

## Bölüm 8

# HEPATİT B VİRÜSÜ ENFEKSİYONLARINDA MİKRO RNA'LARIN ROLÜ

Yeşim TUYJİ TOK<sup>1</sup>

### 1. GİRİŞ VE MİKRO RNA'LAR (MİRNA)

MikroRNA'lar (miRNA), küçük interferans yapan RNA'lar (siRNA) ve PIWI-etkileşimli RNA'lar (piRNA) dahil olmak üzere küçük kodlamayan RNA'lardır. Proteinleri kodlayan dizilerden yoksundur ve yaklaşık 20-30 baz uzunluğundadırlar (1). MikroRNA'lar (miRNA'lar), endojen, tek zincirli, fonksiyonel RNA'lar grubudur. Komplementer mRNA'ları transkripsiyon baskılanmasını veya mRNA bozulmasını indükleyerek (2) ya da G bazından zengin bir RNA dizisi bağlama faktörü 1 (GRSF1) bağımlı yol üzerinden hedef genin ekspresyonunu up-regüle ederek düzenlerler (3). Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında, *Caenorhabditic elegans* türü yuvarlak solucanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, lin-4 olarak adlandırdıkları bir genin, herhangi bir proteini kodlamamasına rağmen küçük bir RNA parçasını transkripsiyona uğrattığının gösterilmesi ile ilk mikroRNA rapor edilmiştir (4). 2000 yılında, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen let-7 adlı farklı bir küçük RNA, Reinhart ve arkadaşları tarafından keşfedildi. Sonraki yıllarda, tüm çok hücreli ökaryotlarda başka birçok küçük RNA molekülü keşfedildi ve bazılarının bitki, böcek, nematod ve insanlar arasında evrimsel olarak korunduğu anlaşıldı (5). miRNA'lar genetik bilginin işlenmesi, düzenlenmesi ve posttranskripsiyonel düzeydeki benzerişlemlerde anahtar rol oynayarak hücrel çoğalma, farklılaşma ve apoptoz mekanizmalarını etkiler (6-9). Posttranskripsiyonel gen susturma, mRNA molekülünün sekans-spesifik bozulmaya uğraması veya transkripsiyona girememesi yoluyla meydana gelir. Bu sırada, mRNA'nın kaynaklandığı genin transkripsiyon hızında veya biçiminde herhangi bir değişiklik olmaz ve sentezlenen mRNA'ya küçük ve kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ekspresyonu baskılanır. Bu olaya RNA interferansı (RNAi) denir. Oligonükleotidlerin kullanımı ile gen ürünlerini düzenleme fikri ilk olarak

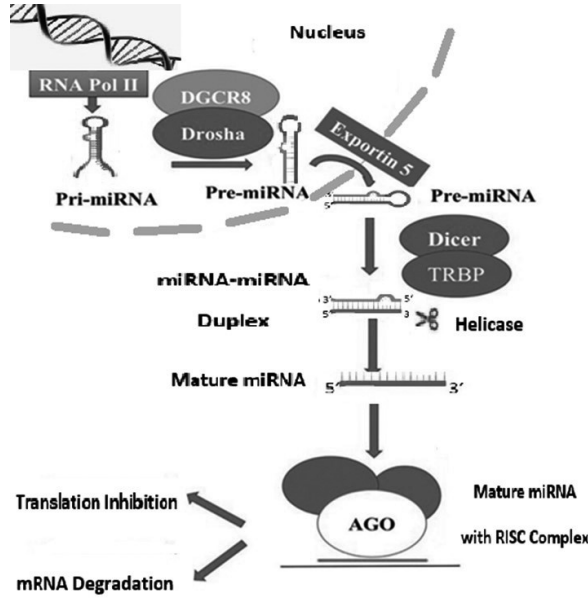
<sup>1</sup> Uzm. Dr., İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, dr.yesimtok@gmail.com

antisens/sensyaklaşımı ile başlamıştır (10). Antisensoligonükleotitler, 15-25 baz uzunluğunda yapay DNA zincirleridir ve Watson-Crick baz eşleştirme kurallarına göre hedef DNA veya RNA'ya bağlanmak üzere tasarlanmışlardır. Canlılara geçişleriyle etkilerini kalıcı olarak gösteren bu oligonükleotitlerin uygulanması ile bugüne kadar birçok genin fonksiyonu açıklanabilmiştir. Öte yandan RNAi, yapay antisensoligonükleotit uygulamalarının aksine doğal bir fenomendir. RNAi'nin doğal işlevinin, genomu, konak hücre içinde aktive edildiğinde tek veya çift sarmallı RNA oluşturabilen virüs ve transpozongibi mobil genetik bileşenlerden korumak olduğu düşünülmektedir (11,12). Konakları kadar birçok insan ve hayvan virüsünün de kodlama yapan miRNA'ları tanımlanmıştır. Birçok viral miRNA'nın işlevi henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, bazı viral miRNA'ların in vivo yaşam döngülerini düzenleyerek virüs persistansına ve kronik inaktif veya aktif enfeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir (13). Bu nedenle viral miRNA'lar temel olarak viral enfeksiyonların seyrini etkiler.

Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu dünya çapında en yaygın viral enfeksiyonlar arasındadır ve kronik karaciğer hastalıkları (siroz) ve hepatoselülerkarsinom (HCC) için önemli bir risk faktörüdür.

### **i.miRNA'larınbiyogenezi ve işlevleri**

Çekirdekteki DNA'dan RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonla ilk oluşan pri-miRNA'nın şekli bir saç tokasını andırır. Öncül miRNA daha sonra çekirdek-kaynaklı RNase III enzimi (Drosha) ve beraberindeki DiGeorge sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) proteini tarafından pre-miRNA'ya çevrilir. Bir sonraki adımda, exportin-5 ve Ran-GTP pre-miRNA'ya bağlanır ve bu yapı sitoplazmaya gönderilir, burada ribonükleaz III (Dicer) ve transaktivasyon yanıt elemanı RNA-bağlayıcı protein (TRBP) tarafından kesilir. Oluşan son yapı çift sarmallı miRNA'dır. Drosha-Dicer enzimleri birbiriyle uyum içinde çalışır ve birinin ürünü diğerinin substratı olarak iş görür. Çift sarmallı olgun miRNA daha sonra tek sarmallı argonot (Ago) ve RNA ile indüklenen susturma kompleksleri (RISC) oluşturmak üzere çözülür ve daha kararlı sarmaldan tek sarmallı miRNA meydana gelir. Olgun miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması sonucunda ya mRNA yıkılır ya da 3' çevrilmeyen bölge (UTR) ile etkileşerek translasyon baskılanır (14,15) (**Şekil-1**). Bununla birlikte, son çalışmalar 5'-UTR'deki hedef bölgelerinin, hatta aynı anda hem 5'-UTR hem de 3'-UTR hedef bölgelerinde miRNA'ların 3' uçlarıyla (3p) etkileşebildiklerini göstermiştir (16).



