

Betydningen af mikroribonukleinsyre for sygdomsudvikling

Læge Budiman Widjaya, læge Jakob Benedict Seidelin, professor Jørgen Olsen & overlæge Ole Haagen Nielsen

Mikroribonukleinsyre (miRNA) blev oprindeligt identificeret af *Ambros & Ruvkun* i 1993 i deres forsøg på at forstå reguleringen af genet *lin-14* i *Caenorhabditis elegans*. De opdagede, at genet *lin-14* udtrykkes i to former, dels en 61 nukleotider lang *precursor*-RNA-streng og dels en 22 nukleotider lang, dobbeltstrengt RNA. De to former af genet koder imidlertid ikke for protein [1].

Indtil 2000 mente man, at regulering af genet *lin-14* i *C. elegans* var en genetisk undtagelse, som ikke fandtes i andre organismer, indtil man identificerede et andet gen, *let-7* i *C. elegans* [1], som viste sig at findes i analoge former i andre arter, herunder hos mennesket. Siden er der hos mennesket identificeret ca. 700 miRNA'er, og antallet af publicerede miRNA-studier er i øjeblikket eksplosivt stigende.

miRNA er et endogent ikkekodende RNA, der består af 19-25 nukleotider, som kan regulere genekspressionen efter transkriptionen ved at styre degradering og translation af bestemte *messenger*-RNA'er (mRNA) [1]. Mange studier har vist, at miRNA er en vigtig regulator af celledifferentiering, -proliferation, -mobilitet og apoptose. miRNA spiller således en fremtrædende rolle for basale biologiske processer og er formentlig også afgørende for vigtige patofysiologiske sammenhænge. Flere studier tyder på, at op- og nedregulering af miRNA er årsag til blandt andet autoimmune, onkologiske, kardiovaskulære, metaboliske og infektiøse sygdomme.

Formålet med denne statusartikel er at give et kort overblik over funktionen af miRNA og miRNA's involvering i forskellige sygdomme.

BIOGENESE AF MIKRORIBONUKLEINSYRE

miRNA-gener transkriberes af RNA-polymerase-II og -III (POL-II og -III) til primære miRNA (pri-miRNA) transkripter, som er korte RNA-molekyler, der foldes op i en hårnålelignende struktur. Et proteinkompleks bestående af RNase drosha og Pasha og andre proteiner genkender pri-miRNA i cellekernen og klipper de løse ender af hårnålestrukturen, hvorved der dannes en cirka 70 nukleotider lang præ-miRNA (Figur 1).

Præ-miRNA transporteres efterfølgende aktivt ud af cellekernen, med Exportin-5 og *Ran guanosine triphosphate* (RAN-GPT) I-cytoplasma bliver buen i

præ-miRNA fjernet af RNase-III-enzymet, Dicer, og tilbage er en 19-25 nukleotider lang RNA-dobbeltstreng. I cytoplasmaet bliver RNA-dobbeltstrengen indbygget i RNA-induced silencing complex (RISC), hvorved et modent miRNA dannes. Den streng, som ikke indbygges i RISC-komplekset, frigøres og degraderes, og det modne miRNA er herefter klar til at binde sig til den komplementære sekvens på mål-mRNA'et, typisk ved den ikke-translaterede 3'-ende af mRNA. Herved forhindres translationen af mRNA til protein i cytosolen. Graden af nedregulering af genekspressionen er afhængig af bindingsgraden. Mål-mRNAet bliver degraderet, hvis et miRNA og mRNA har fuld overensstemmelse i komplementær sekvens. Hvis der er basepar, som derimod ikke passer sammen, og overensstemmelsen dermed ikke er komplet, fører bindingen til standsning af proteinsyntesen, også kaldet translationel hæmning eller *silencing* [1].

SYGDOMME OG MIKRORIBONUKLEINSYRE

Inflammationssygdomme

Inflammatorisk tarmsygdom er karakteriseret ved en dysregulering af immunsystemet. Dysreguleringen af

STATUSARTIKEL

Herlev Hospital,
Gastroenheden,
Medicinsk Sektion, og
Panum Institutttet,
Institut for Cellulær &
Molekylær Medicin



