'yı hedefleyerek lipid mekanizmasını düzenlediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ek olarak miR-27a'nın infeksiyöz HCV partiküllerinin üretiminde

anahtar rol oynayan PPAR α , PPAR γ , ApoA1, ApoB100 ve ApoE3'ü içeren lipid metabolizmasıyla ilişkili genlerin fonksiyonlarını inhibe ettiği bilinmektedir (31).

Tablo 1. HCV replikasyonu ile ilişkili miRNA'lar (Kaynak 16'dan alınarak düzenlenmiştir).

| | miRNA | Hedef | Fonksiyonu |
|---------------------------------------|--------------------------|---|--|
| HCV replikasyonunu arttıran | miR-122 | HCV 5'UTR | IRES aracılı HCV translasyonunu ve HCV replikasyonunu arttırır. |
| | | SOCS3 | SOCS3 gen promoterindeki metilasyonu geliştirir, IFN ile uyarılan ISRE aktivitesini inhibe eder. |
| | | Cyclin G1 | Alkol ile indüklenmiş viral replikasyonu arttırır. |
| | | Xrn1 | HCV RNA'nın 5' bozulmasını inhibe eder. |
| | miR-141 | DLC-1 | DLC-1'i süprese ederek viral replikasyonu arttırır. |
| | miR-130a | IFITM | Tip I interferon sinyallerini inhibe ederek HCV replikasyonunu arttırır. |
| HCV replikasyonunu inhibe eden | miR-196 | HCV genomunda NS5A bölgesi BACH1 | HCV replikasyonunun inhibisyonu NS5A protein ekspresyonu ve HCV RNA inhibisyonu |
| | miR-448 | HCV genomunun CORE bölgesi | HCV replikasyonunun inhibisyonu |
| | Let-7b | HCV genomunda 5' UTR bölgesi ve NS5A BACH1 | HCV infektivitesinin azalması HCV ekspresyonunun baskılanması |
| | miR-199a/ miR-199a-3p | HCV 5-'UTR | Viral replikasyonun inhibisyonu |
| | miR-130a | INF α /INF β | INF α /INF β 'nin ekspresyonlarını arttırarak HCV replikasyonunu inhibe eder. |
| | miR-29 | - | Artışı HCV RNA'yı inhibe eder. |
| | miR-27a | - | Lipid metabolizmasını düzenleme yoluyla HCV replikasyonunu inhibe eder. |

Hepatit C Virus ile İlişkili Fibroz/Siroz' da miRNA'ların Rolü

Fibrozun HCV ile ilişkili karaciğer sirozu ve HSK gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (4). Her ne kadar mekanizma tam olarak açık olmasa da virusun fibroz oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir. Fibrozis kronik inflamasyon ile bağlantılıdır ve HCV kaynaklı karaciğer hasarından sorumlu "transforme edici büyüme faktörü" (TGF- β)'nü arttırmaktadır. TGF- β sinyal aktivitesi, tip I kollajen depozisyonunu takiben ortaya çıkan hasar oluşumunda yer alan esas etken hücre popülasyonu olan hepatik stellata hücrelerini (HSC) ve ekstraselüler matriksi (ECM) üretmektedir. miRNA profil çalışmaları HCV kaynaklı modülasyonlarda miRNA'ların yer aldığını ortaya koymuştur (38). HCV ile infekte hasta örneklerinde miR-21 ekspresyon düzeyleri fibrotik evre ile pozitif korelasyon göstermiştir. miR-21, TGF- β sinyalleşmenin negatif regülatörü SMAD7'yi hedefleyerek fibrojenin artmasına yol açar (39). Ayrıca miR-29 inhibisyonu HSC ve kollajen genlerin (COL1A1 ya da COL3A1) sentezinin aktivasyonu ile bağlantılı olup bu nedenle ECM üretimine katkıda bulunabilir (40).

