

MikroRNS expresszió vizsgálata humán hepatoblastomában

Doktori értekezés

Gyugos Mónika

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Törő Klára, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Horváth Gábor, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fehér Erzsébet, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Simon Károly, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3 -
2.	BEVEZETÉS.....	6 -
2.1.	Hepatoblastoma	6 -
2.1.1.	Etiológia.....	6 -
2.1.2.	Incidencia.....	7 -
2.1.3.	Diagnózis	7 -
2.1.4.	Szövettani felosztás	8 -
2.1.5.	Kezelés.....	12 -
2.1.6.	Túlélés	13 -
2.2.	mikroRNS-ek.....	14 -
2.2.1.	Biogenezis.....	15 -
2.2.2.	Biológiai folyamatokban betöltött szerep.....	16 -
2.2.3.	Szerep a májbetegségekben és hepatokarcinogenezisben	16 -
2.2.4.	A hepatoblastomában vizsgált mikroRNS-ek bemutatása.....	17 -
2.2.5.	mikroRNS célgén predikció.....	24 -
3.	CÉLKITŰZÉSEK	27 -
4.	MÓDSZEREK.....	28 -
4.1.	Betegadatok.....	28 -
4.2.	Szövetminták	28 -
4.3.	RNS izolálás	29 -
4.4.	miRNS expressziós szint meghatározás.....	30 -
4.4.1.	Reverz transzkripció (RT)	30 -
4.4.2.	Valós idejű PCR és relatív expresszió	31 -
4.5.	miRNS célgének keresése <i>in silico</i>	31 -
4.6.	Immunhisztokémia.....	32 -
4.6.1.	Az <i>in silico</i> targetpredikció során meghatározott ZNF207 festése	32 -
4.6.2.	Az immunreakciók értékelése.....	32 -
4.7.	Statisztikai módszerek.....	33 -
5.	EREDMÉNYEK.....	35 -

5.1.	A hepatoblastoma minták makroszkópiája és szövettani vizsgálata	35 -
5.2.	miRNS vizsgálatok	36 -
5.2.1.	Relatív miRNS expresszió szövettani összehasonlításban	36 -
5.2.2.	A túlélés és a miRNS expresszió összefüggése	38 -
5.2.3.	A miRNS célgének keresése <i>in silico</i>	41 -
5.3.	Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	43 -
5.3.1.	ZNF207.....	43 -
5.4.	β -catenin korrelációja a miRNS expresszióval.....	46 -
5.5.	A miRNS expresszió összehasonlítása HB-ben és HCC-ben	47 -
6.	MEGBESZÉLÉS	48 -
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	56 -
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	57 -
9.	SUMMARY	59 -
10.	IRODALOMJEGYZÉK	60 -
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	77 -
12.	FÜGGELÉK	78 -
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84 -

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP	α -fetoprotein
APC	adenomatosus polyposis coli
BAX	B sejt limfómával asszociált X fehérje (BCL2-associated X protein)
BCL-2	B sejt limfóma 2 (B-cell lymphoma 2)
BCL-w	B sejt limfóma 2-szerű 2 (B-cell lymphoma 2 like 2)
BWS	Beckwith-Wiedemann szindróma
CARBOP/VP	karboplatin és etopozid
CARBOP-VP/ADR	karboplatin-etopozid adriamicinnel
CCND1	ciklin D1
CCND3	ciklin D3
CDC42	sejtciklusra ható GTP-kötő fehérje (cell division cycle 42)
CDDP	cisz-diamminedikloroplatinum=ciszplatin
CDK4	ciklin-dependens kináz 4 (cyclin dependent kinase 4)
CDK6	ciklin-dependens kináz 6 (cyclin dependent kinase 6)
CDKN1B	ciklin-dependens kináz inhibitor 1B (cyclin dependent kinase inhibitor 1B)
CDKN1C	ciklin-dependens kináz inhibitor 1C (cyclin dependent kinase inhibitor 1C)
CLDN	claudin
C-MYC	mielocitómatózis virális onkogén homológ (myelocytomatosis viral oncogene homolog)
COG	Gyermekek Onkológiai Csoportja (Children's Oncology Group)
DAB	diaminobenzidin
DLK	delta-szerű protein (delta-like protein)
E2F3	E2F transzkripciósfaktor 3 (E2F transcription factor 3)
EFS	eseménymentes túlélés (event free survival)
FAP	familiaris adenomatosus polyposis

GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	zöld fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein)
HB	hepatoblastoma
HBV	hepatitis B vírus
HCC	hepatocelluláris karcinóma
HCV	hepatitis C vírus
HDGF	hepatoma eredetű növekedési faktor (Hepatoma-derived growth factor)
HE	hematoxin-eozin
IHC	immunhisztokémia (immunohistochemistry)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
miR	mikroRNS
miRNS	mikroRNS
mRNS	messenger RNS
MT	makrotrabekuláris hepatoblastoma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NT	tumormentes környező máj (non-tumorous)
OS	teljes túlélés (overall survival)
PCNA	proliferáló sejt nukleáris antigén (proliferating cell nuclear antigen)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
p53	tumorprotein 53
PDCD4	programozott sejthalál fehérje 4 (programmed cell death protein 4)
PRETEXT	kezelést megelőző tumorterjedelem (pre-treatment extent of disease)
PTEN	foszfát-és tenzin homológ (phosphate and tensin homolog)
RECK	kazal típusú domént tartalmazó ciszteinben gazdag, visszaáramlást indukáló fehérje (reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs)

RHOB	ras-sal homológ géncsalád B tagja (ras homolog gene family, member B)
RISC	RNS-indukált csendesítő komplex (RNA induced silencing complex)
RT	reverz transzkripció (reverse transcription)
SIOPEL	Gyermekekori Májtumороk Nemzetközi Stratégiai Csoportja (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group [<i>International Childhood Liver Tumour Strategy Group</i>])
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
snRNS	kis nukleáris RNS (small nuclearRNS)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TNF α	tumornekrózis faktor α (tumor necrosis factor α)
TGF α	Transzformáló növekedési faktor α (transforming growth factor α)
TIMP3	metallopeptidáz inhibitor 3 (metallopeptidase inhibitor 3)
TLCT	tranzícionális májsejtes tumor (transitional liver cell tumor)
UTR	nem transzlálódó régió (untranslated region)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
ZNF207	cink-ujj fehérje 207 (zinc finger protein 207)

2. BEVEZETÉS

2.1. Hepatoblastoma

Gyermekekori tumorokról 15 év alatti kor esetén beszélhetünk, melyek az összes daganatos megbetegedés 1%-át teszik ki. A primer rosszindulatú májdaganatok a gyerekekori tumoroknak kb. 1-4%-a, ennek 90%-a hepatoblastoma (HB), mely ezzel a leggyakoribb primer rosszindulatú gyerekekori májdaganat (Allan és mtsai 2013, Hiyama 2013, Dezsofi és mtsai 2014). Éves szinten 1 millió gyerek közül körülbelül 1,6-2 betegszik meg hepatoblastomában (Agarwala 2012), Magyarországon évi 3-4 HB esetet regisztrálnak (Országos Gyermektumor Regiszter adatai alapján).

2.1.1. Etiológia

A hepatoblastoma gyakran fejlődési rendellenességekkel asszociált tumor, mely magas alfa-fetoprotein (AFP), onkofetális marker expresszióval jellemezhető (Cairo és mtsai 2012). Etiológiája máig is csak részben tisztázott (Spector és mtsai 2012), melynek egyik lehetséges oka, hogy nagyon ritka betegségről van szó (Adesina és mtsai 2009). Kiváltó okként az anyai fogamzásgátló szereket, az alkohol abúzust, valamint a festék-, fém- és petróleum expozíciót feltételezik (Kemeny és mtsai 2000).

Más egyéb tumorok mellett, a hepatoblastoma tumorbiológiáját sem sikerült még teljes egészében feltárni. A hepatoblastoma hepatikus progenitor sejtekből ered, amelyek különböző májfejlődési állapotokon mennek keresztül, erre utalnak a hepatoblastoma szövettani típusai (Cairo és mtsai 2012). Bár a HB-k többsége sporadikus, kialakulása összefüggésben állhat egyes családi szindrómákkal, úgymint Beckwith-Wiedemann szindróma (BWS) és familiaris adenomatosus polyposis (FAP) (Adesina és mtsai 2009), bár a HB incidenciája magasabb mint a BWS vagy FAP incidenciája (Buendia 2002). Az adenomatosus polyposis coli (APC) tumorszupresszor gén mutációja ritka az amúgyis szórványos HB-ben (Adesina és mtsai 2009). Adesina és munkatársai β -catenin mutációt igazoltak HB-ban, így a wingless (wnt) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalaknak is szerepe lehet a hepatoblastoma patogenezisében

(Adesina és mtsai 2009). Jelentős különbség van a főként gyermekkorban kialakuló hepatoblastoma és a gyermekkort meghaladóan jelentkező hepatocelluláris karcinóma (HCC) között. Különbségek főként az etiológiában valamint a morfológiában és számos egyéb tényezőben találhatók (Cairo és mtsai 2008), míg HCC főként krónikus májbetegség (vírusfertőzés, cirrózis, szteatózis) talaján alakul ki, addig a hepatoblastoma létrejöttében sem vírus, sem cirrhotikus máj nem játszik szerepet, az okok inkább genetikai, epigenetikai eredetre vezethetők vissza (Cairo és mtsai 2008). Egyes kromoszómák azonban mind hepatoblastomában, mind HCC-ben érintettek lehetnek, így az 1q, 8q és 17q (Buendia 2002).

2.1.2. Incidencia

A hepatoblastoma leggyakrabban 6 hónapos és 3 éves kor között (az átlag életkor 18 hónap) fordul elő (Allan és mtsai 2013), éves incidenciáját tekintve – ahogyan korábban is említésre került - egymillió gyerekből 1,6-2 HB megbetegedést diagnosztizálnak évente (Agarwala 2012). Gyakrabban fordul elő nagyon alacsony születési súlyú gyerekeknél (<1000 g) és sok esetben társul bizonyos genetikai faktorokkal (Allan és mtsai 2013). A nemi megoszlását tekintve a fiú lány arány 2:1 (Buendia 2002), a fiúgyermekek esetén főként a fehér bőrűeket érinti (Buendia 2002, Allan és mtsai 2013).

2.1.3. Diagnózis

A HB kezdeti stádiumban nem okoz panaszokat, így egyéb okból végzett hasi ultrahang vizsgálat során a megnagyobbodott máj utalhat hepatoblastomára. A HB azonosításában a legfontosabb az AFP kimutatása a szérumban. A diagnózist ezen marker magas értékére valamint radiológiai és hisztológiai vizsgálatok eredményeire alapozva állítják fel (Agarwala 2012). Az AFP a hepatoblastomás betegek 90-95%-ban kiugróan magas. Az esetek többségében, a pre-operatív fázisban tűbiopszia vagy vékonytű aspirációs citológia (Agarwala 2012) elég ahhoz, hogy az ezekből készült szövettani metszeteken a hematoxin-eozin (HE) festést követően pontos diagnózist állítsanak fel. Munkacsoportunk 2008-ban kimutatta, hogy a Delta-like protein (DLK) a HCC-vel ellentétben, humán epiteliális típusú hepatoblastomában expresszálódik (Dezso és mtsai 2008). Továbbá a szoros sejtkapcsolatot biztosító claudin-1, -2 (CLDN-1,-2) tight

junction membránfehérjék, valamint a transzformáló növekedési faktor α (TGF- α) overexpressziója jellemző a differenciáltabb, jobb túléléssel társuló fetális hepatoblastoma komponensre az embrionális szubtypussal összehasonlítva (Kiss és mtsai 1998, Halasz és mtsai 2006).

2.1.4. Szövettani felosztás

A HB diagnosztikájában és osztályozásában a szövettani vizsgálat alapvető fontosságú. Ez részben azért fontos, hogy elkülöníthető legyen egymástól a HB és a gyerekkori HCC, másrészt pedig a különböző szövettani típusok más-más prognózissal társulnak. A daganatot epiteliális, kevert, valamint nem osztályozható szövettani csoportokra oszthatjuk (Zimmermann 2005, Czauderna és mtsai 2014). Az epiteliális a leggyakoribb típus, mely az esetek 60%-ban fordul elő (Barwad és mtsai 2013). Ezt a típust fetális, embrionális, makrotrabekuláris, kis sejtes differenciálatlan és kolangioblasztikus szubtypusokra oszthatjuk (Zimmermann 2005, Czauderna és mtsai 2014). A hepatoblastoma HE festés alapján történő szövettani felosztását a 1. táblázat mutatja.

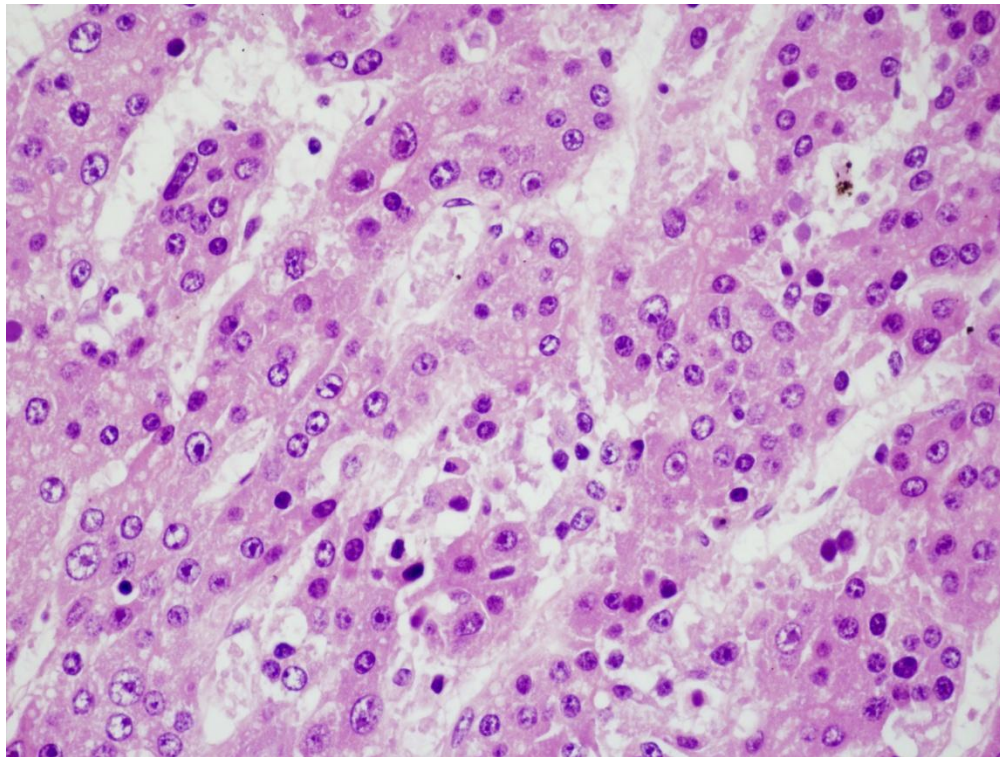
1. táblázat: A hepatoblastoma szövettani klasszifikációja (Czauderna és mtsai 2014)

EPITELIÁLIS TÍPUS
- fetális szubtypus - embrionális szubtypus - makrotrabekuláris szubtypus - kis sejtes differenciálatlan szubtypus -kolangioblasztikus szubtypus
KEVERT TÍPUS
- teratoid elemeket tartalmazó szubtypus - teratoid elemeket nem tartalmazó szubtypus
NEM OSZTÁLYOZHATÓ TÍPUSOK

▪ EPITELIÁLIS SZÖVETTANI TÍPUS

Fetális szubtypus

A tisztán fetális szubtypust kötegekbe, lapokba vagy trabekulákba rendeződött sejtek jellemzik, középen elhelyezkedő kis kerek sejtmaggal, sok citoplazmával és jól elkülönülő sejtmembránnal (Lopez-Terrada és mtsai 2012). A sejtek fetális hepatocitákra hasonlítanak, változó mennyiségű lipidet illetve glikogént tartalmazhatnak. Az utóbbi mennyiségétől a citoplazma többnyire világos, eozinofil (1. ábra) (Lopez-Terrada és Zimmermann 2012). Alacsony mitotikus aktivitással (≤ 2 mitózis) a fetális típus a legkedvezőbb prognózisú (Adesina és mtsai 2009).

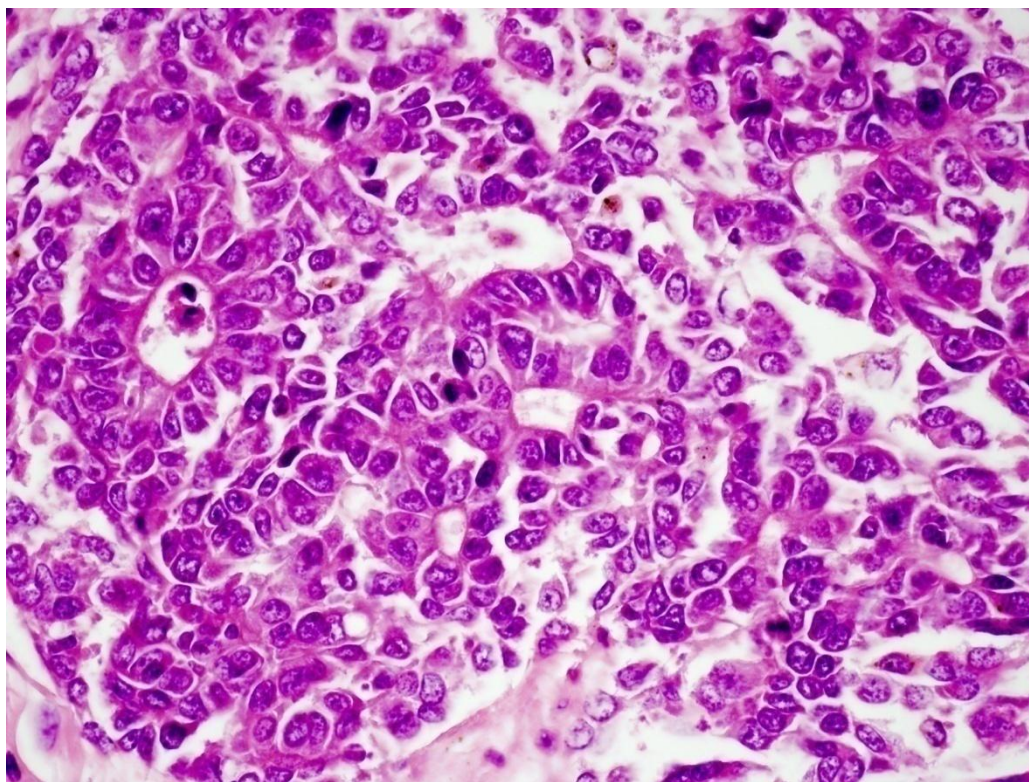


1. ábra: A hepatoblastoma fetális szubtypusának szövettani képe

A tumor eozinofilen festődő tumorsejtekből áll, melyek nagyon hasonlítanak a normál májsejtekhez. (HE, 600x)

Embrionális szubtypus

Az embrionális szubtypus sejtjei bazofil festődésűek, elongált, ovoid alakúak, sejtmagjai hosszúkásak és viszonylag nagyok, a sejtek kevés citoplazmát tartalmaznak. A 10-15 µm átmérőjű tumorsejtek (Czauderna és mtsai 2014) gyakran úgynevezett pszeudorezottákba tömörülnek, ami nem más, mint egy szűk lument körbevevő szabálytalan alakú struktúra (2. ábra). Mivel a sejtek nagyon hasonlítanak az ún. blastema sejtekhez, a HE festés alapján nehéz elkülöníteni a „kis, kerek, kék sejtes” daganatoktól, mint pl. a nefroblasztóma, neuroblasztóma, rabdomioszarkóma illetve a limfóma. A fetális és az embrionális komponens gyakran keveredik egymással, de legtöbbször a két komponens egymástól jól elkülönülten csoportokba vagy mezőkbe rendeződik.



2. ábra: A hepatoblastoma embrionális szubtypusának szövettani képe

A tumorsejtek pszeudorozettákat képeznek. (HE, 600x)

Makrotrabekuláris szubtypus

Gonzalez-Crussi és munkatársai írták le először ezt a ritka variánst, mely a hepatoblastomák 3%-ában fordul elő (Lopez-Terrada és Zimmermann 2012). A makrotrabekuláris területek sejtei lehetnek embrionálisak és/vagy fetálisak (Czauderna és mtsai 2014) vagy nagyon hasonlíthatnak a felnőttkori májtumorra, a HCC-re (Lopez-Terrada és Zimmermann 2012). A makrotrabekuláris csoporton belül, a tumort alkotó sejtek alapján megkülönböztethetünk makrotrabekuláris hepatoblastoma 1 (MT-1) és makrotrabekuláris hepatoblastoma 2 (MT-2) csoportokat. Az MT-1 hepatocitákból, illetve HCC-s tumorsejtekre nagyon hasonlító sejtekből, míg az MT-2 embrionális vagy fetális sejtekből áll. Az MT-1-es csoport áll legközelebb a HCC-hez, ennek a prognózisa is rosszabb (Zimmermann 2005).

Kis sejt differenciálatlan szubtypus

Ez a szövettani szubtypus monomorf 5-10 µm átmérőjű sejtekkel, kerek vagy ovális sejtmagokkal, kevés citoplazmával és magas mitotikus aránnyal jellemezhető (Barwad és mtsai 2013, Czauderna és mtsai 2014), előfordulása rossz prognózissal társított (Brotto és mtsai 2002, Adesina és mtsai 2009). Túlsúlyban vannak a kerek vagy tojás alakú sejtek, de néhol megjelennek orsó vagy csillag alakú sejtek is a mucoid mátrixban (Zimmermann 2005).

Kolangioblasztikus szubtypus

Olyan epiteliális HB szubtypus, melyben a periférián a tumornodulus körül atípusos kolangiocita-szerű sejtek vékony szegélye látható, melyek többnyire dupla réteget alkotnak. A sejtek nagyobbak, mint az embrionális vagy fetális szubtypus sejtei, alakjukat tekintve nyúltabbak, néha oszloposak (Zimmermann 2002).

▪ KEVERT TÍPUS

A kevert típus az epiteliális elemeken kívül neoplasztikus mezenhimális elemeket is tartalmaz, így gyakran találunk benne oszteoid és/vagy kondroitikus elemeket, továbbá társulhat kalcifikációval, vérzéssel és nekrozissal (Barwad és mtsai 2013). Oszteoid képződés a kemoterápiás kezelés után is megfigyelhető (Saxena és mtsai 1993). A mezenhimális elemek megjelenésük alapján lehetnek teratoidak és nem-teratoidak (neurális, melanocitás, intesztinális, rabdomioblasztoid).

▪ NEM OSZTÁLYOZHATÓ (EGYÉB) HB TÍPUSOK

Fontos megemlíteni a tranzicionális májsejtes tumort (TLCT) mely magas AFP szinttel jellemezhető, agresszív, malignus daganat (Zimmermann 2005). Ez a tumor átmenetet képvisel a HB és a HCC között, főként idősebb gyermekeknél és fiatal felnőttekben fordul elő (Prokurat és mtsai 2002).