Şekil-1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar, tümör promotörü (aşırı ekspresyon ve/veya amplifikasyon) veya supresörü (az ekspresyon ve/veya delesyon) olarak hareket ederek hücre çoğalmasını, migrasyon, invazyon ve kanser gelişimini kontrol eder. Her bir miRNA'nın yüzlerce hedef genin posttranskripsiyonel olarak baskılama yeteneğine sahip olduğu; dolayısıyla gen ekspresyonunun güçlü düzenleyicileri oldukları düşünülmektedir (17,18).

## ii. miRNA mekanizmasındaki bozukluklar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda başta kanser olmak üzere birçok hastalığın etyopatogenezinde miRNA'lara bağlı işlev bozukluklarının rol oynadığı gösterilmiştir (19). Disfonksiyonun ortaya çıkmasında çeşitli mekanizmalar rol oynar (20,21). Bunlar arasında en önemli grup miRNA'nın ekspresyonu seviyesindeki değişikliklerdir. Genetik olarak indüklenen ekspresyon değişiklikleri, delesyonlar, amplifikasyonlar veya translokasyonlar gibi büyük ölçekli genom değişikliklerinden kaynaklanır. miRNA kodlayan dizideki delesyonlar, söz konusu miRNA miktarını büyük ölçüde azaltırken, hedef mRNA'da ve ondan kodlanan proteinde artışa neden olur. Amplifikasyonlar, miRNA miktarını artırırken, hedef mRNA'nın etkinliğinde ve ondan kodlanan protein miktarında azalmaya neden olurlar. Translokasyonların etkisi, bölgeye bağlı olarak artış veya azalma olabilir.

Büyük ölçekli genom değişikliklerine ek olarak, nokta mutasyonları damiRNA fonksiyonunu bozabilir. miRNA'yı veya hedef mRNA'yı kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarından kaynaklanan dizi değişiklikleri, miRNA-mRNA etkileşimini bozarak arttırıcı veya azaltıcı yönde etki gösterebilir. Bunların dışında epigenetik değişiklikler ve miRNA'yı kodlayan genin promotör aktivitesindeki değişiklikler ekspresyon seviyesini etkileyebilir (21). Epigenetik varyasyonlar, kromatin yapısını ve dolayısıyla transkripsiyon için gerekli proteinlerin DNA ile etkileşimini değiştirir. DNA'nın miRNA'nın kodlandığı gen bölgesinde metilasyon ve buna bağlı kromatinin kapanması transkripsiyonu engeller ve miRNA sentezini bozar. Sonuç olarak miRNA miktarı azalırken hedef mRNA ve kodladığı proteinler artar (12).

## 2. HBV ile ilişkili miRNA'lar

Birçok virüs, özellikle herpes virüs ailesi üyeleri, replikasyon potansiyellerini arttıracak ve/veya doğal bağışıklık yanıtlarından kaçmalarına izin verecek kendi miRNA'larını kodlar (22). Virüste kodlanan miRNA'lar Epstein-Barr virüsü (23), simian virüsü 40 (SV40), herpes simpleks virüsü (HSV), insan sitomegalovirüsü (HCMV), Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü (KSHV), Marek hastalığı virüsünde ve retrovirüs ailelerinde tanımlanmıştır (MDV) (24-31). Diğer virüsler, aynı etkileri elde etmek için hücrel miRNA'ları modüle eder.

Hepatit B'nin biyolojisini ve patogenezi anlamak, HBV enfeksiyonunu sınırlandırmak için esastır. HBV'nin hepatositlere giriş mekanizması hala bilinmemekle birlikte hepatositlerde çoğalan (hepatotropik) ve sitopatik etkisi olmayan bir virüstür. Son kanıtlar, miRNA disregülasyonunun HBV enfeksiyonu ve HBV-ilişkili HCC'de önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir (**Tablo-1**).

**Tablo 1. HBV enfeksiyonu/sirozu/HCC ilişkili miRNA'lar**

miRNA	Up/Down-Regülasyon	Etki
<b>Let-7 ailesi</b>	Down-regülasyon	Let7a/b/c/d/e/f/g/I IL-6, IL-10, TLR4 ekspresyonunu inhibe eden HBx proteini tarafından down-regüle edilir
<b>Let-7a-3p</b>	Up	(HBV erken döneminde up-regüle edilir/ DDX3X'i hedef alır/ekspresyonu serumda down-regüle dokuda up-regüle edilir)
<b>Let-7c</b>	Up	HBV'nin immün yanıtta kaçışına neden olur/ FXRA aracılığıyla HBV replikasyonunu geliştirmek için HDAC4/MET <sup>3</sup> 'yi hedefler
<b>miR-106a</b>	Down	HBx ile down-regüle edilir, KHB'de IL-8'i hedef alır

