

MikroRNS-ek humán betegségekben

Sonkoly Enikő

*Karolinska Institutet, Department of Medicine, CMM, Unit of Dermatology and Venerology
Stockholm, Svédország*

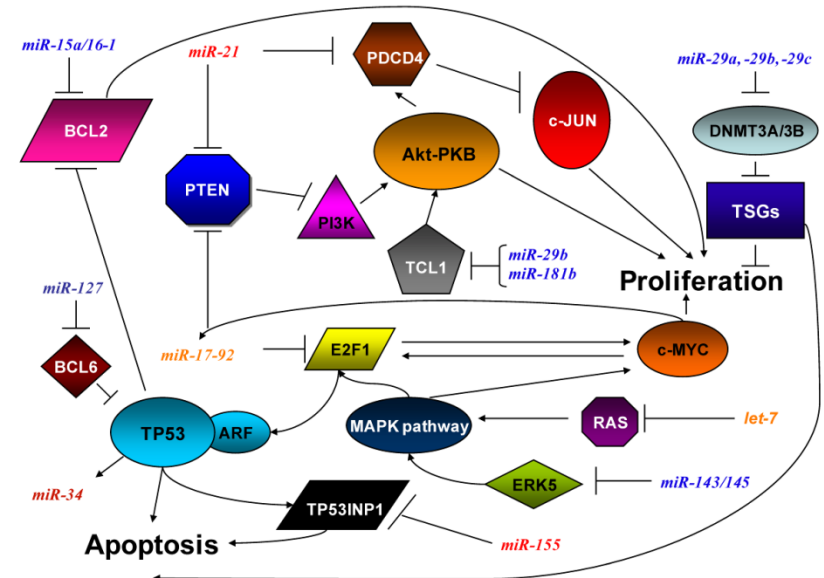
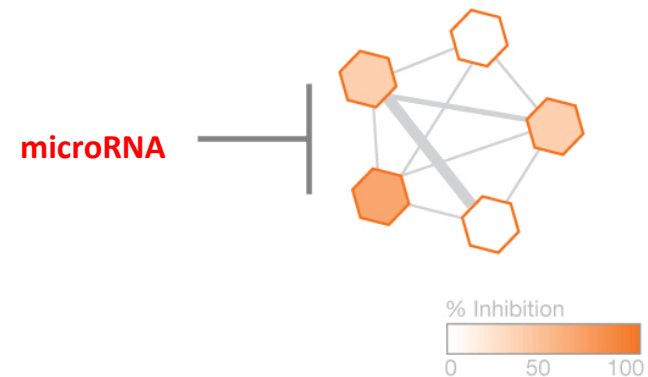
Az előadás vázlata

- Hogyan járulhatnak hozzá a miRNS-ek betegségek kialakulásához?
 - Mutációk/SNP-k
 - Emelkedett/csökkent kifejeződés
 - MiRNS-ek betegségekben
 - Gyulladásos és autoimmun betegségek
 - Daganatos betegségek
 - A miRNS-ek lehetséges alkalmazása
 - Diagnosztikai alkalmazás / a miRNS-ek mint biomarkerek
 - Terápiás alkalmazás
-

A miRNS-ek megváltozott kifejeződése vagy működése egész génhálózatokat érint

- Minden miRNS gének tucatjait/százait szabályozza
- Az miRNS-sel szabályozott mRNS-ek többsége több miRNS szabályozása alatt áll
- Számos miRNS transzkripciós faktorokat szabályoz
- Egy adott folyamatban részt vevő, funkcionálisan rokon gének expressziójának szabályozása miRNS-ek révén harmonizáltan történik
- A miRNS-ek megváltozott kifejeződése számos betegség közös vonása

- Daganatos betegségek
- Gyulladásos és autoimmun betegségek
- Anyagcsere-betegségek
- Kardiológiai betegségek
- Pszichiátriai betegségek
- Egyéb betegségek



Modified from George Calin, MD PhD

Hogyan járulhatnak hozzá a miRNS-ek betegségek kialakulásához?

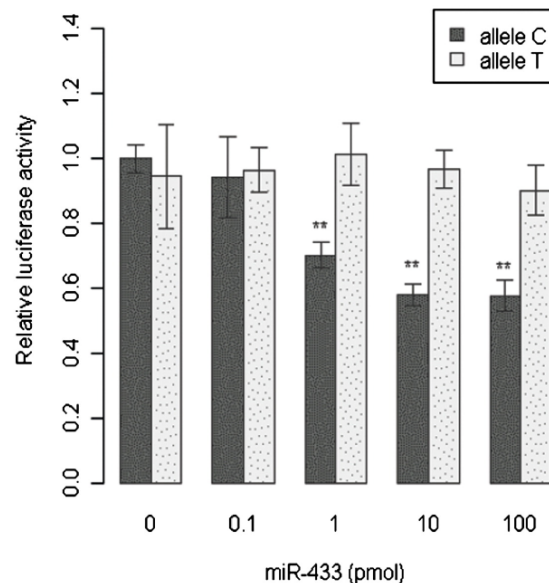
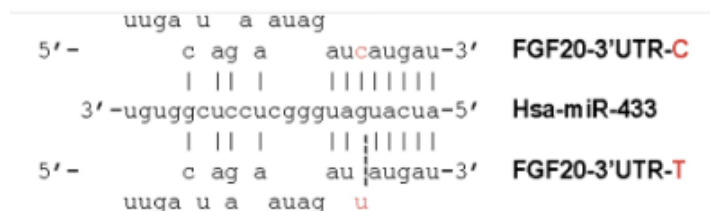
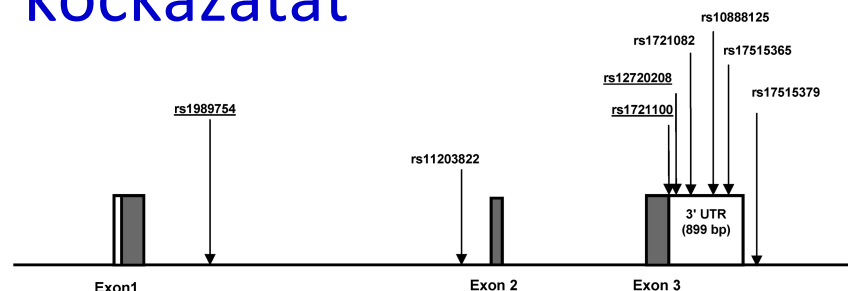
- A miRNS funkcióját befolyásolhatja a miRNS génben történt mutáció
 - A target mRNS 3'végi, nem transzlálódó részében (3'UTR-jében) lévő mutáció megszüntet egy miRNS kötőhelyet
 - A target mRNS 3'UTR-jében lévő mutáció létrehoz egy új miRNS kötőhelyet
-
- A miRNS kifejeződés csökkenése
 - Mutáció/Deléción
 - Epigenetikus inaktiváció
 - Transzkripcionális down-reguláció
 - A miRNS kifejeződés fokozódása
 - Génamplifikáció
 - Mutációk a promoter régióban
 - Transzkripcionális up-reguláció

A gének 3' UTR –jében található SNP-k befolyásolhatják a miRNS-ek kötődését

- Az SNP-k jelentősen hozzájárulnak a fenotípusos variációhoz és a betegségekhez
- 73,497 SNP-t azonosítottak 13,621 emberi gén 3' UTR régiójában
- 2,490 lehetséges SNP hoz létre új miRNS kötőhelyet
- 2,597 SNP megszüntet kötőhelyeket
- Ezek nagy valószínűséggel befolyásolják a génszabályozást és hozzájárulhatnak a fenotípusok variációjához

A FGF20 gén miR-433-kötőhelyét érintő SNP növeli a Parkinson-kór kockázatát

- Parkinson kór: gyakori neurodegeneratív betegség, melynek kialakulásához genetikai és környezeti faktorok hozzájárulnak
- Számos genetikai asszociációs vizsgálat azonosította a *Fibroblast growth factor 20* (FGF20) gént a 8p21.3–22 lokációban
- A legerősebben asszociálódó SNP az FGF20 gén 3' UTR –jében helyezkedik el
- Az SNP megszünteti a miR-433 miRNS kötőhelyét
 - Következmény: fokozott fehérjeképződés



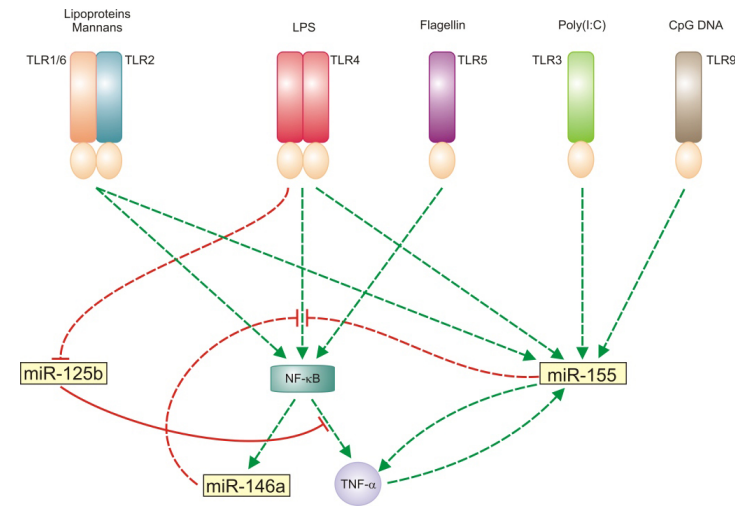
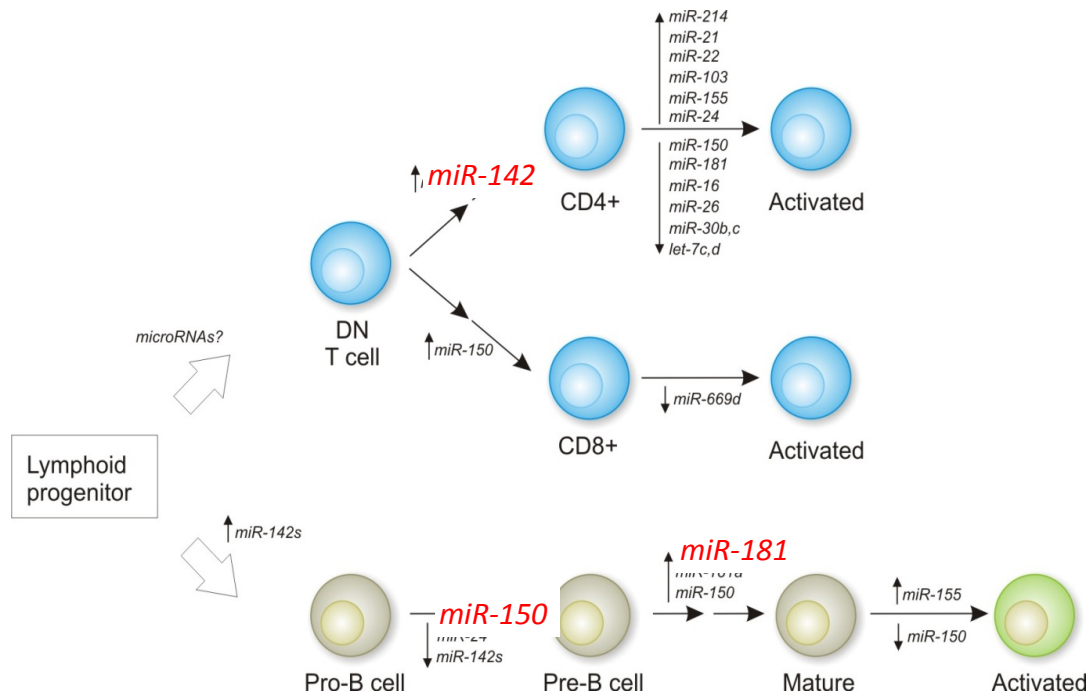
Hogyan járulhatnak hozzá a miRNS-ek betegségek kialakulásához?