2.1.5. Kezelés

A kezelést megelőző tumorterjedelem ún. Pre-Treatment Extension of Disease (PRETEXT) rendszer segítségével meghatározható a tumor sebészeti rezekálhatósága, illetve azon tumorok azonosítása, melyek extrém rezekciót illetve májtranszplantációt igényelnek (Agarwala 2012). A rendszer magában foglalja a lokalizációt, a véna és az extraabdominális érintettséget valamint a metasztázisokat is (Agarwala 2012). Amennyiben a tumor komplett rezekciója jön szóba, úgy a túlélés esélye is jelentősen emelkedik. A legtöbb esetben a tumor műtéti úton való eltávolítását megelőzi a kemoterápia (Agarwala 2012). A Gyermekkori Májtumorkok Nemzetközi Stratégiai Csoportja (SIOPEL) ajánlása ezzel megegyezik, ellentétben a japán és német Gyermek Onkológiai Csoportjával (COG), akik a tumor sebészeti eltávolítását javasolják először, továbbá a kemoterápia megkezdésére a tumor stádium besorolása (staging) után kerül sor (Allan és mtsai 2013). Európa több országához hasonlóan

Magyarországon a SIOPEL protokoll szerint történik a hepatoblastomás gyerekek kezelése.

2.1.6. Túlélés

A tumorterjedelem miatt a HB-k 67%-a nem alkalmas műtéti eltávolításra, ezért, ahogy korábban is említésre került, kemoterápiás kezelés elkezdése javasolt, mely javítja a prognózist (Brotto és Finegold 2002). Ennek tudható be az a tény, hogy az elmúlt évtizedekben a túlélés szignifikánsan javult (Semeraro és mtsai 2013). A HB-s betegek 5 éves túlélése 74% (Spector és Birch 2012), azonban az esetek 20%-ban távoli metasztázis alakul ki, ezek többsége a tüdőben (Agarwala 2012).

2.2. mikroRNS-ek

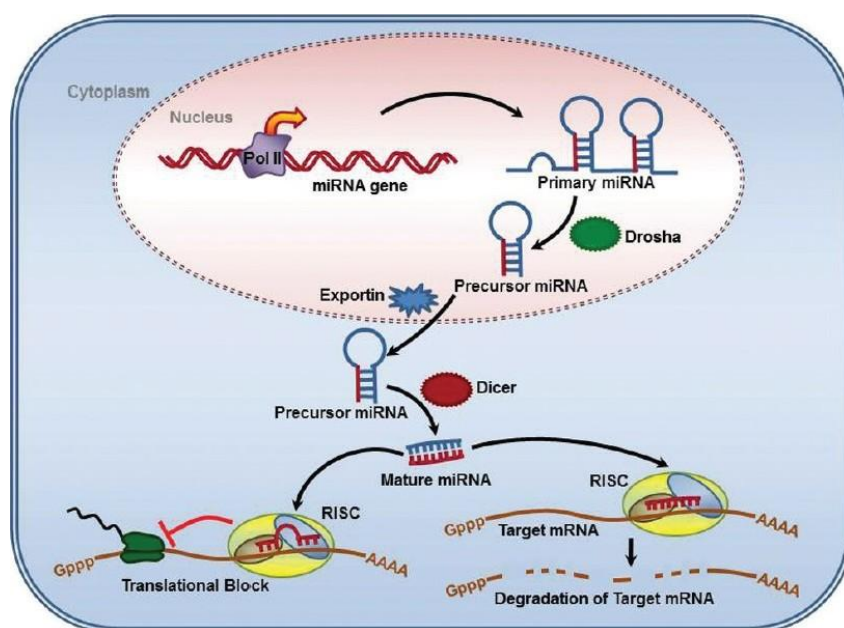
A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, 18-25 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS-ek, amelyek univerzálisan expresszálódnak a gerinces és gerinctelen állati, gomba és növényi szervezetek sejtjeiben (Salvi és mtsai 2013). Az első miRNS-t, a *lin-4*-et, mely a *Caenorhabditis elegans* egyedfejlődésének kontrolljában játszik szerepet, Lee és munkatársai írták le 1993-ban (Lee és mtsai 1993). Ekkor még úgy tűnt, hogy egy fonálféreg-különlegességgel állnak szemben, de amikor 2000-ben ugyanebben a fonálféregben egy újabb miRNS-re bukkantak (*let-7*, sejt differenciációt és egyedfejlődést szabályoz), mely szekvenciáját gerincesekben is megtalálták, elkezdtek felismerni, hogy a leírt új RNS molekuláknak fontos szerepük van a biológiai folyamatok humán vonatkozásban is.

A miRNS-ek a génexpresszió szabályozásában vesznek részt poszt-transzkripció szinten azáltal, hogy a cél messenger RNS (mRNS) 3' nem kódoló (UTR) részéhez kötődve befolyásolják a transzláció folyamatát (Zhang és mtsai 2013). A tapasztalatok azt mutatják, hogy ezt a folyamatot a miR szekvenciája szabályozza aszerint, hogy milyen mértékben komplementer a cél-mRNS szekvenciájával. Ha a két szekvencia teljes mértékben komplementer, az előidézi az mRNS elbomlását, részleges komplementeritás esetén viszont a transzláció fizikai gátlása érvényesül (Faller és mtsai 2008, Filipowicz és mtsai 2008, Joshi és mtsai 2011) (3. ábra). A részleges komplementeritás azt jelenti, hogy a miR egy úgynevezett magrégiója (seed region) vesz részt a kötésben, mely az emlősök miRNS-ére nézve általános érvényű. Ez egy 6-8 nukleotid hosszú szakasz a miRNS 5' végén lévő 1-8. nukleotidja között, amelyhez ettől 1-5 nukleotid távolságra egy újabb, 3-4 nukleotid hosszú kiegészítő kötőhely csatlakozhat a miRNS 13-16. nukleotidja között, amely erősíti a miRNS hatékonyságát (Bartel 2009). A részleges komplementeritás következtében egy miRNS akár több száz különféle cél-mRNS molekulához is kötődhet, ugyanakkor több száz különféle miRNS kötőhely található egy mRNS 3' UTR részén, sőt egy miRNS-nek akár többszörös kötőhelye is lehet ugyanazon cél-mRNS 3' UTR részén. Ez jelentősen megnehezíti a génműködés miRNS-ek általi szabályozásának megértését.

A hivatalos mikroRNS adatbázisban, a miRBase-ben jelenleg 2588 érett és 1881 prekursor regisztrált humán mikroRNS található (miRBase 2014), mely szám a jövőben valószínűleg tovább emelkedik majd.

2.2.1. Biogenezis

A miRNS gének önálló transzkripciók egységeiben találhatóak a genomban, míg másoké a gének fehérjét nem kódoló régióiban, az intronokban bújnak meg. A transzkripció során első lépésében az RNS-polimeráz egy úgynevezett elsődleges mikroRNS-t (pri-miRNS) készít, amely az mRNS-hez hasonlóan 5' sapkával és 3' polyadenosine farokkal, viszont hajtú struktúrával rendelkezik. Ez a pri-miRNS a Drosha (RNase III enzim) által elhasítódik a sejtmagban, melynek eredményeként egy 70 nukleotid nagyságú hajtú alakú úgynevezett prekursor (pre-miRNS) mikroRNS keletkezik. Ez a pre-miRNS aztán a Ran-GTP-áz fehérje segítségével a citoplazmába exportálódik. Itt a Dicer nevű, szintén RNase III típusú enzim hasítja tovább, mely egy duplaszálú, körülbelül 22 nukleotid hosszúságú érett miRNS-t eredményez. Helikázaktivitás hatására egyláncúvá bomlik és az RNS-indukált csendesítő komplexben (RISC) a cél mRNS-hez kötődve kifejti a poszttranszkripciók gátlást (3. ábra) (Tombol és mtsai 2007, Joshi és mtsai 2011, Gomes és mtsai 2013).



3. ábra: A mikroRNS-ek biogenezise (Joshi és mtsai 2011)

2.2.2. Biológiai folyamatokban betöltött szerep

A mikroRNS-ek által szabályozott gének számos életműködésekkel kapcsolatos biológia folyamatot szabályoznak, mint például az egyedfejlődés pontos időbeli lefolyása, sejtdifferenciáció, proliferáció, apoptózis vagy a jelátviteli utak expressziója (Utsunomiya és mtsai 2013, Zhang és mtsai 2013); így szerepet játszanak betegségek, elsősorban daganatok kialakulásában és progressziójában. miRNS-ek diszregulációját humán betegségek széles körében leírták, mint például keringési rendellenességek, metabolikus zavarok, neurodegeneratív- és autoimmun betegségek (Salvi és mtsai 2013, Zhang és mtsai 2013). Felvetődött, hogy a jelentős mértékben megváltozott expressziójú miRNS-ek a tumorok diagnózisa és prognózisa szempontjából biomarkerként számításba jöhetnek (Rong és mtsai 2013), sőt mivel miRNS-ek kimutathatóak szérumból is, az expressziós szintjükben mért változás diagnosztikus értékű lehet (Borel és mtsai 2012). A miRNS-ek génekre kifejtett hatása szerint beszélhetünk onkogén hatású és tumorszupresszorként viselkedő miRNS-ekről, ezáltal a molekuláris rákterápia célpontjaivá is válhatnak (Rong és mtsai 2013). Egészséges állapothoz képest a növekvő expressziójú miRNS-ek (úgynevezett onkomiR-ek) a tumorszupresszor gének csökkent kifejeződését eredményezik, így a sejt pl. kikerül a sejtciklus progressziójának gátlása alól, ugyanakkor a csökkent expressziójú (tumorszupresszor hatású) miRNS-ek az onkogének fokozott expressziójához vezetnek és így a proliferáció serkentése által tumornövekedést idézhetnek elő (Shenouda és mtsai 2009, Ranji és mtsai 2013).

2.2.3. Szerep a májbetegségekben és hepatokarcinogenezisben

A miRNS profil meghatározások alapján úgy tűnik, hogy mind az egészséges, mind a beteg szövetekre sajátos miRNS expressziós mintázat jellemző (Liang és mtsai 2007, Rosenfeld és mtsai 2008). Leírtak szövet-karakterisztikus miRNS-eket, mint amilyen májszövet esetén például a miR-122. Egészséges májban további miRNS-eket találtak, amelyek expressziós szintje szintén magas: pl. miR-192, miR-194, miR-199a és let-7a (Chen 2009). A májbetegségekben ezzel szemben jelentősen emelkedett vagy csökkent expressziójú miRNS-eket írtak le az egészséges vagy tumor körüli májszövethez képest.

Fibrózisban csökkent miR-29 és emelkedett miR-27 szintet találtak a csillagsejtek aktivált állapotával összefüggésben (Ji és mtsai 2009, Kwiecinski és mtsai 2011). Vírus okozta krónikus hepatitisz fertőzésben a vírusetiológiától függetlenül emelkedett miR-21-, miR-221-, miR-222- és csökkent miR-122-, miR-199-, miR-200-szintet találtak, ugyanakkor 19 miRNS esetén expressziós különbséget mértek HBV- és HCV-pozitív (krónikus hepatitiszt és HCC-t is beleértve) betegségcsoportok között (Ura és mtsai 2009, Elamin és mtsai 2011). Cirrózis és cirrózis talaján kialakult HCC között 35 eltérő expressziójú miRNS-t figyeltek meg és a HCC-k 83%-ában fokozott miR-221, 70%-ában alulszabályozott let-7a és miR-122 volt jelen a cirrhotikus szövetpárhoz képest (Gramantieri és mtsai 2007). Munkacsoportunk emelkedett miR-221- és miR-222-szintet talált tumor körüli cirrhotikus májmintákban és HCC-ben, valamint csökkent miR-18a-, miR-21- és miR-222-szintet fokális noduláris hiperpláziában HCC-vel szemben (nem publikált adat). A miRNS-ek diszregulációja valószínűleg fontos szerepet tölt be a HCC kialakulásában, mivel az eltérő expressziójú miRNS-ek között találunk számos pro-angiogén (pl. miR-221), anti-angiogén (pl. miR-122, miR-214) hatású vagy pro-metasztatikus (pl. miR-210) illetve anti-metasztatikus (pl. miR-122) funkciójú miRNS-t (Wang és mtsai 2013), melyek expressziója a tumorigenikus vagy anti-tumorigenikus hatásuknak megfelelően emelkedik vagy csökken HCC-ben (Utsunomiya és mtsai 2013).

2.2.4. A hepatoblastomában vizsgált mikroRNS-ek bemutatása

Kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy hogyan változik a mikroRNS-ek expressziós szintje hepatoblastomában, de néhány közleményben beszámoltak a miR expressziós szintek változásáról a környező szövethez, normál májhoz vagy HCC-hez képest, (Magrelli és mtsai 2009, Cairo és mtsai 2010, von Frowein és mtsai 2011), azonban a különböző HB szövettani típusok miR-expressziós profilját eddig még senki nem vizsgálta. Mivel a hepatoblastomában előforduló változó expressziót mutató miRNS-ekről kevés adat áll rendelkezésre, ezért irodalmi adatok alapján kiválasztottuk azokat a miRNS-eket (2. táblázat), amelyek HCC-s szövetekben magasan vagy alacsonyan expresszálódnak a környező, tumormentes szövethez képest, illetve ismert onkogén illetve tumorszupresszor hatásuk (Gramantieri és mtsai 2007, Wong és mtsai 2008, Liu

és mtsai 2009, Pineau és mtsai 2010, Wong és mtsai 2010, Fu és mtsai 2011, Yang és mtsai 2011, Chen és mtsai 2012, Chen és mtsai 2012, Li és mtsai 2012, Wang és mtsai 2012, Yang és mtsai 2012, Karakatsanis és mtsai 2013, Wang és mtsai 2013).

2. táblázat: Az általunk vizsgált mikroRNS-ek lokalizációja és funkciója

mikroRNS	Kromoszóma lokalizáció	Funkció	Referencia
miR-17-5p	13q31.3	onkogén	(Tao és mtsai 2012)
miR-18a	13q31.3	valószínűleg onkogén	(Tao és mtsai 2012)
miR-21	17q23.1	onkogén	(Karakatsanis és mtsai 2013)
miR-34a	1p36.22	valószínűleg tumorsupresszor	(Chen és mtsai 2013)
miR-96	7q32.2	onkogén	(Varnholt és mtsai 2008, Chen és mtsai 2012, Xu és mtsai 2013)
miR-122	18q21.31	májkarakterisztikus, tumorsupresszor	(Wong és mtsai 2011)
miR-140	16q22.1	tumorsupresszor, kutatásunkban referencia	(Yuan és mtsai 2013)
miR-181a	1q32.1	tumorsupresszor/onkogén	(Shin és mtsai 2011, Zhang és mtsai 2012)
miR-195	17p.13.1	tumorsupresszor	(Xu és mtsai 2009)
miR-210	11p15.5	onkogén	(Yang és mtsai 2012)
miR-214	1q24.3	tumorsupresszor	(Shih és mtsai 2012)
miR-221	Xp11.3	onkogén	(Park és mtsai 2011)
miR-222	Xp11.3	onkogén	(Karakatsanis és mtsai 2013)
miR-223	Xq12	tumorsupresszor	(Wong és mtsai 2008, Zhao és mtsai 2011)
miR-224	Xq28	onkogén	(Zhang és mtsai 2013)

A továbbiakban az általunk kiválasztott mikroRNS-ek részletes bemutatása következik.

miR-17-5p

A miR-17-5p egy, a DNS-en megtalálható több miRNS gént egymás közelségében tartalmazó úgynevezett miR-17-92 klaszter egyik fontos tagja a miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a és a miR-92-1 mellett (O'Day és mtsai 2010, Tao és mtsai 2012). A miR-17-92 overexpresszióját több tumorban leírták, például tüdőrákban, B-sejt limfómában, gyomorrákban és HCC-ben is (Yang és mtsai 2010). A miR-17-5p onkomiR szerepét *in vivo* és *in vitro* kísérletek támasztják alá, amelyek szerint fontos szerepet játszik a HCC sejtek proliferációjában és migrációjában (Yang és mtsai 2010). Ezzel ellentétes tapasztalat, hogy a miR-17-5p-nek tumorszupresszor hatása is lehet, ugyanis az emlőrák tumorsejtjeinek proliferációját gátolta a Ciklin D1 (CCND1) fehérje szintjének csökkentésével (O'Day és Lal 2010).

miR-18a

Az onkogén hatású miR-17-92 klaszter tagja (Yang és mtsai 2010, Tao és mtsai 2012), normál szövetekhez képest szignifikánsan emelkedett szintjét találták gyomor-, hasnyálmirigy-, máj- és vastagbél-daganatban, mely utóbbiban a magas miR-18a expresszió rosszabb prognózissal társult (Morimura és mtsai 2011). Ugyanakkor T24 húgyhólyagrak sejtvonalban tumorszupresszor funkciójú miR-ként írták le (Tao és mtsai 2012). HBV fertőzésen átesett HCC-s betegek szérumában pedig szignifikánsan emelkedett értéket mutatott a normál, egészséges szérumhoz képest (Li és mtsai 2012).

miR-21

Expresszióját több szolid tumorban is kimutatták, úgy mint HCC, vastagbél- illetve hasnyálmirigy-daganat (Kadera és mtsai 2013). Ennek a miRNS-nek onkogén funkciót tulajdonítanak, ugyanis feltételezhetően több tumorszupresszor is a célgénjei közé tartozik, mint pl. programozott sejthalál 4 (PDCD4), reverzió indukáló ciszteinben gazdag fehérje (RECK), Ras-sal homológ géncsalád B tagja (RHOB), metallopeptidáz inhibitor 3 (TIMP3) vagy a foszfát és tenzin homológ (PTEN). Expressziós szintje a

tumorprogresszió során növekszik májszövet → cirrózis → HCC irányban (Pineau és mtsai 2010). A szérumból kimutatott miR-21 alkalmas a máj nekroinflammatorikus aktivitásának kimutatására is (Karakatsanis és mtsai 2013).

miR-34a

A miR-34 család három tagjának: miR-34a, miR-34b és miR-34c proliferációt gátló és apoptózist indukáló hatása van, amelyek expresszióját közvetlenül a p53 fehérje indukálja. Célgénjei között pedig az E2F transzkripciós faktor 3 (E2F3), B sejt limfóma 2 (BCL-2), mielocitomatózis virális onkogén homológ (c-Myc), ciklin-dependens kináz 4 (CDK4) találhatóak (Bommer és mtsai 2007, Javeri és mtsai 2013). A három tag közül a miR-34a tűnik a legfontosabbnak, amelyet a tumor protein 53 (p53) indukál. A tumoros szövetekben alacsonyabb szintet detektáltak normál szövethez képest máj- (Yang és mtsai 2011) és vastagbélrák esetén (Roy és mtsai 2012). Vad típusú emlőrákok 40%-ban szintén alacsonyabb miR-34a expressziót találtak (Javeri és mtsai 2013). Ugyanakkor a tumorprogresszióval növekvő expressziós szintet mértek májszövet → cirrózis → HCC irányban (Pineau és mtsai 2010).

miR-96

A miR-96 expressziós szint emelkedett értéket mutatott krónikus mieloid leukémiában, emlő-, vastagbél-, végbél- valamint májdaganatban a normál szövethez képest. Mindazonáltal *in vitro* kísérletek kimutatták, hogy akadályozott miR-96 expresszió visszafogta a magasan metasztatikus HCC sejtek invázióját (Chen és mtsai 2012).

miR-122

A normál máj miRNS készletének mintegy 70%-át a miR-122 teszi ki (Lagos-Quintana és mtsai 2002, Wong és mtsai 2011), egyetlen májsejt akár 66000 miR-122 kópiát is tartalmazhat (Bai és mtsai 2009). Fontos szabályozó szerepe van a zsír- és koleszterinanyagcserében (Hu és mtsai 2012), hatása a többi miRNS-től eltérően pozitív, melyet valószínűleg közvetett úton fejt ki és a miR-122 ezirányú target mRNS-

eit még nem sikerült megtalálni. Kísérletesen igazolták, hogy HCC-ben alulexpresszálódik és ismeretes tumorszupresszor funkciója is, miszerint Ciklin G1 leszabályozásával a p53 transzkripció aktivitását emeli (Wong és mtsai 2011). *In vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy a miR-122 stimulálja a HCV replikációját (Jopling 2008, Lendvai és mtsai 2012), amely a további vizsgálatok alapján abból ered, hogy a HCV genom 5' UTR régióján a miR-122 bekötődés védi a vírusgenomot az exonukleázokkal szemben (Shimakami és mtsai 2012).

miR-140

A miR-140-et olyan tumorok fejlődésével és progressziójával hozták összefüggésbe, mint pl. oszteoszarkóma, emlő- és vastagbél-daganat, HCC. Ezekből a vizsgálatokból a miR-140 tumorszupresszor funkciójára következtetnek többek között azért, mert a miR-140 overexpressziója jelentősen csökkentette a sejtnvázit *in vitro* illetve a metasztázist *in vivo* nem-kissejtes tüdő-tumor esetén (Yuan és mtsai 2013). Máj-szövet esetén referencia miRNS-ként is ismeretes (Varnholt és mtsai 2008).

miR-181a

A miR-181 család mind a 4 tagja (miR-181a, miR-181b, miR-181c és miR-181d) magasan expresszált embrionális májban és izolált máj őssejtekben az érett hepatocitákkal szemben. Hasonlót észleltek máj-őssejt jellegű HCC-ben az érett-hepatocita jellegű HCC-vel összehasonlítva (Ji és mtsai 2009). A miR-181a szerepet játszik a sejt-differenciáció modulációjában, ezenkívül onkogén és tumorszupresszor funkciói is ismeretesek a tumor lokalizációjától függően, valamint deregulációja hozzájárul emlő- illetve száj-daganat metasztázisainak kialakulásához (He és mtsai 2013). HCC sejtvonalak 50%-ában magasan expresszált miR-181a-t találtak (Wong és mtsai 2008), míg HCC-s szövetmintákban expressziója alacsonyabbnak bizonyult cirrózishoz képest (Gramantieri és mtsai 2007).

miR-195

A miR-195, mint a legtöbb tumor típusban, így HCC-ben is csökkent expressziós szintet mutat az egészséges szövethez képest. Több tanulmány növekedés-gátló funkciót tulajdonít ennek a miRNS-nek, mivel különböző célmolekulái (CCND1/3, CDK4/6, E2F3) által blokkolja a sejtciklus G1/S fázis átmenetét (Xu és mtsai 2009), ezen kívül apoptózist indukál a BCL2 és B sejt limfóma 2-szerű (BCL-w) gének expressziójának csökkentésével. HCC-ben gátolta az angiogenezist, ugyanis a miR-195 egyik közvetlen célgénje a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) (Wang és mtsai 2013).

miR-210

Hepatokarcinogenezis során a miR-210 expresszió növekedését figyelték meg cirrózisban normális szövethez képest valamint HCC-ben cirrózishoz (Pineau és mtsai 2010), illetve a tumort környező májszövethez képest (Su és mtsai 2009, Lendvai és mtsai 2012). HCC-ben valószínűleg a hypoxia által indukált metasztázisban van szerepe (Ying és mtsai 2011).

miR-214

A miR-214 overexpresszálódik HB-ban a normál szövethez viszonyítva (Magrelli és mtsai 2009), HCC-ben alacsonyabb expressziót mutatott cirrózishoz (Gramantieri és mtsai 2007) és tumor körüli májhoz képest (Wang és mtsai 2008). Valószínűsíthetően tumorszupresszor funkciót lát el HCC-ben, mivel alacsony expressziója magasabb kiújulással és rosszabb prognózissal társítható és ezzel összefüggésben azt találták, hogy az alacsony miR-214-szint hepatoma eredetű növekedési faktor (HDGF) expressziót és szekréciót indukál, amely vaszkuláris endotélsejtek stimulációjával angiogenezist és tumornövekedést eredményezett *in vivo* (Shih és mtsai 2012). Magasan expresszált miR-214-szintet írtak le petefészek-, gyomor-, hasnyálmirigy-, méhnyak-, tüdő-, és szájnyálkahártya-daganatokban valamint malignus melanómában (Yang és mtsai 2008, Ueda és mtsai 2010, Penna és mtsai 2011, Shih és mtsai 2012).