**Tablo 1. Devamı**

<b>miRNA</b>	<b>Up/Down-Regülasyon</b>	<b>Etki</b>
<b>miR-122</b>	Up	HBe pozitif hasta serumunda up-regüle edilir/HBV DNA ile korelasyon gösterir
	Down	Sağlıklı kontroller (SK) ile karşılaştırıldığında KHB hastalarında up-regüle edilir/
<b>miR-125</b>	Up	HBV DNA ve HBsAg ile koreledir
<b>miR-125a-5p</b>	Up	HBsAg mRNA ekspresyonunu bloke ederek HBV'yi baskılar
<b>miR-125a</b>	Up	HBV'nin immün yanıtta kaçışına neden olur
<b>miR-130a</b>	Down	HBV DNA/HBeAg ve HBsAg ile koreledir /HBsAg mRNA ekspresyonunu bloke ederek HBV'yi baskılar/KLF13'ü hedef alır
<b>miR-141</b>	Down	HBV'de HBx up-regüle edilir
<b>miR-150</b>	Up	PGC1 $\alpha$ ve PPAR $\gamma$ hedef alınarak HBV replikasyonu düzenlenir/HBV'de muhtemel ikili düzenleme rolü vardır
<b>miR-152</b>	Down	Sirozda down-regüle edilir
<b>miR-155</b>	Up	HBV'de down-regüle edilir
<b>miR-17-92</b>	Up Down	DNA metilasyonunu/hücre proliferasyonunu/migrasyonu/invazyonumodüle eder, HBV'yi bloke eder
<b>miR-18a</b>	Up	JAK/STAT'ı up-regüle etmek için SOCS1'i bloke eder/INF sinyalizasyonunu arttırarak HBV'yi baskılar
<b>miR-181a-d</b>	Down	HBV mRNA'yı baskılayan miR-17-92'yi up-regüle etmek için c-Myc transaktive edilir
<b>miR-182</b>		Proliferasyonu ve bağ doku büyümesini arttırır
<b>miR-191</b>	Up	HBV DNA ve HBV hastalığı gelişimi ile koreledir/HLA-A down-regüle edilir
<b>miR-192</b>	Up	KHB'nin HBV-ilişkili siroza ilerlemesinde down-regüle edilir HBx proteini ile up-regüle edilir
<b>miR-193a-5p</b>	Down	KHB'de up-regüle edilir
<b>miR-199a-5p</b>	Up	A0'a göre A3 inflamasyonda up-regüle edilir
<b>miR-20a</b>	Down	Erken HBV-immüntoleran dönemde up-regüle edilir/ HBx up-regüle edilir
<b>miR-200b</b>	Down	HBx tarafından down-regüle edilir
<b>miR-200c</b>	Down	KHB'de down-regüle edilir
<b>miR-21</b>	Up	HBV enfeksiyonunda HBx baskılanır

Tablo 1. Devamı		
miRNA	Up/Down-Regülasyon	Etki
miR-210	Up	A0'a göre A3 inflamasyonda up-regüle edilir
miR-216	Up	HBV DNA ve HBsAg ile korelasyon gösterir/ inflamasyon markerıdır
miR-22	Up	Hücre proliferasyonu ve migrasyonu
miR-26a	Down	Upregulated in HBV ile enfekte kişilerde up-regüle edilir/ HBeAg ile korelasyon gösterir
miR-29a	Up	Sirozda down-regüle edilir
HBV-mir-2/3	Up	Sirozda up-regüle edilir HBc mRNA ekspresyonunu bloke eder
miR-33	Up	Sirozda up-regüle edilir
miR-340	Up	Sirozda up-regüle edilir
miR-342-3p	Up	HBV enfeksiyonunda up-regüle edilir
miR-363	Down	
miR-371	Up	Tümör gelişimini modüle eder HBx proteini ile up-regüle edilir
miR-372	Up	HBV DNA ile korelasyon gösterir
miR-501	Up	HBX1P'yi hedef alır
miR-92a	Up	HBV'de up-regüle edilir
miR-96	Up	İler evre fibroziste up-regüle edilir/ ATF2/E2F3/CREB3L2 hedef alınır

### i. HBV enfeksiyonunda miRNA'ların rolü

HBV enfeksiyonunda miRNA'ların rolü, hastalığın evresine bağlıdır. Akut evrede virüs, bağışıklık sistemi tarafından yok edilmekten kurtularak kendi replikasyonunu sürdürmek zorundadır. Kronik evrede virüs, viral replikasyonun kısıtlandığı dormant duruma geçerken bir yandan da bağışıklık sisteminden kaçmaya devam eder. Bu, miRNA'ların önemli rol oynadığı karmaşık bir zaman-bağımlı etkileşimler ağı sayesinde gerçekleşir. HBV, uygun bir ortam elde etmek ve yaşam döngüsünü sürdürmek için çeşitli hücresel miRNA'ların ekspresyonunu modüle edebilir. HBV enfeksiyonu ve diğer karaciğer ile ilgili hastalıklarda en iyi çalışılan miRNA'lardan biri miR-122'dir. Bu karaciğere özgü miRNA, normal hepatositlerde (yetişkin karaciğer toplam miRNA popülasyonunun yaklaşık %70'i) en yüksek seviyelerde eksprese edilir ve lipid metabolizması, karaciğer gelişimi, farklılaşma, büyüme gibi çeşitli karaciğer fonksiyonlarında ve neoplastik transformasyon-

da anahtar rol oynar (32,33). miR-122 ekspresyonundaki artış, hepatit C virüsü (HCV) replikasyonunu kolaylaştırırken, HBV enfeksiyonunda tersine virüsün replikasyonunu baskılamak için miR-122 ekspresyonu arttırılır, yakın zamanda yapılan bir çalışma, bu etkinin HBV X (HBx) proteini aracılığıyla elde edildiğini göstermiştir (34,35). Ancak miR-122'nin HBV replikasyonu üzerindeki bu etkisi, negatif geri besleme ile sınırlanmaktadır. Öte yandan miR-1, histondeasetilaz 4 (HDAC4) ekspresyonunu down-regüle ederek HBV'nin çekirdek promotör transkripsiyonunu artırabilir. Bu miRNA, cccDNA üzerinde epigenetik değişiklikleri indüklemek ve viral genomamplifikasyonu için nükleer HBx'inbir komplementeri olarak hareket edebilir. Ek olarak miR-372, miR-373 ile birlikte nükleer faktör I/ B'yi hedefleyerek HBV ekspresyonunu destekler. Bununla birlikte, let-7 ailesinden miRNA'ların da HBx tarafından down-regüle edildiği gösterilmiştir (36) Bu, artan transkripsiyon 3 aktivatör (STAT3) aktivitesi yoluyla hücre çoğalmasına, viral replikasyona ve kanser gelişimine yol açar. HBV, miR-192-3p ekspresyonunu inhibe ederek otofajiyi indükler, bu da miR-192-3p hedefi XIAP'nin ekspresyonunun artmasına yol açar, bu da HBV ile geçici olarak transfekte edilmiş hepatositlerde otofajiyi teşvik etmek için NF-KB yolunu aktive eder. miR-192-3p-XIAP-NF-κB ile indüklenen otofaji, HBV replikasyonu için kritik öneme sahiptir (37). Son olarak miR-501'in viral replikasyon lehine HBx ile işbirliği yaptığı öne sürülmüştür (38). HBx'in kendisi de hücre miRNA'ların ekspresyonunu düzenleyebilir. Bu küçük protein, HBV enfeksiyonunun kilit düzenleyicisidir. Genellikle HCC'de aşırı eksprese edilir ve hepatokarsinogenezde rol oynar (39).