- A miRNS funkcióját befolyásolhatja a miRNS génben történt mutáció
 - A target mRNS 3'végi, nem transzlálódó részében (3'UTR-jében) lévő mutáció megszüntet egy miRNS kötőhelyet
 - A target mRNS 3'UTR-jében lévő mutáció létrehoz egy új miRNS kötőhelyet
- A miRNS kifejeződés csökkenése
 - Mutáció/Deléción
 - Epigenetikus inaktiváció
 - Transzkripcionális down-reguláció
 - A miRNS kifejeződés fokozódása
 - Génamplifikáció
 - Mutációk a promoter régióban
 - Transzkripcionális up-reguláció

A miRNS-ek szerepe gyulladásos betegségekben

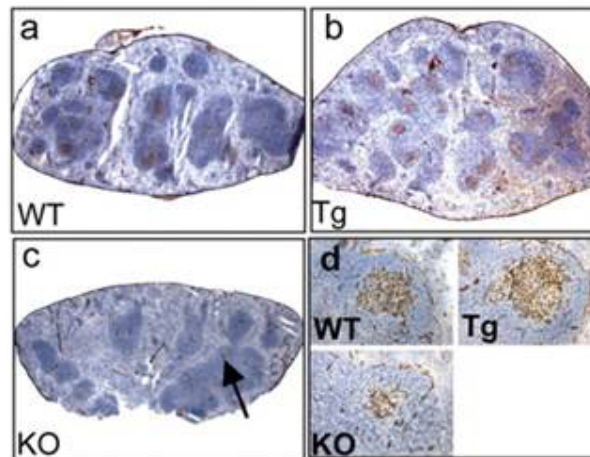
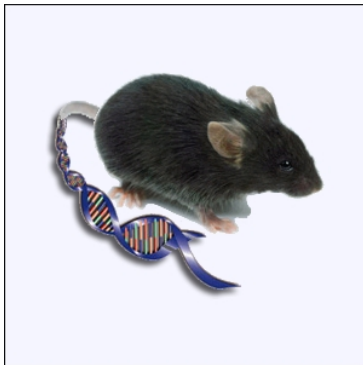
A miRNS-ek szabályozzák az immunválaszt

- A miRNS-ek szabályozzák a fehérvérsejtek fejlődését és aktivációját (különböző fehérvérsejt fejlődési vonalak: különböző miRNS profil)
- A miRNS-ek szabályozzák a veleszületett és az adaptív immunválaszt



A miR-155 szükséges a T és B sejtes immunválaszhoz

- miR-155 knock-out egér (2 független csoport)
- A *Salmonella typhimurium* elleni oltás nem védte meg a miR-155 –null egereket a virulens *Salmonella* ellen
- A dendritikus sejt – T sejt interakció érintett
- Kevesebb és kisebb germinális központ
- A B sejtek kevesebb IgM-et termelnek (B-sejtes válasz)
- Az IL-2 és IFN- γ termelődése csökkent (T-sejtes válasz)

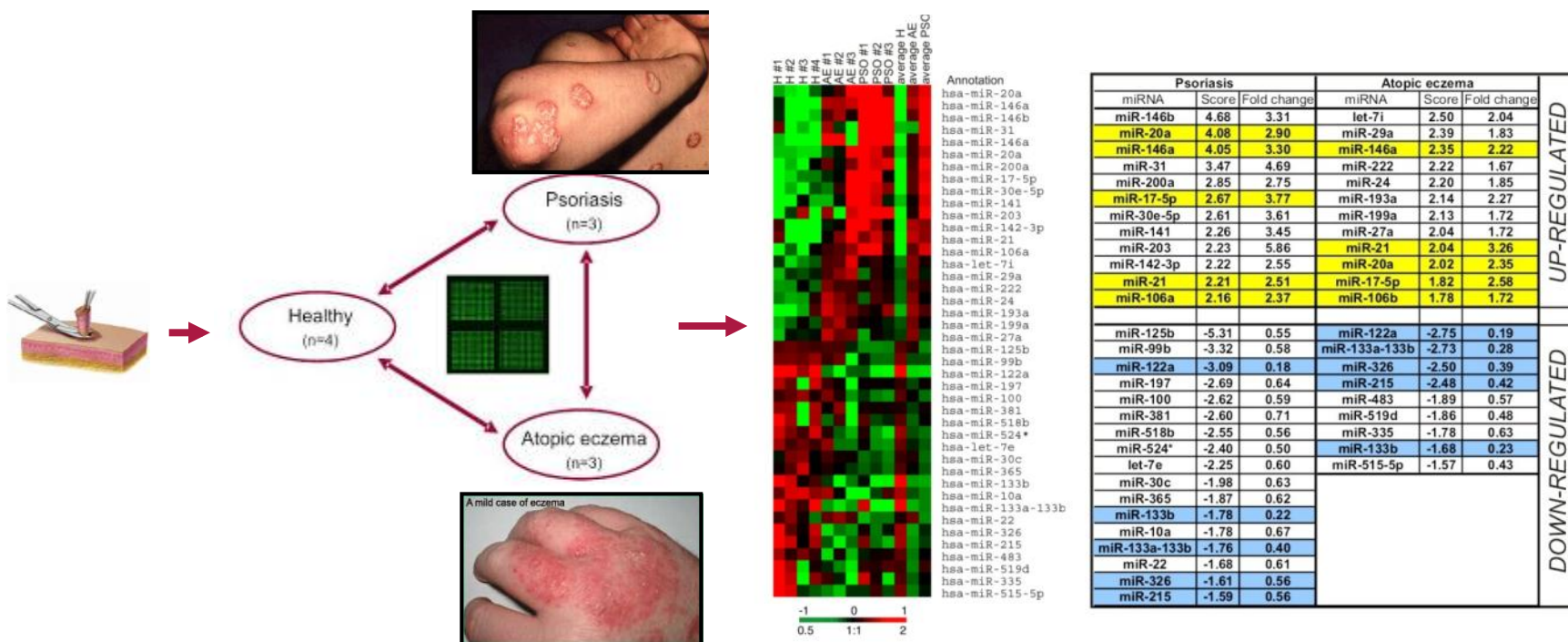


A miR-155 szükséges a T és B sejtes immunválaszhoz

A miRNS-ek kifejeződése megváltozott gyulladásos és autoimmun betegségekben

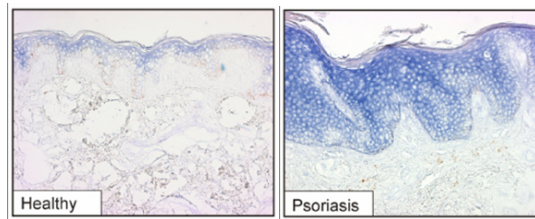
	Disease	Deregulation	Tissue/cell type	Species	Reference
miR-155	rheumatoid arthritis	↑	PBMC	human	[44]
	rheumatoid arthritis	↑	RASF	human	[38]
miR-146a	rheumatoid arthritis	↑	PBMC	human	[44]
	rheumatoid arthritis	↑	RASF	human	[38, 39]
	osteoarthritis	↑ / ↓	cartilage	human	[40, 45, 46]
	SLE	↓	PBMC	human	[43]
	psoriasis	↑	skin	human	[13]
miR-21	psoriasis	↑	skin	human	[13]
	asthma	↑	lung/leukocytes	mouse model	[80]
miR-203	psoriasis	↑	skin	human	[13]
miR-125b	psoriasis	↓	skin	human	[13]
miR-9	osteoarthritis	↑	cartilage, bone	human	[46]
miR-192	ulcerative colitis	↓	colon	human	[94]
miR-101	SLE	↓	T cells	mouse model	[95]

MikroRNS-ek krónikus gyulladásos bőrbetegségekben - pikkelysömör és atópiás dermatitis



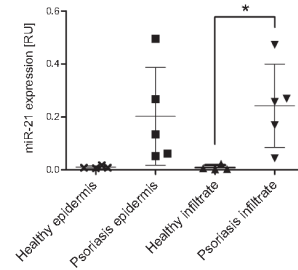
- MiRNS microarray pikkelysömörös és atópiás dermatitises betegek léziós bőrből és egészséges bőrből (342 miRNS)
- Az egészséges bőr, az atópiás dermatitis és a pikkelysömör miRNS kifejeződési mintázata különböző

↑ miR-203 →



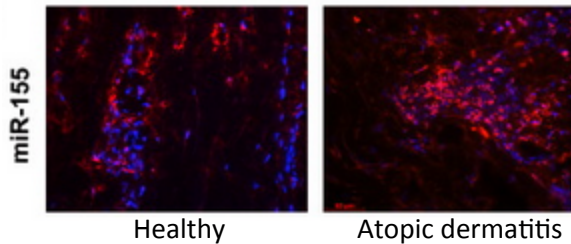
Egy "bőr miRNS", amely a keratinocita differenciációt szabályozza

↑ miR-21 →



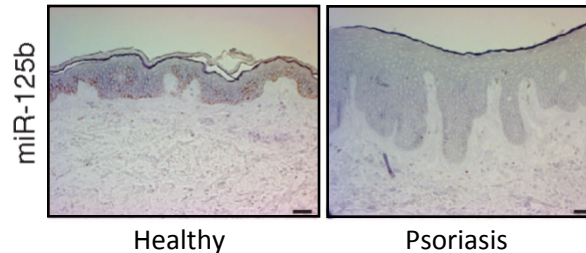
Növekedett a kifejeződése pikkelysömörben és gátolja a T sejtek apoptózisát

↑ miR-155 →



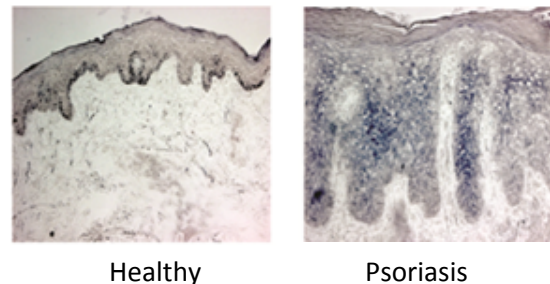
Növekedett a kifejeződése atópiás dermatitisben és fokozza az aktivált T sejtek proliferációját