YKL40'nın ekspresyonu KHC enfeksiyonlu hastalarda yükselmiştir ve HCV ilişkili fibrozisin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar miR-449a'nın kontrol grubuna kıyasla KHC'li infekte hastalardan elde edilen karaciğer biyopsilerinde dikkate değer şekilde yüksek olduğunu göstermiştir. miR-449a'nın artırılmış ekspresyonu, NF- κ B/p65'in nükleer lokalizasyonunu kolaylaştıran NOTCH1'i hedefler (41). NF- κ B/p65, bir transkrip-

siyon faktörü olarak fonksiyon göstererek YKL40'nın ekspresyonunu arttıran, KHC enfeksiyonu sonrası karaciğer fibrozuna katkı sağlayan bir faktördür. Böylece, miR-449a'nın azalan seviyeleri, NOTCH1'in artırılmasından ve daha sonra karaciğer fibrozu ve ECM'nin sentezini arttıran YKL40'nın artan seviyelerinden sorumludur (41).

miR-107'nin ekspresyon seviyeleri miR-449a'nın azalması ile birlikte KHC enfeksiyonu olan hastaların karaciğerlerinde önemli ölçüde azalmaktadır. miR-449a ve miR-107 sırasıyla interlökin-6 reseptör (IL-6R) ve Janus kinaz 1 (JAK1)'in ekspresyonlarını negatif yönde düzenlediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. IL-6R ve JAK1 aracılı proinflatuvar sinyal yollarlarının aktivasyonu, KHC enfeksiyonu takiben bir inflamatuvar kemokin olan, kemokin (CC motifi) ligandı 2 (CCL2)'in, ekspresyonunu arttırmada görev almaktadır. CCL2'nin, HSC'leri kuvvetlendirdiği görülmüştür. Sonuç olarak, miR-449a ve miR-107'nin ekspresyonlarının HCV kaynaklı azalması IL-6R ve JAK1'in ekspresyonlarının artmasına ve daha sonra CCL2 ekspresyonunun indüksiyonuna neden olur böylece hepatik fibroz gelişebilir (42).

KHC enfeksiyonu sonucu Fas-ilişkili protein (FAP1)'in ekspresyonunu baskılayan miR-200c'nin ekspresyonu artmaktadır. Bir protein tirozin fosfataz olan FAP1, Src kinaz aktivitesini olumsuz yönde düzenler. Src kinaz, pro-fibrotik sinyal yollarının önemli bir aracıdır. Dolayısıyla miR-200c'nin KHC kaynaklı artması hepatik fibroz arttırmaktadır (33). Tablo 2'de HCV İlişkili Fibroz/Siroz'da rolü olan miRNA'lar özetlenmiştir.

Tablo 2. HCV İlişkili Fibroz/Siroz'da rolü olan miRNA'lar (Kaynak 33'den alınarak düzenlenmiştir.)

| miRNA | Ekspresyon seviyeleri | Hedef | Fonksiyonu |
|----------|-----------------------|----------------------------|---|
| miR-21 | Artar | SMAD7 | TGF- β sinyallerini arttırarak fibrogenize neden olur. |
| miR-29 | Azalıır | HSC ve COL1A1 ya da COL3A1 | ECM üretimine katkıda bulunarak fibrojenizi destekler. |
| miR-449a | Azalıır | NOTCH1 IL-6R | YKL40'nın ekspresyonunu arttırarak ederek fibrojenizi destekler. CCL2 ekspresyonunu süprese ederek fibrozu arttırır. |
| miR-107 | Azalıır | JAK1 | CCL2 ekspresyonunu baskılayarak fibrozu arttırır. |
| miR-200c | Artar | FAP1 | Src kinazı aktivitesini arttırarak fibrozun gelişimine katkı sağlar. |