Son çalışmalar, HBV enfeksiyonunun seyrini düzenleyen miRNA'ların sadece karaciğer dokusundan değil, HBV'nin kendisinden de kaynaklanabileceğini göstermiştir. Örneğin, ilk tanımlanan viralmiRNA, HBV-miR-3'ün, HBV genomunda ve HBV hepatoma tümörlerinin hücre hatlarında yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. HBV enfeksiyonu olan hastalarda HBV-miR-3, eksozomlar ve HBV viryonları tarafından dolaşıma salınır ve salınan bu HBV-miR-3'ler, özellikle HBV enfeksiyonunun akut fazında hastaların serumlarında gösterilebilir. Serum HBV-miR-3 düzeyi ile HBV titreleri arasında pozitif bir ilişki vardır ve HBsAg, HBeAg ve HBV replikasyonunu baskılar. HBV-miR-3, HBc protein ekspresyonunu, pregenomik RNA (pgRNA) seviyelerini ve HBV replikasyon ara maddesi (HBV-RI) oluşumunu azaltırken, HBV DNA polimeraz seviyesini etkilemez. HBV replikasyonu sırasında çekirdekte yoksun bol miktarda subviral partikül içeren HBV viryonunun düşük miktarda üretimi muhtemelen bu mekanizma ile ilgilidir ve bu süreç hastalarda kalıcı enfeksiyon gelişimini kolaylaştırır (40). Çok çalışılan diğer HBV tarafından kodlanan miRNA'dan biri olan HBV-miR-2, kara-



ciğer kanseri hücrelerinde TRIM35 ekspresyonunu down-regüle ederek ve RAN ekspresyonunu up-regüle ederek onkojenik aktiviteyi teşvik eder ve muhtemelen HBV ile ilişkili karaciğer kanserinde tümör gelişimi hakkında bilgi sağlar (41).

### ***HBV'nin bağışıklık sisteminden kaçışında miRNA'ların rolü***

miRNA'lar bağışıklık sisteminin matürasyonu ve işlevleri için önemlidir. Özellikle miR-155, patojenlerin toll-like reseptörler tarafından tanınması sonrası akut inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi gibi doğal immün yanıt sürecinde birçok rol oynar (42). Su ve ark. insan hepatom hücrelerinde miR-155'in ektopik ekspresyonunun, januskinaz (JAK)/STAT yolunu güçlendirerek ve HBx ekspresyonunu down-regüle ederek doğal immün yanıtlarını artırabildiğini gösterdi (43).

Öte yandan, miR-181a'nın up-regülasyonu, HBV'yi kararlı bir şekilde eksprese eden karaciğer hücre hatlarında miRNA'ların değişen ekspresyon profillerini analiz eden bir çalışmada tarif edilmiştir (44). Karaciğer hücresindeki miRNA'ların bu düzensizliği, HBV antijeni sunumuna bağımlı-insan lökosit antijeni A'yı (HLA-A) inhibe ederek HBV replikasyonuna katkıda bulunur.

### ***Kronik HBV enfeksiyonu gelişiminde miRNA'ların rolü***

Özellikle küçük çocuklarda HBV enfeksiyonunun doğal seyri sıklıkla akut enfeksiyondan kronik enfeksiyona geçiş gösterir. Virüs cccDNA formunda, enfekte hepatositler dereaktivasyona kadar dormant durumda kalır.

Çalışmalarda, viral gen ekspresyonunu ve dolayısıyla viral antijen sunumunu inhibe etmek için cccDNA'nın CpG adalarının DNA metiltransferaz1 (DNMT1) tarafından metilasyonu gösterilmiştir. HBx'in etkisiyle azalan miR-152, DNMT1'in aşırı ekspresyonunu indüklemektedir (45).

miR-1'in HBV enfeksiyonu sırasında ikili davranış sergileyebildiği gözlemlenmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi, bu miRNA viral replikasyonu teşvik edebileceği gibi aynı zamanda hücre proliferasyonunu da inhibe edebilir ve hatta bir anti-kanser hücre fenotipini indükleyebilir. Ayrıca miR-122 ekspresyonunu baskılamak için doğrudan polimeraz bölgesine de bağlanabilir. miR-125a-5p ve benzer şekilde miR-199a-3p'nin miR-210'un S bölgesini ve pre-S1 bölgesini etkileyebileceği bildirilmiştir (46,47). RNA, HBV'ye öncülük ettiği için (pgRNA ve kopyaları), hücresel miRNA'lar için iyi hedeflerdir. Bununla birlikte, miRNA'ların HBV kopyalarını hedeflenmesinin, konağı anti-viral mekanizmalara mı yoksa virüsü dormant duruma geçiş yoluna mı yönlendirdiği hala belirsizdir.



## **ii. HBV ile ilişkili hastalıklarda miRNA'ların rolü**

HBV enfeksiyonunun neden olduğu değişiklikler, hücresel ve genel organizma homeostazını büyük ölçüde etkiler. Bunlar genellikle fibroz ve karaciğer sirozu gibi hastalıklarla ilişkilidir. Karaciğer sirozu ise sıklıkla HCC'ye ilerler.

### ***HBV ile ilişkili sirozda miRNA'ların rolü***

Roderburg ve ark. hayvan modellerinde karbon tetraklorür ve safra kanalı ligasyonunun fibroz gelişimi üzerindeki etkisini göstermiş ve fibrotik karaciğer dokusunda miRNA-29 ailesinin tüm üyelerinde önemli bir down-regülasyon olduğunu kaydetmiştir (38). HCC pozitif veya HCC negatif kronik hepatit B ve hepatit C hastalarında miRNA ekspresyon profiline odaklanan başka bir çalışmada, miR-29c düzeylerinde değişim gözlenmiştir (48).