miR-221 és miR-222

A miR-221 kevesebb, mint 10 kb távolságra található a miR-222-től az X kromoszómán, melyeknek valószínűleg közös a promóter régiójuk (Garofalo és mtsai 2009, Yang és mtsai 2011), ezért ezen onkomiR-ek célgénjei is sokszor hasonlóak (pl. PTEN és TIMP3). Ezen gének eliminálása miatt a sejtek apoptózisra kevésbé, míg migrációra, invázióra erősen fogékonyá válnak. A tumorsejtek proliferációját azáltal is elősegítik, hogy elnyomják a ciklin-dependens kináz inhibitorokat (CDKN1B/p27 és CDKN1C/p57), kiütve ezáltal a sejtciklus progressziójának két fontos szabályozóját (Ogawa és mtsai 2012). Mindkét miRNS expressziója növekedett a tumorprogresszióval májszövet → cirrózis → HCC irányban (Pineau és mtsai 2010). Megfigyelték továbbá, hogy miR-221 szintje korrelált a cirrózis jelenlétével, a tumor stádiumával és a rosszabb prognózissal HCC-ben (Karakatsanis és mtsai 2013). A szérumban mért miR-221-szint jelentősen magasabbnak bizonyult és rövidebb túléléssel társult (Li és mtsai 2011), viszont a miR-221/222 expressziója intrahepatikus epeúti tumorokban csökkent (Karakatsanis és mtsai 2013). Ezen túlmenően májfibrózisban a miR221/222 expresszió szignifikánsan magasabbnak mutatkozott súlyos fibrózisban (F4), enyhe fibrózissal (F1) szemben és szintjük korrelált az I. típusú kollagén mRNS szintjével is, jelezve így a csillagsejtek aktivációját (Ogawa és mtsai 2012).

miR-223

Alacsonyabb miR-223 expressziós szintet találtak HCC-ben normál májhoz (Karakatsanis és mtsai 2013), krónikus vírus hepatitiszhez (Ura és mtsai 2009) valamint cirrózishoz képest (Jiang és mtsai 2008). Ezzel szemben emelkedett miR-223 expressziós szintet mutattak ki HCC-s betegek szérumában egészségesekéhez viszonyítva (Xu és mtsai 2011). Továbbá szintén emelkedett miR-223-szintet mértek intrahepatikus epeúti daganatokban (Karakatsanis és mtsai 2013).

miR-224

Tumorprogresszió során a miR-224 expresszió növekedését tapasztalták normális májszövethez képest cirrózisban és HCC-ben cirrózishoz képest (Pineau és mtsai 2010), továbbá a tumort környező májszövethez képest (Murakami és mtsai 2006). Szintje magasabbnak bizonyult normális májszövethez viszonyítva benignus (hepatocelluláris adenoma és fokális noduláris hiperplázia) és malignus májváltozásokban normális → benignus → malignus irányban (Ladeiro és mtsai 2008). Munkacsoportunk szintén emelkedett expressziót talált szteatotikus krónikus HCV pozitív májszövetben egészséges és nem szteatotikus krónikus HCV pozitív májszövethez képest (Lendvai és mtsai, közlésre benyújtott kézirat), illetve a miR-224 szint korrelációt mutatott fibrózis súlyosságával különböző etiológiájú fibrotikus májszövetekben (Halász és mtsai, közlésre benyújtott kézirat). A miR-224 onkogén miRNS, amely az eddig azonosított célgénnek elnyomása összefüggésbe hozható a sejtproliferáció, migráció, invázió (Zhang és mtsai 2013, Li és mtsai 2014), illetve a tumornekrózis faktor α (TNF α) gyulladású út vonal aktiválódásával (Scisciani és mtsai 2012).

2.2.5. mikroRNS célgén predikció

Mivel a miRNS-ek cél-mRNS-hez kötődésének nem feltétele a teljes mértékű komplementaritás, valamint a kötésben résztvevő magrégiót változó számú nukleotid alkothatja, ezért nehéz megjósolni, hogy adott miRNS-nek melyek is a cél-mRNS-ei és hogy valójában mely gének expresszióját is befolyásolja. A miRNS és cél-mRNS közötti kötődés létrejötte sejtkultúrákon oly módon vizsgálható, hogy az mRNS 3' UTR részét riporterfehérjéhez (luciferáz vagy zöld fluoreszkáló fehérje – GFP) kapcsolva plazmidként bejuttatják a sejtekbe, majd a vizsgálandó miRNS-t is hozzáadva a valóságos miRNS-mRNS kötődés következményeként a riporterfehérje expressziójának csökkenését mérik. A nagyszámú cél-mRNS okán ezek a vizsgálatok időigényesek, ezért bioinformatikai algoritmusokat fejlesztettek ki, amelyek segítségével lehetővé vált a cél-mRNS-ek *in silico* prediktálása. Természetesen ez a kísérletes úton történő validálást nem váltja ki, de nagymértékben segíthet lecsökkenti a lehetséges cél-mRNS-ek számát, így a kötődés kísérletes validálásra is általában a predikciót követően

kerülhet sor. Az *in silico* algoritmusok egyrészt a miRNS magrégiójának (a miRNS 5' végén lévő 1-8. nukleotid komplementaritását veti össze az mRNS-ek 3' UTR szakaszával (pl. DIANA-microT, miRWalk, miRanda adatbázisok), de vannak a miRNS-mRNS kötést termodinamikailag tesztelő (pl. PITA) és a miRNS szekvencia evolúciós megtartottságát vizsgáló algoritmusok is, mint például miRanda és TargetScan, amelyek mindhárom szempont szerint keresik a miRNS-ek lehetséges cél-mRNS-eit (Dweep és mtsai 2013).

A fontosabb miRNS adatbázisok leírása és elérhetősége:

miRBase: általános miRNS információ (<http://www.mirbase.org>; (Hsu és mtsai 2011, Kozomara és mtsai 2011).

miRTarBase: validált miRNS-cél-mRNS kapcsolat (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>; (Hsu és mtsai 2011)

TarBase: validált miRNS-cél-mRNS kapcsolat (<http://www.microrna.gr/tarbase>; (Vergoulis és mtsai 2012)

miRanda: predikció komplementaritás, kötés szabad energiája, evolúciós megtartottság alapján (<http://www.microrna.org>; (Enright és mtsai 2003, John és mtsai 2004, Betel és mtsai 2008)

TargetScan: predikció magrégió komplementaritás, kötés szabad energiája, evolúciós megtartottság alapján (<http://www.targetscan.org>; (Lewis és mtsai 2003, Lewis és mtsai 2005)

DIANA-microT: predikció magrégió komplementaritás és termodinamika alapján, valamint evolúciós megtartottság szűrő (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT>; (Kiriakidou és mtsai 2004, Maragkakis és mtsai 2009)

miRWalk: predikció magrégió komplementaritás alapján, nem csak a 3' UTR-re korlátozva, hanem promóter, 5' UTR és kódoló régióra is kiterjesztve (<http://mirwalk.uni-hd.de>; (Dweep és mtsai 2011)

RNA22: predikció komplementaritás, mintázatfelismerés alapján (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>; (Miranda és mtsai 2006)

PicTar: predikció szinergizáló miRNS-ek által szabályozott 3' UTR kötőhelyek keresése alapján (<http://pictar.mdc-berlin.de>; (Krek és mtsai 2005, Lall és mtsai 2006)

PITA: predikció termodinamika, RNS másodlagos szerkezete alapján (<http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07>; (Kertész és mtsai 2007))

RNAhybrid: predikció termodinamika, RNS másodlagos szerkezete alapján (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>; (Rehmsmeier és mtsai 2004))

miR2Disease: miRNS-betegség kapcsolat (<http://www.mir2disease.org>; (Jiang és mtsai 2009))

Mivel egyelőre nem létezik olyan algoritmus, amelyik a kötéshez szükséges valamennyi szempontot figyelembe tudná venni, ezért a kutatók között bevett szokássá vált, hogy több algoritmus által prediktált cél-mRNS-ek metszetét veszik alapul (Megraw és mtsai 2007, Papagregoriou és mtsai 2012, Dweep és mtsai 2013). Többféle algoritmus használata segíthet ugyanis az álpozitív és álnegatív cél-mRNS-ek számának csökkentésében.

Az algoritmusok ingyenesen elérhetőek internetes alkalmazás formájában és legtöbbjük oda-vissza irányú keresést is megenged, vagyis egy miRNS lehetséges cél-mRNS-eit illetve az egy mRNS-hez feltételezhetően kötődő miRNS-eket is megkereshetjük.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A leggyakoribb gyermekkori malignus májdaganat a hepatoblastoma, melynek kialakulásában az ismert genetikai okok mellett még számos eddig ismeretlen tényező játszhat szerepet, mint pl. a miRNS-ek rendellenes expressziós szintje. Az irodalomban mindösszesen három munkacsoport vizsgálta a miRNS-ek eltérő expresszióját hepatoblastomában, agresszív fenotípusú hepatoblastomában illetve metasztatikus hepatoblastomában (Magrelli és mtsai 2009, Cairo és mtsai 2010, von Frowein és mtsai 2011). Munkánk során a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-34a, miR-96, miR-122, miR-140, miR-181a, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-223 és miR-224 mikroRNS-ek expressziós szintjének meghatározása hepatoblastomában, kiemelten az epiteliális szövettani altípusokban.
2. A hepatoblastomában észlelt miRNS eltérések összevetése a betegek túlélési adataival.
3. A túléléssel összefüggést mutató miRNS-ek közös célgénjeinek *in silico* feltérképezése.
4. A miRNS expresszió és β -catenin-szint korrelációjának vizsgálata hepatoblastomában.
5. A hepatoblastomában mért miRNS expresszió összevetése HCC-ben észlelt eltérésekkel irodalmi adatok alapján.

4. MÓDSZEREK

4.1. Betegadatok

A betegmintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének valamint az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének archívumában 1995-2010 között megtalálható hepatoblastoma esetekből választottuk. A formalin-fixált paraffinba ágyazott blokkokon végzett miRNS és immunhisztokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével végeztük (#192), a mintákat anonim módon kezeltük. A betegek a SIOPEL protokoll szerinti kezelésben részesültek, azaz a sebészeti rezekciót megelőzően ciszplatin vagy ciszdiamminedikloroplatinum (CDDP) vagy karboplatin és etopozid (CARBOP/VP) vagy karboplatin-etopozid-adriamicin (CARBOP-VP/ADR) kezelést kaptak. A vizsgálat lezárásának idején (2013. március) a 20-ból 5 beteg meghalt, 12 tumormentes volt, egy esetben távoli (tüdő) metasztázis és recidíva volt kimutatható, egy esetben recidíva továbbá egy betegnek volt recidíva nélküli metasztázisa. A betegek nem és kor szerinti megoszlását, valamint a recidívára, metasztázisra és elhalálózásra vonatkozó adatokat a 3. táblázatban (következő oldal) foglaltam össze.

4.2. Szövetminták

A rezekciós mintákat a rutin laboratóriumi protokoll szerint dolgoztuk fel. A 10%-os puffertolt formalinban történt 24 órás fixálást követően a mintákat paraffinba ágyaztuk. A szövettani értékeléshez 3-5 μ m-es metszeteket készítettünk és HE-nal megfestettük. Az általunk vizsgált hepatoblastoma tumorok epiteliális típusúnak bizonyultak 12 fetális és 8 embrionális típus megoszlásban, utóbbi csoportból 5 esetben csak embrionális területet, míg 3 esetben mind embrionális, mind fetális területet ki tudunk jelölni a makrodisszekcióhoz, így összesen 15 fetális, 8 embrionális illetve 15 tumorkörnyéki tumormentes májminta állt rendelkezésünkre. A vizsgált hepatoblastoma esetekből kapott mintákat a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: A vizsgált betegek adatai

Eset	Nem	Életkor (év)	Tumor komponens n=23		Tumor-környéki máj	Minta/Beteg	Meta-sztázis	Recidíva	Halál
1	f	0,36	F			1		Igen	Igen
2	n	1,44		E	NT	2			
3	f	10,14	F		NT	2		Igen	
4	f	5,14	F		NT	2	Tüdő	Igen	Igen
5	n	5,44	F		NT	2			
6	n	0,30	F		NT	2			
7	f	6,45	F		NT	2			
8	n	2,16	F	E		2			
9	f	3,12	F		NT	2			
10	f	2,40		E		1			
11	f	0,76	F		NT	2			
12	f	0,98	F		NT	2	Tüdő	Igen	
13	n	1,13	F	E		2			
14	f	7,66	F		NT	2			
15	n	4,76		E		1	Tüdő	Igen	Igen
16	n	15,82	F		NT	2	Tüdő	Igen	Igen
17	n	1,19		E	NT	2			
18	n	1,54	F		NT	2	Tüdő		
19	n	0,98		E	NT	2			
20	f	2,16	F	E	NT	3	Tüdő	Igen	Igen
Össz:	10f, 10n	átlag: 3,69	15	8	15	38	6	7	5

n: nő, f: férfi, F: fetális szubtypus, E: embrionális szubtypus, NT: tumorkörnyéki tumormentes máj

4.3. RNS izolálás

A metszetek HE festését követően jól látható volt az elkülönült embrionális és fetális komponens. Ezeket a területeket valamint a környező tumormentes májat kijelölve mikroszkópos ellenőrzés mellett történt a makrodisszekálás. A teljes RNS izolálás a tumorkomponens illetve környező máj méretétől függően 10-20 darab körülbelül 2µm-es natív metszetekből RNeasy FFPE mini kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország), a DNS emésztés Turbo DNase-zal (Ambion, Austin, TX) történt a gyártó által leírt protokollok alapján. A koncentráció meghatározása után a tisztított RNS-t -80°C-on tároltuk felhasználásig.

4.4. miRNS expressziós szint meghatározás

A HCC-ben leggyakrabban eltérő expressziót mutató 15 miRNS (Varnholt 2008, Pineau és mtsai 2010, Karakatsanis és mtsai 2013) expressziós szintjét TaqMan MicroRNA Assay-vel (Applied Biosystems, Foster City, CA) valós idejű PCR-en alapuló módszerrel mértük meg. A miRNS-eket és az alkalmazott assay azonosítókat az 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ek és a hozzájuk rendelt assay azonosítók (Applied Biosystems)

miRNS	Assay ID	mikroRNS	Assay ID
miR-17-5p	ID: 000393	miR-195	ID:000494
miR-18a	ID:002422	miR-210	ID:000512
miR-21	ID: 000397	miR-214	ID:002306
miR-34a	ID: 000426	miR-221	ID: 000524
miR-96	ID:000186	miR-222	ID:002276
miR-122	ID: 002245	miR-223	ID:002295
miR-140	ID:000462	miR-224	ID:002099
miR-181a	ID:000480	U6 snRNS*	ID:002099

*A relatív expresszió kiszámításához széles körben használt kicsi magi RNS (Furukawa és mtsai 2011).

4.4.1. Reverz transzkripció (RT)

Az RT reakciót TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével hajtottuk végre a gyártó előírásainak megfelelően 7,5 µl ösztérfogatban 10 ng teljes RNS-ből kiindulva.

4.4.2. Valós idejű PCR és relatív expresszió

A kvantitatív PCR-t TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA) felhasználásával végeztük szintén a gyártó utasításai szerint 10 µl össztérfogatban és 0,65 µl RT termék hozzáadásával. A reakciókat ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) készüléken futtattuk duplikátumban. A relatív expressziót a $2^{Cq(ref)-Cq(target)}$ képlettel számoltuk a miR-140-et véve referenciának, ugyanis a Normfinder (Andersen és mtsai 2004) alkalmazás szerint ez a miRNS bizonyult a legstabilabbnak az általánosan használt U6 snRNS-sel (Furukawa és mtsai 2011) szemben, továbbá a miR-140-et májszövet esetén már alkalmazták referenciaként (Varnholt és mtsai 2008).

4.5. miRNS célgének keresése *in silico*

A túlélési analízisben szignifikánsnak talált miRNS-ek potenciális célgénjeinek feltérképezését a miRanda (Betel és mtsai 2008) predikciós algoritmus alapján végeztük, mely a miRBase 15.0 adatbázissal dolgozik. A szignifikáns változást mutató miRNS-ek közös célgénjeinek kiválasztásához a kapott adatokat Microsoft Access-be importáltuk.

A közös célgének által érintett jelátviteli útvonalak analízisét a WebGestalt rendszer (Wang és mtsai 2013) segítségével végeztük a Benjamini-Hochberg módszer szerinti többszörös korrekciós teszt alapján. Az eredményt a $p < 0,01$ alatt fogadtuk el szignifikánsnak, a minimális génszám a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes rendszerben (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) 5-re lett beállítva.

4.6. Immunhisztokémia

4.6.1. Az *in silico* targetpredikció során meghatározott ZNF207 festése

Az immunreakciót formalin fixált paraffinba ágyazott blokkokból készített 3 µm vastag metszeteken végeztük a Novolink Polymer Detection System Kit (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) és ZNF207 ellenes antitest (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) segítségével. Deparaffinálást követően az antigén feltárására mikrohullámú sütőben került sor (TRIS-EDTA pufferben 2 perc 900 W, majd 30 perc 180 W). Desztillált vízes mosás után blokkoltuk az endogén peroxidázt (5 perc a Peroxidase Block reagenssel). PBS pufferben történt mosás (2 x 5 perc) után 0,4%-os kazein-PBS oldattal csökkentettük a nem specifikus hidrofób és ionos antitestkötődést (5 perc a Protein Block reagenssel). Újabb PBS pufferes mosás után (2 x 5 perc) ZNF207 antitesttel szobahőn inkubáltuk a mintákat 1:50 hígításban 60 percig. A PBS pufferben történt mosás (2 x 5 perc) után nyúl anti-egér IgG-vel inkubáltuk a mintákat (30 perc a Post Primary reagenssel). A PBS pufferes mosást követően újabb inkubálás következett anti-nyúl poli-torma-peroxidáz konjugált IgG-vel (30 perc a Novolink Polymer reagenssel). Majd újabb mosást (2 x 5 perc PBS-ben) követően DAB (diaminobenzidin) kromogénnel végeztük az előhívást (5 perc DAB Working Solution reagenssel). Desztillált vízzel öblítés után hematoxilinnal festettük a metszeteket. Pozitív kontrollként a gyártó ajánlása alapján humán mellékvesét használtunk. Az immunreakció lépéseit a 5. táblázatban (34. oldal) foglaltam össze.

4.6.2. Az immunreakciók értékelése

Az immunreakciókat szemikvantitatív módon értékeltük a következők szerint: 10 random módon kiválasztott 400x nagyítású látótérben 100 sejtet vizsgáltunk területenként. A pozitívan festődő sejtmagok százalékos arányát 0-5 pontig terjedő skálán adtuk meg a következő intervallumokkal: $\leq 5\%$ = 0 pont, 6-20% = 1 pont, 21-40% = 2 pont, 41-60% = 3 pont, 61-80% = 4 pont, 81-100% = 5 pont. A festődés intenzitását 0-3 pontos skálával állapítottuk meg az alábbiak szerint: nem festődött = 0 pont, gyenge = 1 pont, közepes = 2 pont, erős = 3 pont. Az immunreakció értékének az

intenzitás és a festődő sejtmagok százalékos arányának megfelelő pontérték szorzatát vettük és azt használtuk a statisztikai számításokhoz. (Pl. egy metszeten a sejtek 90%-a festődött erősen: $5 \times 3 = 15$ pont.)

4.7. Statisztikai módszerek

A mintákban mért relatív expresszió statisztikai összehasonlításához nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk. A hepatoblastoma minták ($n=23$) tumormentes környező májjal ($n=15$) történő összevetését Mann-Whitney U teszttel végeztük, míg a különböző epiteliális komponenseket (embrionális: $n=8$, fetális: $n=15$ tumorkörnyéki máj: $n=15$) Kruskal-Wallis ANOVA és medián teszttel vetettük össze. A teljes túlélést (OS, overall survival) és az eseménymentes túlélést (EFS, event free survival) Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk. A túlélési görbék összehasonlításához log-rank tesztet alkalmaztunk. A túlélési vizsgálatokhoz az adott miRNS relatív expressziós értékeinek mediánjához képest az egyes mintákat alacsony illetve magas csoportokba osztottuk. Az immunhisztokémiai és relatív miRNS expressziós értékek korrelációját a szintén nem-parametrikus Spearman rangsor teszttel végeztük. A statisztikai számításokhoz a STATISTICA szoftver 9.1 verzióját (Statsoft.Inc, Tulsa, OK) használtuk és a kapott tesztteredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak ha $p < 0,05$ teljesült.

5. táblázat: A ZNF207 ellenes antitesttel végzett IHC vizsgálat részletei

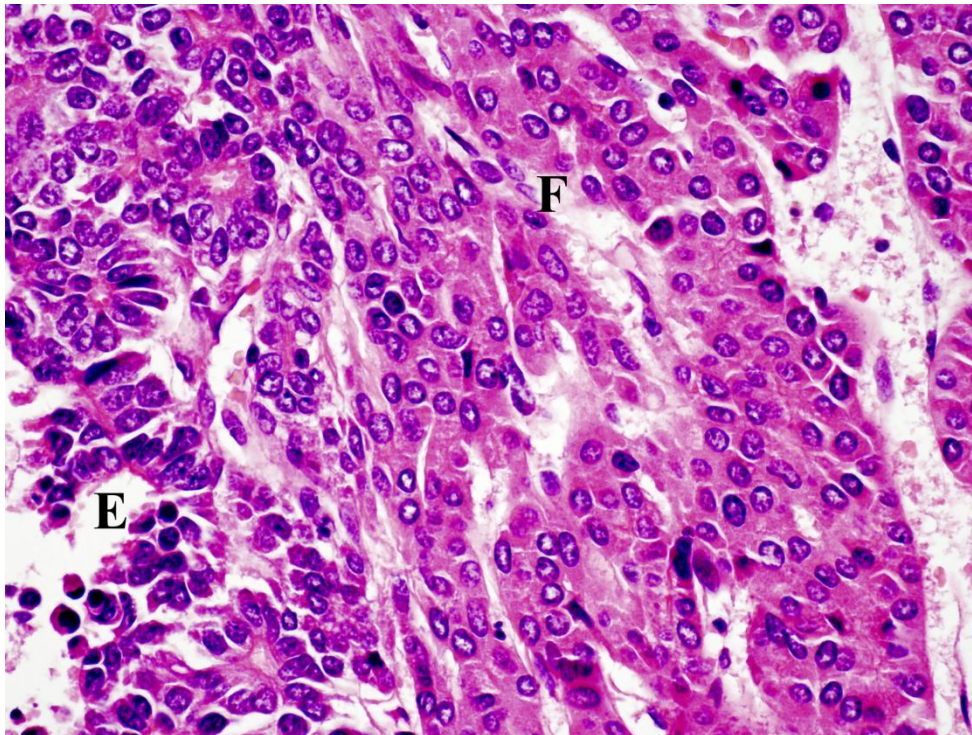
Deparaffinálás, víztelenítés	2 x 10 perc xylol 5 perc abs. alkohol 5 perc 70%-os alkohol, 5 perc 50%-os alkohol 5 perc desztillált víz
Antigén feltárás	2 perc melegítés mikrohullámú sütőben 900 watton TRIS-EDTA pH9 pufferben, 30 perc melegítés mikrohullámú sütőben 180 watton
Mosás	desztillált víz
Endogén peroxidáz blokkolás	5 perc Peroxidase Block (RE7101)
Mosás	2 x 5 perc PBS puffer
Fehérjeblokkolás	5 perc Protein Block (RE7102)
Mosás	2 x 5 perc PBS
Primer antitest	ZNF207: 1:50 hígítás, 60 perc szobahőmérsékleten
Mosás	2 x 5 perc PBS
Post primary blokkolás	30 perc, Post primary (RE7111)
Mosás	2 x 5 perc PBS
Szekunder antitest	30 perc Novolink Polymer (RE7112)
Mosás	2 x 5 perc PBS
Előhívás	5 perc DAB Chromogen (RE7105) Novolink DAB Substrate Buffer (RE7143)
Mosás	desztillált víz
Magfestés	Hematoxylin (RE7107)
Kékítés	csapvizetes öblítés
Víztelenítés	5 perc desztillált víz 5 perc 50%-os alkohol 5 perc 70%-os alkohol 5 perc abs. alkohol
Lefedés	Clearium (Leica, Lot:102510)

5. EREDMÉNYEK

5.1. A hepatoblastoma minták makroszkópiája és szövettani vizsgálata

Az általunk vizsgált tumorok mérete 15x10 mm-től 150x100 mm-ig terjedt, az átlag tumornagyság 50x25 mm volt. A szövettani vizsgálat epiteliális hepatoblastoma tipikus hisztopatológiai képét mutatta az összes esetben.