Hepatit C Virus ile İlişkili Hepatosellüler Karsinomada miRNA'ların Rolü

HSK kompleks bir hastalıktır ve HCV enfeksiyonu hepatokarsinogenezis için majör risk faktörlerinden birisidir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların değişen ekspresyonlarla HCV enfeksiyonu ile ilişkili tümör oluşumunda rol oynadıklarını ortaya koymaktadır (9). Mikroarray teknolojisi kullanılarak miRNA ekspresyon profillerinin yapıldığı bir çalışmada beş olgun ve bir prekürsör miRNA'nın ekspresyonlarının HSK'lı ve kontrol grupları arasında ilgi çekici düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada HSK'lı hasta örneklerinde prekürsör miR-18 ve miR-224 artmış iken, miR-199a, miR-195, miR-200a ve miR-125a azalmış olarak bulunmuştur (45). Yine mikroarray teknolojisinin kullanıldığı başka bir çalışmada, sirotik karaciğer ve HSK'lı örneklerinde miRNA ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. Bu çalışmada sirotik karaciğer ile karşılaştırıldığında 35 miRNA'nın ekspresyonlarının düzensiz olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada miR-122, HSK'lı örneklerin yaklaşık %70'inde azalmış ve miR-122'nin tüm HSK kaynaklı hücre dizileri incelemelerinde HSK gelişimi sırasında tümör baskılayıcı olarak rol aldığı tespit edilmiştir (46).

miR-21 belirli insan kanserlerinde bol miktarda tespit edilen ve HCV enfeksiyonuyla ilişkili onkogenik miRNA olarak üzerinde en fazla durulan ilk miRNA'lardan biridir. Bir kanser ksenograf modelde, miR-21'in aşırı ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde ve tümör boyunca hücre proliferasyonunu, göçünü arttırmada rol oynadığı ve apoptozisi baskıladığı ortaya konmuş bir onkogen miRNA olarak farklı kanser türlerindeki hayati rolü tanımlanmıştır (47). miR-21 aynı zamanda HSK'da da aşırı eksprese olmaktadır. Meng ve ark. (47) normal karaciğer dokularına karşı HSK tümör dokularında miRNA ekspresyon profillerini analiz etmiş ve normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda miR-21'in 5 kattan daha fazla arttığını göstermişlerdir. HSK hücre kültürlerinde miR-21'in engellenmesi tümör baskılayıcı PTEN'in ekspresyonunu arttırdığı ve tümör hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (47). miR-21, PTEN'i arttırdığı bilinen Syrouy2 (SPRY2)'i hedeflemektedir (48). Yapılan çalışmalar, başka bir hedef olan, tümör baskılayıcı gen Ras Homolog gen ailesi, member B (RHOB)'nin, Huh-7 ve HepG2 hücre dizinlerinde miR-21'in azalmış olduğu durumlarda artmış olduğunu göstermiştir. RHOB'un aşırı ekspresyonu tümör oluşumunu inhibe etmektedir (49). miR-155'in ekspresyon seviyelerinin KHC infekte hastalarda önemli derecede yükseldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kanser başlamasında ve ilerlemesinde birçok aşamasında önemli görev alan NF-κB,