↓ miR-125b →



Csökkent a kifejeződése pikkelysömörben és mérsékli a keratinocita proliferációt

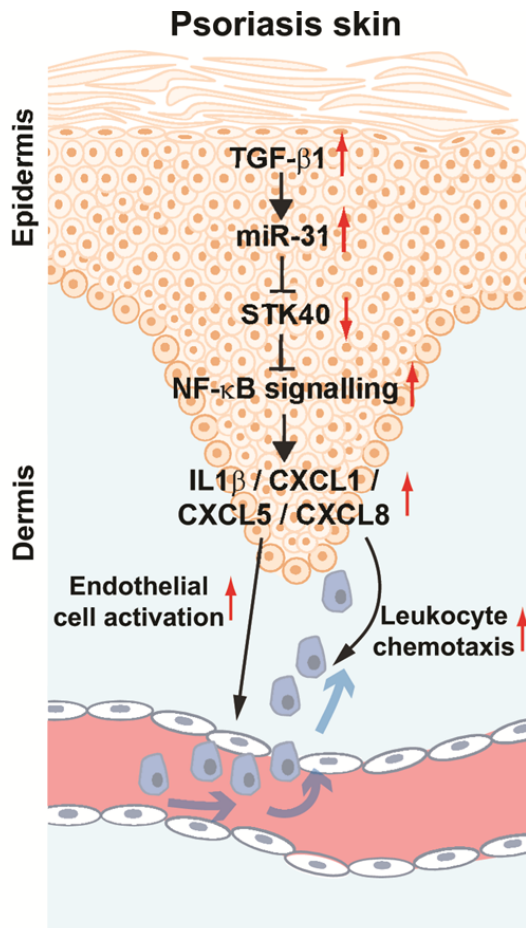
↑ miR-31 →



Növekedett a kifejeződése pikkelysömörben és szabályozza a citokintermelést és a fehérvérsejt-migrációt

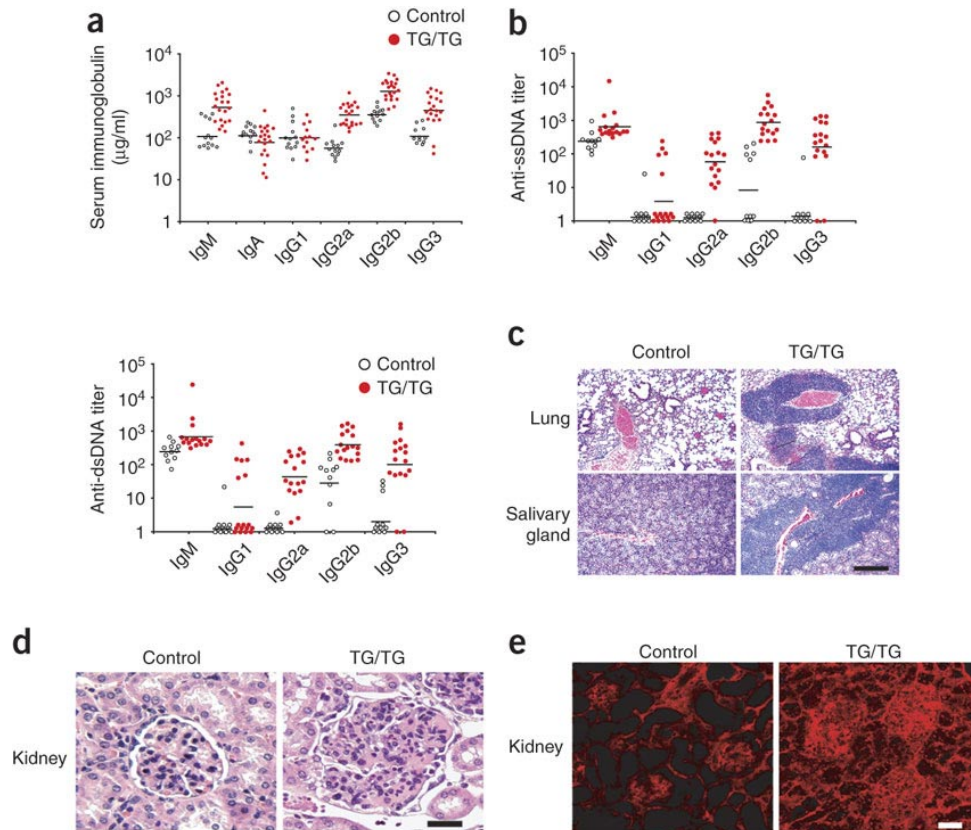
Sonkoly et al, J Invest Derm 2009
 Meisgen et al, Exp Med 2012
 Sonkoly et al, J All Clin Immunol 2010
 Xu et al, J Invest Derm 2011
 Xu et al, J Immunol 2013

A miR-31 feltételezett szerepe pikkelysömörben



- A TGF- β indukálja a miR-31-t
- A miR-31 gátolja az NF- κ B jelátviteli út egy gátló elemét, az STK40-t
- Az NF- κ B jelátviteli út kemokinek termelését indukálja
- Ez endotélsejt-aktivációt és a fehérvérsejtek bőrbe történő vándorlását (kemotaxisát) eredményezi

A miR-17-92 overexpressziója egérben autoimmunitást és limfoproliferatív betegséget eredményez

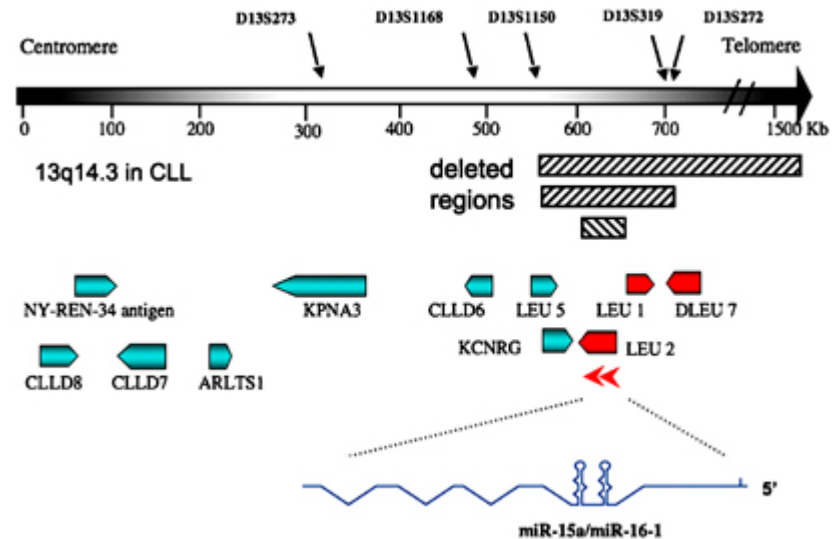


- Egy másik megközelítés: a miRNS kifejeződés megváltoztatása állatmodellben
- A miR-17-92 cluster overexpressziója (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b and miR-92) egérben a következőket eredményezte:
 - Növekedett IgM és IgG szint
 - Az anti-dsDNS és anti-ssDNS ellenanyagok szintjének emelkedése
 - Limfoid infiltráció nem-limfoid szövetekben
 - Limfoproliferaív betegség
- **A miR-17-92 cluster** szerepet játszhat autoimmun betegségek kialakulásában
- miR-17-5p kifejeződése emelkedett pikkelysömörben

A miRNS-ek szerepe daganatos betegségekben

A kromoszómális átrendeződések befolyásolhatják a miRNS kifejeződést daganatokban

- Számos kromoszómális átrendeződés a tumorsejtekben nem fehérjekódoló régiót érint
- A 13q14.3 deléciója a krónikus lymphoid leukaemiák (CLL) több mint felében megtalálható
- az aprólékos genetikai vizsgálatoknak sem sikerült egyértelműen tumorsuppresszorként karakterizálni az itt lokalizálódó 12 fehérjét kódoló gén egyikét sem
- A minimálisan deletált régióban két miRNS gén, a *miR-15a* és a *miR-16-1* található (2002 – 1 évvel a miRNS-ek felfedezése után)
- *miR-15a* és *miR-16-1* szuppresszálja a BCL2 gént és apoptózist indukál a daganatsejtekben – ezek a miRNS-ek tumor szuppresszorként működnek



Számos miRNS gén kromoszómális töréspontokon (fragile sites) található

Table 1. Examples of microRNAs located in minimal deleted regions, minimal amplified regions and breakpoints involved in human cancers^{a,b}

Chromosome	Location (defining markers)	Size (Mb)	MiR	Hystotype	OG or TS
3p21.1–21.2-D	ARP–DRR1	7	<i>Let-7g</i> and <i>miR-135–1</i>	Lung and breast cancer	Not known
3p21.3(AP2O)-D	GOLGA4–VILL	0.75	<i>MiR-26a</i>	Epithelial cancer	Not known
3p23–21.31(MDR2)-D	D3S1768–D3S1767	12.32	<i>MiR-26a</i> and <i>miR-138–1</i>	Nasopharyngeal cancer	Not known
5q32-D	ADRB2–ATX1	2.92	<i>MiR-145</i> and <i>miR-143</i>	Myelodysplastic syndrome	Not known
9q22.3-D	D9S280–D9S1809	1.46	<i>MiR-24–1</i> , <i>miR-27b</i> and <i>miR-23b</i> ; <i>let-7a-1</i> , <i>let-7f-1</i> and <i>let-7d</i>	Urothelial cancer	<i>PTC</i> and <i>FANCC</i>
9q33-D	D9S1826–D9S158	0.4	<i>MiR-123</i>	NSCLC	Not known
11q23–q24-D	D11S927–D11S1347	1.994	<i>MiR-34a-1</i> and <i>miR-34a-2</i>	Breast and lung cancer	<i>PPP2R1B</i>
11q23–q24-D	D11S1345–D11S1328	1.725	<i>MiR-125b-1</i> , <i>let-7a-2</i> and <i>miR-100</i>	Breast, lung, ovary and cervix cancer	Not known
13q14.3-D	D13S272–D13S25	0.54	<i>MiR-15a</i> and <i>miR-16a</i>	B-cell CLL	Not known
13q32–33-A	stSG15303–stSG31624	7.15	<i>MiR-17</i> , <i>miR-18</i> , <i>miR-19a</i> , <i>miR-20</i> , <i>miR-19b-1</i> and <i>miR-92–1</i>	Follicular lymphoma	Not known
17p13.3-D	D17S1866–D17S1574	1.899	<i>MiR-22</i> , <i>miR-132</i> and <i>miR-212</i>	HCC	Not known
17p13.3-D	ENO3–TP53	2.275	<i>MiR-195</i>	Lung cancer	<i>TP53</i>
17q22–t(8;17)	MiR-142s–c-MYC		<i>MiR-142s</i> and <i>miR-142as</i>	Prolymphocytic leukemia	<i>c-MYC</i>
17q23-A	CLTC–PPM1D	0.97	<i>MiR-21</i>	Neuroblastoma	Not known
20q13A	FLI33887–ZNF217	0.55	<i>MiR-297–3</i>	Colon cancer	Not known
21q11.1-D	D21S1911–ANA	2.84	<i>MiR-99a</i> , <i>let-7c</i> and <i>miR-125b</i>	Lung cancer	Not known

^aThis Table was reproduced, with permission, from Ref. [13].