A fetális komponens kis, uniform, fetális hepatocitákra emlékeztető sejtekből állt eozinofil citoplazmával, kerek-ovális bazofil sejtmaggal. A sejtek néhol trabekulákba rendeződtek. Ezzel ellentétben az embrionális komponens sejtszelei kevésbé differenciálódtak, nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeztek, továbbá a sejtek az embrionális komponensre jellemző pszeudorozettákat alkottak (4. ábra). A környező máj nem mutatott szignifikáns változást, néhol fibrózis illetve nem-specifikus gyulladás volt látható.



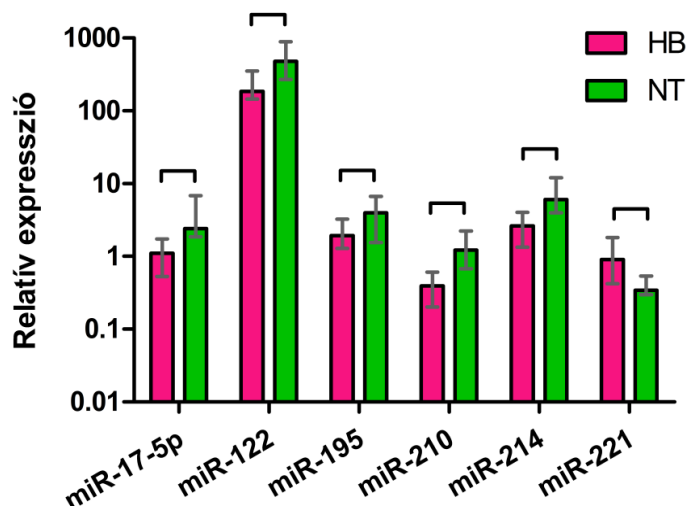
**4. ábra: Embrionális és fetális komponens szövettani képe egy mintán belül
(8. beteg) (HE, 600x)**

5.2. miRNS vizsgálatok

5.2.1. Relatív miRNS expresszió szövettani összehasonlításban

Amikor a hepatoblastoma tumoros mintákat (n=23) a környező májjal (n=15) hasonlítottuk össze, 6 miRNS mutatott szignifikáns különbséget (5. ábra). Látható, hogy a miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214 relatív expressziója csökkent, míg a miR-221-szintje emelkedett a tumoros mintákban a környező májszövethez képest. A csoportok medián relatív expressziói közötti arányt a 6. táblázat (lásd a következő oldalon) mutatja be.

Amikor a fetális (n=15) és embrionális (n=8) hepatoblastoma szövettani típusokat vetettük össze a tumormentes környező májjal (n=15), a miR-17-5p, miR-195, miR-210 és miR-214 expressziója csökkent, míg a miR-221 szintje emelkedett a fetális mintákban. Ugyanakkor csökkent miR-122 expressziót találtunk az embrionális mintákban a környező májszövethez képest. A miR-18a expressziós szintje szignifikánsan csökkent a fetális mintákban az embrionális mintákhoz viszonyítva (6. ábra, következő oldal). Az egyes mintacsoportok közötti arányt a 7. táblázat (38. oldal) szemlélteti.

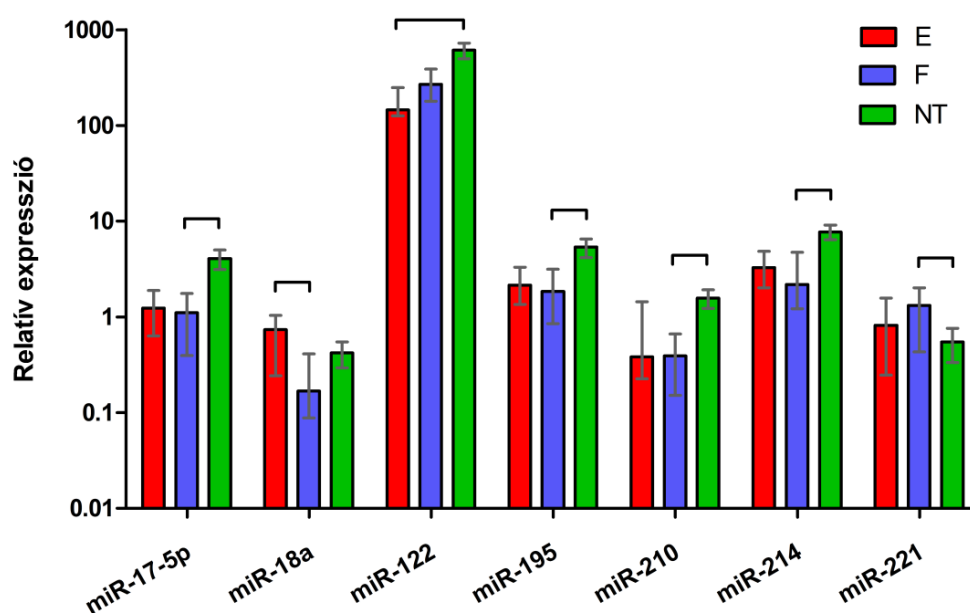


5. ábra: Statisztikailag szignifikáns különbségeket mutató miRNS-ek relatív expressziója tumoros (HB) és a tumormentes környező máj (NT) között
Az oszlopok a medián értékeket mutatják, a hibahatárok pedig az interkvartilis tartományt ábrázolják.

6. táblázat: Mann-Whitney U teszttel végzett statisztikai vizsgálatok p-értékei és a medián relatív expressziók aránya (HB/NT)

mikroRNS	p-érték	arány	mikroRNS	p-érték	arány
miR-17-5p	0,0041	0,46	miR-195	0,0013	0,42
miR-18a	NS	1,11	miR-210	0,0013	0,32
miR-21	NS	0,80	miR-214	0,0026	0,43
miR-34a	NS	1,37	miR-221	0,0060	3,24
miR-96	NS	0,82	miR-222	NS	1,68
miR-122	0,0023	0,43	miR-223	NS	1,89
miR-181a	NS	0,80	miR-224	NS	1,13

NS: nem szignifikáns



6. ábra: Az embrionális (E), fetális (F) és tumormentes környező máj (NT) közti miRNS expressziós különbségek

Az oszlopok a relatív expresszió medián értékeit mutatják, míg a hibahatárok az interkvartilis tartományt ábrázolják.

7. táblázat: A Kruskal-Wallis teszttel végzett statisztikai vizsgálat p-értékei és a medián relatív expressziók aránya a mintacsoportok között

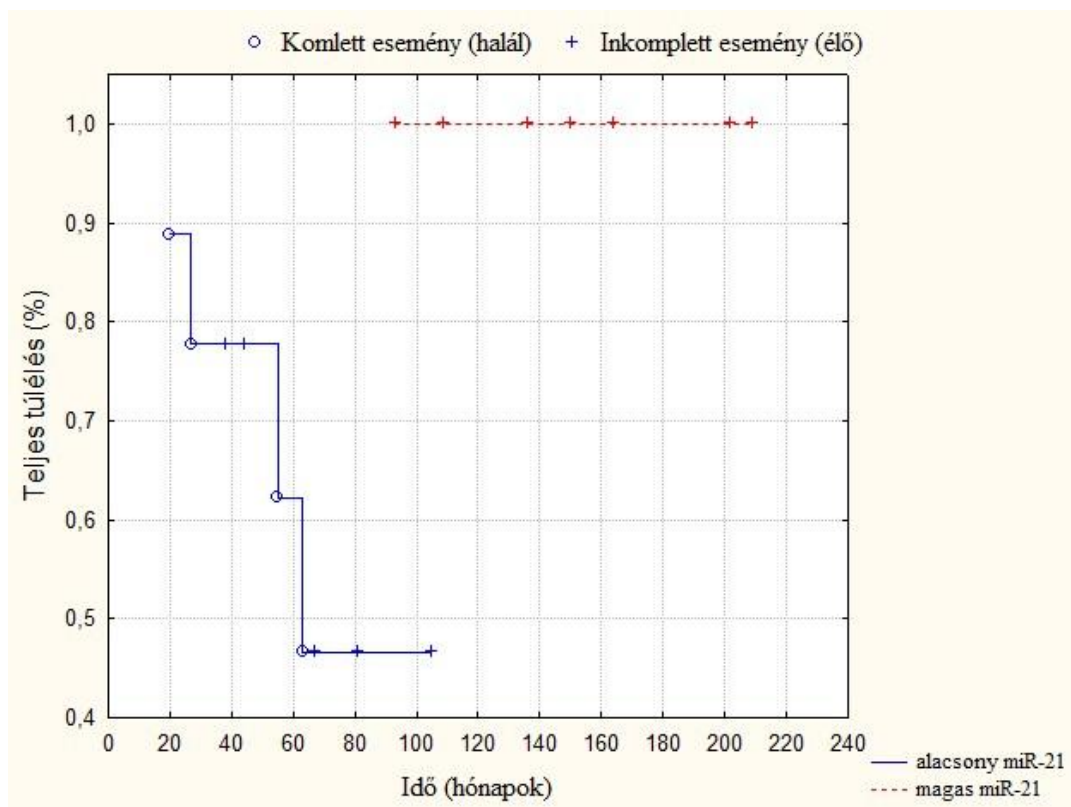
	Embrionális vs. fetális		embrionális vs. NT		Fetális vs. NT	
mikroRNS	p-érték	arány	p-érték	arány	p-érték	arány
miR-17-5p	NS	1,12	NS	0,52	0,0222	0,46
miR-18a	0,0134	4,39	NS	3,47	NS	0,79
miR-21	NS	0,66	NS	0,67	NS	1,01
miR-34a	NS	0,57	NS	0,90	NS	1,57
miR-96	NS	5,08	NS	2,85	NS	0,56
miR-122	NS	0,54	0,0026	0,30	NS	0,56
miR-181a	NS	1,08	NS	0,87	NS	0,80
miR-195	NS	1,16	NS	0,49	0,0048	0,42
miR-210	NS	0,98	NS	0,32	0,0040	0,32
miR-214	NS	1,50	NS	0,54	0,0048	0,36
miR-221	NS	0,62	NS	2,51	0,0084	4,06
miR-222	NS	0,91	NS	1,53	NS	1,68
miR-223	NS	3,11	NS	2,26	NS	0,73
miR-224	NS	3,69	NS	1,78	NS	0,48

NS: nem szignifikáns

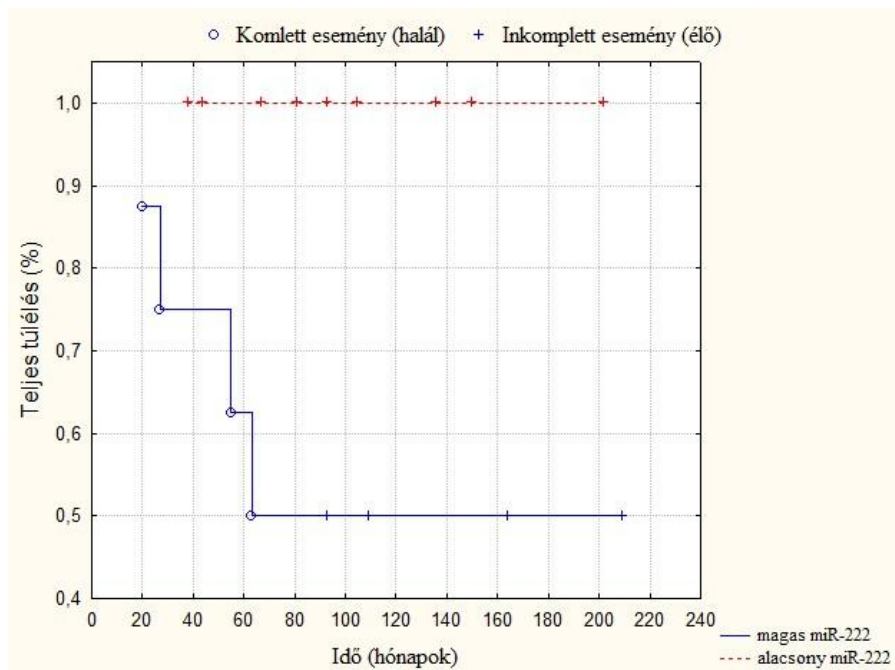
5.2.2. A túlélés és a miRNS expresszió összefüggése

Azt a három beteget (8, 13. és 20. beteg, 3. táblázat, 29. oldal), akiknek mintáiban a fetális komponens elérte a 30-50%-ot, a túlélés statisztikai vizsgálatából kihagytuk, mivel sem az embrionális sem a fetális komponens miRNS expressziójának egyedüli figyelembe vétele nem jelentette volna a reprezentatív értékeket. Statisztikailag szignifikáns különbséget EFS és OS tekintetében nem találtunk a tisztán fetális (n=12) és embrionális (n=5) esetek között. Ha a szövettani szubtypustól eltekintve a 17 hepatoblastoma mintát vizsgáltuk, az EFS szintén nem mutatott különbséget, míg az OS szignifikánsan különbözött az magas és alacsony miR-21 ($p<0,02$), a magas és alacsony miR-222 ($p<0,03$), valamint a magas és alacsony miR-224 ($p<0,01$) vonatkozásában. (7.

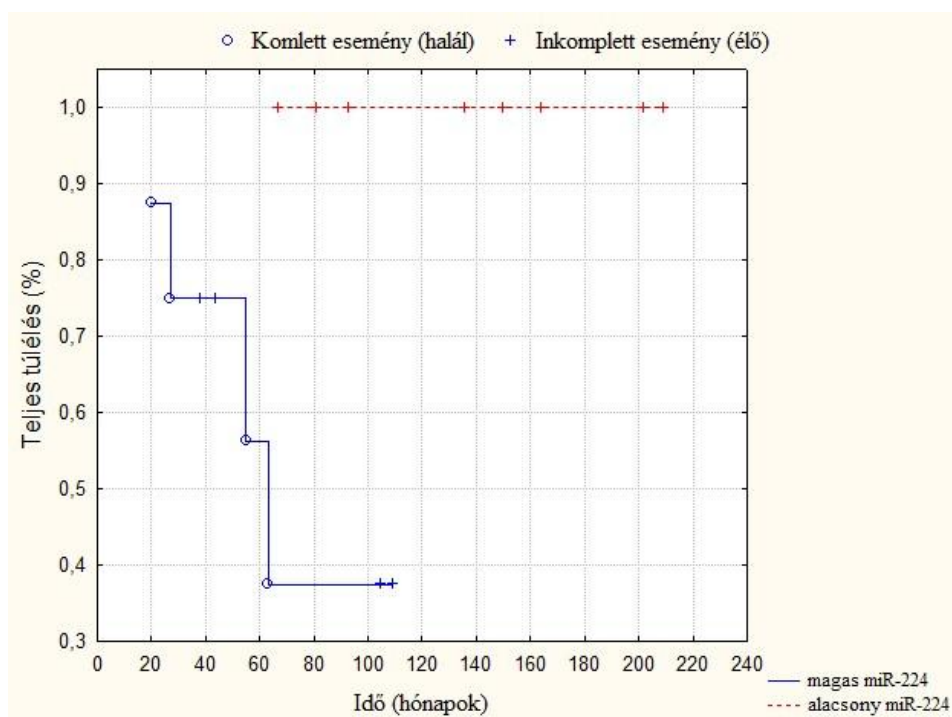
ábra A, B, C). Magas miR-222, magas miR-224 és alacsony miR-21 rövidebb OS-sel társult; az átlagos túlélés 92,5, 57,6 és 55,6 hónap volt ebben a csoportban. Ezzel szemben az alacsony miR-222, alacsony miR-224 és magas miR-21 csoport átlagos túlélése 101,8; 132,8 és 144,5 hónap volt. Halálozás a magas miR-222, magas-224 és alacsony miR-21 csoportban történt, amelyben három tisztán fetális eset és egy embrionális eset található. Az előbbieknél vagy recidíva vagy metasztázis fordult elő, az utóbbi egy esetről pedig mind recidíva, mind metasztázis is előfordult. EFS tekintetében sem a recidívával, sem a metasztázissal összefüggésben nem kaptunk szignifikáns különbséget.



7. A) miR-21



7. B) miR-222



7. C) miR-224

7. ábra: A hepatoblastoma betegek OS vizsgálata

Kaplan-Meier görbék OS és miR-21 (A), miR-222 (B) és miR-224 (C) összefüggésében.

5.2.3. A miRNS célgének keresése *in silico*

A túléléssel szignifikáns összefüggést mutató miR-21, miR-222 és miR-224 célgénjeit és cél mRNS szekvenciáit a miRanda targetpredikciós algoritmus segítségével kerestük. Az eredményt a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat: a miRNS-ek miRanda algoritmus által megjósolt célgénjeinek és célszekvenciáinak száma

miRNS	miRBase azonosító	célszekvenciák száma	célgének száma
miR-21	MIMAT0000076	3562	2522
miR-222	MIMAT0000279	3113	2230
miR-224	MIMAT0000281	4808	3276

A három miRNS közös metszeteként 203 célgénzt kaptunk, amelyek közül 198 rendelkezett „Entrez Gene” azonosítóval a KEGG rendszerben. A statisztikai számítások után 4 útvonal felelt meg a kritériumoknak (minimális génszám: 5, $p < 0,01$), amelyeket a 9. táblázat foglal össze. Az útvonalak teljes térképe a függelékben található.

9. táblázat: A három miRNS közös célgénjei által érintett útvonalak a KEGG rendszerben végzett analízissel

KEGG útvonal	#	R	E	Nyers p	p
Aktin citoszkeleton szabályozása	7	213	0.98	6.23E-05	0.0015
MAPK jelátviteli útvonal	6	268	1.23	0.0016	0.0064
Endocitózis	5	201	0.92	0.0024	0.0072
Fokális adhézio	5	200	0.92	0.0024	0.0072

#: útvonalak száma; R: referenciák száma a kategóriában; E: várható gének száma a kategóriában; p: p-érték

Választásunk a MAPK útvonalra esett, mert irodalmi adatok arra utalnak, hogy a hepatoblastoma tumorbiológiája összefüggésben áll ezzel az útvonallal (Adesina és

mtsai 2009). A kapott célgének betegmintákban történő expressziójának kiértékeléséhez microarray chip eredményeket kerestünk a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) és TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) adatbázisokban. A "hepatoblastoma" ÉS "gpl96", "gpl570", "gpl571" kulcsszavak egyik adatbázisban sem adtak megfelelő találatot, ezért a „hepatoblastoma”-t „liver cancer”-re módosítottuk. A GEO adatbázisban eredményül kapott listából kizártuk azokat a kutatási eredményeket, melyek nem rendelkeztek publikált klinikai adatokkal beleértve a túlélési adatokat is, valamint azokat, amelyek nem Affymetrix array-jel készültek. A szűkítés a GSE14520-t hozta eredményül. Az arrayhez tartozó közlemény egy egyedülálló metasztatikus gén azonosítását írja le korai fázisú HCC-ben (Roessler és mtsai 2010). A microarray adatkészletek fenti keresése és kiértékelése Györffy és mtsai által közzétett módszeren alapszik (Györffy és mtsai 2009). A megtalált Affymetrix array-eken a 203 génből 149 szerepelt. A legjobb Affymetrix próba meghatározásához a JetSet-et használtuk (Li és mtsai 2011). Minden gén esetén a nemtumoros és tumoros minták közötti statisztikai vizsgálatot Student t-teszttel végeztük el. A tumoros minták és az 5 gén expressziója, valamint az eseménymentes túlélés közti összefüggésre Cox regressziót számoltunk a WinSTAT 2007 for Microsoft Excel (Robert K. Fitch Software, Germany) segítségével. Az eredményül kapott legelső 5 gén a 10. táblázatban látható.