miR-155'in transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumlu bulunmuştur. miR-155'in aşırı ekspresyonu büyük ölçüde apoptozisi baskılar ve hepatositlerin proliferasyonunu artırır. Bundan başka miR-155 *in vitro* ve *in vivo* Wnt sinyal yolunu aktive ederek hepatositlerin çoğalmasına ve tümör oluşumuna yol açtığı saptanmıştır (50). Benzer şekilde miR-141, insan hepatositlerinde, bir tümör baskılayıcı gen olan "deleted in liver cancer 1" (DLC-1)'in ekspresyonunu negatif yönde düzenleyebilir böylece tümör oluşumunu arttırabilir (51). HSK'da miRNA ekspresyon profilleri çalışmalarında sirotik dokularda ve tümörlerde miR-221 ve miR-222'nin ekspresyon seviyelerinin devamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. HSK'da artmış olan miR-221'in onkogenik rolü P13K/AKT/mTOR yolaklarının düzenleyicisi, DDIT4 ve siklin bağımlı kinaz inhibitör p27'nin hedeflemesi ile destek görmektedir. Yapılan çalışmalarda miR-221'in sadece kanser başlangıcını uyarmadığı aynı zamanda tümör ilerleyişini arttırdığı gösterilmiştir (52). miR-221'nin onkogenik rolü, HSK'da proapoptatik protein Bcl-2-modifiye faktör (BMF) ve miR-221'in ters korelasyonu tarafından da desteklenmektedir. Antagomirler tarafından miR-221'in azaltılması, HSK hücre dizinlerinde hücre döngüsü denetim noktası inhibitörleri CDKN1C/p57 ve CDKN1B/p27'nin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (52). Aynı şekilde onkogenik miR-222'nin ekspresyonunun artmasının ileri aşama HSK ile önemli derecede ilişkili olduğu bulunmuştur. miR-222'nin aşırı ekspresyonu AKT (protein kinaz B) sinyali yolunu aktive ederek hücreye göç avantajı sağlar (53). Yao ve ark. (54) yaptığı çalışmalarında miR-30d'nin HSK'da artmış olduğu ve intra-hepatik metastaz ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Galphai2 (GNAI2) miR-30d'nin direkt fonksiyonel hedefi olarak tespit edilmiştir. GNAI2'nin ekspresyonunun artması miR-30d aracılı HSK hücre invazyon ve metatazını engelleyebilmektedir (54). HSK'da aşırı ekspresyon gösterdiği rapor edilen diğer bir miRNA miR-17-5p'dir. Bu miR'in aşırı ekspresyonunun proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bu miRNA'nın *in vitro* susturulması ile hepatositlerin büyümesi ve proliferasyonunda %50 azalma olduğu bulunmuştur (55). miR-17-5p'nin, p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK) aktivitesini önemli derecede aktive ettiği ve "ısı şok protein 27" (HSP27) fosforilasyonunu attırdığı bilinmektedir (56).

Diğer taraftan miR-152 ve miR-491'in HCV enfeksiyonu tümörögeninde tümör süpresör olarak fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir. Her iki miRNA'nın da ekspresyonları HCV enfeksiyonunu takiben azalmıştır. miR-152 Wnt1 mRNA'nın 3' UTR'yi hedefler ve Wnt1 mRNA ve proteinin ekspresyonlarını baskılayabilir. Wnt1 ekspresyonları-

nın artması HCV kaynaklı hepatokarsinogenezi artırır. Böylece miR-152'nin HCV aracılı downregülasyonu Wnt sinyal yolağını aktive ederek karaciğer tümörüne artması ile sonuçlanmaktadır (57). miR-491'in ekspresyonunun HCV aracılı azaltılması da miR-152'den farklı bir mekanizma aracılığıyla karaciğer tümörüne arttırdığı bilinmektedir. miR-491, insan HSK dokularında sıklıkla artmış olan, Bcl-2 aile üyesi antiapoptatik Bcl-xL'yi hedefleyerek apoptosizi artırabilme yeteneğindedir. Aslında miR-491'in ektopik ekspresyonu, insan kanserlerinde yaygın aktif bir yolak olan "fosfoinositol 3 kinaz (PI3)-Akt" yolağını inhibe ederek HCV enfeksiyonunu takiben hücre proliferasyonunu süprese edebilmektedir (58). HCV enfeksiyonunu takiben azalmış olan tümör baskılayıcı diğer bir mikroRNA da miR-122'dir. Bu miRNA hücre invazyonu ve göçü gibi metastatik özelliklerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. miR-122'nin metastazının bir promotörü olarak bilinen, "A Disintegrin ve Metalloprotease 17" (ADAM17)'i hedefleyerek kanser hücrelerinin invazyon ve göçünü baskılayabilir (59). miR-101'in de HSK'lı dokularda önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada miR-101'in artan ekspresyonuyla *in vivo* tümör oluşumu ve *in vitro* koloni oluşumunun süprese olduğu ortaya çıkarılmıştır. Myeloid lösemi hücre dizisi 1; (Mcl-1), miR-101'in gerçek hedefi olarak tanımlanmıştır. miR-101'in azalması bir anti apoptotik molekül olan Mcl-1'in artması ile ilişkilendirilmiştir (60). Lan ve ark. (61) yaptıkları çalışmada let-7 g'nin tümör süpresör miRNA olarak hareket edebildiğini göstermişlerdir. let-7g'nin, aşırı ekspresyonu sırasıyla, c-Myc ve p16(INK4A) negatif ve pozitif düzenlemesi aracılığıyla HSK hücre dizininin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu bulgular let-7 g'nin tümör süpresör p16(INK4A)'nın

