



Molekularne povezave med cirkadianim ritmom in mikro RNA v hepatocelularnem karcinomu

Molecular links between circadian rhythm and micro RNA in hepatocellular carcinoma

Rok Struna,^{*1} Jan Tehovnik,^{*1} Rok Razpotnik,² Tadeja Režen²

Izvleček

Izhodišča: Cirkadiani ritem se uravnava na centralni in celični ravni preko transkripcijsko-translacijskih povratnih zank, ki so natančno uravnavane. Vpliv na uravnavanje cirkadianega ritma imajo miRNA molekule, ki skupaj s proteinskimi kompleksi privedejo do utišanja prevajanja določenih celičnih proteinov. Kronična motnja v cirkadianem ritmu lahko privede do maligne transformacije celic. Hepatocelularni karcinom je eden najpogostejših vrst raka pri človeku, pri katerem še vedno ni pojasnjen vpliv različnih signalnih poti na karcinogenezo. Namen študije je bil ugotoviti vpliv transkripcijskih dejavnikov cirkadianega ritma in miRNA na izražanje mRNA in krožnih RNA iz istega genskega lokusa, tj. gena *LDLR* (LDL receptor).

Metode: Poskus smo izvedli na celičnih linijah Hep G2 in Huh7. Sprva smo v celice s postopkom transfekcije vnesli želene molekule (hsa-miR-17 in cirkadiane transkripcijske faktorje), s katerimi smo želeli vplivati na izražanje genov, ki so nas zanimali. Iz celic smo nato osamili RNA, ki smo jo nato prepisali v komplementarno DNA in izvedli qPCR (kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo), na podlagi katere smo sklepali na raven izražanja želenih genov. Rezultate smo računalniško obdelali in jih grafično predstavili.

Rezultati: Z obdelavo rezultatov smo ugotovili, da nobene od treh hipotez nismo uspeli potrditi, saj pri nobenem rezultatu v stopnji izražanja želenih genov nismo ugotovili statistično pomembne razlike ($\alpha=0,05$).

Zaključki: Kljub temu da sprememb v izražanju genov nismo uspeli potrditi, bi bilo raziskovano področje vredno nadaljnjih raziskav, ki bi trdneje prikazale povezavo. Osrediniti bi se morali na konkretne molekule, s čimer bi pridobili nove tarče za zdravljenje jetrnih bolezni, s katerimi bi izboljšali kakovost življenja bolnikov s HCC. Ugotovili bi lahko tudi nove dejavnike tveganja, na podlagi katerih bi lahko bolje ozaveščali prebivalstvo o preventivi, ki bi zmanjšala incidenco HCC.

* Avtorja sta si delila prvo avtorstvo pri pisanju članka.

¹ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Tadeja Režen, e: tadeja.rezen@mf.uni-lj.si

Ključne besede: karcinogeneza; izražanje genov; molekularna genetika; povratne zanke; medcelično signaliziranje

Key words: carcinogenesis; gene expression; molecular genetics; feedback loops; intercellular signalling

Prispelo / Received: 30. 3. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 21. 5. 2022

Citirajte kot/Cite as: Struna R, Tehovnik J, Razpotnik R, Režen T. Molekularne povezave med cirkadianim ritmom in mikro RNA v hepatocelularnem karcinomu. Zdrav Vestn. 2023;92(1–2):11–9. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3350>



Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

Abstract

Background: Circadian rhythm is regulated at the central as well as at the cellular level via transcriptional-translational feedback loops that are precisely regulated. MiRNA molecules also affect the regulation of circadian rhythm, which, together with protein complexes, lead to the silencing of the translation of certain cellular proteins. Chronic disturbance in circadian rhythm can potentially lead to malignant cell transformation. Hepatocellular carcinoma is one of the most common cancers in humans, where the influence of different signaling pathways on carcinogenesis is still unclear. We were interested in the influence of circadian rhythm and miRNA molecules on the occurrence of hepatocellular carcinoma. We focused on the influence of circadian rhythm and miRNA molecules on circular RNA expression. We also wanted to examine whether the increased expression of specific miRNA molecules affects the amount of mRNA produced for certain proteins in liver cancer cells.