Bununla birlikte, insan karaciğer dokularının farklı inflamasyon, enfeksiyon ve kanser durumu analizlerindeki genel miRNA ekspresyon profili her zaman tutarlı değildir. Viral hepatit ve sirozla ilişkisi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, viral hepatitin tipine göre bazen belirli bir profilin gözlemlendiği, bazen de fark bulunmamıştır (48-50). Kronik viral hepatitli hastalarda siroz gelişiminde ve sirozdan HCC'ye geçişte miRNA'ları etkileyen moleküler mekanizmaları ve viral bileşenleri tanımlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

### ***HBV ile ilişkili hepatosellüler karsinomda miRNA'ların rolü***

Hepatit B virüsü enfeksiyonu, gelişmekte olan ülkelerde tüm hepatosellüler karsinomların %60'ından fazlası ile ilişkilidir, gelişmiş ülkelerde ise bu oran %40'tır. Bu sebeple HBV, "tütünden sonra en tehlikeli ikinci kanserojen" olarak adlandırılmıştır (51, 52). Son yıllarda miRNA'ların meme kanseri, mide kanseri, prostat kanseri ve kolorektal kanser dahil olmak üzere birçok kanser türünde onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak hareket ettiği gösterilmiştir (53-56). HCC'nin gelişiminde ise en çok miR-106b-25 kümesinin üyeleri (miR-106b, miR-93 ve miR-25) suçlanmaktadır (57). Örneğin, eksozomal miR-93-5p, TIMP2/TP53/INP1/CDKN1A inhibisyonu yoluyla HCC proliferasyonunu ve invazyonunu artırır; miR-93-5p, doğrudan HCC proliferasyonunu ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) aracılı invazyon ve metastazı teşvik eden PDCCD4'ü hedefler (58). miR-106b-5p, APC'yi down-regüle ederek Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu aktive eder ve HCC proliferasyonunun artmasına neden olur; miR-106b-5p'nin up-regülasyonu, HCC'nin lokal ve uzak metastazını artırır.

miR-17-92 kümesi, HBV enfeksiyonu ve dolayısıyla HCC'deki diğer önemli RNA molekülleridir. Bu polisistron altı miRNA (miR-17-5p, miR-18a, miR-19a,

miR-19b, miR-20 ve miR-92a-1) içerir ve bunların ekspresyonlarının up-regülasyonumalignite ile ilişkilendirilmektedir (59). Connolly ve ark., insan HBV-pozitif HCC dokuları, hepatoma hücre dizileri ve dağ sıçanı hepatit virüsü ile indüklenen HCC'nin bir hayvan modelini kullanarak artan miR-17-92 küme ekspresyonunu ve bunun malignfenotip üzerindeki etkisini gösterdi (60). HBV'ninlatent duruma katkıda bulunmak için HBx kontrolünde bu kümenin ekspresyonu c-myctaktivasyonu ile arttırılabilir ve bu süreç hepatom gelişimini uyarabilir (61,62).

miR-155, HBV ilişkili immün yolaktarol oynayan diğer bir mikro RNA'dır. Kronik inflamasyonunhepatokarsinogenezde önemli neden olup miR-155 upregülasyonu daonkogeneze etkilidir. HCC-indüklenmiş fare modeli kullananWang ve ark., miR-155'in kanser gelişimindeki bu rolünü göstermiştir (63). miRNA'lar, HBV ile ilişkili hepatokarsinogenezde tümör baskılayıcıları etkisiz hale getirebilir. Tümör baskılayıcılar, genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla HCC'nin başlaması ve ilerlemesinde genellikle etkisiz hale getirilir. Bununla birlikte, tümör baskılayıcıların kaybının altında yatan bir diğer önemli mekanizma, miRNA aracılı susturma olduğu düşünülmektedir. Örneğin miR-21, hücre apoptozunu indükleyen programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) tümör baskılayıcılarını hedefleyen onkogenik bir miRNA olarak tanımlanmıştır. miR-21'in HBx tarafından düzenlenmesi, PDCD4'ü baskılar ve sonuçta hepatokarsinogenezi kolaylaştırır.

miRNA'lar, HBV-ilişkili hepatokarsinogenezdeonkogen ekspresyonunu sağlar. Onkogen ekspresyonunun upregülasyonu, hepatokarsinogenezde rol oynayan bir diğer önemli faktördür. miRNA'lar ve HBV-ilişkili HCC'nin metastazı, HCC hastalarının klinik yönetimini ve uzun süreli sağkalımını etkileyen en önemli süreçlerden biridir. HCC metastazı ile ilişkili olabilecek çeşitli miRNA'larda, ekspresyon görüntülemesi kullanılarak tanımlanmıştır.

Son veriler, bazımiRNA'ların(miR-122, miR-150, miR-342-3p, miR-663, miR-20b, miR-92a-3p, miR-376c-3p ve miR-92b) imza ekspresyonlarının HBV-ilişkili HCC'nin gelişiminde rol oynayabileceğini ve potansiyel yeni terapötik hedefler olabileceklerini göstermektedir (64).

### **3. HBV-İLİŞKİLİ HASTALIKLARIN TANI, PROGNOZ VE TEDAVİSİNDE MİRNA TEMELLİ STRATEJİLER**

#### **i. HBV enfeksiyonu ve HBV-ilişkili HCC tanısında miRNA'lar**

Hücre sel miRNA'ların hücrelerden sızarak kan dolaşımına ulaşabileceği ve hücre hasarı ve ölümü sonrasında serumda stabil kalabileceği öne sürülmüştür. Dolaşan bu miRNA'ların, hücre içi işlevlerine ek olarak, belirli dokular veya hücreler tara-