re-ekspresyonuna neden olabilen c-Myc'nin direkt baskılanması aracılığıyla HSK hücre proliferasyonunun inhibitörü olarak fonksiyon gösterebildiğine işaret etmektedir (61). Wong ve ark. (62) yaptıkları çalışmada miR-139'un primer HSK örnekleriyle kıyaslandığında metastatik HSK örneklerinde daha fazla azalmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada miR-139'un aşırı ekspresyonunun *in vitro* hücre göçünü ve invazyonunu azalttığı aynı zamanda farelerde karaciğer tümörü ve metastazının şiddetini de azalttığı gösterilmiştir. miR-139, HSK'da artmış olarak bulunan önemli metastatik gen olan Rho-kinaz 2 (ROCK2)'nin 3' bölgesi ile etkileşerek ve HSK hücrelerindeki ekspresyonunu azaltabilmektedir (62). HSK'da onkogen ve tümör süpresör olarak hareket edebilen miRNA'ların listesi Tablo 3'de gösterilmiştir.

HCV tedavisi zor ve kronikleşme eğiliminde olan bir enfeksiyon etkenidir. Keşfinden bugüne gitikçe önemi daha iyi anlaşılan miRNA'ların, HCV'nin hayat döngüsünün birçok aşamasında, HCV enfeksiyonunun oluşmasında ve onların enfekte hepatositlerde yayılmasında önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Son çalışmalar bazı miRNA'ların HCV enfeksiyonunda markır olabileceğini ve bu enfeksiyona karşı yeni terapötik hedefler olarak kullanılabileceğini göstermiştir. miRNA'ların HCV enfeksiyonundaki bu rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için biyogenezlerinin ve HCV replikasyonunda ve enfeksiyonundaki hedeflerinin belirlenmesine yönelik daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması ve çalışmaların bu yönde ilerlemesi HCV enfeksiyonu ve buna bağlı komplikasyonların tanısında ve ortadan kaldırılmasında umut verici gelişmeler olacaktır.

Tablo 3. HSK'da onkogen ve tümör baskılayıcı olarak hareket edebilen miRNA'lar (Kaynak 16'dan alınarak düzenlenmiştir).

| | miRNA | Hedef | Ekspresyon |
|------------------------------------|-----------|--------------------------|------------|
| Onkogenik miRNA'lar | miR-21 | PTEN, SPRY2, RHOB | Artar |
| | miR-155 | Wnt sinyal yolağı | Artar |
| | miR-141 | DLC-1 | Artar |
| | miR-221 | DDIT4, p27, BMF | Artar |
| | miR-222 | AKT Sinyal Yolağı | Artar |
| | miR-30d | GNAI2 | Artar |
| | miR-17-5p | MAPK, HSP27 | Artar |
| Tümör Baskılayıcı miRNA'lar | miR-152 | Wnt1 | Azalı |
| | miR-491 | Bcl-xL, (P13)-Akt yolağı | Azalı |
| | miR-122 | ADAM17 | Azalı |
| | miR-101 | Mcl-1 | Azalı |
| | Let-7 g | c-Myc, p16(INK4A) | Azalı |
| | miR 139 | ROCK2 | Azalı |