10. táblázat: A Györffy és mtsai által leírt módszerrel azonosított legelső 5 gén

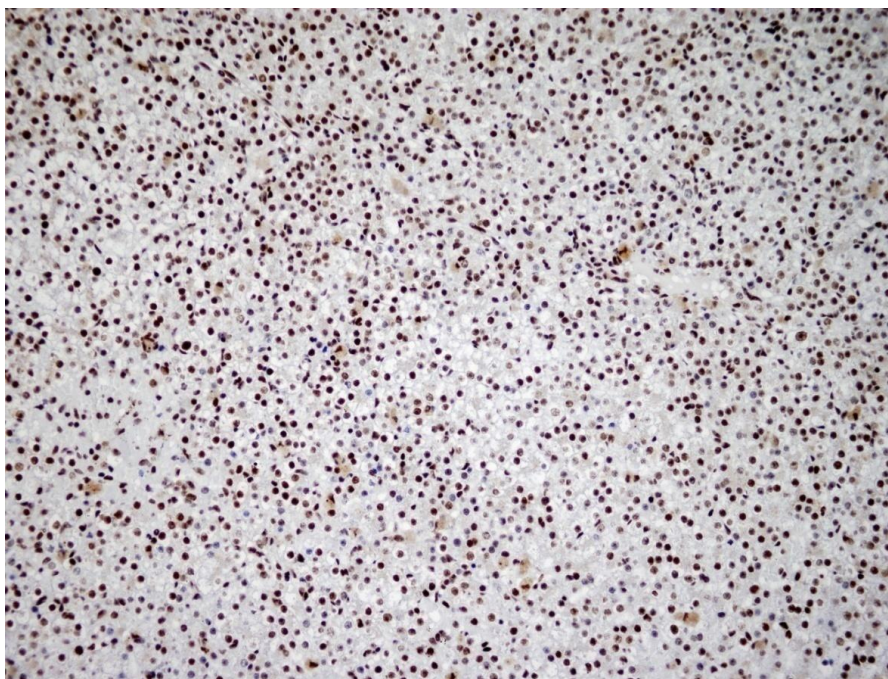
		Tumor vs. Normál		Túlélés	
Gene Symbol	Affymetrix ID	t-teszt p-érték	Fold change	Cox p-érték	HR
ZNF207	200829_x_at	4.61E-12	1.92	0.019043	2.604
FGB	204988_at	1.73E-11	0.52	0.056262	NS
TP53BP2	203120_at	4.39E-10	3.23	0.881871	NS
TIAM1	213135_at	2.47E-09	0.42	0.715233	NS
MPZL1	201875_s_at	1.36E-08	2.40	0.903455	NS

A fold change >1 esetén a tumorban magasabb az expressziós szint, mint a normál májban; HR: Hazard regression

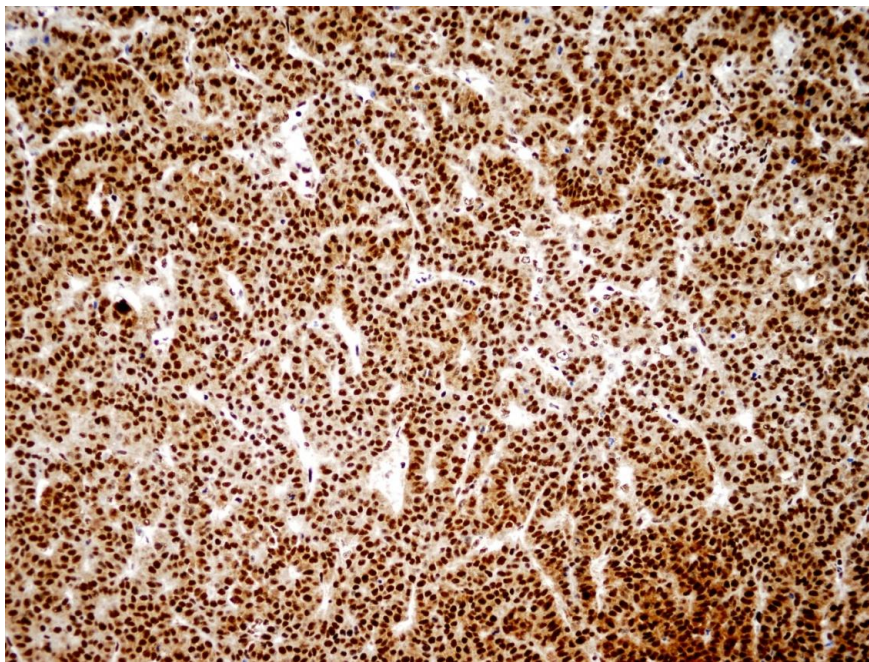
5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

5.3.1. ZNF207

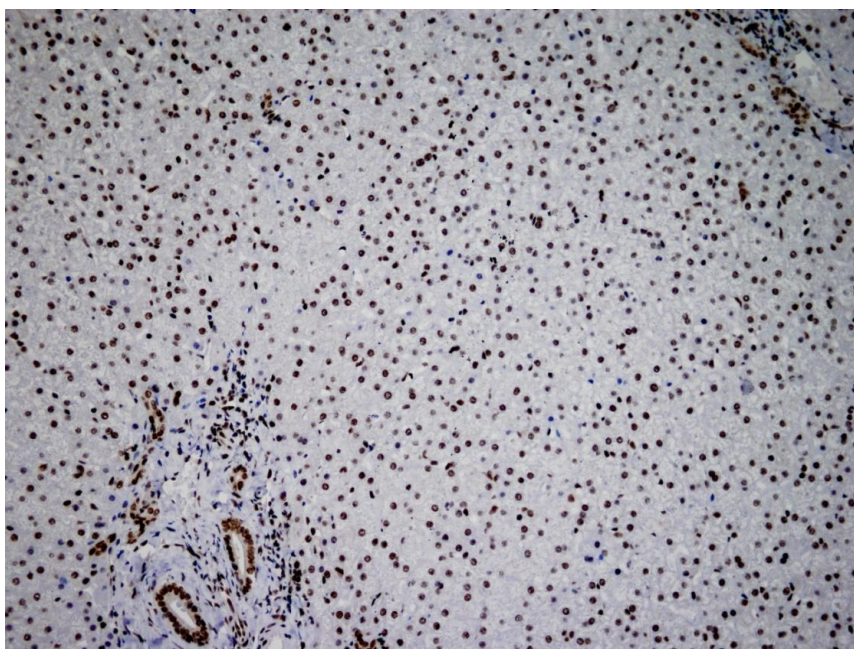
Az *in silico* célgén keresés és microarray adatok értékelése alapján elsőként rangsorolt ZNF207 fehérje expresszióját vizsgáltuk a hepatoblastoma mintákon. ZNF207 a fetális májban gyenge/közepes, míg az embrionális szubtypusban erős reakciót adott. A tumorkörnyéki máj sejtmagjai pozitívan festődtek (8-10. ábra). Az immunhisztokémiai reakció kiértékelése után a Kruskal-Wallis ANOVA teszt szignifikáns különbséget mutatott az embrionális és a környező máj között ($p < 0,008$), valamint a Mann-Whitney U teszt a hepatoblastoma minták és környező máj között ($p < 0,03$) (11. ábra, 45. oldal). A túlélés statisztikai vizsgálata nem mutatott összefüggést az OS és a ZNF207 expresszió között, ugyanakkor az EFS a recidíva függvényében összefüggést mutatott a ZNF207 fehérje expressziójával (12. ábra, 45. oldal): magas ZNF207 expresszió jobb EFS-sel társult ($p < 0,04$).



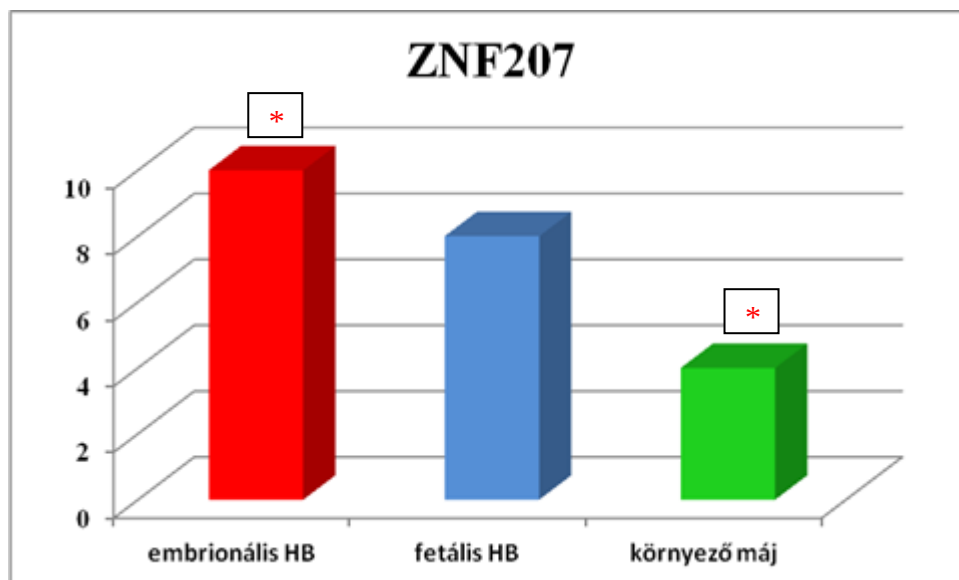
8. ábra: Gyenge/közepes ZNF207 festődés fetális szubtypusú hepatoblastomában (400x). A barna színnel festődött magvak mutatják a festődés intenzitását.



9. ábra: Erős nukleáris ZNF207 festődés embrionális szubtypusú hepatoblastomában (400x). A barna színnel festődött magvak jelölik a festődés intenzitását.

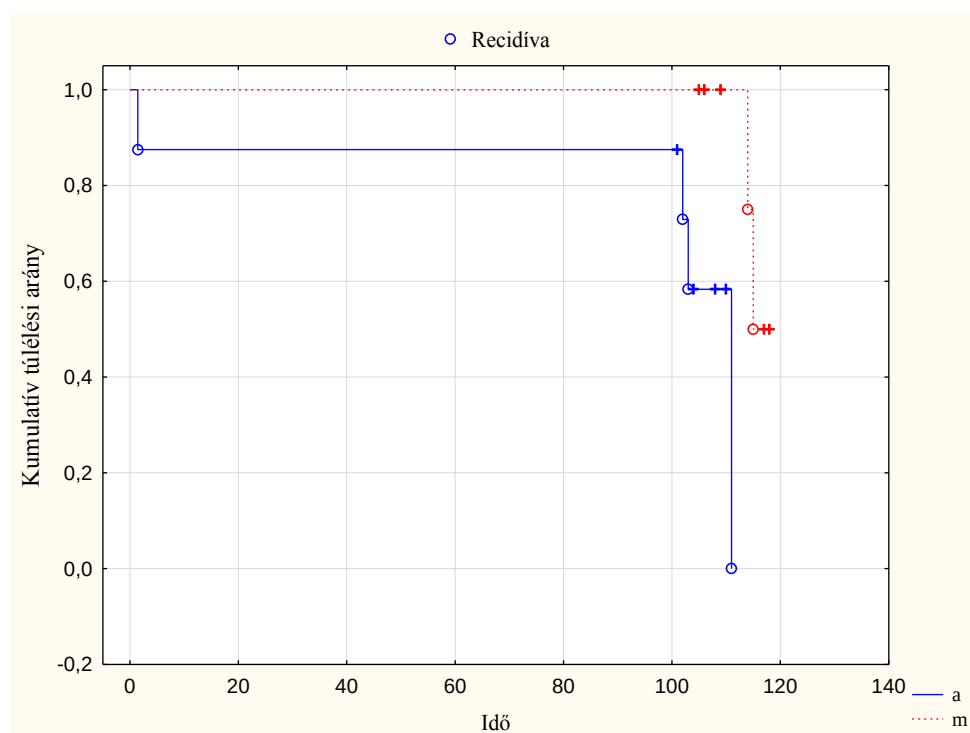


10. ábra: Pozitív nukleáris ZNF207 immunreakció a tumor környéki májban (400x). A barna színnel festődött magvak jelölik a festődés intenzitását. Az ábrán jól látható, hogy az epeutak magvai is festődtek, ugyancsak pozitív immunreakciót adtak.



11. ábra: A ZNF207 IHC pontértékeinek mediánja

*:Szignifikáns különbség, $p < 0,008$.



12. ábra: A ZNF207 expresszió az EFS-sel összefüggésben. Kaplan-Meier görbe. a:
medián alatti (alacsony), m: medián feletti (magas) ZNF207 expressziós szint

5.4. β -catenin korrelációja a miRNS expresszióval

A β -catenin immunreakciót Schlachter és mtsai (Schlachter és mtsai 2014) végezték el a hepatoblastoma mintákon. A Spearman tesztek alapján a magi β -catenin expressziója inverz korrelációban állt a miR-17-5p ($p < 0,03$), miR-122 ($p < 0,003$), miR-195 ($p < 0,009$), miR-210 ($p < 0,0042$) és miR-214 ($p < 0,008$) szintekkel. Ugyanúgy inverz korrelációt kaptunk a citoplazmatikus β -catenin expresszió és miR-17-5p ($p < 0,006$), miR-122 ($p < 0,001$), miR-195 ($p < 0,01$), miR-210 ($p = 0,003$) és miR-214 ($p < 0,03$) között, ugyanakkor miR-221 pozitívan korrelált ($p < 0,04$) a citoplazmatikus β -catenin expresszióval (12. táblázat).

11. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ekkel pozitív korrelációt mutató citoplazmatikus és magi β -catenin expresszió

Citoplazmatikus β -catenin	Nukleáris β -catenin
miR-17-5p ($r = -0.4$, $p < 0.006$)	miR-17-5p ($r = -0.3$, $p < 0.03$)
miR-122 ($r = -0.5$, $p < 0.001$)	miR-122 ($r = -0.5$, $p < 0.003$)
miR-195 ($r = -0.4$, $p < 0.01$)	miR-195 ($r = -0.4$, $p < 0.009$)
miR-210 ($r = -0.5$, $p < 0.003$)	miR-210 ($r = -0.4$, $p < 0.004$)
miR-214 ($r = -0.3$, $p < 0.03$)	miR-214 ($r = -0.4$, $p < 0.008$)
miR-221 ($r = 0.3$, $p < 0.04$)	

5.5. A miRNS expresszió összehasonlítása HB-ben és HCC-ben

A 12. táblázatban összefoglalt általunk vizsgált miRNS-ek tumormentes szövethez viszonyított változásából látható, hogy a miR-122, miR-195, miR-214 és miR-221 azonos irányú változást, míg a miR-17-5p és miR-210 ellentétes irányú változást mutat hepatoblastomában és HCC-ben. Viszont a miR-214 változása egy a hepatoblastomákban leírt miR-expressziót vizsgáló közleményben az általunk vizsgált mintákban tapasztaltakkal ellentétesnek bizonyult (Magrelli és mtsai 2009).

12. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ek változása hepatoblastomában és HCC-ben az irodalmi adatokkal összevetve

miRNS-ek	HB eredményeink	HB irodalom alapján	HCC irodalom alapján	Referencia HCC-re (#) és HB-ra (*) vonatkozóan
miR-17-5p	↓	NA	↑	(Chen és mtsai 2012) #
miR-122	↓	NA	↓	(Karakatsanis és mtsai 2013) #
miR-195	↓	NA	↓	(Liu és mtsai 2009) #
miR-210	↓	NA	↑	(Pineau és mtsai 2010) #
miR-214	↓	↑	↓	(Magrelli és mtsai 2009)* (Jiang és mtsai 2008) #
miR-221	↑	NA	↑	(Karakatsanis és mtsai 2013) #

↑: emelkedett expresszió tumorban a normális szövethez képest; ↓: csökkent expresszió tumorban a normális szövethez képest; NA: nincs adat; piros szín az eltérő irányú expressziót jelzi

6. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban egyre inkább felismerjük, hogy a biológiai folyamatok összetett rendszerének fokozatos felborulása tehető felelőssé a sejtek normálistól eltérő működéséért, a különböző betegségek kialakulásáért. A hepatoblastoma ugyan a leggyakoribb primer malignus gyermekkori májdaganat, előfordulása mégis ritka, az összes gyermekkori daganat csupán 1%-a (Agarwala 2012, Lopez-Terrada és Zimmermann 2012, Dezsofi és mtsai 2014). Ez a tény is maga után vonja, hogy etiológiája is csak részben tisztázott. Munkacsoportunk ezért is fordult a nemrégiben felfedezett rövid, fehérjét nem kódoló kis RNS molekulák, a mikroRNS-ek felé, hiszen egyre több információ lát napvilágot a tumorképzésben betöltött szerepüket illetően. Számos miRNS-nek tulajdonítanak onkogén illetve tumorszupresszor szerepet a beteg, elsősorban tumoros szövetben mérhető expressziós szintjük emelkedése illetve csökkenése alapján. Nagyszámú *in vivo* és *in vitro* kísérlet támasztja alá a miRNS-ek tumorfejlődésben, angiogenezisben, embrionális és post-natális fejlődésben betöltött szerepét (Ciesla és mtsai 2011). Számos megbetegedésben és tumor típusban (Cairo és mtsai 2010, Braconi és mtsai 2011, Farazi és mtsai 2011), beleértve a májbetegségeket és a májtumorokat is, leírták a miRNS expressziós szintek megváltozását (Kerr és mtsai 2011, Lakner és mtsai 2011), mely a vizsgált betegségek indikátoraiként funkcionálhat (Lendvai és mtsai 2012, Gelley és mtsai 2014, Gyongyosi és mtsai 2014). Biológiai szerepükből eredően ugyanis a miRNS expresszió megváltozása összefüggésben áll a sejtbiológiai folyamatokkal és azok megváltozásával. A prognosztikai és diagnosztikai markerek lehetőségén túl a miRNS-ek ígéretes rákterápiás célpontokká is fejlődhetnek (Ciesla és mtsai 2011, Rong és mtsai 2013, Finch és mtsai 2014).

A HB éretlen sejtek rosszindulatú transzformációjaként fogható fel (Cairo és mtsai 2012), azonban a ritkasága miatt nehéz nagyszámú mintaanyagot összegyűjteni etiológiájának kutatásához. A felnőttkori májrák egyik leggyakoribb oka az alkoholabúzus, a hepatitisz vírusok (HBV, HCV) okozta fertőzések következtében kialakult cirrózis, de eredményezhetnek toxinok, gyógyszerek okozta mérgezések is májrákot. A hepatoblastoma kialakulását nem előzi meg cirrózis, vírusetiológia sem bizonyított és az alkoholfogyasztás sem jellemző az 5 éven aluli gyerekekre. Lehetséges okként az anyai fogamzásgátló szerek, szülés előtti hormonkezelés, a szülők alkohol

abúza illetve festék-, fém- és petróleum expozíciója is vetődött fel (Kemeny és mtsai 2000), melyek következtében olyan genetikai változások mennek végbe, ami végül hepatoblastoma kialakulását eredményezi.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban kimutatta, hogy a DLK, amelyet az embrionális szövetek, pl. a fetális máj expresszál, a hepatoblastoma rendkívül specifikus és érzékeny markere (Dezso és mtsai 2008), továbbá a PCNA és Ki67 az embrionális tumorsejtekben fokozottabban expresszálódik, mint a fetális tumorsejtekben (Halasz és mtsai 2006). Szintén munkacsoportunk igazolta hogy a CLDN-1 és CLDN-2 szoros sejtkapcsolatot biztosító tight junction transzmembránfehérjék és TGF- α overexpressziója kiválóan alkalmas a hepatoblastoma fetális és embrionális komponenseinek elkülönítésére, mivel a differenciáltabb fetális szubtypusban overexpresszálódik az embrionálissal szemben (Kiss és mtsai 1998, Halasz és mtsai 2006). Ezen túlmenően Chopra és munkatársai kimutatták, hogy a pro-apoptotikus Bax magasan expresszálódik az embrionális területeken, míg az anti-apoptotikus Bcl-xL inkább a fetális területekre jellemző (Chopra és mtsai 2010). A fenti adatok azt sugallják, hogy a kevésbé differenciált embrionális szubtypus nem csak morfológiailag különbözik a fetális komponensétől, hanem molekuláris, genetikai, epigenetikai változások, gén expressziós profilok alapján a két epiteliális HB komponens prognosztikai jelentőséggel is bír (Adesina és mtsai 2009, Cairo és mtsai 2012, Purcell és mtsai 2012).

Munkánk során az embrionális és fetális szubtypusok illetve a tumor környéki tumormentes szövetrel történő összehasonlításban kerestük a miRNS expressziós különbségeket. A tumor ritka előfordulása és a szigorú beválogatási feltételek eredményeképpen 20 hepatoblastoma tumormintában vizsgáltuk 15 miRNS expressziós szintjét. Mivel több mint 2000 ismert humán miRNS-t tartanak számon és a miRNS-ek szintjének változása hepatoblastomában még kevésbé ismert (Magrelli és mtsai 2009, Cairo és mtsai 2010, von Frowein és mtsai 2011), azokat a miRNS-eket választottuk ki, amelyek irodalmi adatok alapján HCC-ben a legjelentősebb eltérést mutatják (Karakatsanis, 2013; Varnholt, 2008; Pineau 2010). Három embrionális mintában, ahol a fetális komponens aránya elérte a 30-50%-ot, az embrionális minta mellett a fetális minta vizsgálatát is el tudtuk végezni.

Vizsgálataink eredményeképpen hepatoblastomában (n=23) 5 miRNS szintje csökkent és miR-221 expressziója emelkedett a tumorkörnyéki tumormentes májmintákhoz képest. Érdekes módon az 5-ből 4 miRNS (miR-17-5p, miR-195, miR-210 és miR-214) szintje szintén csökkent, míg a miR-221 expressziója emelkedett a fetális komponensben (n=15) a tumorkörnyéki tumormentes májmintákhoz viszonyítva. Ezzel szemben az embrionális komponensben (n=8) csak a miR-122 (ez az 5. csökkenő miRNS) szintje mutatott csökkenést. Az embrionális és fetális szövetminták összehasonlításakor a miR-18a expressziós szintje bizonyult szignifikánsan különbözőnek a két szubtípus között.

Az eredmények alapján a miRNS mintázat a fetális hepatoblastoma komponensben tűnik karakterisztikusnak. Ezek az eltérések a HCC-vel részben megegyező expressziós változást mutatnak, azzal a kivétellel, hogy miR-17-5p és miR-210 expressziója csökkenni látszik mind az összes hepatoblastoma mintában, mind a fetális komponensben a HCC-ben leírt adatokkal szemben. Az embrionális komponens esetén is a fetálishoz hasonlóan mutatkozott az expresszióbeli változás iránya, azonban az eltérés mértéke a statisztikai különbséghez szükséges mértéket nem érte el. Ez adódhatott az alacsony esetszámból, de jelentheti azt is, hogy ezen miRNS-ek expressziójának változása nem olyan jelentős az embrionális komponensben, mely HCC-től eltérő patogenetikai folyamatokra utalhat miRNS szinten. Ugyanakkor a miR-122 szintjének jelentős csökkenése és a miR-18a expressziójának emelkedése (ugyan a tumorkörnyéki májmintához viszonyítva nem szignifikánsan) inkább HCC-vel megegyező tendenciát mutat. Ezért felmerül, hogy a nem szignifikáns expressziós mintázat hátterében az embrionális minták alacsony esetszáma is állhat.

Ezzel szemben a fetális komponensben tapasztalt **miR-18a** szint jelentős csökkenése a HCC-ben tapasztalt változással ellentétes. Ez a csökkenés az embrionális komponenshez képest jelentős és felveti azt, hogy a miR-18a által szabályozott gének expressziójának szerepe lehet az embrionális és fetális hepatoblastoma rosszabb illetve jobb prognózisában. Az eredményeink alapján tehát az epiteliális hepatoblastomában, főleg a fetális komponensben, egyes miRNS-ek expressziós mintázata HCC-vel megegyezik, más mikroRNS-eké pedig HCC-vel ellentétes. Természetesen a pontosabb feltáráshoz további vizsgálatokra van szükség.

A miR-18a több szempontból is érdekes. Egyrészt azért, mert egy ismert onkomiR, az onkogén miR-17-92 klaszter tagja (Tao és mtsai 2012), overexpresszióját kimutatták már gyomor-, hasnyálmirigy-, máj- és vastagbél-daganatokban, utóbbiban a magas miR-18a expresszió rosszabb prognózissal társított (Morimura és mtsai 2011), másrészt azért, mert célgénje a májban még nem ismert. Gyomor adenocarcinomában leírták, hogy a miR-18a egyik célgénje, a PIAS3, mely a STAT3 inhibitora; a citokinek és növekedési faktorok hatására aktiválódó STAT jelpálya gátolja a tumorsejtek apoptózisát és serkenti a c-myc expressziót (Brock és mtsai 2011, Wu és mtsai 2013). Arra, hogy ez a máj daganatos elváltozásaira is igaz-e további vizsgálatok tudnak majd fényt deríteni valamint arra is, hogy a miR-18a milyen további célgéneket szabályozhat.

A **miR-122** szintén különös figyelmet érdemel, ugyanis a máj miRNS készletének 70%-át alkotja, továbbá nélkülözhetetlen a hepatociták működéséhez (Cairo és mtsai 2010), ugyanis pozitívan szabályozza a koleszterol- és trigliceridszintet, valamint gátolja a zsírsav-oxidációt (Esau és mtsai 2006, Bai és mtsai 2009). A pozitív szabályozó hatása valószínűleg indirekt módon jut kifejezésre, mivel a zsírsavcsereben szerepet játszó célgénjeit májban még nem találták meg. Alacsony expresszióját HCC-ben is leírták, amely összefüggésben állhat tumorszupresszor funkciójával, a tumorsejtek migrációjának és inváziójának gátlásával, valamint az *in vivo* karcinogenezissel. Csökkent szintje májbetegségekben is ismert (Finch és mtsai 2014). Amíg további vizsgálatok erre fényt derítenek, valószínűsíthető hogy hepatoblastomában, elsősorban az embrionális komponensben, az alacsony expresszióval összefüggésbe hozható mindkét mechanizmus szerepet játszhat.