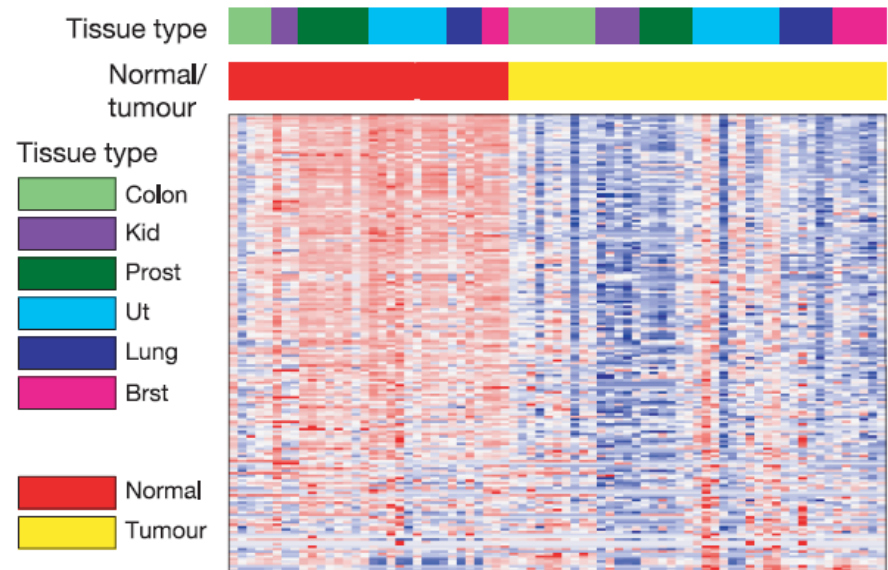
^bCLL, chronic lymphocytic leukemia; FANCC, Fanconi anemia, complementation group C; HCC, hepatocellular carcinoma; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; OG, oncogene; PPP2R1B, protein phosphatase 2, regulatory subunit A, β isoform; PTC, papillary thyroid carcinoma TP53, tumor protein 53; TS, tumor suppressor.

D : deleted region

- A miRNS gének gyakran a kromoszómák fragilis részén helyezkednek **A : amplified region** el, ahol igen gyakori a transzlokáció vagy deléció

A miRNS-ek kifejeződése megváltozott minden daganattípusban

- A miRNS-ek kifejeződése megváltozott minden daganattípusban (nem csak mutáció miatt)
- Különböző daganattípusokat nagy pontossággal el lehet különíteni a miRNS kifejeződési mintázat alapján
- A miRNS-ek deregulációja daganatokban nem random jelenség
- A fokozott kifejeződésű miRNS-ek onkogénként, a csökkent kifejeződésűek tumor szuppresszorként működhetnek? (2005)



A miRNS-ek működhetnek tumor szuppresszorként vagy onkogénként daganatokban

- Számos miRNS sejtsztódást, apoptózist, differenciációt, „stemness”-t szabályoz

- Vannak **onkogénként** működő miRNS-ek

- a daganatokban emelkedett a szintjük, és a célgénjük tumor szuppresszor gén

- miR-155

- miR-21

- miR17-92 cluster

- Vannak **tumor szuppresszorként** működő miRNS-ek :

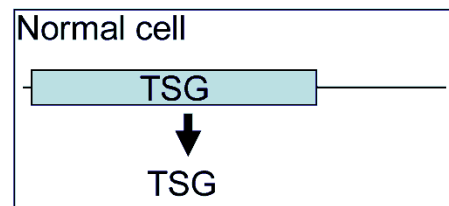
- a daganatokban csökkent a kifejeződésük, és a célgénjük onkogén (daganatokban az onkogének felszabadulnak a miRNS-mediált gátlás alól)

- miR-16 - miR-15a család

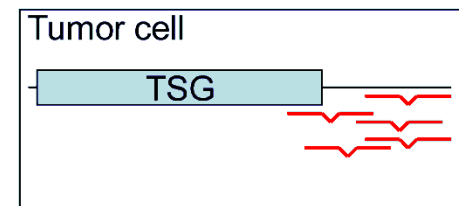
- let-7 család

- miR-34

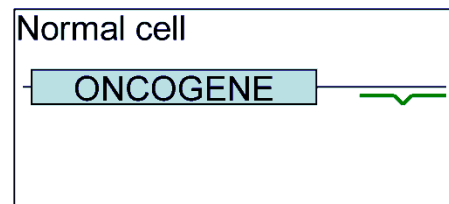
Oncogenic microRNA



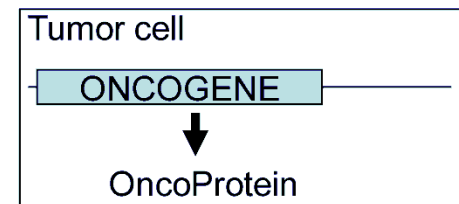
Oncogenic microRNA



TS microRNA



TS microRNA



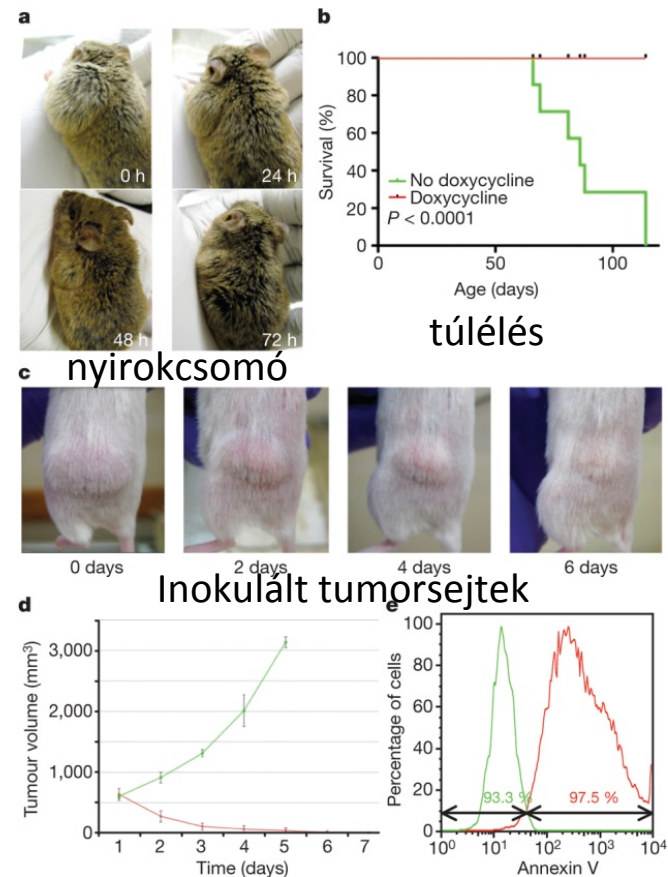
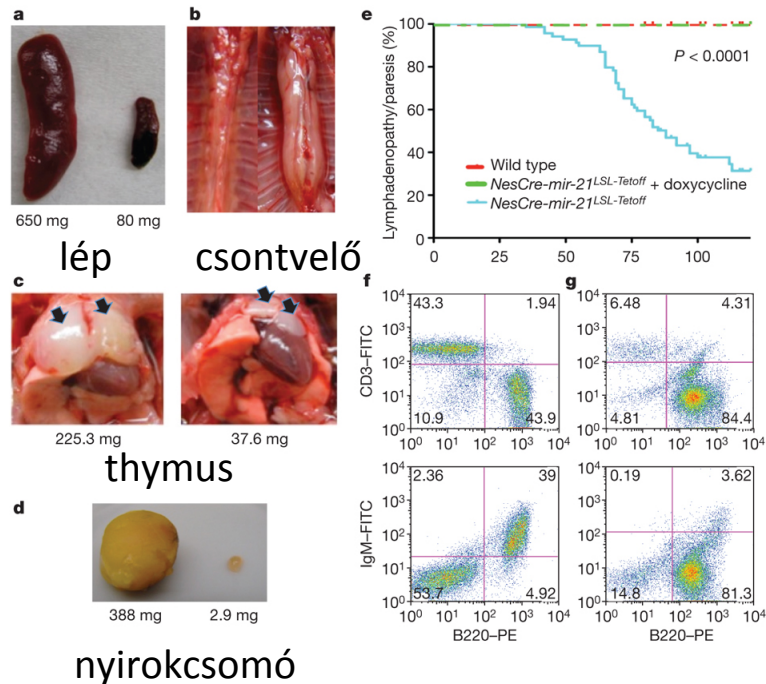
MiR-21: egy onkomiR (onkogén miRNS)

- Emelkedett a szintje hasnyálmirigy-, emlő-, tüdő-, prosztata- és gyomorrákban, glioblasztomában, leukémiákban (a legtöbb eddig vizsgált daganattípusban)
- A miR-21 tumor szuppresszor gének kifejeződését gátolja
 - *PDCD4*
 - *PTEN*
- Pl. kolorektális tumorban: Anti-miR21-el transzfektált sejtekben (= a miR-21 gátlása) a PDCD4 kifejeződés emelkedett, az invázió csökkent

MiR-21 – onkomiR addikció egy limfóma modellben

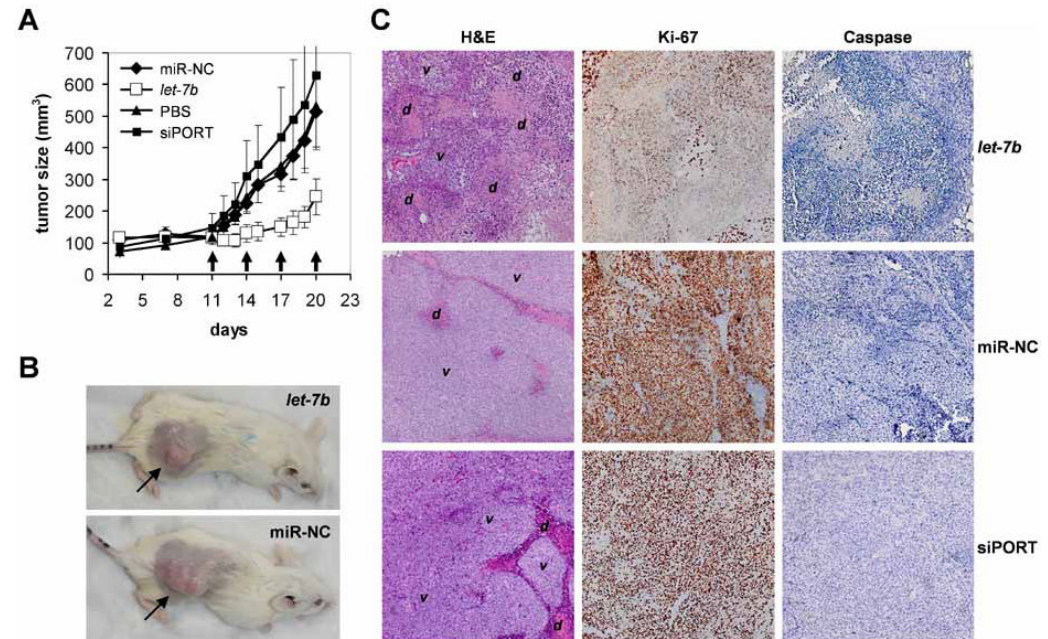
NesCre8, mir-21^{LSL-Tetoff} egér: A miR-21 doxycyclin hiányában aktív: limfóma fejlődött ki 2 hónap alatt (pre-B-sejtes)

A miR-21 gén kikapcsolása doxycyclin adásával remissziót eredményezett!