Kaynaklar

1. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19(44):7896-909.
2. Avşar E, Eren F. Hepatit C virus enfeksiyonu. In: Tözün N, Şimsek H, Özkan H, Şimsek İ, Gören A. Eds. Klinik gastroentoloji ve hepatoloji, Ankara: MN Medikal-Nobel; 2007: 419-20.
3. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virüs replication from to function. *Nature* 2005;436(7053):933-38.
4. Shrivastava S, Mukherjee A, Ray RB. Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World J Hepatol* 2013;5(9):479-86.
5. Mıstık R. Ülkemizde Kronik Viral Hepatitlerin Epidemiyolojisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Kongre Kitabı, Antalya; 2007:61-3.
6. Kanda T, Imazeki F, Yokosuka O. New antiviral therapies for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2010;4(3):548-61.
7. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;364(25):2405-16.
8. Jun DW, Tak WY, Bae SH, Lee YJ. Recent trends in the treatment of chronic hepatitis C. *Korean J Hepatol* 2012;18(1):22-8.
9. Jopling CL. Targeting microRNA-122 to treat hepatitis C virus infection. *Viruses* 2010;2(7):1382-93.
10. miRBase: the microRNA database. Erişim: <http://www.mirbase.org>. Erişim Tarihi: 01.09.2014.
11. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19(1):92-105.
12. Elmen J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Heltjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452(7189):896-99.
13. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
14. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009;11(3):228-34.
15. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009;11(3):228-34.
16. Gupta P, Cairns MJ and Saksena NK. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Virology Journal* 2014;11:64.
17. Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 2010;84(13):6615-25.
18. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(8):3193-98.
19. Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* 2011;39(17):7716-29.
20. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM. Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(5):1881-86.
21. Hou W, Bukong TN, Kodys K, Szabo G. Alcohol facilitates HCV RNA replication via up-regulation of miR-122 expression and inhibition of cyclin G1 in human hepatoma cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37(4):599-608.
22. Muurakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepato* 2009;50(3):453-60.
23. Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL. MicroRNA-196 represses Bach-1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology* 2010;51(5):1494-504.
24. Cheng JC, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD. Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(15):2621-33.
25. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 2009;50(3):453-60.
26. Bandyopadhyay S, Friedman RC, Marquez RT, Keck K, Kong B, Icardi MS, Brown KE, Burge CB, Schmidt WN, Wang Y, McCaffrey AP. Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. *J Infect Dis* 2011;203(12):1753-62.
27. Bhanja Chowdhury J, Shrivastava S, Steele R, Di Bisceglie AM, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus infection modulates expression of interferon stimulatory gene IFITM1 by upregulating miR-130A. *J Virol* 2012;86(18):10221-5.
28. Steuerwald NM, Parsons JC, Bennett K, Bates TC, Bonkovsky HL. Parallel microRNA and mRNA expression profiling of (genotype 1b) human hepatoma cells expressing hepatitis C virus. *Liver Int* 2010;30(10):1490-504.