FORKORTELSER

β -MHC = β -*myosin heavy chain*

EMT = epitelial-mesenkymal transition

ERK5 = ekstracellulært signalreguleret kinase-5

HCV = hepatitis C-virus

HCN = *hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium*

IL = interleukin

IFN = interferon

MIP-2 α = *macrophage inflammatory protein-2 α*

MAPK = mitogenaktiveret proteinkinase

miRNA = mikroribonukleinsyre

mRNA = *messenger*-RNA

Pasha = partner til Drosha

pri-miRNA = primært miRNA

POL-II og -III = RNA-polymerase-II og -III

RAN-GTP = *Ran guanosine triphosphate*

Rho(A) = Ras homolog *gene family (member A)*

RISC = *RNA-induced silencing complex*

Smad4 = *Sma and Mad related protein 4*

TGF- β = *transforming growth factor β*

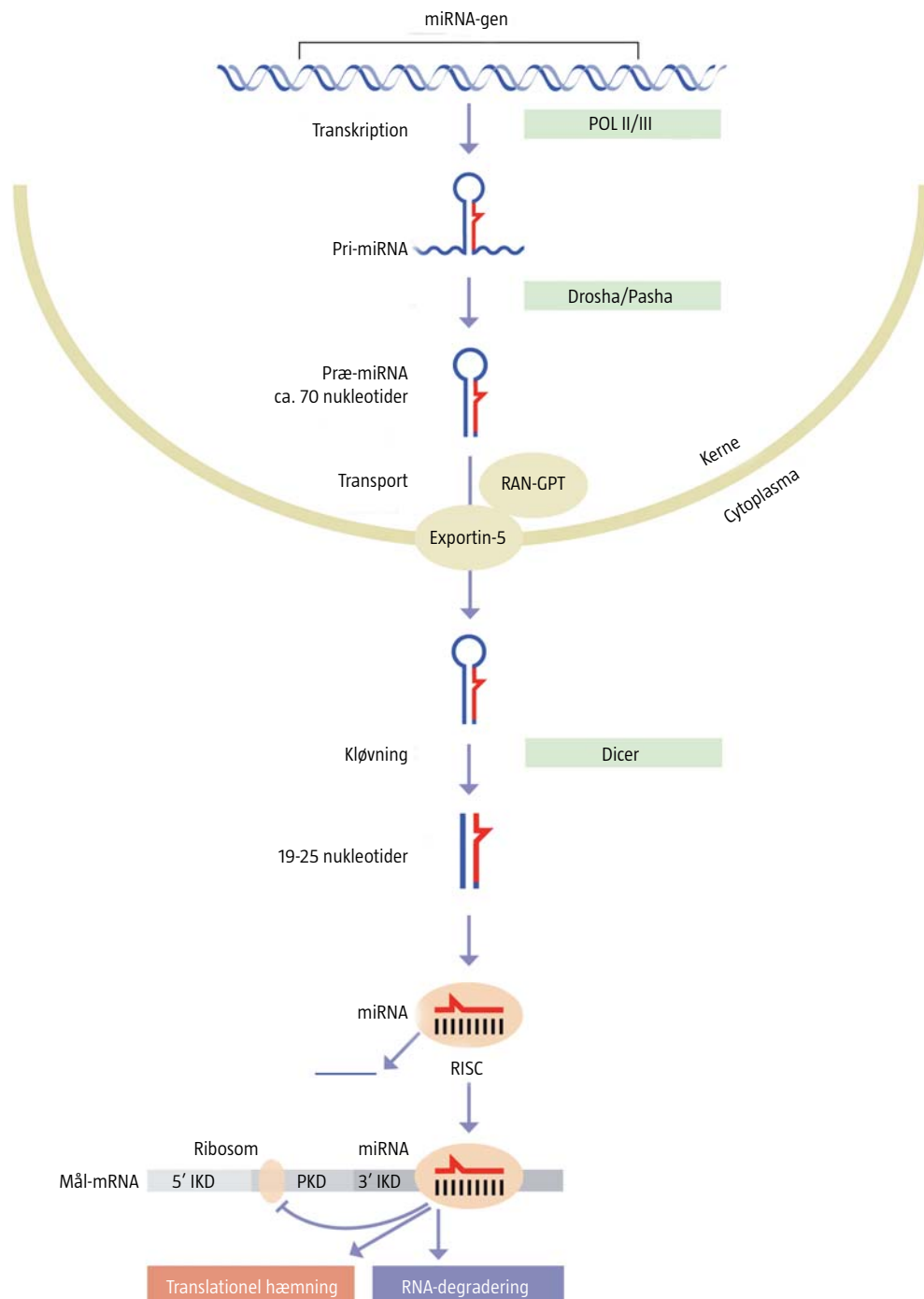
UC = colitis ulcerosa

immunsystemet kunne være forårsaget af regulering af proteinsyntesen af cytokiner og kemokiner på translationelt niveau ved mRNA-miRNA-interaktion. En ny undersøgelse har vist, at der er flere op- og nedregulerede miRNA'er hos patienter med aktiv colitis

ulcerosa (UC). Eksempelvis findes miR-192 meget nedreguleret i kolonepitelceller fra patienter med UC-aktivitet. miR-192 bindes til og hæmmer ekspresionen af *macrophage inflammatory protein-2 α* -mRNA (MIP-2 α -mRNA), som koder for et kemotaktisk cyto-

FIGUR 1

Syntese af mikroribonukleinsyre og dets betydning for proteinsyntesen.