Methods: The experiment was performed on the Hep G2 and Huh7 cell lines. Initially, we introduced the desired molecules (hsa-miR-17 and circadian transcription factors) into the cells by the transfection process, with which we wanted to influence the expression of the genes of interest. RNA was isolated from the cells and transcribed into complementary DNA. qPCR (quantitative polymerase chain reaction) was performed, based on which we then inferred the level of expression of the desired genes. The results were processed and presented graphically.

Results: By processing the results, we found that none of the three hypotheses could be confirmed, as no statistically significant difference was found in any of the expression levels of the desired genes ($\alpha = 0.05$).

Conclusions: Although we could not confirm the hypotheses, the research area would be worth further attention to show a more substantial influence of the factors we observed. It would be necessary to focus on specific molecules, thus gaining new targets for treating liver diseases, which would improve the patients' quality of life and prolong their expected survival. New risk factors could also be identified to raise public awareness of prevention to reduce the incidence of HCC.

1 Uvod

Hepatocelularni karcinom (HCC, *angl.* hepatocellular carcinoma) je še nedavno veljal za redko obliko raka, od osemdesetih let prejšnjega stoletja pa se opaža hiter porast incidence. Danes ta karcinom predstavlja najpogostejši primarni rak jeter in peto najpogostejšo rakavo bolezen pri moških (1,2). Višanje incidence te bolezni pripisujemo predvsem nezdravemu načinu prehranjevanja (debelosti) in boljši diagnostiki (3).

V razvitem zahodnem svetu razlog za razvoj karcinoma leži predvsem v presnovnih boleznih jeter, kot je metabolno asociirana maščobna bolezen jeter (MAFLD, *angl.* Metabolic associated fatty liver disease) (4,5). MAFLD nastane kot posledica nabiranja lipidnih kapljic in neuravnoveženih bioloških procesov. Nadaljnji razvoj povzroči nastanek nealkoholnega steatohepatitisa (NASH) (*angl.* Non-alcoholic steatohepatitis), ki je pomemben dejavnik za razvoj HCC.