A **miR-17-5p** és a **miR-210** ismert onkomiR HCC-ben (Gramantieri és mtsai 2007, Wang és mtsai 2008, Yang és mtsai 2010). A miR-17-5p az onkogén miR-17-92 klaszter tagja (O'Day és Lal 2010) és overexpresszióját több tumorban is leírták (Yang és mtsai 2010, Chen és mtsai 2012, Shan és mtsai 2013, Yang és mtsai 2013). Ezzel szemben emlőrákban tumorszupresszor hatását írták le mivel a Ciklin D1 szintet gátolva visszafogta a tumorsejtek proliferációját (O'Day és Lal 2010). Ezek alapján felmerül, hogy a miR-17-5p egy olyan miR, amely szövettípustól függően onkomiRként és tumorszupresszorként is funkcionálhat. Ez természetesen hepatoblastomában még megerősítésre vár. A miR-210 a hypoxia által indukált metasztázisban játszik szerepet

HCC-ben (Ying és mtsai 2011), mely folyamat feltehetőleg nem ennyire kifejezett, mivel expressziója hepatoblastomában csökkent HCC-vel szemben.

A **miR-195** tumorszupresszor hatású HCC-ben (Furuta és mtsai 2013), mely hatása egyrészt abban rejlik, hogy egyik célgénje az angiogenezisért felelős VEGF (Wang és mtsai 2013), másrészt, hogy apoptózist indukál a BCL-2 és BCL-w gének blokkolásával, valamint, hogy a VAV2, CDC42 és RAF1 metasztázis kialakulásáért felelősek célgénjeinek leszabályozásával, végül, hogy a proliferációért felelős CCND1/3, CDK4/6, E2F3 gének expresszióját gátolja (Wang és mtsai 2013). Hepatoblastomában való alulexpresszáldása arra utal, hogy itt is hasonló funkciókat tölthet be.

A **miR-214** valószínűsíthetően tumorszupresszor funkciót tölt be HCC-ben, és alacsony szintje feltételezhetően HDGF expressziót indukál, mely angiogenezishez és tumornövekedéshez vezet (Shih és mtsai 2012). Hepatoblastomában, a vizsgálatunkban tapasztalt alacsony miR-214 expresszió ezt feltételezi, azonban Magrelli és munkatársai a miR-214 overexpressziójáról számoltak be hepatoblastomában a nemtumoros májhoz képest (Magrelli és mtsai 2009). Az ellentétes eredmények oka származhat abból, hogy a két vizsgálatban a mintaszám (Gyugos és mtsai: 23 hepatoblastoma, 15 tumorkörnyéki májszövet, Magrelli és mtsai: 9 hepatoblastoma és tumormentes környező májszövet) és a minták megőrzésének típusa (Gyugos és mtsai: formalin fixált paraffinba ágyazott minták, Magrelli és mtsai: fagyasztott minták) eltérő volt. Azonban a megfigyelés, hogy alacsony miR-214-szint a HCC magasabb kiújulásával és rosszabb prognózisával társítható, alátámasztja a miR-214 tumorszupresszor hatását, ami feltételezhetően hepatoblastomában is igaz, de nagyobb mintaszámú vizsgálat adhat majd erre választ. Az újabb kutatások feltételezik azt is, hogy a miR-214 egyik közvetlen célgénje a β -catenin (Wang és mtsai 2012), mely ezzel a miR-214 további tumorszupresszor hatását igazolja.

A **miR-221** ismert oncomiR HCC-ben, melynek a sejtek migrációjában és inváziójában, valamint csökkent apoptózisában van szerepe, továbbá a ciklin-dependens kináz inhibitorok kiütésével a sejtciklus progressziójában és ezzel elősegítik a tumorsejtek proliferációját (Ogawa és mtsai 2012). Továbbá metasztatizáló HCC-ben magasabb miR-221-es szintet találtak a metasztázis-mentes HCC-vel szemben (Rong és mtsai 2013). Mindezek azt sugallják, hogy a hepatoblastomában tapasztalt magas miR-

221-szint háttérében is hasonló jelenségek állhatnak. Érdekes viszont, hogy a miR-221-gyel közös promóter régióval rendelkező miR-222 szintje az általunk vizsgált hepatoblastoma szövetekben szignifikáns eltérést nem mutatott.

Amint láttuk, a HCC-ben tapasztalt miRNS expressziós szintektől a miR-17-5p és a miR-210 expressziója tért el jelentősen az általunk vizsgált hepatoblastoma mintákban, amely a két eltérő életkorban jelentkező és eltérő etiológiájú primer, rosszindulatú májrák különböző molekuláris háttérét mutathatja.

Hepatoblastomában az 5 éves túlélés 70% körüli (Allan és mtsai 2013), melynek egyik lehetséges oka, hogy a HB-s gyerekek jobban reagálnak a kemoterápiára, mint a HCC-s betegek (Ismail és mtsai 2012). A túlélésre a tumor szövettana is befolyással van. Több kutatás is alátámasztja, hogy az epiteliális-fetális szövettani típus jobb prognózissal bír, míg a kis sejtes differenciálatlan szubtypus vagy az embrionális szubtypus rossz prognózissal társított (Lopez-Terrada és Zimmermann 2012).

Vizsgálatunkban a miRNS expresszió összefüggést mutatott a betegek túlélési adataival: a **magas miR-21**, valamint alacsony **miR-222 és miR-224** szint jobb teljes túléléssel társult. Az alacsony miR-222 és miR-224 expresszió összefüggését a hosszabb túléléssel irodalmi adatok is alátámasztják, mivel ezek az oncomiR-ek proliferációt, migrációt és inváziót serkentő hatásúak HCC-ben az AKT jelátviteli út aktiválása során, valamint magas expressziójuk szintén összefüggést mutatott a HCC rosszabb prognózisával (Wong és mtsai 2010, Garofalo és mtsai 2012, Ma és mtsai 2012, Scisciani és mtsai 2012, Lu és mtsai 2013, Shen és mtsai 2013). A magas miR-21 expresszió és a jobb túlélés kapcsolata azonban ellentmondani látszik azzal, hogy ez a miRNS is oncomiR-ként ismert, amely a PTEN-re hatva serkenti a migrációt és inváziót (Zhu és mtsai 2012, Bao és mtsai 2013, Karakatsanis és mtsai 2013). Ezen ellentmondás tisztázása további vizsgálatokat tesz szükségessé. Azonban Wang és munkatársai a miénkhez hasonló eredményre jutottak 29 tanulmány 1654 betegmintája alapján végzett meta-analízise szerint, amely alapján a szérumbeli magas miR-21 szint rosszabb prognózissal társul (Wang és mtsai 2013).

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a hepatoblastoma ritka előfordulása és a szigorú beválasztási feltételek miatt a kapott eredményeink alacsony mintaszámú vizsgálatra vonatkoznak. Természetesen az eredményeink klinikai jelentőségének tisztázásához nagyobb mintaszámú betegcsoport prospektív vizsgálatára van szükség.

Munkánkban kísérletet tettünk a túlélésben szerepet játszó azon miRNS-ek közös célgénjeinek *in silico* megtalálására, amely gének expressziója szignifikánsan különbözött a tumoros és tumormentes minták között, valamint amelyek EFS-sel is összefüggést mutattak. Ezek alapján a **ZNF207-et** kaptuk eredményül, mint a feltételeknek legjobban megfelelő fehérjét, amely a cink-ujj fehérjék családjába tartozik és 1998-ban Pahl és munkatársai írtak le (Pahl és mtsai 1998). A cink-ujj fehérjék sajátossága, hogy olyan transzkripciós faktorok, melyek a genomiális DNS-hez kapcsolódva a génexpressziót szabályozzák. A ZNF207 szerepe kevésbé ismert, feltehetően alapvető celluláris funkciókat lát el és felmerült, hogy mitózis során az osztódási orsó és a kromoszómák közötti kapcsolat létrehozásában egy fehérje komplex tagjaként vesz részt (Toledo és mtsai 2014).

A hepatoblastoma mintákban a ZNF207 expressziót fehérje szinten vizsgáltuk és a környező májhoz képest **az embrionális szövetmintákban** illetve szövettani komponensektől függetlenül az összes HB mintában magasabb expressziót találtunk, amely utalhat a tumor illetve az embrionális hepatoblastoma nagyobb mértékű proliferációjára. Ugyanakkor ennek ellentmondani látszik a magas ZNF207 expresszió összefüggése a jobb EFS-sel, míg OS tekintetében statisztikai mértékű összefüggést a ZNF207 szinttel nem kaptunk. Az eredmények értelmezéséhez hozzátartozik megemlíteni azt, hogy a hepatoblastoma ritkasága következtében leközölt és feltöltött hepatoblastoma adatkészlet nem állt rendelkezésünkre (ezért HCC adatkészlet *in silico* elemzését tudtuk csak elvégezni) valamint hogy a felnőttkori és a gyerekkori májrakok mind kialakulásában mind etiológiájában különböznek. Meg kell említeni azt is, hogy vizsgálatunkban a miR-21, miR-222 és miR-224 közös célgénjét kerestük és e három miRNS feltételezhetően eltérő mértékben szabályozhatja a ZNF207 fehérje expresszióját, illetve egymástól függetlenül a sejtek biológiai folyamataiban szerepet játszó további fehérjék expresszióját is, amelyek a túléléssel kapcsolatban állhatnak.

Végül megnéztük, hogy a HCC-vel és a hepatoblastoma kialakulásával is összefüggésbe hozott **β -catenin fehérje expressziója hogyan viszonyul a miRNS expressziós szintekhez** különös tekintettel a magi lokalizációra. Azt találtuk, hogy **miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214** fordított arányú korrelációt mutatott a **β -catenin magi** lokalizációjával, míg **miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214** a **β -catenin citoplazmatikus** lokalizációjával korrelált fordított

arányban, vagyis látható, hogy a β -catenin expresszió a miRNS-ek expressziójának csökkenésével jár. Így felvetődik, hogy a β -catenin és annak mutációja sajátos miRNS expressziós mintázatot mutat. A β -catenin protoonkogén nukleáris akkumulációja mutációra utalhat és az intracellulárisan akkumulálódó, majd a sejtmagba transzlokálódó β -catenin transzkripciós faktorhoz (TCF-4) kötődve onkogének aktivációját idézi elő (pl. c-myc, Ciklin D1), amelyek aztán dedifferenciációt és proliferációt serkentenek, illetve apoptózist gátolnak (Buendia 2002). A β -catenin mutáció szövettani típustól függetlenül a hepatoblastomák kb. 50%-ában megtalálható és nukleáris akkumulációja fontos prognosztikai faktor, amely a szövettanilag rosszul differenciált embrionális szubtypussal szoros összefüggést mutat (Schlachter és mtsai 2014). Xu és munkatársai megfigyelték, hogy a **miR-122** közvetlenül hat a Wnt/ β -catenin útvonalra azáltal, hogy overexpressziója alulszabályozza a wnt1, β -catenin és TCF-4 fehérjéket (Xu és mtsai 2012), míg Wang és munkatársai leírták, hogy HCC-ben a miR-214 elnyomta a β -catenin expresszióját és leszabályozta downstream génjeit, amelynek eredményeképpen gátolta a HCC sejtek növekedését (Wang és mtsai 2012). Vagyis a magas miR-122 és miR-214 szint a tumor szempontjából feltehetőleg nem kívánatos, amelyet korrelációs megfigyelésünk is alátámaszt.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Elsőként mutattuk ki, hogy a **miR-18a** szignifikáns különbséget mutat az epiteliális hepatoblastoma **embrionális és fetális szubtypusa között**, aminek következtében a miR-18a alkalmas lehet a kevésbé differenciált embrionális szubtypus és a differenciáltabb fetális szubtypus elkülönítésére, ami prognosztikai értékű lehet. Ez a különbség, valamint a hepatoblastoma komponensek és a környező máj közötti miRNS expressziós különbségek hozzásegíthetnek a két komponensben zajló eltérő patogenetikai folyamatok megértéséhez.
2. Kimutattuk, hogy a **magas miR-21**, valamint **alacsony miR-222 és miR-224** expressziós szint jobb teljes túléléssel társul hepatoblastomában az epiteliális komponensből függetlenül, amely HCC-vel részben megegyező, részben különböző sajátságot mutat.
3. A túlélésben szerepet játszó miRNS-ek *in silico* célgén-kereséseként egy egyelőre kevésbé ismert cink-ujj gént, a **ZNF207**-et kaptuk, mely fehérje expressziója a hepatoblastoma, különösen az embrionális komponens és a környező máj között bizonyult eltérőnek, a teljes túléléssel azonban nem mutatott összefüggést.
4. A mintákon elvégzett **β -catenin** immunhisztokémiai reakciók eredményének és a mikroRNS expressziós adatok korreláltatásának eredményeként azt kaptuk, hogy a sejtmagba és citoplazmába lokalizálódó β -catenin expresszió fordított arányú korrelációt mutat a **miR-17-5p, miR-122, miR-195 és miR-210** szintjével, ami egy β -catenin-karakterisztikus miRNS mintázatra utalhat.
5. Két oncomiR, a **miR-17-5p** és a **miR-210** expressziójának HCC-től eltérő változása tumoros és tumor környéki máj között, a hepatoblastoma HCC-től eltérő patogenezisére utalhat.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A hepatoblastoma (HB) a leggyakoribb gyermekkori primer malignus májdaganat, melynek etiológiáját a mai napig csak részben ismerjük és a kialakulásában részt vevő tényezők között a miRNS-ek rendellenes expressziós szintje is szerepet játszhat. A miRNS-ek rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek a gének kifejeződését szabályozzák általában negatív módon az mRNS-ek transzlációjának akadályozásával. A miRNS-eknek egyre nagyobb szerep jut a tumorbiológiában, ugyanis a betegségekben a megváltozott expressziós szintjük miatt felmerült biomarkerként való alkalmazhatóságuk, illetve az általuk szabályozott célgénjeik ismeretében rávilágíthatnak a betegségben lezajló biológiai folyamatokra. Ezért munkánk során célul tűztük ki, hogy a hepatoblastoma leggyakoribb szövettani típusában, az embrionális és fetális szubtypusban, megvizsgáljuk a miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-34a, miR-96, miR-122, miR-140, miR-181a, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-223 és miR-224 miRNS-ek expressziós szintjének megváltozását és összehasonlítjuk a HCC-ben közölt irodalmi adatokkal, valamint megvizsgáljuk a miRNS szintek összefüggését a betegek túlélésével. A **miR-18a** magasabb expressziót mutatott a rosszabb prognózisú embrionális szubtypusban a differenciáltabb, jobb prognózissal bíró fetális szubtypussal szemben, míg a **miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221** expressziója eltérőnek bizonyult a hepatoblastoma mintákban a tumormentes környező májhoz képest. Továbbá az embrionális és környező máj viszonylatában a miR-122, fetális és máj összevetésében pedig a miR-17-5p, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221 expressziója volt különböző. Ezen felül a **magas miR-21, valamint alacsony miR-222 és miR-224** szintek a vizsgált hepatoblastomás betegek jobb teljes túlélésével társultak, amely előrejelezheti a prognózis felállításában betöltendő szerepüket is. A túléléssel összefüggést mutató miRNS-ek közös célgénjeinek *in silico* vizsgálatával a ZNF207 cink-ujj fehérje génjét kaptuk eredményül, amelynek expresszióját fehérjeszinten validáltuk a vizsgált hepatoblastoma mintákban. Ennek eredményeként különbség mutatkozott a hepatoblastoma, elsősorban az embrionális komponens, és a környező máj között. A malignus májdaganatokban, így hepatoblastomában is gyakorta érintett β -catenin magi és citoplazmatikus lokalizációja fordított arányú korrelációt mutatott a miR-17-5p, miR-122, miR-195 és

miR-210 expressziójával. A hepatoblastoma HCC-vel szembeni eltérő biológiájára utalhat az, hogy miR-17-5p és miR-210 szintek változásának irányát hepatoblastomában ellentétesnek találtuk HCC-hez viszonyítva. Úgy tűnik, az eredményeink alátámasztják azt, hogy a miRNS-eknek HCC-vel részben megegyező, részben eltérő módon, hepatoblastomában is szerepük van.

Megfigyeléseink felvetik a miRNS-ek alkalmazhatóságát hepatoblastomában, mint diagnosztikai és prognosztikai faktorok.

9. SUMMARY

Hepatoblastoma (HB) is the most common primary liver cancer in childhood. microRNAs (miRNA) are small noncoding RNAs, which play important roles in tumorigenesis. We aimed to determine miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-34a, miR-96, miR-122, miR-181a, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-223 and miR-224 expression levels of the main subtypes of the most common HB histological epithelial type to reveal the differences and relate them to survival. Relative expressions of the mentioned miRNAs were determined by TaqMan MicroRNA Assays.

Results and conclusions:

1. It was found that miR-18a was able to separate the embryonal from the fetal component at miRNA expression level. miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210, miR-214 and miR-221 levels were capable of separating HB and non-tumorous SL samples. Altered miR-122 level was found in the embryonal component and altered miR-17-5p, miR-195, miR-210, miR-214 and miR-221 levels were observed in the fetal component as compared with SL samples.

2. High miR-21, low miR-222 and low miR-224 levels proved to be independent prognostic factors for HB and were associated with significantly increased OS. These miRNAs could serve as valuable tools for predicting OS of HB patients regardless of epithelial subtype.

3. Bioinformatical validation revealed that the common target gene of miR-21, miR-222 and miR-224 is ZNF207. By immunohistochemistry, this gene resulted an altered expression level in the embryonal compartment compared to SL samples and also showed significant difference between all of the HB and SL samples.

4. Nuclear β -catenin immunostaining was correlated to miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 and miR-214 relative expression levels, with correlation found between cytoplasmic β -catenin immunostaining and miR-17-5p, miR-122, miR-195 and miR-210 expressions.

5. miR-17-5p and miR-210 relative expression levels demonstrated differences as compared with HCC.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Adesina, A. M., D. Lopez-Terrada, K. K. Wong, P. Gunaratne, Y. Nguyen, J. Pulliam, J. Margolin és M. J. Finegold (2009). "Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways." Hum Pathol **40**(6): 843-853.

Agarwala, S. (2012). "Primary malignant liver tumors in children." Indian J Pediatr **79**(6): 793-800.

Allan, B. J., P. P. Parikh, S. Diaz, E. A. Perez, H. L. Neville és J. E. Sola (2013). "Predictors of survival and incidence of hepatoblastoma in the paediatric population." HPB (Oxford).

Andersen, C. L., J. L. Jensen és T. F. Orntoft (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." Cancer Res **64**(15): 5245-5250.

Bai, S., M. W. Nasser, B. Wang, S. H. Hsu, J. Datta, H. Kutay, A. Yadav, G. Nuovo, P. Kumar és K. Ghoshal (2009). "MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib." J Biol Chem **284**(46): 32015-32027.

Bao, L., Y. Yan, C. Xu, W. Ji, S. Shen, G. Xu, Y. Zeng, B. Sun, H. Qian, L. Chen, M. Wu, J. Chen és C. Su (2013). "MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways." Cancer Lett.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.

Barwad, A., N. Gupta, K. Gupta, A. Rajwanshi, R. K. Marwaha, K. L. Rao, P. Dey, R. Srinivasan és R. Nijhawan (2013). "Hepatoblastoma-An attempt of histological subtyping on fine-needle aspiration material." Diagn Cytopathol **41**(2): 95-101.

Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks és C. Sander (2008). "The microRNA.org resource: targets and expression." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D149-153.

Bommer, G. T., I. Gerin, Y. Feng, A. J. Kaczorowski, R. Kuick, R. E. Love, Y. Zhai, T. J. Giordano, Z. S. Qin, B. B. Moore, O. A. MacDougald, K. R. Cho és E. R. Fearon (2007). "p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes." Curr Biol **17**(15): 1298-1307.

Borel, F., P. Konstantinova és P. L. Jansen (2012). "Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma." J Hepatol **56**(6): 1371-1383.

Braconi, C., J. C. Henry, T. Kogure, T. Schmittgen és T. Patel (2011). "The role of microRNAs in human liver cancers." Semin Oncol **38**(6): 752-763.

Brock, M., M. Trenkmann, R. E. Gay, S. Gay, R. Speich és L. C. Huber (2011). "MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes." J Biol Chem **286**(46): 40142-40150.

Brotto, M. és M. J. Finegold (2002). "Distinct patterns of p27/KIP 1 gene expression in hepatoblastoma and prognostic implications with correlation before and after chemotherapy." Hum Pathol **33**(2): 198-205.

Buendia, M. A. (2002). "Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects." Med Pediatr Oncol **39**(5): 530-535.

Cairo, S., C. Armengol és M. A. Buendia (2012). "Activation of Wnt and Myc signaling in hepatoblastoma." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 480-486.

Cairo, S., C. Armengol, A. De Reynies, Y. Wei, E. Thomas, C. A. Renard, A. Goga, A. Balakrishnan, M. Semeraro, L. Gresh, M. Pontoglio, H. Strick-Marchand, F. Levillayer, Y. Nouet, D. Rickman, F. Gauthier, S. Branchereau, L. Brugieres, V. Laithier, R. Bouvier, F. Boman, G. Basso, J. F. Michiels, P. Hofman, F. Arbez-Gindre, H. Jouan, M. C. Rousselet-Chapeau, D. Berrebi, L. Marcellin, F. Plenat, D. Zachar, M. Joubert, J. Selves, D. Pasquier, P. Bioulac-Sage, M. Grotzer, M. Childs, M. Fabre és M. A. Buendia (2008). "Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer." Cancer Cell **14**(6): 471-484.

Cairo, S., Y. Wang, A. de Reynies, K. Duroure, J. Dahan, M. J. Redon, M. Fabre, M. McClelland, X. W. Wang, C. M. Croce és M. A. Buendia (2010). "Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20471-20476.

Chen, L., M. Jiang, W. Yuan és H. Tang (2012). "miR-17-5p as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma." J Invest Surg **25**(3): 156-161.

Chen, R. X., Y. H. Xia, T. C. Xue és S. L. Ye (2012). "Suppression of microRNA-96 expression inhibits the invasion of hepatocellular carcinoma cells." Mol Med Rep **5**(3): 800-804.

Chen, X., Y. Zhang, J. Yan, R. Sadiq és T. Chen (2013). "miR-34a suppresses mutagenesis by inducing apoptosis in human lymphoblastoid TK6 cells." Mutat Res.

Chen, X. M. (2009). "MicroRNA signatures in liver diseases." World Journal of Gastroenterology **15**(14): 1665-1672.

Chopra, A., V. K. Iyer, S. Agarwala, S. R. Mathur, M. Aron, S. D. Gupta és K. Verma (2010). "Apoptotic protein expression, glycogen content, DNA ploidy and cell proliferation in hepatoblastoma subtyping and their role in prognostication." Pediatr Surg Int **26**(12): 1173-1178.

Ciesla, M., K. Skrzypek, M. Kozakowska, A. Loboda, A. Jozkowicz és J. Dulak (2011). "MicroRNAs as biomarkers of disease onset." Anal Bioanal Chem **401**(7): 2051-2061.