IKD = Ikkekodende del; PKD = proteinkodende del; pri-miRNA = primært miRNA; POL-II og -III = RNA-polymerase-II og -III; RAN-GTP = *Ran* guanosine triphosphate; RISC = RNA-induced silencing complex.

kin, der produceres af makrofager og kolonepitelceller. Den nedsatte ekspresion af miR-192 fører derfor til øget translation og proteinekspresion af MIP-2 α blandt patienter med UC i aktiv fase, uden at mRNA-ekspresionen er øget. Omvendt har raske patienter en højere ekspresion af miR-192 og en lavere ekspresion af MIP-2 α [2].

Cancersygdomme

Cancersygdomme opstår på grund af uhensigtsmæssige mutationer, som aktiverer protoonkogener og deaktiverer tumorsuppressorgener. I studier har man vist, at ubalance af f.eks. miR-143/miR-145, miR-146 og miR155 fører til deregulering af en række protoonkogener og tumorsuppressorgener [1].

Studier har vist, at miRNA'er er involveret i reguleringen og differentieringen af pluripotente hæmatopoietiske stamceller. Velundersøgt er blandt andet miR-155 og miR-146. Transgene mus, som overudtrykker miR-155, får polyklonal B-celle-leukæmi. På den anden side er miR155-*knockout*-mus ikke i stand til at producere tilstrækkeligt T- eller B-celle-immunrespons og har ikke normal dendritcellefunktion. Det dårligt fungerende immunforsvar ses ved, at *knockout*-musene også har reduceret interleukin (IL)-2 og interferon (IFN)- γ -produktion. miR-155 er forhøjet hos patienter med leukæmi eller lymfom, især Burkitts lymfom. To studier har vist, at miR-146 og miR-155 er overudtrykt i synovialvæv og især i synoviale fibroblaster blandt patienter med reumatoid arthritis [3], hvilket kan have betydning for, at maligne sygdomme ses hyppigere ved denne tilstand, og samtidigt kan tænkes at spille en rolle for den inflammatoriske reaktion.

Epitelial-mesenkymal transition (EMT) er en proces, hvor epiteliiale *tight junctions* opløses, hvilket fører til ophævet adhærence og kollaps af cytoskelettet, og denne proces menes at være vigtig for, at primærtumorer metastaserer. Der er tiltagende evidens for, at signalstoffet *transforming growth factor* β (TGF- β) via blandt andet hæmning af Ras homolog *gene family, member A* (RhoA) spiller en nøglerolle for EMT. Et nyligt studie har vist, at TGF- β via *Sma and Mad related protein 4* (Smad4) opregulerer ekspresionen af miR-155. miR-155 bindes til og hæmmer translationen af RhoA-mRNA. RhoA er medlem af Ras homolog gen-GTPase-familien, som regulerer en række cellulære processer, herunder cellepolaritet, motilitet og *tight junction*-dannelse. RhoA er dermed væsentlig for cellernes stabilitet. Hæmning af RhoA-ekspresion via opregulering af miR-155 spiller formentlig en stor rolle for TGF- β 's evne til at inducere EMT [4].

Nedsat ekspresion af miR-143/145 er beskrevet

i kolorektalcancer og i prækankrøse adenomatøse polypper. En lignende nedregulering er tillige beskrevet ved mamma-, prostata-, cervix- og lymfoid cancer. miR-143/145 er in vitro beskrevet at have en tumorsupprimerende effekt. Ekstracellulært signalreguleret kinase-5 (ERK5), som inducerer celle-vækst og proliferation og er en del af mitogenaktiveret proteinkinase (MAPK)-familien, er en vigtig komponent for overlevelsen af prolifererende celler. Det er vist, at miR-143 kan hæmme ERK5 ved direkte interaktion med ERK5-mRNA.

Kardiovaskulære sygdomme

Hos patienter med hjertehypertrofi er der fundet opregulering af miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a og miR-214, og en nedregulering af miR-150 og miR-181b i kardiomyocytter. Endvidere har in vitro-undersøgelser vist, at en overudtrykkelse af ovennævnte miRNA'er inducerer hjertehypertrofi. I transgene mus er det også vist, at et overudtryk af miR-195 alene kan forårsage dilateret kardiomyopati ledsaget af overproduktion af atrialt peptid, β -type protein og *β -mysosin heavy chain* (β -MHC). Derimod fører overekspresion af miR-150 og miR-181b in vitro over en endnu ukendt mekanisme til en reduktion af kardiomyocytters størrelse [6].