29. Banaudha K, Kaliszewski M, Korolnek T, Florea L, Yeung ML, Jeang KT, Kumar A. MicroRNA silencing of tumor suppressor DLC-1 promotes efficient hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes. *Hepatology* 2011;53(1):53-61.
30. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology* 2010;398(1):57-67.
31. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol* 2013;87(9):5270-86.
32. Marquez RT, Wendlandt E, Galle CS, Keck K, McCaffrey AP. MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF-kappaB signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298(4):G535-41.
33. Li X, Yang W, Ye W, Jin L, He J, Lou L. microRNAs: Novel players in hepatitis C virus infection. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014;38(6):664-75.
34. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21(1):3-16.
35. Bugianesi E, Salamone F, Negro F. The interaction of metabolic factors with HCV infection: does it matter? *J Hepatol* 2012;56(1):S56-65.
36. Gu Y, Xu Y, Jiang L, Cao X, Liu F, Li H, Zhang L, Li Z, Li J, Ye J, Li Q. Differentially expressed microRNAs in Huh-7 cells expressing HCV core genotypes 3a or 1b: potential functions and downstream pathways. *Int J Mol Med* 2012;30(2):374-82.
37. Singaravelu R, Chen R, Lyn RK, Jones DM, O'Hara S, Rouleau Y, Cheng J, Srinivasan P, Nasheri N, Russell RS, Tyrrell DL, Pezacki JP. Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: a novel mechanism for hepatic steatosis. *Hepatology* 2014;59(1):98-108.
38. Zampino R, Marrone A, Restivo L, Guerrero B, Sellitto A, Rinaldi L, Romano C, Adinolfi LE. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J Hepatol* 2013;5(10):528-40.
39. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab Invest* 2010;90(12):1727-36.
40. Bandyopadhyay S, Friedman RC, Marquez RT, Keck K, Kong B, Icardi MS, Brown KE, Burge CB, Schmidt WN, Wang Y, McCaffrey AP. Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. *J Infect Dis* 2011;203(12):1753-62.
41. Kamal SM, Turner B, He Q, Rasenack J, Bianchi L, Al Tawil A, Nooman A, Massoud M, Koziel MJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology* 2006;43(4):771-9.
42. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Crippin JS, Chapman WC, Mohanakumar T. Hepatitis C virus-induced changes in microRNA 107 (miRNA-107) and miRNA-449a modulate CCL2 by targeting the interleukin-6 receptor complex in hepatitis. *J Virol* 2014;88(7):3733-43.
43. Ramachandran S, Ilias Basha H, Sarma NJ, Lin Y, Crippin JS, Chapman WC, Mohanakumar T. Hepatitis C virus induced miR200c down modulates FAP-1, a negative regulator of Src signaling and promotes hepatic fibrosis. *PLoS One* 2013;8(8):e70744.
44. Shrivastava S, Mukherjee A, Ray RB. Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World J Hepatol* 2013;5(9):479-86.
45. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006;25(17):2537-45.
46. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;67(13):6092-9.
47. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133(2):647-58.
48. Sayed D, Rane S, Lypowy J, He M, Chen IY, Vashistha H, Yan L, Malhotra A, Vatner D, Abdellatif M. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell* 2008;19(8):3272-82.
49. Connolly EC, Van Doorslaer K, Rogler LE, Rogler CE. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol Cancer Res* 2010;8(5):691-700.
50. Zhang Y, Wei W, Cheng N, Wang K, Li B, Jiang X, Sun S. Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling. *Hepatology* 2012;56(5):1631-40.
51. Banaudha K, Kaliszewski M, Korolnek T, Florea L, Yeung ML, Jeang KT, Kumar A. MicroRNA silencing of tumor suppressor DLC-1 promotes efficient hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes. *Hepatology* 2011;53(1):53-61.
52. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(1):264-9.

53. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):867-75.
54. Yao J, Liang L, Huang S, Ding J, Tan N, Zhao Y, Yan M, Ge C, Zhang Z, Chen T, Wan D, Yao M, Li J, Gu J, He X. MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51(3):846-56.
55. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, Rogler LE, Zavolan M, Tuschl T, Rogler CE. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol* 2008;173(3):856-64.
56. Yang F, Yin Y, Wang F, Wang Y, Zhang L, Tang Y, Sun S. miR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway. *Hepatology* 2010;51(5):1614-23.
57. Huang S, Xie Y, Yang P, Chen P, Zhang L. HCV core protein-induced down-regulation of microRNA-152 promoted aberrant proliferation by regulating Wnt1 in HepG2 cells. *PLoS One* 2014;9(1):e81730.
58. Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412(1):92-7.
59. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem* 2009;284(46):32015-27.
60. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009;69(3):1135-42.
61. Lan FF, Wang H, Chen YC, Chan CY, Ng SS, Li K, Xie D, He ML, Lin MC, Kung HF. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16(INK4A). *Int J Cancer* 2011;128(2):319-31.
62. Wong CC, Wong CM, Tung EK, Au SL, Lee JM, Poon RT, Man K, Ng IO. The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2. *Gastroenterology* 2011;140(1):322-31.