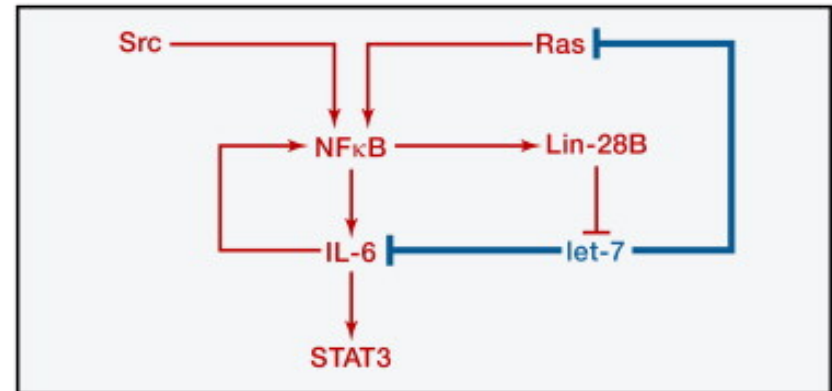
A let-7 mint tumor szuppresszor miRNS

- Downregulált tüdő-, vastagbél-, emlő-, petefészek- és gyomorrákban
- Az egerekbe szubkután injektáltak tüdőráksejteket (NSCLC)
- Amikor tapintható tumorok fejlődtek ki, intratumorálisan *let-7b*-t injektáltak minden 3. napon (siPORTamine komplexben)
- A *let-7b* lokális bevitele gátolta a tumor növekedését

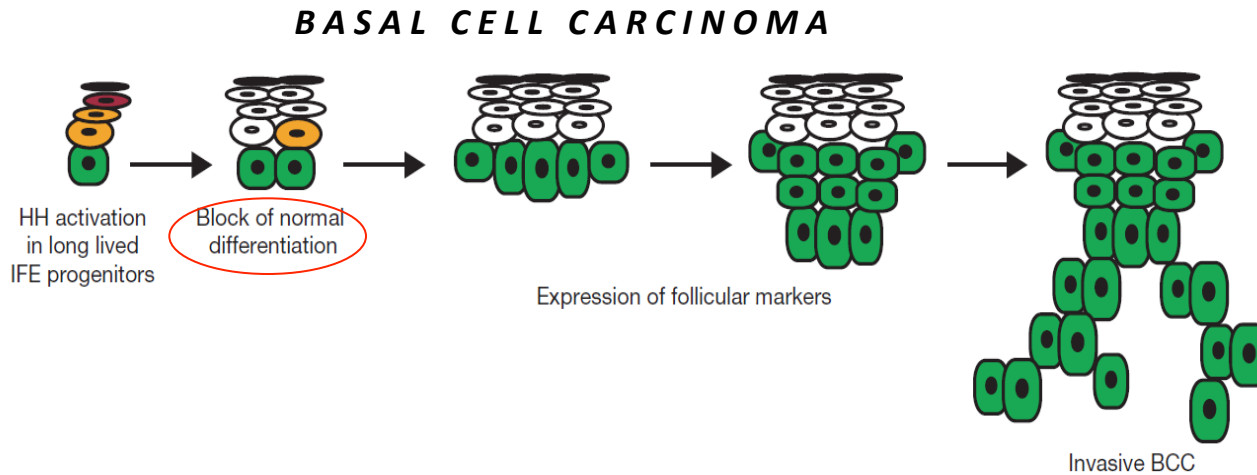


Hogyan járulhat hozzá a csökkent let-7 kifejeződés a daganatok kialakulásához?

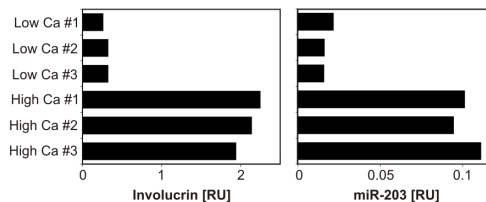
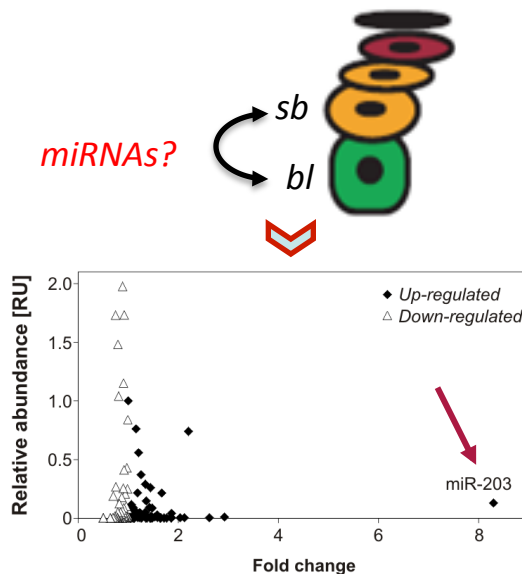
- Egy onkogén (Src) átmeneti aktivációja vagy más trigger NF-kB aktivációhoz vezet (gyulladás)
- Az NF-kB indukálja az IL-6 ot és down-regulálja a let-7-t
- Az IL-6 tovább aktiválja az NF-kBt, amely tovább csökkenti a let-7 szintjét
- Az alacsony let-7 szint a Ras onkogén derepressziójához vezet, ami tovább aktiválja a jelátviteli utat - ami további let-7 csökkenéshez vezet
- Pozitív visszacsatolás: a miRNS mérsékelt hatása felerősödik
- Daganatsejtekben a let-7 downregulációja fenntartja a kört, és folyamatos proliferációt eredményez



Szerepet játszhatnak-e a miRNS-ek bőrrákban?



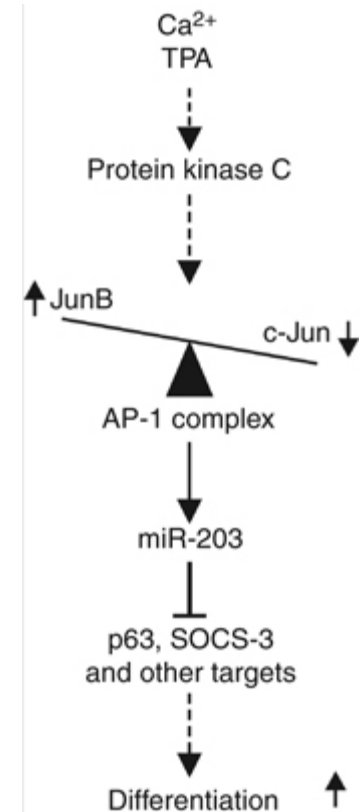
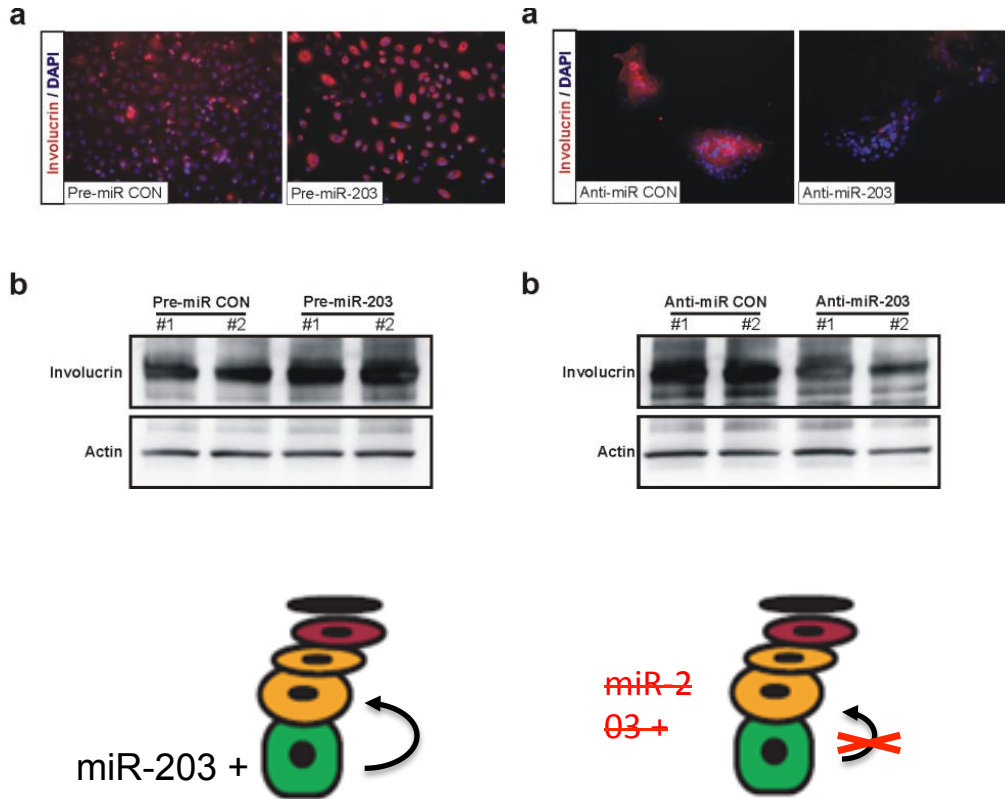
A keratinociták differenciációja során a legnagyobb mértékben upregulált miRNS a miR-203



	miRNA	Score	Fold change	q-value(%)
Up-regulated	miR-203	10.31	8.3	0.00
	miR-429	9.95	1.6	0.00
	miR-98	6.65	2.9	0.00
	miR-594	5.22	2.2	0.00
	miR-200a	3.01	1.9	18.98
	miR-365	2.81	1.5	18.98
Down-regulated	miR-200c	-5.06	0.7	12.65
	miR-210	-4.69	0.5	12.65

- 365 emberi miRNS kifejeződésének vizsgálata (Taqman Low Density Array/TLDA)
- A legnagyobb mértékben upregulált miRNS a miR-203 : ~8-szorosára emelkedett a szintje a differenciált keratinocitákban