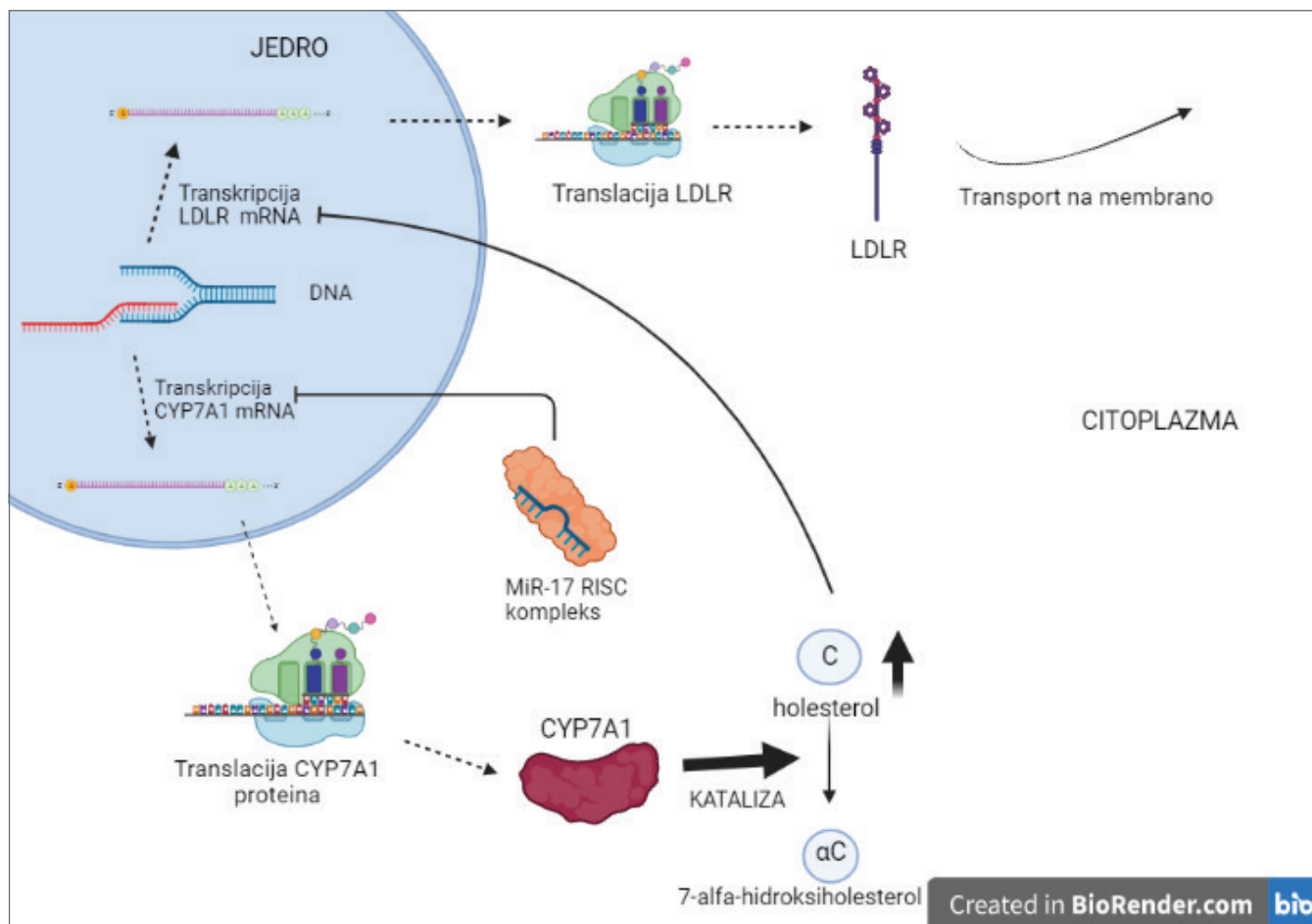
Nekateri biokemični in vedenjski procesi v živih organizmih potekajo v neprekinjenih, ponavljajočih se ciklih. Izmed bioloških ciklov je najpomembnejši in najboljše raziskan cirkadiani ritem, to je biološki ritem s periodo 24 ur (6,7). Nadzorno mesto cirkadianega ritma pri sesalcih se nahaja v suprakjzmatičnem jedru hipotalamusa. Cirkadiani ritmi so se v živih bitjih

razvili zaradi prilagajanja cikličnemu spreminjanju zunanega okolja. To jim omogoča, da določen metabolni proces opravljajo ob določenem delu dneva, ko je ta proces najbolj potreben, kar jim omogoča večjo energijsko učinkovitost ter tako večjo možnost preživetja (8).

Uravljanje cirkadiane ure je na celični ravni uravnavano s pomočjo cikličnega izražanja serije genov. Na molekularni ravni gre za kompleksne povezave med geni, med katerimi so najpomembnejši *CLOCK*, *BMAL1*, *PER* in *CRY* in njihovimi prepisanimi produkti, ki so soodvisni in se izražajo po principu negativne povratne zanke in se tako izražajo ciklično (9).

Pravilno delovanje biološke ure deluje kot tumorsupresorski signal, medtem ko motnje ritma, npr. nočne izmene, pomanjkanje spanja, predstavljajo dejavnik tveganja za razvoj raka jeter (10).

Raziskave so pokazale, da izmensko delo vpliva na pojav MAFLD in NASH, ter v končni fazi tudi na pojav ciroze in HCC (11). Dokazano je bilo, da pri miših z genotipom *Bmal1*^{-/-}, torej homozigotih z odsotnim genom *Bmal1*, pride do jetrne steatoze, hiperlipidemije in povečane količine ektopičnega maščobnega tkiva, kljub ustreznemu hranjenju živali (11). Prav tako pride do



Slika 1: Nastanek CYP7A1 ter povezava z LDLR.