findan salgılanarak haberciler olarak davranabileceği ve hücreden hücreye iletişime aracılık edebileceği varsayılmaktadır. Bu görüş, prometastatik inflamatuvar yanıtın dolaşımdaki miRNA'ların alınması ve ardından alıcı hücrelerin toll-like reseptörlerine bağlanmasıyla indüklendiğini gösteren çalışmalar tarafından da desteklenmiştir (65). HCC'nin erken teşhisi, iyi bir prognoz elde etmek için kritik öneme sahiptir. Şu anda, HCC tanısı büyük ölçüde  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) ölçümü ve abdominal ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme dahil olmak üzere görüntüleme teknolojilerine dayanmaktadır. Bu görüntüleme teknikleri, bir cm kadar küçük HCC lezyonlarını tespit edebilir. Ancak tanıdaki doğrulukları tümör boyutu ve vaskülaritesi ile yakından ilişkilidir ve yüksek maliyetleri nedeniyle rutin bir tarama aracı olarak kullanıma uygun değildirler. AFP, HCC tanısında ve nüksün takibinde uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak duyarlılığı düşüktür (yaklaşık %30) ve HCC'nin erken tespiti için kullanımı sınırlıdır. Karaciğer biyopsilerinin patolojik incelemesi belirli riskleri olan invaziv bir yöntem olmasına rağmen kanser tanısında halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Yeni bir yaklaşım olan, tümör hücreleri tarafından kan, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarına salınan RNA moleküllerinin ve dolaşımdaki serbest DNA'nın (cfDNA) moleküler biyobelirteç olarak kullanılması, diğer adıyla "sıvı biyopsi", alternatif olarak umut vadetmektedir. Kanser hücreleri tarafından salınan nükleik asitlerdeki gen mutasyonları gibi spesifik moleküler imzaların, DNA metilasyonundaki değişimlerin ve dolaşımdaki miRNA seviyelerinin bir biyobelirteç olarak kullanılmasının etkinliği çalışmalarla kanıtlanmıştır. Vücut sıvılarının analizi, kronik olarak hepatit virüsleri ile enfekte olan kişilerde karaciğer hastalığının ilerleyişini veya tedavi almış hastalarda HCC nüksünü izlemede değerli bir strateji olabilir (66).

Serum miRNA profillerinin, sağlıklı kontrollere kıyasla kronik HBV enfeksiyonu (CHB), HBV-ilişkili HCC veya okültHBV enfeksiyonu olan hastalarda serum veya plazmadaki farklı miRNA profilleri ile HBV için bir biyobelirteç görevi görebileceği öne sürülmüştür. miRNA-122 serum konsantrasyonları, inaktifHBV taşıyıcılarını yüksek (>3500 IU/ml) ya da düşük (<3500 IU/ml) düzeylerde HBsAg-saptanmayan bireylerden ayırmada yardımcı olabilir. Wang ve ark., HBV kronik enfeksiyonunda, viral ekspresyonun ve replikasyonun, konakçı kısıtlayıcı küçük RNA molekülünü ve miR-122-siklin G1/p53-viral güçlendirici yolunu down-regüle ederek belirli ölçülerde kolaylaştırıldığını gösterdi. Güncel bir çalışma, siklin G1 ile gen regülasyonu arasındaki yakın ilişkiyi doğrulamıştır. Anormal siklin G1 ekspresyonunun bir sonucu olarak, hücreler G1 fazında kalır ve P53- bağımlı hücre bölünme yolu yeniden düzenlenir. miR-122 ve miR-22, HBV-ilişkili HCC

hastalarında down-regüle edilir, bu sebeple tümör boyutu, lenf nodu metastazı, TNM evresi, patolojik tip, farklılaşma derecesi, karaciğer sirozu, AFP ve HBV DNA düzeyleri ile ilişkilidir (67). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma, mir-21, mir-122 ve mir-192'nin tek başına veya özellikle üçü birlikte kullanıldığında HCC tanısında yüksek doğrulukta biyobelirteçler olabileceğini göstermiştir. Yine bu çalışma ile bu üç miRNA'nın, nispeten düşük seviyelerde olduğu kanserin erken evrelerinde bile AFP seviyeleri ile korele olduğu kanıtlanmıştır (68).

## **ii. HCC için terapötik hedefler olarak miRNA'lar**

Yıllar içinde, miRNA'ların karaciğer kanserinin hem başlatıcısı hem de önleyicisi olabileceği hipotezi üzerine yapılan çalışma bulguları ve bilgi birikimi, bu moleküllerin kanser tedavisinde hedef olarak kullanılabilmesine dair umutları arttırdı. Buna dayanarak, HCC için iki miRNA tabanlı tedavi stratejisi tasarlanabilir; taklitler kullanılarak HCC'ye özgü miRNA'ların değiştirilmesi ve antagonistler kullanılarak HCC'ye özgü miRNA'ların supresyonu veya down-regülasyonu. Replasman tedavisinde, HCC'deki silinen veya down-regüle olan miRNA'lar geri kazanılır; bu, tümör hücrelerinde apoptozu indükler (69). miRNA supresyon yaklaşımında onkogenik miRNA'lar antagonize edilerek HCC gelişiminin engellenmesi hedeflenir (70). Bu amaçla öncelikle miRNA'ların doğrudan uygulanması denenmiş, ancak molekülün hücre zarlarından geçememesi ve nükleazlar tarafından parçalanması nedeniyle hedef dokuda beklenen düzeye ulaşamamıştır. Daha sonra bu sıkıntıları aşabilmek için geliştirilen miRNA oligomerleri, anti-miRNA oligonükleotitleri (AMO'lar), kilitli-nükleik asit antisens oligonükleotitleri (LNA'lar), miRNA süngerleri, miRNA maskeleri, nanopartiküller, antagomirler ve çoklu hedef anti-miRNA antisens oligodeoksiribonükleotitler (MTg-AMO'lar) miRNA işlev bozukluklarını düzenlemede kullanılmıştır (71,72). Adeno-ilişkili virüs (AAV) vektörleri kullanılarak miRNA inhibitörlerinin veya öncüllerinin uygulandığı bir çalışmada, miR-26a replasmanı yapılmış, D2 ve E2 siklinleri hedeflenerek hücre döngüsünün durması indüklemiş, böylece HCC gelişimi önemli ölçüde baskılanmıştır (73). Fare modelinde yapılan bir çalışmada isetoksisite olmadan apoptozu indükleyerek HCC gelişiminden koruma sağlayabilecek AAV vektörleri kullanılmış ve miR-26a'nın sistemik uygulanmasına benzer sonuçlar elde edilmiştir (74). Ayrıca bir in vitro çalışmada, miR-122'nin LNP-DP1 (bir katyonik lipid nanoparçacık formülasyonu) ile sistemik uygulaması, HCC hücrelerinde hedef genlerin down-regülasyonu ve anjiyogenezin bozulması yoluyla HCC büyümesini baskılamıştır (75).