Også hjerterytme og hjerterytmeforstyrrelser kan påvirkes af miRNA-ekspresion. HCN-2 og -4 er to vigtige pacemakerkanalproteiner, der kontrollerer rytimestabiliteten i hjertet. Nye studier viser, at miR-1 og miR133 påvirker ekspresionen af disse to proteiner ved binding til deres mRNA, som medfører *silencing*. miR-1 er overudtrykt i myokardiet efter et infarkt, og en overekspresion af miR-1 inducerer – mens en reduktion omvendt hæmmer – hjerterytmier. Der arbejdes på at udvikle miR-1- og miR-133-lignende molekyler, der kan manipulere reguleringen af disse mRNA'er og derved benyttes i terapeutisk øjemed [7].

Metabolisk sygdom: diabetes mellitus

Cirka 68 miRNA'er bliver udtrykt i insulinproducerende β -celler i pankreas. I øjeblikket kender man kun funktionen af et af disse miRNA'er – det β -cellespecifikke miR-375. Dyreeksperimentelle studier har vist, at miR-375 hæmmer sekretion af insulin via blokade af udtrykkelsen af myotropin, et cytoplasmatiske protein, der inducerer eksocytose af insulin granula [8]. Dette betyder, at et overudtryk af miR-375 medfører reduktion af insulinsekretionen, mens nedregulering fører til øget sekretion. Da miR-375 er β -cellespecifik, kan en manipulation af dette miRNA vise sig at blive en vigtig behandlingsform i fremtiden.

Infektiøse sygdomme: hepatitis C

Hepatitis C-virus (HCV) er et RNA-virus, der fører til kronisk leverlidelse, herunder levercirrose og -cancer og ofte til levertransplantation. Behandling med interferon α og ribavirin er en relativ ny behandlingsform, hvor 50-80% af patienterne opnår klinisk bedring. Det er vist, at det leverspecifikke miR-122 er afgørende for virusreplikation. miR-122 er således forhøjet hos patienter med HCV-infektion. miR-122 binder sig til 5'-enden af den non-translationale region af HCV-RNA og hjælper HCV-virusreplikation ved at øge bindingen af ribosomer til det virale RNA. Her er altså et eksempel på, at miRNA kan øge translation. Det er stadig uklart, hvordan HCV stimulerer ekspressionen af miR-122, som er udtrykt i værtcellens genom og ikke i HCV-RNA. En *silencing* af miR-122 med korte RNA-sekvenser med komplementær sekvens til miR-122 nedsætter HCV-virusreplikation betydeligt [9]. Derfor synes miR-122 at kunne være et terapeutisk mål for behandling af hepatitis C. I et helt nyt studie har man dog vist, at der ikke er sammenhæng mellem miR-122-ekspression og *viral load* ved HCV-infektion, og at patienter med lav miR-122 responderer dårligt på interferonbehandling [10]. Endvidere er det vist, at interferon α specifikt opregulerer en række miRNA'er, som binder til HCV-RNA, og dermed forhindrer translation. Dette er formentlig en væsentlig mekanisme bag interferon α 's antivirale effekt.

FREMTIDIGE PERSPEKTIVER

Sygdomme betinges blandt andet af proteinekspression og -funktion. Proteintranskriptionen er afhængig af mRNA. Som beskrevet ovenfor besidder miRNA en negativ reguleringsfunktion – både via *silencing* og via nedbrydning af mRNA. På denne måde påvirkes proteinsyntesen.

Som beskrevet har miRNA en betydende funktion i reguleringen af forskellige cellulære processer. Inden for en række sygdomme har studier påvist dysregulering af enkelte miRNA'er, der kan være specifikt forhøjede eller reducerede i en sygdomsgruppe. Derfor kan flere miRNA'er antageligt bruges både til diagnostik og muligvis også i terapeutisk øjemed. Området er dog stadig i sin vorden, og miRNA'ernes betydning for patofysiologi og mulig terapeutiske mål bør kortlægges for en lang række sygdomme.

KORRESPONDANCE: Budiman Widjaya, Gastroenheden, Medicinsk Sektion, Herlev Hospital, DK-2730 Herlev.
E-mail: bwidjaya@dadlnet.dk

ANTAGET: 8. april 2009

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

LITTERATUR

1. Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genom* 2008;33:139-47.

2. Wu F, Zikusoka M, Trindade A et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2alpha. *Gastroenterology* 2008;135:1624-35 e24.
3. Tili E, Michaille JJ, Costinean S et al. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:534-41.
4. Kong W, Yang H, He L et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 2008;28:6773-84.
5. Esau C, Kang X, Peralta E et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:52361-5.
6. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 2008;79:562-70.
7. Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:699-706.
8. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226-30.
9. Lodish HF, Zhou B, Liu G et al. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* 2008;8:120-30.
10. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I et al. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med* 2009;15:31-3.