Spodnji del slike prikazuje pot nastanka encima holesterol 7-alfa-hidroksilaza (CYP7A1), ki pretvarja holesterol v 7-alfa-hidroksiholesterol. MiR-17 v kompleksu RISC zavira izražanje CYP7A1 mRNA z vezavo na 3'-konec in tako preko zmanjšanja količine CYP7A1 povzroči zvišanje koncentracije holesterola v plazmi in povzroča steatozo. Zvišan holesterol v plazmi zavre transkripcijo mRNA za LDLR, zato se manj receptorjev za LDL prenese na membrano celice in LDL zastaja v krvno-žilnem sistemu. Končni rezultat je pospešena ateroskleroza.

jetrne steatoze in hiperlipidemije ter debelosti pri miših z mutiranim genom *Clock* (11).

Rora je gen, ki je vključen v nadzor cirkadianih procesov. Pomanjkanje njegovega produkta vodi v oksidativni stres v jetrih in vnetne reakcije, podobno kot se zgodi pri NASH (11).

Vsi ti podatki nakazujejo na pomembno povezavo med motnjami cirkadianega ritma in napredovanjem različnih jetrnih bolezni, kar jih naredi zanimive za nadaljnje raziskave (11).

Ribonukleinske kisline so pri sesalcih pomembne molekule, v celicah imajo namreč funkcijo podloge za nastanek beljakovin, predstavljajo strukturni del ribosomov, služijo pa tudi kot regulatorji celičnih procesov. Nekodirajoče RNA svojo funkcijo izražajo skozi različne mehanizme. Mikro RNA (v nadaljevanju miRNA)

so razred kratkih nekodirajočih RNA molekul, dolgih približno 20 nukleotidov, ki delujejo preko posttranslacijskih mehanizmov.

Izražanje nekaterih zrelih kot tudi nezrelih oblik miRNA se poslužuje cirkadianega ritma, vendar mehanizmi še vedno ostajajo neznani. Novejše študije kažejo, da je cirkadiani ritem izražanja genov reguliran preko miRNA in obratno (12,13).

Mi-RNA-17-92 je družina molekul, ki so v človeškem telesu pogosto vključene v razvoj raka. V človeškem telesu so pomembne predvsem na ravni uravnavanja celičnega cikla, proliferacije in apoptoze (14).

Krožna RNA je oblika RNA molekule, ki ima povezana 3'- in 5'-konec in tako tvori krožno strukturo. Sodijo med ene izmed manj raziskanih molekul, saj so bile odkrite nedavno (15).

Nekatere študije so pokazale zanimivo povezavo med povečano ekspresijo gena za zapis miR-17 in steatozo v jetrih (14). Izkazalo se je, da je encim, ki spada v družino P450 citokrom oksidaz CYP7A1 (holesterol 7-alfa-hidroksilaza), pomembna tarča molekule miR-17 (14). Slednji zavira izražanje citokroma CYP7A1 z vezavo na 3'-UTP in s tem inducira steatozo v opazovanih jetrnih celicah. Pomen encima CYP7A1 se kaže pri ljudeh, ki imajo ta encim zaradi mutacije nefunkcionalen. To povzroči kopičenje holesterola v jetrnih celicah, zaradi česar se posledično zmanjša izražanje LDL receptorja (Slika 1). To vodi v povišane vrednosti plazemskih trigliceridov in LDL holesterola (14).

2 Metode

V raziskavi smo uporabili celice hepatocelularnega karcinoma miši. Za izvedbo raziskave tako odobritev Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko ni potrebna.

2.1 Gojenje in precepljanje celic

Pri poskusu smo uporabili celice iz nesmrtnne celične linije Hep G2 ter Huh7. V obeh primerih gre za celice, izolirane iz hepatocelularnega karcinoma. Gojili smo jih v plastičnih posodah s površino 25 cm² in 75 cm². Za gojenje smo uporabljali polni medij – DMEM (*angl.* Dulbecco's modified eagle medium) z 1 % dodanega antibiotika penicilin-streptomycin in 10 % FBS (*angl.* fetal bovine serum). Inkubator, v katerem so uspevale celice, je imel v notranjosti temperaturo 37 stopinj Celzija in 5 % vsebnost CO₂.

Celice je bilo potrebno redno precepiti, ko so dosegle ustrezno konfluenco (nad 80 %). Medij smo celicam menjali vsake 2-3 dni.

Precepljanje je potekalo v laminariju s stalnim tokom zraka, ki smo ga po vsakem delu dezinficirali z UV lučjo in etanolom.