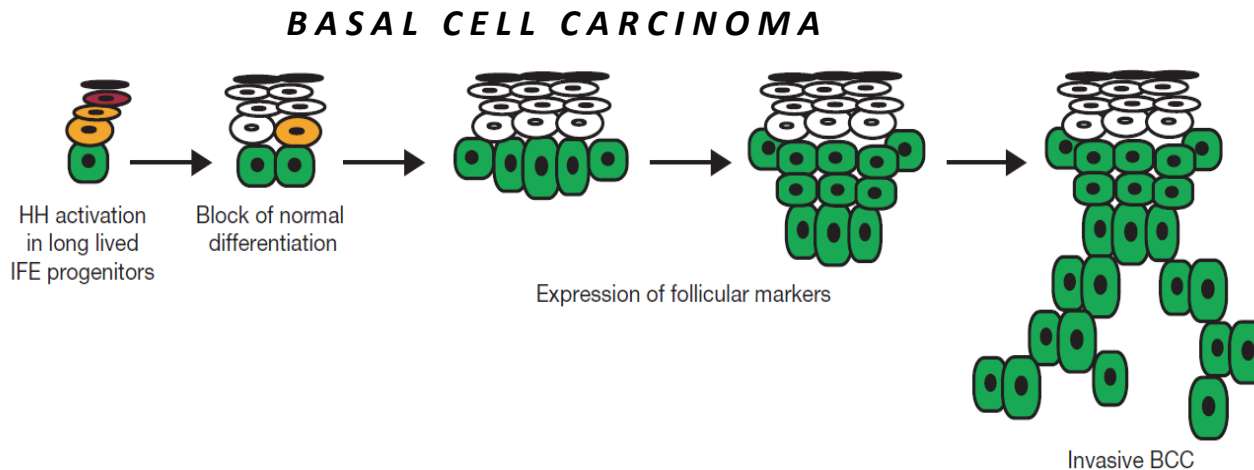
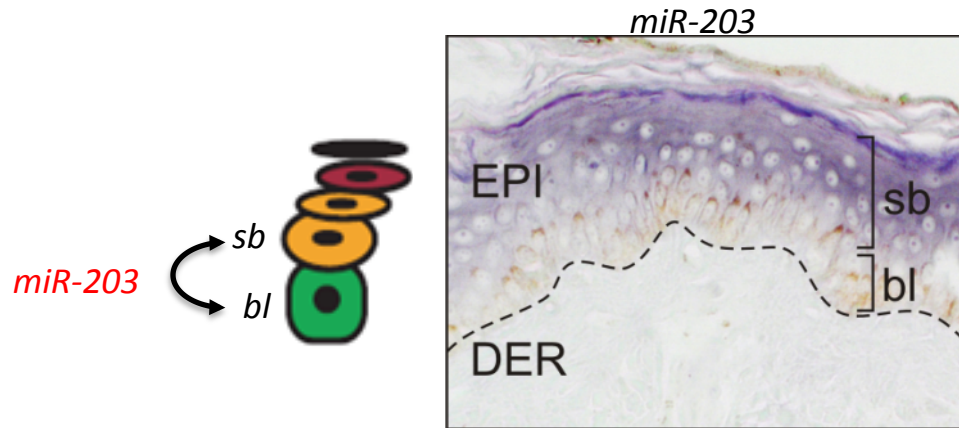
A miR-203 keratinocita-differenciációt indukál



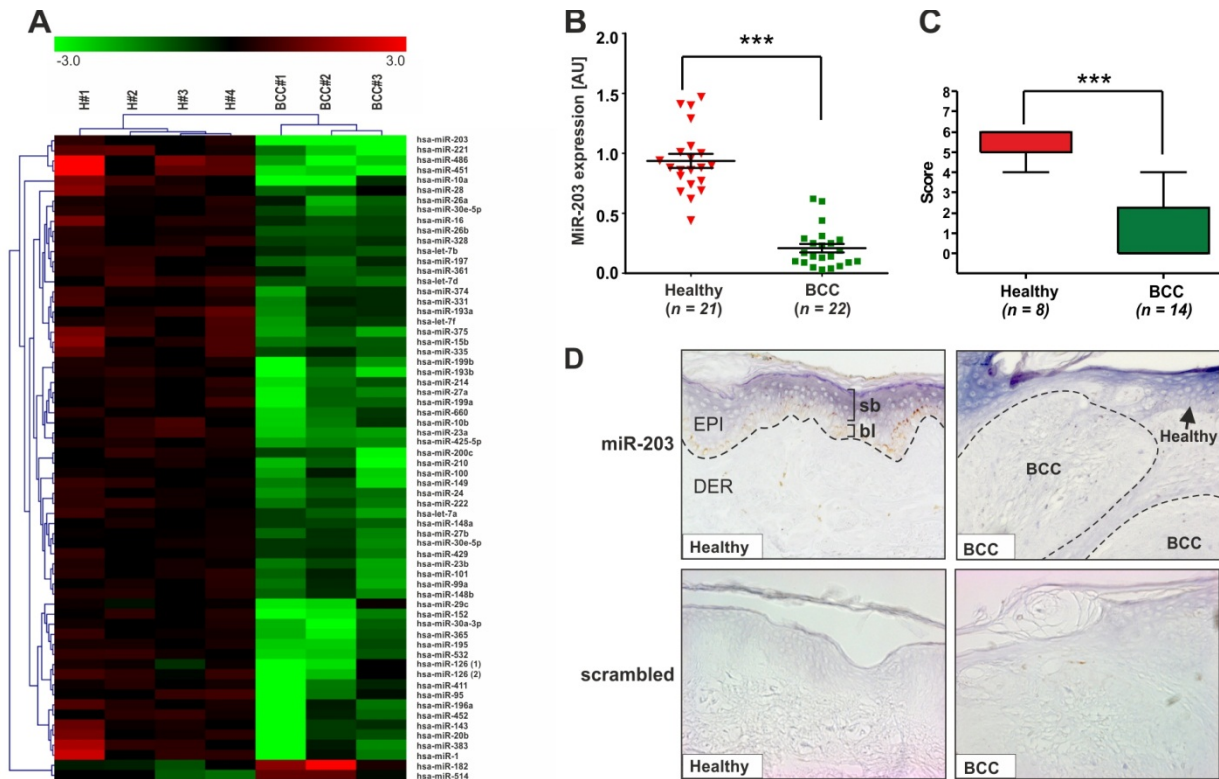
- A miR-203 a keratinociták fenotípusát megváltoztatja bazálisról szuprabazálisra
- A miR-203 overexpressziója differenciációt indukál
- A miR-203 gátlása mérsékelte a kalcium-indukált differenciációt
- A miR-203 szuppresszálja a p63 gént és a „stemness”-t (Yi et al, Nature, 2008)

Sonkoly et al, J Invest Derm, 2009
Yi et al, Nature, 2008

Szerepet játszhatnak-e a miRNS-ek bőrrákban?



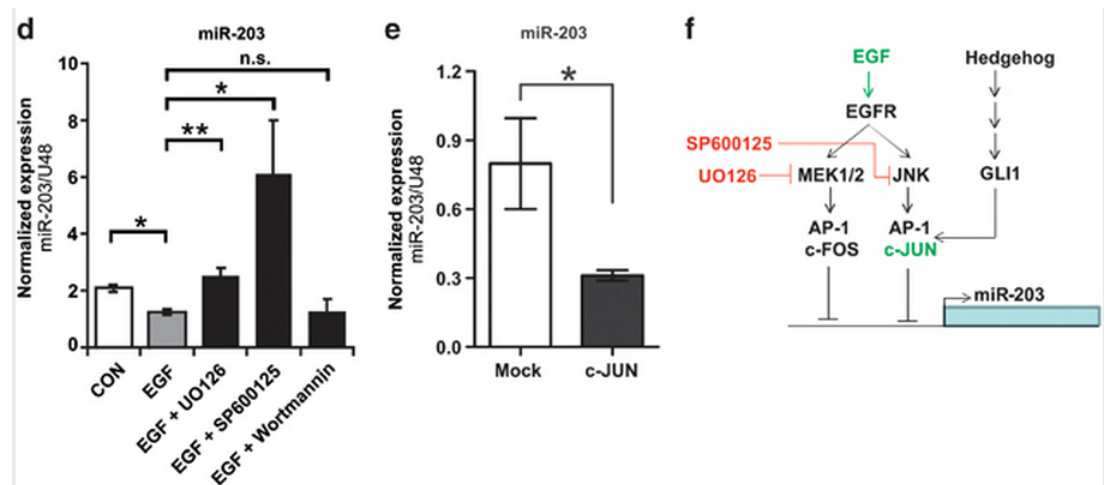
A miR-203 kifejeződése jelentősen csökkent basaliomában



- A miRNS-ek kifejeződése megváltozott basaliomában az egészséges bőrhöz képest
- Basaliomában a miR-203 a legnagyobb mértékben csökkent kifejeződésű miRNS
- A miR-203 az egészséges epidermisz szuprabazális rétegében fejeződik ki, míg basaliomában jelentősen csökkent a szintje

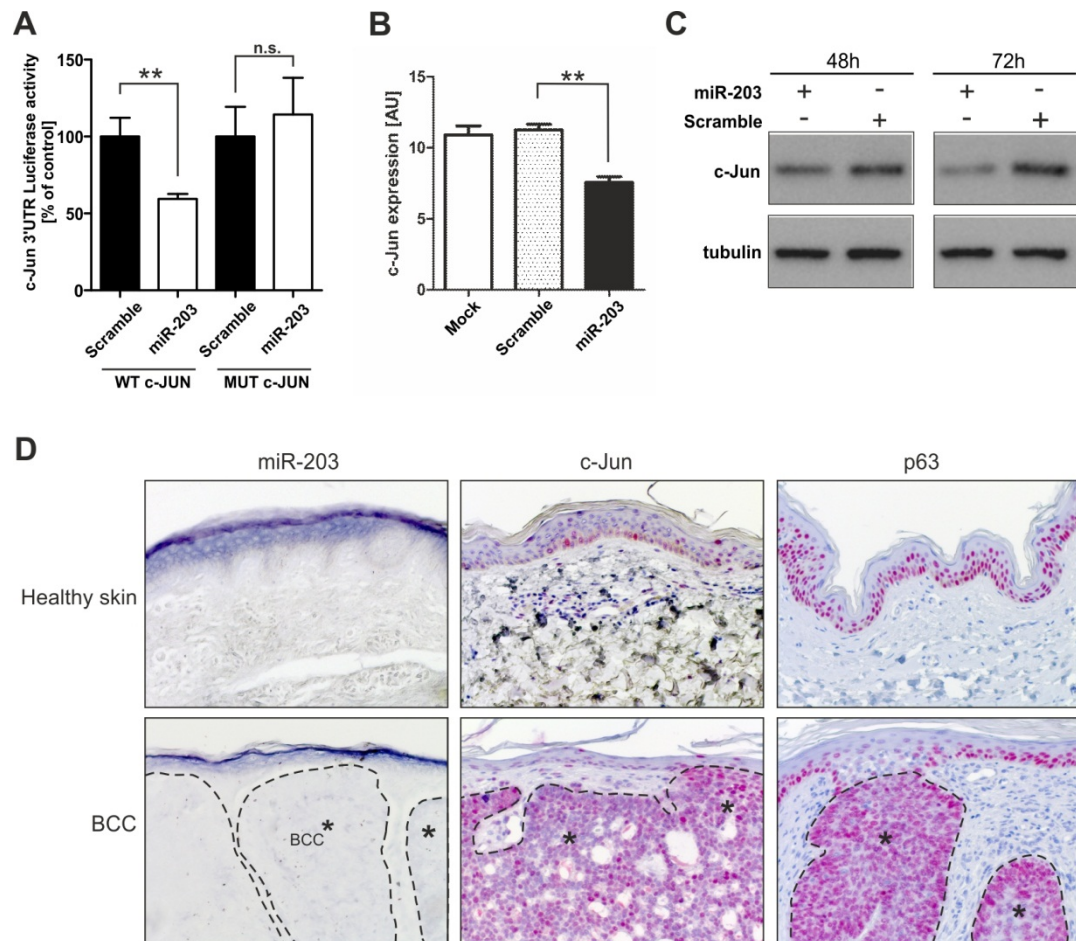
Az EGFR/MEK/ERK/JUN jelátviteli út gátolja a miR-203-t