Czauderna, P., D. Lopez-Terrada, E. Hiyama, B. Haberle, M. H. Malogolowkin és R. L. Meyers (2014). "Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy." Curr Opin Pediatr **26**(1): 19-28.

Dezso, K., J. Halasz, H. C. Bisgaard, S. Paku, E. Turanyi, Z. Schaff és P. Nagy (2008). "Delta-like protein (DLK) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas." Virchows Arch **452**(4): 443-448.

Dezsofi, A., V. McLin és N. Hadzic (2014). "Hepatic neoplasms in children: A focus on differential diagnosis." Clin Res Hepatol Gastroenterol **38**(4): 399-402.

Dweep, H., C. Sticht és N. Gretz (2013). "In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions." Curr Genomics **14**(2): 127-136.

Dweep, H., C. Sticht, A. Kharkar, P. Pandey és N. Gretz (2013). "Parallel analysis of mRNA and microRNA microarray profiles to explore functional regulatory patterns in polycystic kidney disease: using PKD/Mhm rat model." PLoS One **8**(1): e53780.

Dweep, H., C. Sticht, P. Pandey és N. Gretz (2011). "miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes." J Biomed Inform **44**(5): 839-847.

Elamin, B. K., E. Callegari, L. Gramantieri, S. Sabbioni és M. Negrini (2011). "MicroRNA response to environmental mutagens in liver." Mutat Res **717**(1-2): 67-76.

Enright, A. J., B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander és D. S. Marks (2003). "MicroRNA targets in Drosophila." Genome Biol **5**(1): R1.

Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot és B. P. Monia (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." Cell Metab **3**(2): 87-98.

Faller, M. és F. Guo (2008). "MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat." Biochim Biophys Acta **1779**(11): 663-667.

Farazi, T. A., J. I. Spitzer, P. Morozov és T. Tuschl (2011). "miRNAs in human cancer." J Pathol **223**(2): 102-115.

Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya és N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.

Finch, M. L., J. U. Marquardt, G. C. Yeoh és B. A. Callus (2014). "Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease." Int J Biochem Cell Biol **54c**: 288-303.

Fu, X., Q. Wang, J. Chen, X. Huang, X. Chen, L. Cao, H. Tan, W. Li, L. Zhang, J. Bi, Q. Su és L. Chen (2011). "Clinical significance of miR-221 and its inverse correlation with p27Kip(1) in hepatocellular carcinoma." Mol Biol Rep **38**(5): 3029-3035.

Furukawa, N., F. Sakurai, K. Katayama, N. Seki, K. Kawabata és H. Mizuguchi (2011). "Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA." Journal of Controlled Release **150**(1): 94-101.

Furuta, M., K. Kozaki, K. Tanimoto, S. Tanaka, S. Arai, T. Shimamura, A. Niida, S. Miyano és J. Inazawa (2013). "The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma." PLoS One **8**(3): e60155.

Garofalo, M., G. Di Leva, G. Romano, G. Nuovo, S. S. Suh, A. Nganheu, C. Taccioli, F. Pichiorri, H. Alder, P. Secchiero, P. Gasparini, A. Gonelli, S. Costinean, M. Acunzo, G. Condorelli és C. M. Croce (2009). "miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation." Cancer Cell **16**(6): 498-509.

Garofalo, M., C. Quintavalle, G. Romano, C. M. Croce és G. Condorelli (2012). "miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy." Curr Mol Med **12**(1): 27-33.

Gelley, F., G. Zadori, B. Nemes, M. Fassan, G. Lendvai, E. Sarvary, A. Doros, Z. Gerlei, P. Nagy, Z. Schaff és A. Kiss (2014). "MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for hepatitis C virus cirrhosis." J Gastroenterol Hepatol **29**(1): 121-127.

Gomes, C. P., J. H. Cho, L. Hood, O. L. Franco, R. W. Pereira és K. Wang (2013). "A Review of Computational Tools in microRNA Discovery." Front Genet **4**: 81.

Gramantieri, L., M. Ferracin, F. Fornari, A. Veronese, S. Sabbioni, C. G. Liu, G. A. Calin, C. Giovannini, E. Ferrazzi, G. L. Grazi, C. M. Croce, L. Bolondi és M. Negrini (2007). "Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma." Cancer Res **67**(13): 6092-6099.

Gyongyosi, B., E. Vegh, B. Jaray, E. Szekely, M. Fassan, G. Bodoky, Z. Schaff és A. Kiss (2014). "Pretreatment MicroRNA Level and Outcome in Sorafenib-treated Hepatocellular Carcinoma." J Histochem Cytochem **62**(8): 547-555.

Gyorffy, B. és R. Schafer (2009). "Meta-analysis of gene expression profiles related to relapse-free survival in 1,079 breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **118**(3): 433-441.

Halasz, J., A. Holczbauer, C. Paska, M. Kovacs, G. Benyo, T. Verebely, Z. Schaff és A. Kiss (2006). "Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma." Hum Pathol **37**(5): 555-561.

He, Q., X. Zhou, S. Li, Y. Jin, Z. Chen, D. Chen, Y. Cai, Z. Liu, T. Zhao és A. Wang (2013). "MicroRNA-181a suppresses salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by targeting MAPK-Snai2 pathway." Biochim Biophys Acta **1830**(11): 5258-5266.

Hiyama, E. (2013). "Current therapeutic strategies for childhood hepatic malignant tumors." Int J Clin Oncol **18**(6): 943-945.

Hsu, S. D., F. M. Lin, W. Y. Wu, C. Liang, W. C. Huang, W. L. Chan, W. T. Tsai, G. Z. Chen, C. J. Lee, C. M. Chiu, C. H. Chien, M. C. Wu, C. Y. Huang, A. P. Tsou és H. D. Huang (2011). "miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D163-169.

Hu, J., Y. Xu, J. Hao, S. Wang, C. Li és S. Meng (2012). "MiR-122 in hepatic function and liver diseases." Protein Cell **3**(5): 364-371.

Ismail, H., D. Broniszczak, P. Kalicinski, B. Dembowska-Baginska, D. Perek, J. Teisseyre, P. Kluge, A. Kosciesza, A. Lembas és M. Markiewicz (2012). "Changing treatment and outcome of children with hepatoblastoma: analysis of a single center experience over the last 20 years." J Pediatr Surg **47**(7): 1331-1339.

Javeri, A., M. Ghaffarpour, M. F. Taha és M. Houshmand (2013). "Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis." Med Oncol **30**(1): 413.

Ji, J., T. Yamashita, A. Budhu, M. Forgues, H. L. Jia, C. Li, C. Deng, E. Wauthier, L. M. Reid, Q. H. Ye, L. X. Qin, W. Yang, H. Y. Wang, Z. Y. Tang, C. M. Croce és X. W. Wang (2009). "Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells." Hepatology **50**(2): 472-480.

Ji, J., J. Zhang, G. Huang, J. Qian, X. Wang és S. Mei (2009). "Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation." FEBS Lett **583**(4): 759-766.

Jiang, J., Y. Gusev, I. Aderca, T. A. Mettler, D. M. Nagorney, D. J. Brackett, L. R. Roberts és T. D. Schmittgen (2008). "Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival." Clin Cancer Res **14**(2): 419-427.

Jiang, Q., Y. Wang, Y. Hao, L. Juan, M. Teng, X. Zhang, M. Li, G. Wang és Y. Liu (2009). "miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D98-104.

John, B., A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander és D. S. Marks (2004). "Human MicroRNA targets." PLoS Biol **2**(11): e363.

Jopling, C. L. (2008). "Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122." Biochem Soc Trans **36**(Pt 6): 1220-1223.

Joshi, S. R., J. M. McLendon, B. S. Comer és W. T. Gerthoffer (2011). "MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease." Pulm Circ **1**(3): 357-364.

Kadera, B. E., L. Li, P. A. Toste, N. Wu, C. Adams, D. W. Dawson és T. R. Donahue (2013). "MicroRNA-21 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tumor-Associated Fibroblasts Promotes Metastasis." PLoS One **8**(8): e71978.

Karakatsanis, A., I. Papaconstantinou, M. Gazouli, A. Lyberopoulou, G. Polymeneas és D. Voros (2013). "Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance." Mol Carcinog **52**(4): 297-303.

Kemeny, V., U. Meder, M. Babosa, E. Kontor, Z. Hajmassy és Z. Schaff (2000). "[Childhood liver tumor in Hungary: two interesting clinical cases]." Magy Onkol **44**(4): 271-274.

Kerr, T. A., K. M. Korenblat és N. O. Davidson (2011). "MicroRNAs and liver disease." Transl Res **157**(4): 241-252.

Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul és E. Segal (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." Nat Genet **39**(10): 1278-1284.

Kiriakidou, M., P. T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos és A. Hatzigeorgiou (2004). "A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets." Genes Dev **18**(10): 1165-1178.

Kiss, A., A. Szepesi, G. Lotz, P. Nagy és Z. Schaff (1998). "Expression of transforming growth factor-alpha in hepatoblastoma." Cancer **83**(4): 690-697.

Kozomara, A. és S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D152-157.

Krek, A., D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel és N. Rajewsky (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet **37**(5): 495-500.

Kwiecinski, M., A. Noetel, N. Elfimova, J. Trebicka, S. Schievenbusch, I. Strack, L. Molnar, M. von Brandenstein, U. Tox, R. Nischt, O. Coutelle, H. P. Dienes és M. Odenthal (2011). "Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction." PLoS One **6**(9): e24568.

Ladeiro, Y., G. Couchy, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, L. Pelletier, S. Rebouissou és J. Zucman-Rossi (2008). "MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations." Hepatology **47**(6): 1955-1963.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel és T. Tuschl (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.

Lakner, A. M., H. L. Bonkovsky és L. W. Schrum (2011). "microRNAs: fad or future of liver disease." World J Gastroenterol **17**(20): 2536-2542.

Lall, S., D. Grun, A. Krek, K. Chen, Y. L. Wang, C. N. Dewey, P. Sood, T. Colombo, N. Bray, P. Macmenamin, H. L. Kao, K. C. Gunsalus, L. Pachter, F. Piano és N. Rajewsky (2006). "A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*." Curr Biol **16**(5): 460-471.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum és V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.

Lendvai, G., A. Kiss, I. Kovalszky és Z. Schaff (2012). "[MicroRNAs in hepatocarcinogenesis]." Orv Hetil **153**(25): 978-989.

Lewis, B. P., C. B. Burge és D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel és C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.

Li, J., Y. Wang, W. Yu, J. Chen és J. Luo (2011). "Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance." Biochem Biophys Res Commun **406**(1): 70-73.

Li, L., Z. Guo, J. Wang, Y. Mao és Q. Gao (2012). "Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening." Dig Dis Sci **57**(11): 2910-2916.

Li, Q., N. J. Birkbak, B. Györffy, Z. Szallasi és A. C. Eklund (2011). "Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene." BMC Bioinformatics **12**: 474.

Li, Q., C. Ding, C. Chen, Z. Zhang, H. Xiao, F. Xie, L. Lei, Y. Chen, B. Mao, M. Jiang, J. Li, D. Wang és G. Wang (2014). "miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol Hepatol **29**(4): 835-842.

Liang, Y., D. Ridzon, L. Wong és C. Chen (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.

Liu, W. H., S. H. Yeh, C. C. Lu, S. L. Yu, H. Y. Chen, C. Y. Lin, D. S. Chen és P. J. Chen (2009). "MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells." Gastroenterology **136**(2): 683-693.

Liu, Z. R., X. W. Chen, X. H. Qiao, R. Wang és Z. Xiang (2009). "[Detection of miR-122a and miR-224 expression in hepatocellular carcinoma by real-time fluorescence quantitative RT-PCR]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **29**(4): 751-753.

Lopez-Terrada, D. és A. Zimmermann (2012). "Current issues and controversies in the classification of pediatric hepatocellular tumors." Pediatr Blood Cancer **59**(5): 780-784.

Lu, S., S. Wang, S. Geng, S. Ma, Z. Liang és B. Jiao (2013). "Upregulation of microRNA-224 confers a poor prognosis in glioma patients." Clin Transl Oncol **15**(7): 569-574.

Ma, D., X. Tao, F. Gao, C. Fan és D. Wu (2012). "miR-224 functions as an oncomiRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling." Oncol Lett **4**(3): 483-488.

Magrelli, A., G. Azzalin, M. Salvatore, M. Viganotti, F. Tosto, T. Colombo, R. Devito, A. Di Masi, A. Antoccia, S. Lorenzetti, F. Maranghi, A. Mantovani, C. Tanzarella, G. Macino és D. Taruscio (2009). "Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients." Transl Oncol **2**(3): 157-163.

Maragkakis, M., P. Alexiou, G. L. Papadopoulos, M. Reczko, T. Dalamagas, G. Giannopoulos, G. Goumas, E. Koukis, K. Kourtis, V. A. Simossis, P. Sethupathy, T.

Vergoulis, N. Koziris, T. Sellis, P. Tsanakas és A. G. Hatzigeorgiou (2009). "Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels." BMC Bioinformatics **10**: 295.

Megraw, M., P. Sethupathy, B. Corda és A. G. Hatzigeorgiou (2007). "miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D149-155.

Miranda, K. C., T. Huynh, Y. Tay, Y. S. Ang, W. L. Tam, A. M. Thomson, B. Lim és I. Rigoutsos (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." Cell **126**(6): 1203-1217.

miRBase. (2014). from <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>.

Morimura, R., S. Komatsu, D. Ichikawa, H. Takeshita, M. Tsujiura, H. Nagata, H. Konishi, A. Shiozaki, H. Ikoma, K. Okamoto, T. Ochiai, H. Taniguchi és E. Otsuji (2011). "Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer." Br J Cancer **105**(11): 1733-1740.

Murakami, Y., T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue és K. Shimotohno (2006). "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues." Oncogene **25**(17): 2537-2545.

O'Day, E. és A. Lal (2010). "MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer." Breast Cancer Res **12**(2): 201.

Ogawa, T., M. Enomoto, H. Fujii, Y. Sekiya, K. Yoshizato, K. Ikeda és N. Kawada (2012). "MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis." Gut **61**(11): 1600-1609.

Pahl, P. M., Y. K. Hodges, L. Meltesen, M. B. Perryman, K. B. Horwitz és L. D. Horwitz (1998). "ZNF207, a ubiquitously expressed zinc finger gene on chromosome 6p21.3." Genomics **53**(3): 410-412.

Papagregoriou, G., K. Erguler, H. Dweep, K. Voskarides, P. Koupepidou, Y. Athanasiou, A. Pierides, N. Gretz, K. N. Felekis és C. Deltas (2012). "A miR-1207-5p binding site polymorphism abolishes regulation of HBEGF and is associated with disease severity in CFHR5 nephropathy." PLoS One **7**(2): e31021.

Park, J. K., T. Kogure, G. J. Nuovo, J. Jiang, L. He, J. H. Kim, M. A. Phelps, T. L. Papenfuss, C. M. Croce, T. Patel és T. D. Schmittgen (2011). "miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival." Cancer Res **71**(24): 7608-7616.

Penna, E., F. Orso, D. Cimino, E. Tenaglia, A. Lembo, E. Quaglino, L. Polisenio, A. Haimovic, S. Osella-Abate, C. De Pitta, E. Pinatel, M. B. Stadler, P. Provero, M. G. Bernengo, I. Osman és D. Taverna (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C." Embo j **30**(10): 1990-2007.

Pineau, P., S. Volinia, K. McJunkin, A. Marchio, C. Battiston, B. Terris, V. Mazzaferro, S. W. Lowe, C. M. Croce és A. Dejean (2010). "miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 264-269.

Prokurat, A., P. Kluge, A. Kosciesza, D. Perek, A. Kappeler és A. Zimmermann (2002). "Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin." Med Pediatr Oncol **39**(5): 510-518.

Purcell, R., M. Childs, R. Maibach, C. Miles, C. Turner, A. Zimmermann, P. Czauderna és M. Sullivan (2012). "Potential biomarkers for hepatoblastoma: results from the SIOPEL-3 study." Eur J Cancer **48**(12): 1853-1859.

Ranji, N., M. Sadeghizadeh, M. A. Shokrgozar, B. Bakhshandeh, M. Karimipour, A. Amanzadeh és K. Azadmanesh (2013). "miR-17-92 cluster: an apoptosis inducer or proliferation enhancer." Mol Cell Biochem.

Rehmsmeier, M., P. Steffen, M. Hochsmann és R. Giegerich (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes." Rna **10**(10): 1507-1517.

Roessler, S., H. L. Jia, A. Budhu, M. Forgues, Q. H. Ye, J. S. Lee, S. S. Thorgeirsson, Z. Sun, Z. Y. Tang, L. X. Qin és X. W. Wang (2010). "A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients." Cancer Res **70**(24): 10202-10212.

Rong, M., G. Chen és Y. Dang (2013). "Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro." BMC Cancer **13**: 21.

Rosenfeld, N., R. Aharonov, E. Meiri, S. Rosenwald, Y. Spector, M. Zepeniuk, H. Benjamin, N. Shabes, S. Tabak, A. Levy, D. Lebanony, Y. Goren, E. Silberschein, N. Targan, A. Ben-Ari, S. Gilad, N. Sion-Vardy, A. Tobar, M. Feinmesser, O. Kharenko, O. Nativ, D. Nass, M. Perelman, A. Yosepovich, B. Shalmon, S. Polak-Charcon, E.

Fridman, A. Avniel, I. Bentwich, Z. Bentwich, D. Cohen, A. Chajut és I. Barshack (2008). "MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin." Nat Biotechnol **26**(4): 462-469.

Roy, S., E. Levi, A. P. Majumdar és F. H. Sarkar (2012). "Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF." J Hematol Oncol **5**: 58.

Salvi, A., E. Abeni, N. Portolani, S. Barlati és G. De Petro (2013). "Human hepatocellular carcinoma cell-specific miRNAs reveal the differential expression of miR-24 and miR-27a in cirrhotic/non-cirrhotic HCC." Int J Oncol **42**(2): 391-402.

Saxena, R., J. L. Leake, E. A. Shafford, M. Davenport, A. P. Mowat, J. Pritchard, G. Mieli-Vergani, E. R. Howard, L. Spitz, M. Malone és et al. (1993). "Chemotherapy effects on hepatoblastoma. A histological study." Am J Surg Pathol **17**(12): 1266-1271.

Schlachter, K., M. Gyugos, J. Halasz, G. Lendvai, K. Baghy, M. Garami, B. Gyongyosi, Z. Schaff és A. Kiss (2014). "High tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma." Histopathology.

Scisciani, C., S. Vossio, F. Guerrieri, V. Schinzari, R. De Iaco, P. D'Onorio de Meo, M. Cervello, G. Montalto, T. Pollicino, G. Raimondo, M. Levrero és N. Pediconi (2012). "Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFkappaB inflammatory pathways." J Hepatol **56**(4): 855-861.

Semeraro, M., S. Branchereau, R. Maibach, J. Zsiros, M. Casanova, P. Brock, C. Domerg, D. C. Aronson, A. Zimmermann, V. Laithier, M. Childs, D. Roebuck, G. Perilongo, P. Czauderna és L. Brugieres (2013). "Relapses in hepatoblastoma patients: clinical characteristics and outcome--experience of the International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL)." Eur J Cancer **49**(4): 915-922.

Shan, S. W., L. Fang, T. Shatseva, Z. J. Rutnam, X. Yang, W. Du, W. Y. Lu, J. W. Xuan, Z. Deng és B. B. Yang (2013). "Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways." J Cell Sci **126**(Pt 6): 1517-1530.

Shen, S. N., L. F. Wang, Y. F. Jia, Y. Q. Hao, L. Zhang és H. Wang (2013). "Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer." Diagn Pathol **8**: 69.

Shenouda, S. K. és S. K. Alahari (2009). "MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?" Cancer Metastasis Rev **28**(3-4): 369-378.

Shih, T. C., Y. J. Tien, C. J. Wen, T. S. Yeh, M. C. Yu, C. H. Huang, Y. S. Lee, T. C. Yen és S. Y. Hsieh (2012). "MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma." J Hepatol **57**(3): 584-591.

Shimakami, T., D. Yamane, R. K. Jangra, B. J. Kempf, C. Spaniel, D. J. Barton és S. M. Lemon (2012). "Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(3): 941-946.

Shin, K. H., S. D. Bae, H. S. Hong, R. H. Kim, M. K. Kang és N. H. Park (2011). "miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras." Biochem Biophys Res Commun **404**(4): 896-902.

Spector, L. G. és J. Birch (2012). "The epidemiology of hepatoblastoma." Pediatr Blood Cancer **59**(5): 776-779.

Su, H., J. R. Yang, T. Xu, J. Huang, L. Xu, Y. Yuan és S. M. Zhuang (2009). "MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity." Cancer Res **69**(3): 1135-1142.

Tao, J., D. Wu, P. Li, B. Xu, Q. Lu és W. Zhang (2012). "microRNA-18a, a member of the oncogenic miR-17-92 cluster, targets Dicer and suppresses cell proliferation in bladder cancer T24 cells." Mol Med Rep **5**(1): 167-172.

Toledo, C. M., J. A. Herman, J. B. Olsen, Y. Ding, P. Corrin, E. J. Girard, J. M. Olson, A. Emili, J. G. DeLuca és P. J. Paddison (2014). "BuGZ is required for Bub3 stability, Bub1 kinetochore function, and chromosome alignment." Dev Cell **28**(3): 282-294.

Tombol, Z., P. Szabo, K. Racz, Z. Tulassay és P. Igaz (2007). "[Relevance of microRNA-s in neoplastic diseases]." Orv Hetil **148**(24): 1135-1141.

Ueda, T., S. Volinia, H. Okumura, M. Shimizu, C. Taccioli, S. Rossi, H. Alder, C. G. Liu, N. Oue, W. Yasui, K. Yoshida, H. Sasaki, S. Nomura, Y. Seto, M. Kaminishi, G. A. Calin és C. M. Croce (2010). "Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis." Lancet Oncol **11**(2): 136-146.

Ura, S., M. Honda, T. Yamashita, T. Ueda, H. Takatori, R. Nishino, H. Sunakozaka, Y. Sakai, K. Horimoto és S. Kaneko (2009). "Differential MicroRNA Expression Between Hepatitis B and Hepatitis C Leading Disease Progression to Hepatocellular Carcinoma." Hepatology **49**(4): 1098-1112.

Utsunomiya, T., D. Ishikawa, M. Asanoma, S. Yamada, S. Iwahashi, M. Kanamoto, Y. Arakawa, T. Ikemoto, Y. Morine, S. Imura, H. Ishibashi, C. Takasu és M. Shimada (2013). "Specific miRNA-expression profiles of non-tumor liver tissue predict a risk for recurrence of hepatocellular carcinoma." Hepatol Res.

Varnholt, H. (2008). "The role of microRNAs in primary liver cancer." Ann Hepatol 7(2): 104-113.

Varnholt, H., U. Drebbler, F. Schulze, I. Wedemeyer, P. Schirmacher, H. P. Dienes és M. Odenthal (2008). "MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma." Hepatology 47(4): 1223-1232.

Vergoulis, T., I. S. Vlachos, P. Alexiou, G. Georgakilas, M. Maragkakis, M. Reczko, S. Gerangelos, N. Koziris, T. Dalamagas és A. G. Hatzigeorgiou (2012). "TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support." Nucleic Acids Res 40(Database issue): D222-229.

von Frowein, J., P. Pagel, R. Kappler, D. von Schweinitz, A. Roscher és I. Schmid (2011). "MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma." Hepatology 53(3): 833-842.