2.2 Transfekcija celic in obdelava vzorcev

Za opazovanje vpliva hsa-miR-17 in proteinov za indukcijo cirkadianih transkripcijskih faktorjev smo morali le-te s postopkom transfekcije vnesti v zelene celice. Opazovali smo naslednje vplive na izražanje genov:

Za preverjanje vpliva nadizražanja hsa-miR-17 na izražanje mRNA *LDLR* in izražanje krožne RNA smo v celice vnesli hsa-miR-17 mimik s pomočjo PepMute® siRNA Transfection reagenta.

Za preverjanje vpliva indukcije izražanja gena *LDLR*

s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji na izražanje krožne RNA smo v celice s pomočjo GenJet™ In Vitro DNA Transfection reagenta vnesli plazmide za izražanje cirkadianih transkripcijskih faktorjev. Uporabili smo plazmida pT7-CLOCK in pFLAG-BMAL. Negativni kontroli plazmidov sta prazna plazmida pT7 in pFLAG.

Za preverjanje vpliva nadizražanja hsa-miR-17 in indukcije izražanja s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji na izražanje *LDLR* mRNA in krožne RNA smo v celice hkrati vnesli plazmide za izražanje cirkadianih transkripcijskih faktorjev in hsa-miR-17 mimik.

Celice smo 48 ur po transfekciji lizirali v 1 ml Tri reagenta. Za preverjanje hipotez smo nato izolirali RNA, ki odraža stanje izražanja genov v času lize celic. Za vsak gen smo izolirali po tri vzorce RNA. Pri dveh vzorcih smo zaznali slabšo kakovost in nižjo koncentracijo RNA od pričakovane, zato smo se odločili za precipitacijo dobljene RNA v etanolu.

Dobljene vzorce celokupne RNA smo tretirali z encimom DNaza I za odstranitev ostankov DNA. Izolirano RNA smo nato prepisali v komplementarno DNA ali cDNA.

Pri celicah, ki smo jih tretirali s hsa-miR-17 mimikom, smo se dodatno odločili tudi za spremljanje vpliva mimika na kopičenje lipidnih kapljic v hepatocitih, ki smo jih obarvali z Oil Red O raztopino. Celice smo pogledali in slikali pod mikroskopom z rdečo fluorescenco po 48 in 72 urah. Rezultate smo primerjali in tudi kvantificirali s prikazom relativne fluorescence.

2.3 Izvedba qPCR (kvantitativna verižna reakcija s polimerazo)

S pomočjo reakcije qPCR smo nato iz dobljene cDNA kvantificirali količino izraženih genov, ki smo jih preiskovali. Ko se prepis gena s pomočjo DNA polimeraze pomnožuje, lahko njegovo količino spremljamo v realnem času na podlagi fluorescence, ki jo emitira barvilo Sybrgreen. Količina prepisov gena se hitro povečuje, saj se v vsakem ciklu količina DNA podvoji. Večja kot je količina začetne cDNA, hitreje je dosežen prazni cikel, pri katerem jo zaznamo, na podlagi česar sklepamo o stopnji izraženega gena v opazovanih celicah.

Pripravili smo mešanico oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje genov, katerih izražanje smo preučevali. Uporabili smo mešanico 3'→5' in 5'→3' oligonukleotidnih začetnikov za obojesmerno pomnoževanje DNA. Poskus smo opravili na triplikatih, torej smo vsako reakcijsko mešanico pripravili trikrat.

2.4 Statistična analiza rezultatov

Dobljene rezultate smo nato obdelali in jih grafično predstavili. Primerjali smo stopnjo izražanja izbranih prepisov gena *LDLR*, *hsa_circRNA_0003892* in *hsa_circRNA_0002579* pri kontrolnih poskusih in pri ustrezno tretiranih celicah. Podatke o stopnji izražanja genov smo normalizirali na tako imenovane "hišne gene". To so geni, ki se v celicah izražajo pretežno stalno v enaki meri in smo jih izbrali na podlagi opazovanj v prejšnjih poskusih. Izbrali smo si gena *ACTB* in *RPLP0*. Povprečje izražanja preučevanih genov v tretiranih celicah smo prikazali relativno glede na kontrolne celice. Predstavili smo tudi slikovno primerjavo kopičenja lipidnih kapljic z rdečo fluorescenco in grafično prikazali relativno količinsko razliko v lipidnih kapljicah med kontrolnimi celicami in celicami, tretiranimi s *hsa-miR-17* mimikom po 48 in 72 urah.