### **iii. HCC terapi direncinde miRNA'lar**

Hepatit B-ilişkili HCC gelişimine karşı iki tedavi yaklaşımı vardır: kemoterapötik ilaçlar (sisplatin, dokсорubisin, 5-FU) ve moleküler hedefli ilaçlar (sorafenib, regorafenib, lenvatinib). Geliştirilen yeni ajanlar sayesinde medikal tedavi ile başarılı yanıtlar alınsa da ilaç direnci halen tedaviye yanıtızlığın önemli nedenlerinden biridir. İlaç efflux pompaları, hedef ve hücre döngüsü kontrol noktası değışikliği, anti-apoptotik sinyal artış ve DNA hasar onarımı ilaç direncine neden olan ana mekanizmalardır (76). Ve bu yollardaki miRNA'ların işlevlerini ortaya çıkaran daha ileri çalışmalar, ilaç duyarlılığını tahmin etmeye, ilaç direncinin üstesinden gelmede daha iyi terapötik stratejiler geliştirmeye ve HCC hastaları için tedavi sonuçlarını iyileştirmeye yardımcı olacaktır. Yakın zamanda miR-33a-5p, miR-130a, miR-182, miR-96, miR-199a, miR-340, miR-363, miR-200a-3p, miR-183, miR-141, miR-193a-3p, miR-200a-3p, miRNA-125b, miRNA-195 ve miR-216a/217 gibi HCC terapi direncinde çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır. Bu miRNA'lar, ilaca dirençli HCC için potansiyel terapötik hedefler olarak umut vaatetmektedir.

## **4. SONUÇ**

miRNA'lar, hücrelerde gen ekspresyonunun kontrolünde yeni anahtar aktörler olarak ortaya çıkmıştır. Profil analizleri ile tümörlerde ve viral enfeksiyonlarda çeşitli miRNA'ların düzensizlikleri gösterilmiş ve halen bu konuda birçok çalışma devam etmektedir. HBV, hepatosellülerkarsinom gelişimi ile yakından ilişkili, prevalansı ve insidansı yüksek bir viral patojendir. HBV ile etkileşime giren çok sayıda hücresele miRNA tanımlanmıştır. Karsinogenez tetikleyen viral enfeksiyonun bir sonucu olarak karaciğeri ve değışen hücresele yolları etkilerler.

Günümüzde miRNA'ların, HBV enfeksiyon sürecinde immün yanıtın yanı sıra virüs-konak etkileşiminde de etkili olduğu bilinmektedir. Konak ve virüs, bir grup miRNA'nın kendi yararına regülasyonunu değıştirebilir. Bu nedenle, bazı miRNA'ların epigenetik düzenlemeleri ve HBx aracılı düzensizliği, kanserin başlaması ve ilerlemesinde etkili olabilir. Son yirmi yılda, bu miRNA düzensizliklerinin daha fazla hedefi ve düzenleyicisi tanımlanmıştır. Ancak bu süreçler hakkında daha detaylı ve kapsamlı bilgi edinmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. HCC'nin klinik olarak anormal miRNA'lara dayalı tanı ve tedavisinin büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Tüm bu gelişmeler göz önüne alındığında, miRNA'yı hedefleyen teknolojilerin, miRNA düzeylerini değıştirmeye veya miRNA fonksiyonlarını inhibe etmeye yönelik stratejilere dayalı yöntemlerin gelişmesiyle, HBV ile ilişkili hastalıkların tedavisinde çok yakın bir gelecekte klinik

başarıların elde edilmesi beklenmektedir. miRNA ve HBV enfeksiyonu arasındaki etkileşim ve bunun HCC'ye ilerlemesi hakkındaki mevcut ve gelecekte edinilecek bilgiler, muhtemelen tüm aşamalarda HBV enfeksiyonunun neden olduğu karaciğer karsinogenezi ile etkili bir şekilde başa çıkmak için stratejilerin ve araçların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

1. Oura K, Masaki T. Molecular and Functional Roles of MicroRNAs in the Progression of Hepatocellular Carcinoma—A Review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 8362-8392
2. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The wide spread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11:597– 610.
3. Song G, Wang R, Guo J, Liu X, et al. miR-346 and miR-138 competitively regulate hTERT in GRSF1- and AGO2-dependent manners, respectively. *Sci Rep.* 2015;5:15793.
4. Vaziri PA, Rezaeieh KAP. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA'lar ve Hedef Transkripsyon ların Faliyetleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2012;5 (2): 96-98.
5. Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz I, et al. Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2014;12(1): 45-56.
6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993;75:843– 854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
7. Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol.* 2011; 12:221. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-221>.
8. Fang L, Deng Z, Shatseva T, et al. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta 8. *Oncogene.* 2011; 30:806 – 821. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.465>.
9. Su Y, Li X, Ji W, et al. Small molecule with big role: microRNAs in cancer metastatic micro environments. *Cancer Lett.* 2014; 344:147–156.
10. Achenbach TV, Brunner B, Heermeier K. Oligonucleotide based knock down technologies; antisense versus RNA interference. *Chembio chem.* 2003; 4:928-35.
11. Tuschli T. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembio chem.* 2001; 2:239-45.
12. Bodur E, Demirpençe E. Kodlamayan RNA'lar ve Gen Susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi (Acta Medica).* 2010;41(2):82-89.
13. Tycowski KT, Guo YE, Lee N, et al. Viral noncoding RNAs: more surprises. *Genes Dev.* 2015; 29:567–584. <https://doi.org/10.1101/gad.259077.115>.
14. Kim VNN. Micro RNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6: 376–385.
15. Borchert GM, Lanier W, Davidson BLL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13:1097–1101.
16. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136: 215-233
17. Esquela-Kerscher A, Slack FJJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6: 2596–2599.
18. Bartel DPP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281–297.
19. Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet.* 2008; 74:296-306.
20. Zhang B, Farwell MA. MicroRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2008; 12:3-21.
21. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS,* 2007; 115:1090-106.
22. Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:123-141.



23. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004;304:734–736. <https://doi.org/10.1126/science.1096781>.
24. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*. 2005; 435:682– 686. <https://doi.org/10.1038/nature03576>.
25. Cui C, Griffiths A, Li G, et al. Prediction and identification of Herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol*. 2005; 80:5499–5508. <https://doi.org/10.1128/JVI.00200-06>.
26. Grey F, Meyers H, White EA, et al. A human cytomegalo virus-encoded micro RNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog*. 2007;3:e163. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030163>.
27. Samols MA, Skalsky RL, Maldonado AM, et al. Identification of cellular genes targeted by KSHV encoded microRNAs. *PLoS Pathog*. 2007;3:e65. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030065>.
28. Yao Y, Zhao Y, Xu H, et al. Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1. *J Virol*. 2007;81: 7164 –7170. <https://doi.org/10.1128/JVI.00112-07>.
29. Klase Z, Kale P, Winograd R, et al. HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC MolBiol*. 2007; 8:63. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-63>.
30. Whisnant AW, Kehl T, Bao Q, et al. Identification of novel, highly expressed retroviral microRNAs in cells infected by bovine foamy virus. *J Virol*. 2014; 88:4679 – 4686. <https://doi.org/10.1128/JVI.03587-13>.
31. Harwig A, Das AT, Berkhout B. Retroviral microRNAs. *Curr Opin Virol*. 2014;7:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.013>.
32. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. microRNAs. *Curr Biol*. 2002; 12: 735-739.
33. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*. 2008; 48: 648-656. 1-97.
34. Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclinG(1)-modulated P53 activity. *Hepatology*. 2012; 55: 730-741.
35. Song K, Han C, Zhang J, et al. Epigenetic regulation of miR-122 by PPAR gamma and hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 2013. doi: 10.1002/hep.26514.
36. Wang Y, Lu Y, Toh ST, et al. G Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3. *J Hepatol*. 2010; 53: 57-66.
37. Wang J, Chen J, Liu Y, et al. Hepatitis B Virus Induces Autophagy to Promote its Replication by the Axis of miR-192-3p-XIAP Through NF kappa B Signaling. *J Hepatology*. 2019;69:3.
38. Roderburg C, Urban GW, Betterman K et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 2010; 53: 209-218.
39. Tian Y, Yang W, Song J, et al. HBV X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol Cell Biol*. 2013; 33: 2810-2816.
40. Yang X, Li H, Sun H, et al. Hepatitis B virus-encoded microRNA controls viral replication. *J Virol*. 2017; 91:e01919-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01919-16>
41. Yao L, Zhou Y, Sui Z, et al. HBV-encoded miR-2 functions as an oncogene by down regulating TRIM35 but upregulating RAN in liver cancer cells. *Bio Medicine*. 2019;48:117–129
42. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007; 179: 5082-5089.
43. Su C, Hou Z, Zhang C, et al. Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virol J*. 2011; 8. doi:10.1186/1743-422X-8-354.
44. Liu Y, Zhao JJ, Wang CM, et al. Altered expression profiles of micro RNAs in a stable hepatitis B virus-expressing cell line. *Chin Med J*. 2009; 122: 10-14.



45. Huang J, Wang Y, Guo Y, et al. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*. 2010; 52:60-70.
46. Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res*. 2010; 88: 169-175.
47. Potenza N, Papa U, Mosca N, et al. Human microRNA hsa-miR125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39:5157-5163.
48. Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009; 49: 1098-1112.
49. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis. infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 419-427.
50. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and nontumorous tissues. *Oncogene*. 2006; 25:2537-2545.
51. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, et al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 4300.
52. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012; 142:1264-1273.
53. Bai X, Han G, Liu Y, et al. MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. *Bio med Pharmacol ther*. 2018;103:1482-9.
54. Schmitt AM, Garcia JT, Hung T, et al. An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling. *Nat Genet*. 2016;48:1370-6.
55. Jackson BL, Grabowska A, Ratan HL. MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers. *BMC Cancer*. 2014;14:930.
56. Liu N, Jiang F, Han XY, et al. MiRNA-155 promotes the invasion of colorectal cancer SW-480 cells through regulating the Wnt/beta-catenin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:101-9.
57. Li Y, Tan W, Neo TW, et al. Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009;100:1234-42.
58. Huang H, Wang X, Wang C, et al. The miR-93 promotes proliferation by directly targeting PDCD4 in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma*. 2017;64:770-7.
59. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is over expressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005; 65:9628-9632.
60. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *The American Journal of Pathology*. 2008;173(3):856-864. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080096>
61. Terradillos O, Billet O, Renard CA, et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*. 1997;14(4):395-404. doi:10.1038/sj.onc.1200850
62. Jung YJ, Kim JW, Park SJ, et al. c-Myc-mediated over expression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *J Med Virol*. 2013; 85, 969-978.
63. Wang B, Majumder S, Nuovo G, et al. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis in duced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology*. 2009; 50: 1152-1161.
64. Wang G, Dong F, Xu Z, et al. MicroRNA profile in HBV-induced infection and hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2017;17:805. doi: 10.1186/s12885-017-3816-1.
65. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: E2110-2116.

66. Pezzuto F, Buonaguro L, Buonaguro FM, et al. The Role of Circulating Free DNA and MicroRNA in Non-Invasive Diagnosis of HBV- and HCV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 1007. doi:10.3390/ijms19041007
67. Qiao DD, Yang J, Lei XF, et al. Expression of microRNA-122 and microRNA-22 in HBV-related liver cancer and the correlation with clinical features. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2017; 21: 742-747.
68. Tat Trung N, Duong DC, Tong HV, et al. Optimisation of quantitative miRNA panels to consolidate the diagnostic surveillance of HBV-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE.* 2018;13(4): e0196081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196081>
69. Chung HJ, Choi YE, Kim ES, et al. miR-29b attenuates tumorigenicity and stemness maintenance in human glioblastoma multiforme by directly targeting BCL2L2. *Oncotarget.* 2015; 6:18429–18444.
70. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* 2012;13: e249–e258.
71. Amodeo V, Bazan V, Fanale D, et al. Effects of anti-miR-182 on TSP-1 expression in human colon cancer cells: There is a sense in antisense? *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17:1249–1261.
72. Nedaeinia R, Sharifi M, Avan A, et al. Locked nucleic acid anti-miR-21 inhibits cell growth than invasive behaviors of a colorectal adenocarcinoma cell line: LNA-anti-miR as a novel approach. *Cancer Gene Ther.* 2016; 23:246–253.
73. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 2009; 137: 1005–1017.
74. Hsu SH, Yu B, Wang X, et al. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine.* 2013; 9:1169–1180.
75. Inchingolo R, Posa A, Mariappan M, et al. Locoregional treatments for hepatocellular carcinoma: Current evidence and future directions. *World J Gastroenterol.* 2019; 25: 4614–4628.
76. Gottesman MMM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 615–627.