Wang, J., D. Duncan, Z. Shi és B. Zhang (2013). "WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013." Nucleic Acids Res 41(Web Server issue): W77-83.

Wang, R., N. Zhao, S. Li, J. H. Fang, M. X. Chen, J. Yang, W. H. Jia, Y. Yuan és S. M. Zhuang (2013). "MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2 and CDC42." Hepatology.

Wang, X., J. Chen, F. Li, Y. Lin, X. Zhang, Z. Lv és J. Jiang (2012). "MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin." Biochem Biophys Res Commun 428(4): 525-531.

Wang, Y., X. Gao, F. Wei, X. Zhang, J. Yu, H. Zhao, Q. Sun, F. Yan, C. Yan, H. Li és X. Ren (2013). "Diagnostic and prognostic value of circulating miR-21 for cancer: A systematic review and meta-analysis." Gene.

Wang, Y., A. T. Lee, J. Z. Ma, J. Wang, J. Ren, Y. Yang, E. Tantoso, K. B. Li, L. L. Ooi, P. Tan és C. G. Lee (2008). "Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target." J Biol Chem 283(19): 13205-13215.

Wong, C. C., C. Wong, E. K. Tung, S. L. Au, J. M. Lee, R. T. Poon, K. Man és I. O. Ng (2011). "The MicroRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating rho-kinase 2." Gastroenterology **140**(1): 322-331.

Wong, Q. W., A. K. Ching, A. W. Chan, K. W. Choy, K. F. To, P. B. Lai és N. Wong (2010). "MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling." Clin Cancer Res **16**(3): 867-875.

Wong, Q. W., R. W. Lung, P. T. Law, P. B. Lai, K. Y. Chan, K. F. To és N. Wong (2008). "MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1." Gastroenterology **135**(1): 257-269.

Wu, W., M. Takanashi, N. Borjigin, S. I. Ohno, K. Fujita, S. Hoshino, Y. Osaka, A. Tsuchida és M. Kuroda (2013). "MicroRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis." Br J Cancer **108**(3): 653-661.

Xu, D., X. He, Y. Chang, C. Xu, X. Jiang, S. Sun és J. Lin (2013). "Inhibition of miR-96 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of HepG2 hepatoma cells." Oncol Rep **29**(2): 653-661.

Xu, J., C. Wu, X. Che, L. Wang, D. Yu, T. Zhang, L. Huang, H. Li, W. Tan, C. Wang és D. Lin (2011). "Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis." Mol Carcinog **50**(2): 136-142.

Xu, J., X. Zhu, L. Wu, R. Yang, Z. Yang, Q. Wang és F. Wu (2012). "MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/beta-catenin pathway." Liver Int **32**(5): 752-760.

Xu, T., Y. Zhu, Y. Xiong, Y. Y. Ge, J. P. Yun és S. M. Zhuang (2009). "MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells." Hepatology **50**(1): 113-121.

Yang, C. J., W. G. Shen, C. J. Liu, Y. W. Chen, H. H. Lu, M. M. Tsai és S. C. Lin (2011). "miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells." J Oral Pathol Med **40**(7): 560-566.

Yang, F., Y. Yin, F. Wang, Y. Wang, L. Zhang, Y. Tang és S. Sun (2010). "miR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway." Hepatology **51**(5): 1614-1623.

Yang, H., W. Kong, L. He, J. J. Zhao, J. D. O'Donnell, J. Wang, R. M. Wenham, D. Coppola, P. A. Kruk, S. V. Nicosia és J. Q. Cheng (2008). "MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN." Cancer Res **68**(2): 425-433.

Yang, H., T. W. Li, J. Peng, X. Tang, K. S. Ko, M. Xia és M. A. Aller (2011). "A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression." Gastroenterology **141**(1): 378-388, 388 e371-374.

Yang, W., T. Sun, J. Cao, F. Liu, Y. Tian és W. Zhu (2012). "Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro." Exp Cell Res **318**(8): 944-954.

Yang, X., W. W. Du, H. Li, F. Liu, A. Khorshidi, Z. J. Rutnam és B. B. Yang (2013). "Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion." Nucleic Acids Res.

Yang, X., J. Yu, J. Yin, Q. Xiang, H. Tang és X. Lei (2012). "MiR-195 regulates cell apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting LATS2." Pharmazie **67**(7): 645-651.

Ying, Q., L. Liang, W. Guo, R. Zha, Q. Tian, S. Huang, J. Yao, J. Ding, M. Bao, C. Ge, M. Yao, J. Li és X. He (2011). "Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma." Hepatology **54**(6): 2064-2075.

Yuan, Y., Y. Shen, L. Xue és H. Fan (2013). "miR-140 Suppresses Tumor Growth and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor." PLoS One **8**(9): e73604.

Zhang, X., Y. Nie, Y. Du, J. Cao, B. Shen és Y. Li (2012). "MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6." Tumour Biol **33**(5): 1589-1597.

Zhang, Y., S. Takahashi, A. Tasaka, T. Yoshima, H. Ochi és K. Chayama (2013). "Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol Hepatol **28**(3): 565-575.

Zhao, W. Y., D. D. Wang, M. Q. Song, L. Yang, J. Ye és L. B. Chen (2011). "[Role of microRNA-223 and its target gene oncogene c-myc in hepatocellular carcinoma pathogenesis.]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi **19**(2): 114-117.

Zhu, Q., Z. Wang, Y. Hu, J. Li, X. Li, L. Zhou és Y. Huang (2012). "miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma." Oncol Rep **27**(5): 1660-1668.

Zimmermann, A. (2002). "Hepatoblastoma with cholangioblastic features ('cholangioblastic hepatoblastoma') and other liver tumors with bimodal differentiation in young patients." Med Pediatr Oncol **39**(5): 487-491.

Zimmermann, A. (2005). "The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis." Eur J Cancer **41**(11): 1503-1514.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

1. **Gyugos, M.**, G. Lendvai, I. Kenessey, K. Schlachter, J. Halasz, P. Nagy, M. Garami, Z. Jakab, Z. Schaff and A. Kiss. (2014) microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. Virchows Arch. 2014 Apr; 464(4): 419-427. Doi:10.1007/s00428-014-1549-y.
2. K.Schlachter, **Gyugos, M.**, J. Halász, G. Lendvai, K. Baghy, M. Garami, B. Gyöngyösi, Z. Schaff, A. Kiss (2014) High Tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma. Histopathology.2014 Apr 16. doi: 10.1111/his.12436.

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

1. A. Dencs, A. Farkas, **M. Gyugos**, A. Kurcz, E. Puskas, B. Tresó, E. Rusvai, E. Barcsay and M. Takacs. (2011) Phylogenetic analysis of a nosocomial transmission of hepatitis B virus at a paediatric haematology ward. Acta Microbiol Immunol Hung, 58: 23-29.

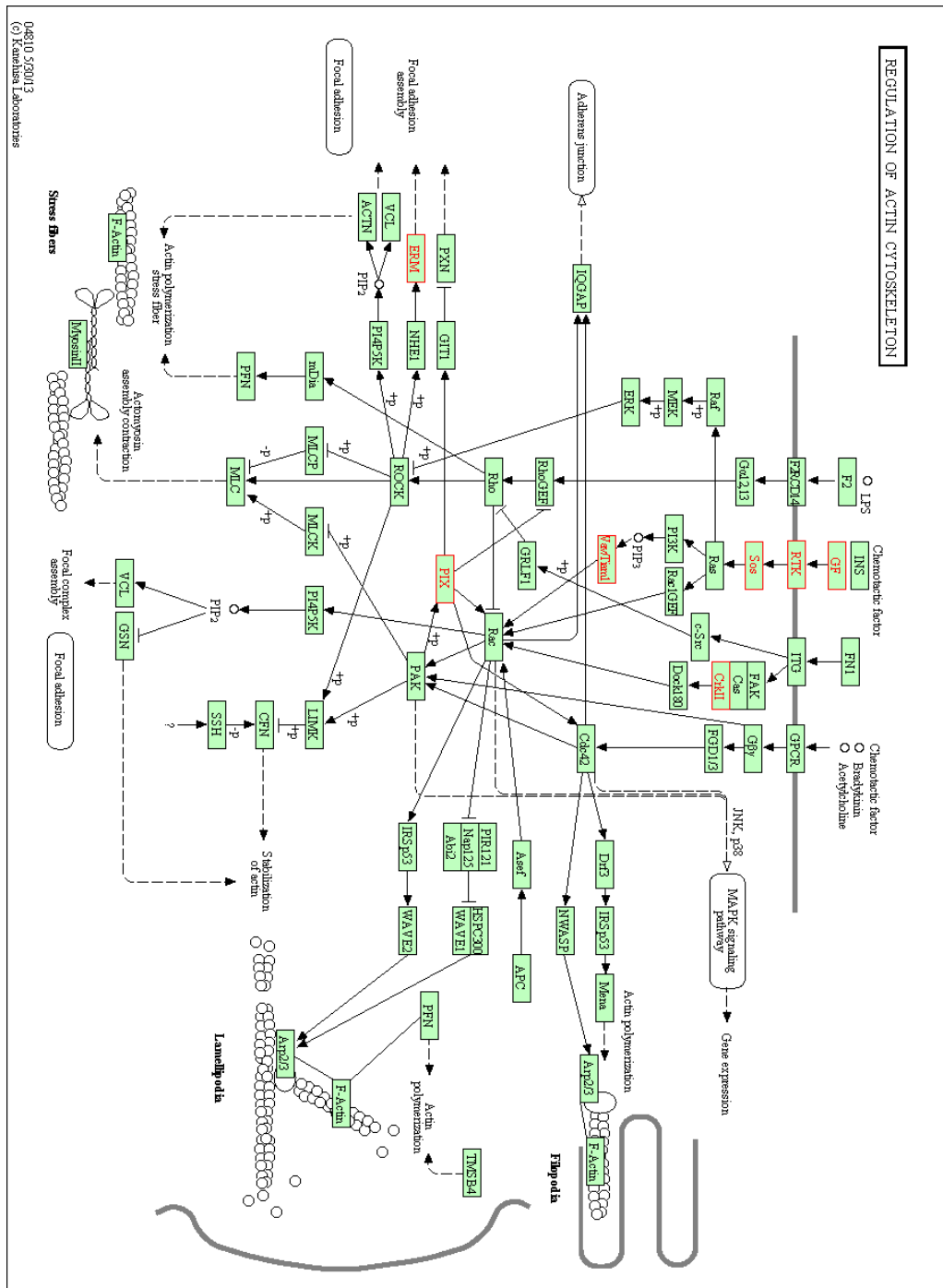
12. FÜGGELÉK

1. Ábrajegyzék

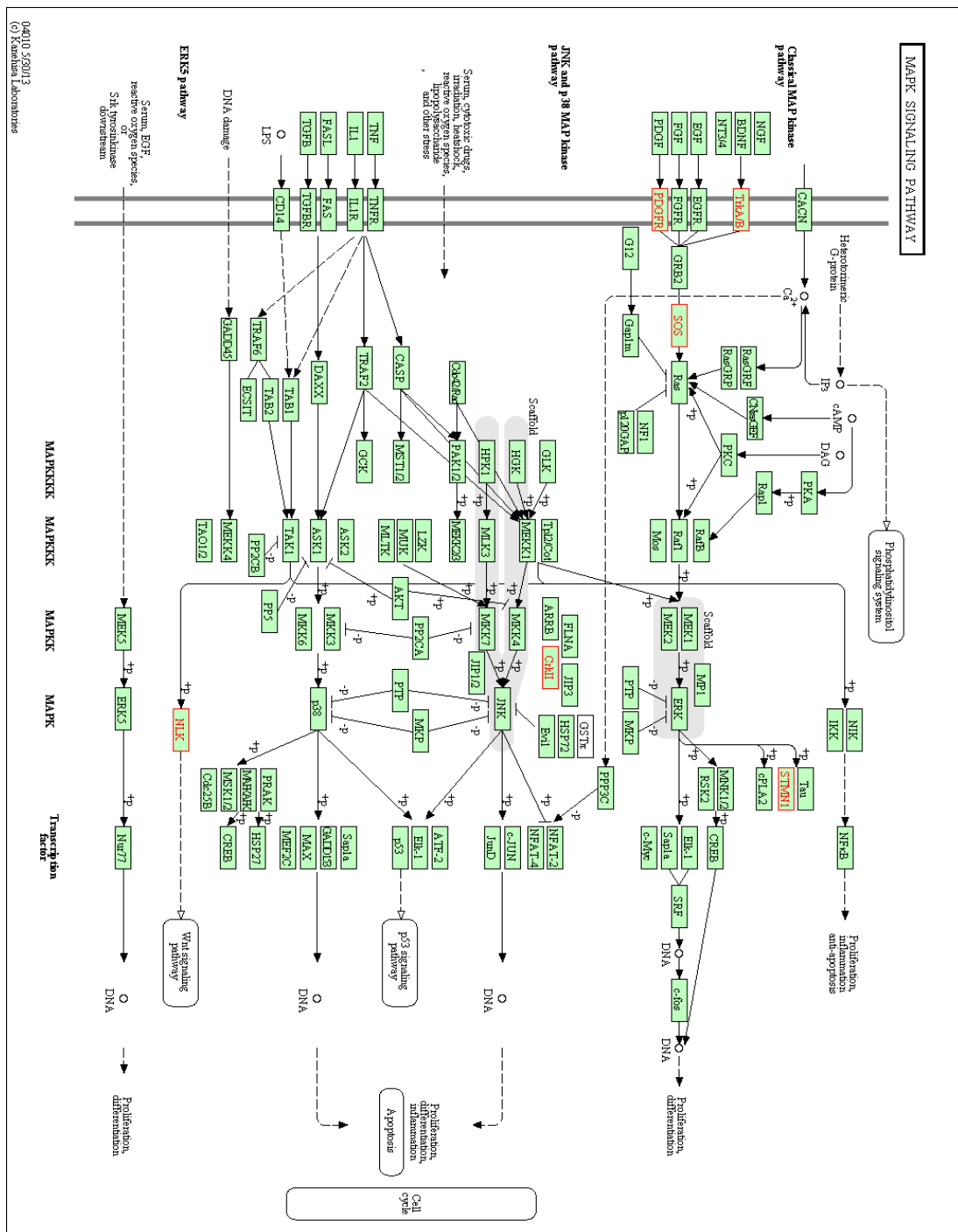
1. ábra: A hepatoblastoma fetális szubtypusának szövettani képe
2. ábra: A hepatoblastoma embrionális szubtypusának szövettani képe
3. ábra: A mikroRNS-ek biogenezeise
4. ábra: Embrionális és fetális komponens szövettani képe egy mintán belül
5. ábra: Statisztikailag szignifikáns különbségeket mutató miRNS-ek relatív expressziója tumoros (HB) és a tumormentes környező máj (NT) között
6. ábra: Az embrionális (E), fetális (F) és tumormentes környező máj (NT) közti miRNS expressziós különbségek
7. ábra: A hepatoblastoma betegek OS vizsgálata
 - A) miR-21,
 - B) miR-222,
 - C) miR-224
8. ábra: Gyenge/közepes ZNF207 festődés fetális szubtypusú hepatoblastomában (400x)
9. ábra: Erős nukleáris ZNF207 festődés embrionális szubtypusú hepatoblastomában (400x)
10. ábra: Pozitív nukleáris ZNF207 immunreakció a tumor környéki májban (400x)
11. ábra: A ZNF207 IHC pontértékeinek mediánja
12. ábra: A ZNF207 expresszió az EFS-sel összefüggésben

2. Táblázatjegyzék

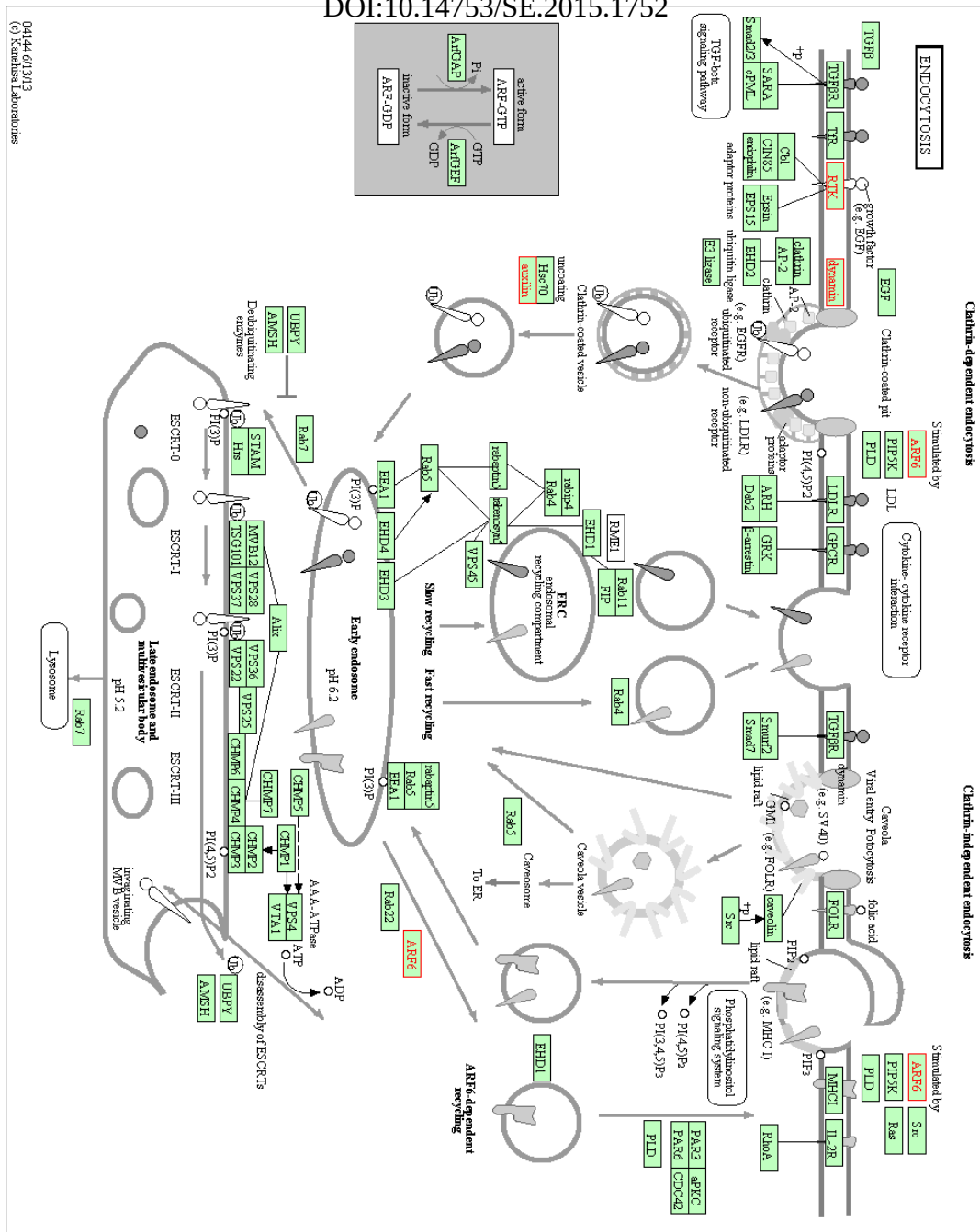
1. táblázat: A hepatoblastoma szövettani klasszifikációja
2. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ek lokalizációja és funkciója
3. táblázat: A vizsgált betegek adatai
4. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ek és a hozzájuk rendelt assay azonosítók (Applied Biosystems)
5. táblázat: A ZNF207 ellenes antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálat részletei
6. táblázat: Mann-Whitney U teszttel végzett statisztikai vizsgálatok p-értékei és a medián relatív expressziók aránya (HB/NT)
7. táblázat: A Kruskal-Wallis teszttel végzett statisztikai vizsgálat p-értékei és a medián relatív expressziók aránya a mintacsoportok között
8. táblázat: A miRNS-ek miRanda algoritmus által megjósolt célgénjeinek és célszekvenciáinak száma
9. táblázat: A három miRNS közös célgénjei által érintett útvonalak a KEGG rendszerben végzett analízissel
10. táblázat: A Györffy és mtsai által leírt módszerrel azonosított legelső 5 gén
11. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ekkel pozitív korrelációt mutató citoplazmatikus és magi β -catenin expresszió
12. táblázat: Az általunk vizsgált miRNS-ek változása hepatoblastomában és HCC-ben az irodalmi adatokkal összevetve



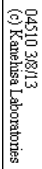
1. melléklet: Az aktin-citoszkeleton útvonal



2. melléklet: A MAPK jelátviteli útvonal



3. melléklet: Endocitózis



- 83 -

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Dr. Schaff Zsuzsának** mindazért, aminek következtében ez a munka létrejöhett. Köszönöm a szakmai útmutatásait, alaposágát, türelmét és idejét, valamint a lehetőséget, hogy kutatási eredményeinket nívós nemzetközi konferenciákon is bemutatthassuk. Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Tímár Józsefnek**, hogy intézetvezetőként lehetőséget teremtett a PhD munkám kivitelezéséhez és ezzel hozzájárult szakmai fejlődésemhez. Köszönöm **Dr. Kiss András, Dr. Lendvai Gábor** és **Dr. Lotz Gábor docens** uraknak a szakmai segítségnyújtást és a tudományos közleményekben való segítséget, szeretném megköszönni alapos és kitartó munkájukat.

Köszönettel tartozom I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, hogy létrejöhett ez a munka, hisz a mintáink egy részét ők biztosították. **Prof. Dr. Nagy Péter, Prof. Dr. Kovalszky Ilona, Dr. Baghy Kornélia**.

Hálás köszönettel tartozom a II. számú Gyerekklinika munkatársainak **Dr. Jakab Zsuzsának** és **Dr. Garami Miklós** egyetemi docens úrnak a betegadatokért. Külön köszönet illeti **Dr. Györffy Balázst**, az I. számú Gyerekklinika kutatóját, akinek alapos, precíz és gyors munkájára az *in silico* vizsgálatok során számíthattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Tőkés Anna-Máriának** a disszertációm legnagyobb alaposággal elkészített, minden apró részletre kiterjedő házi bírálatát. Köszönettel tartozom **Dr. Kenessey Istvánnak**, hogy segített tájékozódni a statisztika bonyolult világában és bármikor rendelkezésemre állt, ha segítségre volt szükségem. Szeretném megköszönni kolleganőmnek, **Dr. Schlachter Krisztinának** az immunreakciók kiértékelésében való segítséget. Köszönöm **Gyöngyösi Benedeknek** a statisztikával illetve a számítógépes szoftverek használatával kapcsolatos segítségét.

Hálásan köszönöm **Rigóné Kálé Elvirának** az angol nyelvű munkák lektorálását. Külön köszönet illeti az asszisztenseket, akik türelme határtalan és mindig a rendelkezésemre álltak: **Pekár Zoltánné, Horváth Csilla, Gregor Viktória, Sklánitzné Samodai Erika** és **Azumah Erzsébet**. Nagyon szépen köszönöm **Hegedüs Zitának** és **Pekár Zoltánnénak** a munkán túlmenően a barátságukat. A **II.sz. Patológiai Intézet** minden egyes dolgozójának köszönök mindent. Végül, de nem

utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani páromnak, **Végh Árpádnak**, hogy mindvégig támogatott, biztatott, motivált és mellettem állt.