- Mi lehet a miR-203 csökkent kifejeződésének az oka basaliomában?
- A miR-203-t potenciálisan szabályozó jelátviteli utakat vizsgáltuk
- Az EGF gátolja a miR-203-t, amely részben visszafordítható MEK/JNK inhibitorokkal
- A c-Jun overexpresszió gátolja a miR-203-t
- Az EGFR/MEK/ERK/JUN jelátviteli út gátolja a miR-203-t

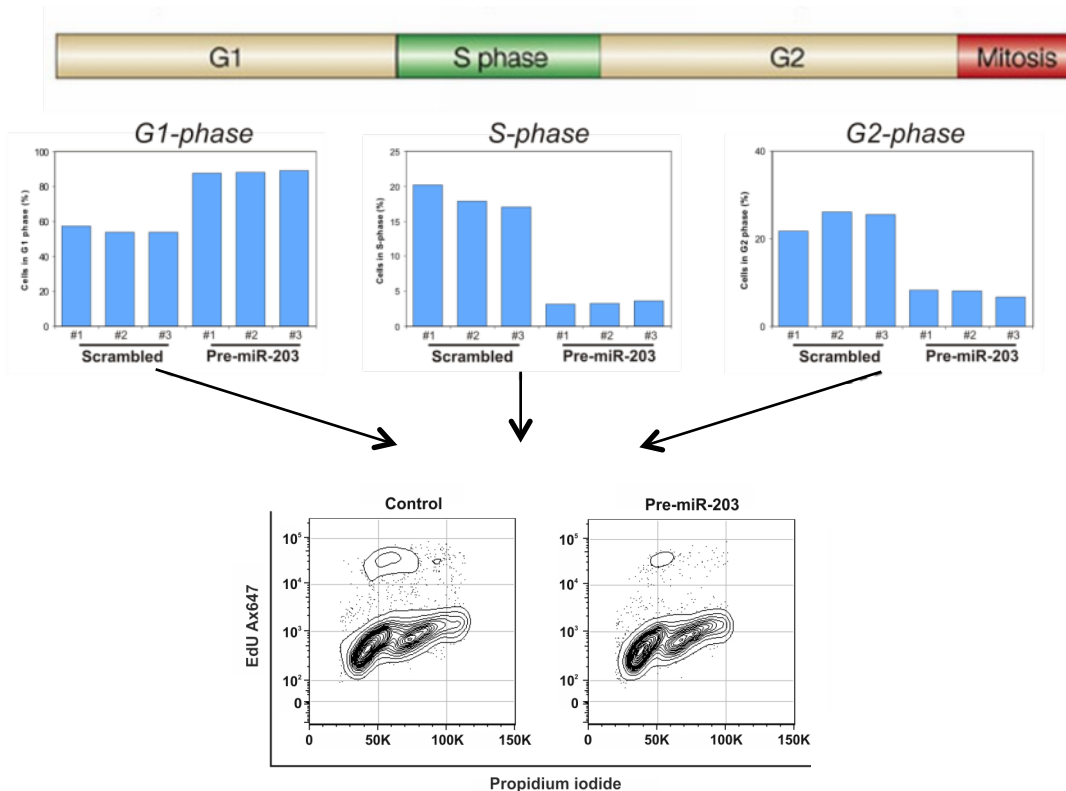


A miR-203 a c-Jun onkogént közvetlenül gátolja

- A miR-203 célgénjei között feldúsultak a sejtprolifерációt és sejtciklust szabályozó gének
- A c-jun onkogén a miR-203 új target génje
- A miR-203 gátolja a c-Jun 3'UTR luciferáz aktivitást (direkt miRNS:mRNS interakció a prediktált kötőhelyen keresztül)
- A miR-203 csökkenti a c-jun fehérje szintjét
- A miR-203 target gének (p63, c-Jun) kifejeződése emelkedett basaliomában

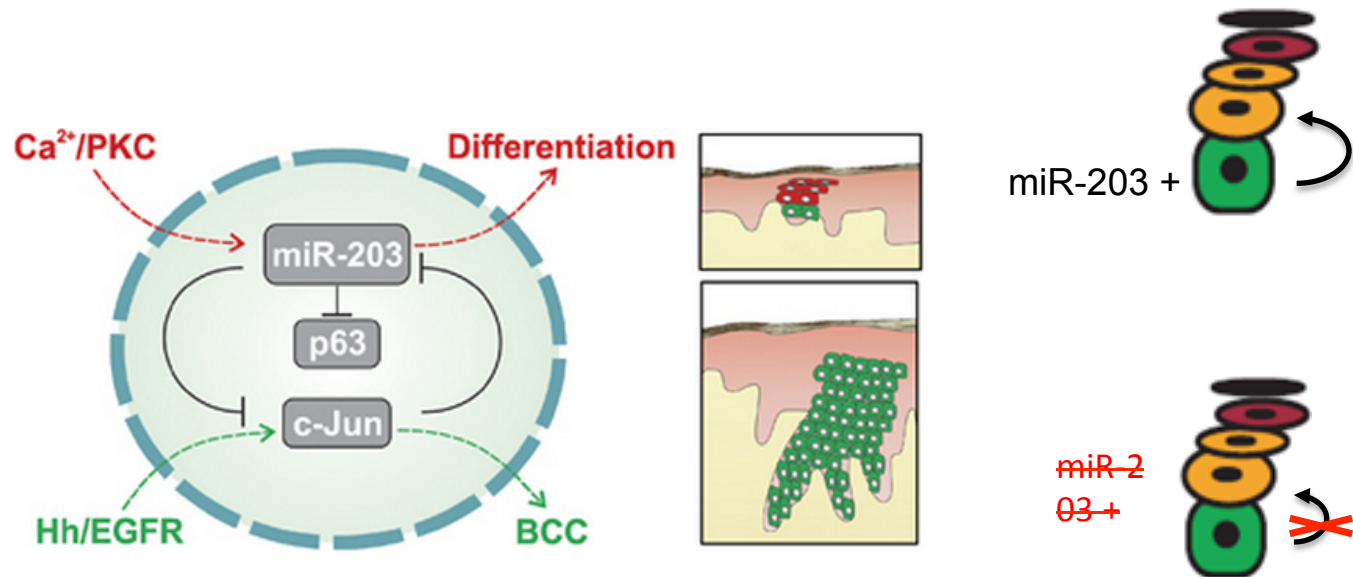


A miR-203 gátolja a sejtproliferációt a G1-S fázis tranzíció gátlásával

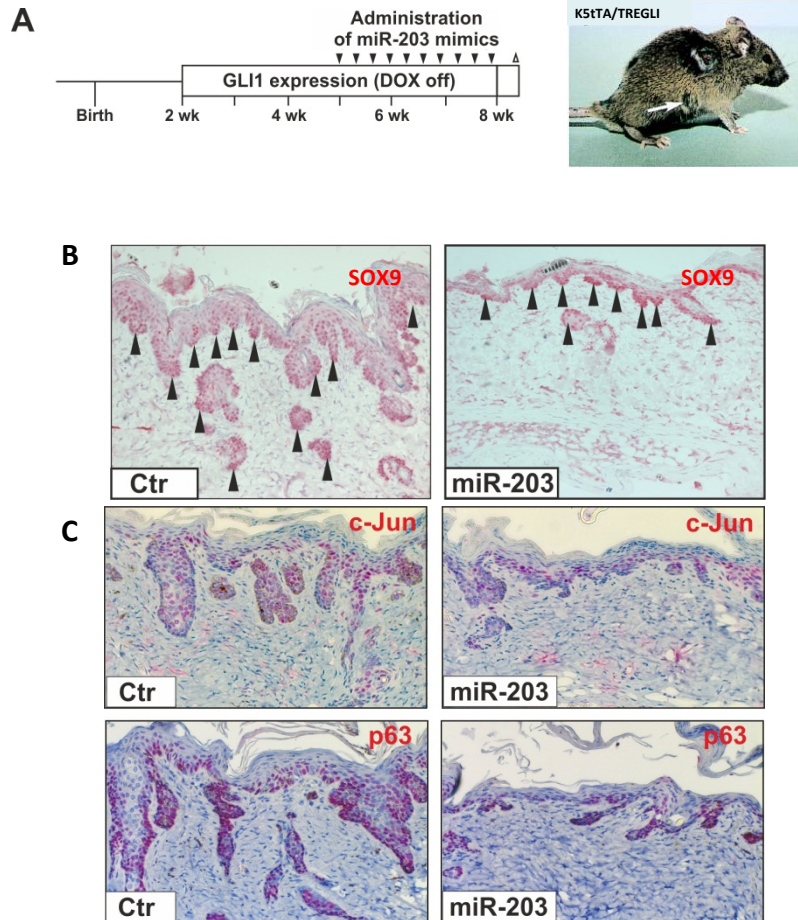


- A miR-203 funkcionális szerepe a basalióma kialakulásában?
- A miR-203 overexpressziója keratinocitákban gátolja a proliferációt
- Növekszik a G1 fázisban lévő sejtek aránya
- Csökken az S fázisban lévő sejtek aránya
- A miR-203 interferál a G1-S fázis tranzícióval keratinocitákban
- A miR-203 downregulációja hozzájárulhat a basalioma-sejtek folyamatos proliferációjához

A miR-203 egészséges bőrben és bőrrákban betöltött szerepének modellje



A miR-203 „mimic” szubkután adminisztrációja csökkenti a basalioma-szerű tumorok méretét egérben



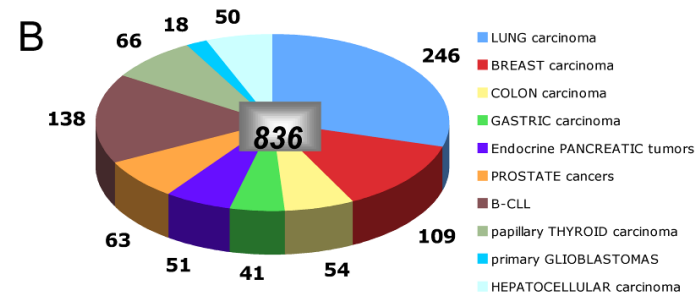
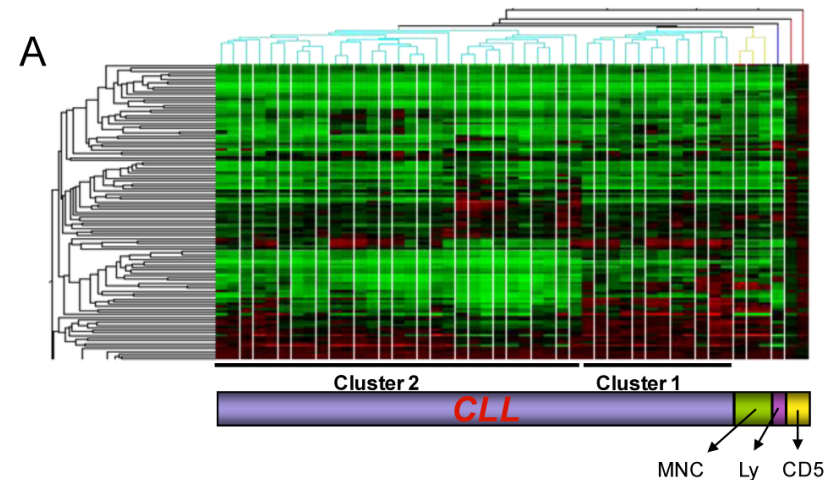
- GLI1 overexpresszáló egerek bőrén basalioma-szerű léziók fejlődnek ki
- MiR-203 „mimic” szubkután injekciója 48 óránként
- Morfológiai változások: a basalioma-szerű léziók mérete és száma csökkent
- A miR-203 célgénnek: c-Jun és p63 expressziója csökkent
- A miR-203 kifejeződés visszaállítása terápiás opció lehet basaliómában

Mire használhatóak a miRNS-ek betegségekben?

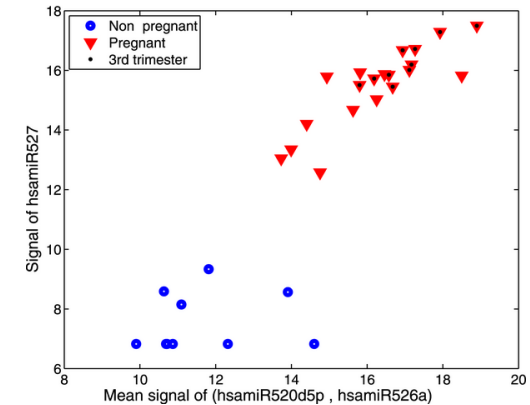
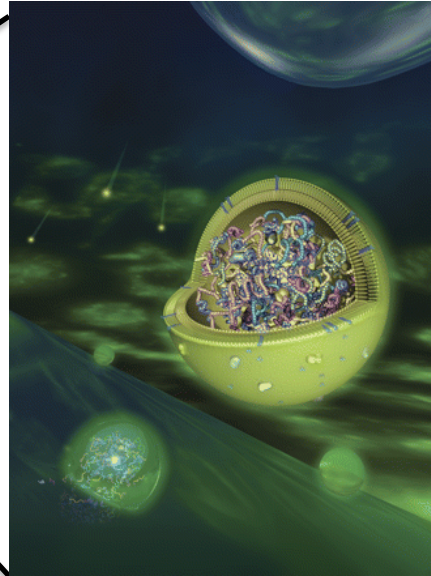
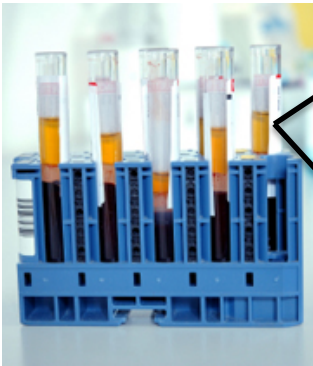
1. A miRNS-ek expressziója gyakran megváltozott a betegségekben az egészséges szövetekhez képest → DIAGNOSZTIKA.
2. MiRNS-ek / miRNS inhibitorok terápiás alkalmazása állatmodellekben pl sikeres daganatkezelés → TERÁPIA.

A miRNS kifejeződési mintázat alapján csoportosítani lehet a betegségeket

- A különböző szöveteknek/sejteknek egyedi miRNS kifejeződési mintázata van
- A legmagasabban kifejeződő 10-15 miRNS teszi ki az összes miRNS (klón) 80%-át
- A miRNS kifejeződés alapján pontosabban lehet osztályozni a daganattípusokat, mint az mRNS-kifejeződés alapján



A mikroRNS-ek jelen vannak a keringésben extracellulárisan



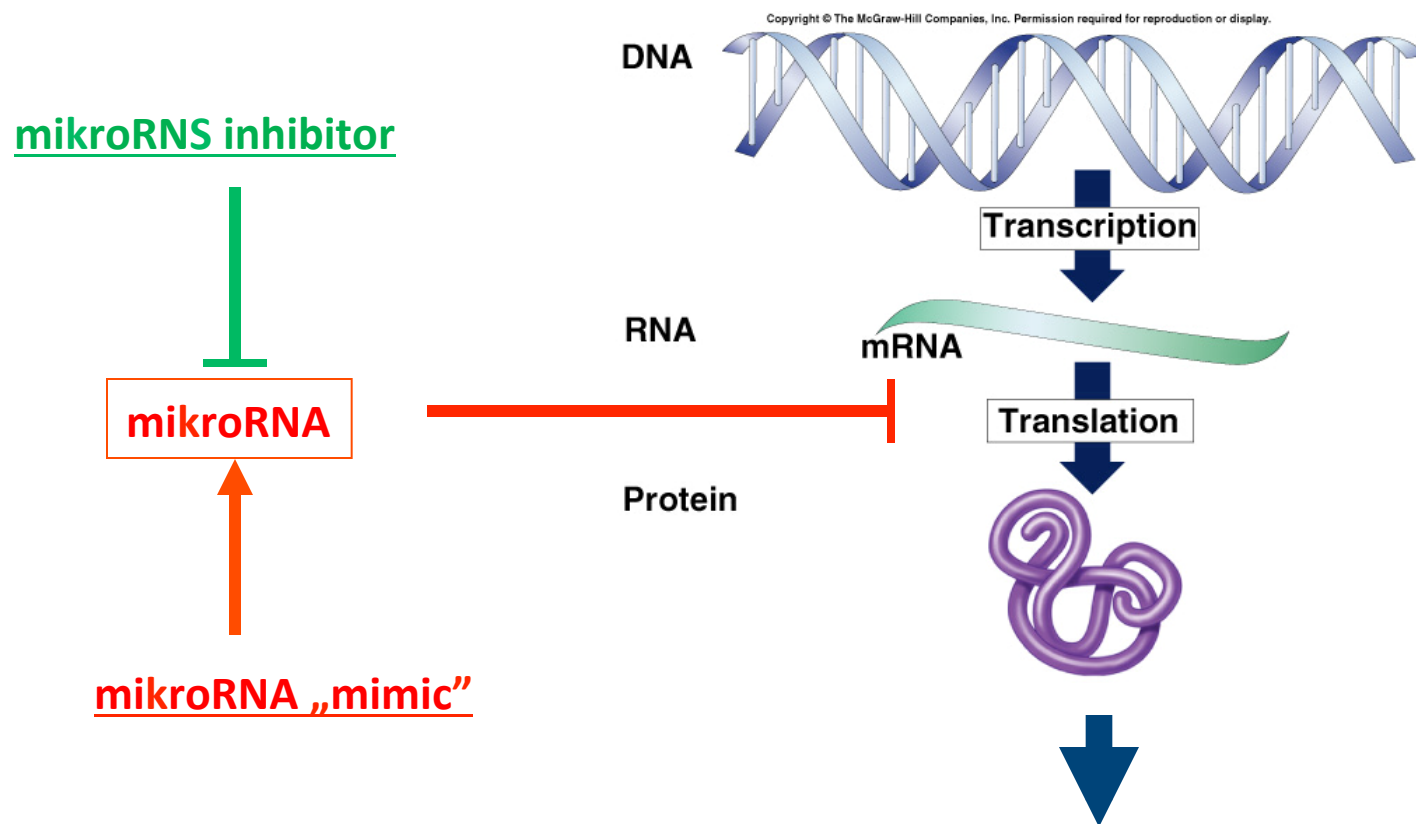
“Pregnancy classification” according to the levels of three microRNAs in the sera of pregnant vs. non pregnant women.

Gilad et al, PloS One, 2008

- a miRNS-ek jelen vannak a plazmában, szérumban és egyéb testfolyadékokban pl nyálban, anyatejben, vizeletben
- a legtöbb miRNS a keringésben exosomákban található, azaz lipid/lipoprotein komplexekehez kötődik és ezért stabil
- a szekréció mechanizmusa és az extracelluláris miRNS-ek élettani funkciója kevésbé ismert
- betegségek markerei lehetnek

Valadi et al, Nature Cell Biology 2007
Chen et al, Cell Research 2008
Kosaka et al, Cancer Science 2010
Kosaka et al, J Biol Chem, June 4, 2010

A miRNS-ek modulálása terápiás célból?



A gyulladás mérséklése?
A daganatok növekedésének gátlása?
Terápiás hatás?

Anti-miR-122: az első klinikai vizsgálatba került miRNS-alapú gyógyszer

- miR-122: egy máj-miRNS amely a hepatitisz C vírus replikációját elősegíti
- LNA anti-miR-122 (Santaris Pharma): gátolja a miR-122-t
- A krónikus HCV fertőzés csimpánz-modelljében használták
- A HCV által indukált patológiás elváltozások a májban mérséklődtek
- Nem volt rezisztencia vagy mellékhatás
- 2. fázisú klinikai vizsgálat: 2010-ben



az első klinikai vizsgálatba
került miRNS-alapú
gyógyszer

Összefoglalás

- A miRNS-ek kifejeződése számos betegségben megváltozott, és a miRNS-ek ezekben oki szerepet is játszhatnak
- A jövőben elképzelhető miRNS-alapú diagnosztika
- MiRNS-eknek vagy miRNS-inhibitoroknak terápiás hatása lehet
- A miRNS-alapú kezelések hatásosabbak lehetnek, mint a fehérjéket célzó terápiák, mert a miRNS-ek gyakran egy jelátviteli út több elemét is szabályozzák