3 Rezultati

3.1 Vpliv nadizražanja *hsa-miR-17* na izražanje mRNA *LDLR* in izražanje krožne RNA

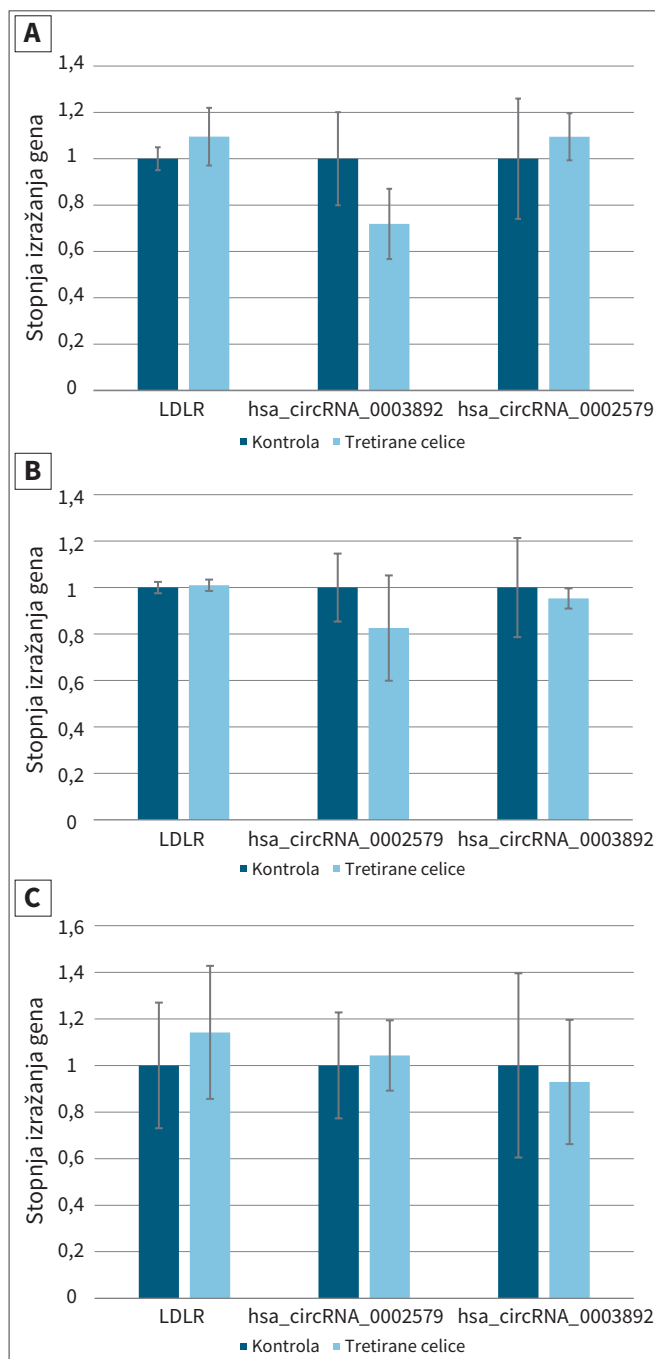
V prvem poskusu smo želeli preveriti, ali *hsa-miR-17* vpliva na izražanje RNA prepisov iz gena *LDLR*. Zato smo celice Huh7 tretirali s *hsa-miR-17* mimikom 48 ur, nato izolirali celokupno RNA in s qPCR preverili izražanje treh RNA prepisov iz gena *LDLR*. To so *LDLR*, *hsa_circRNA_0003892* in *hsa_circRNA_0002579* (Slika 2A).

Po primerjavi rezultatov z dvosmernim Studentovim t-testom smo ugotovili, da pri nobenem od treh prepisov gena za *LDLR* v tem primeru ne gre za statistično značilno razliko v izražanju genov ($\alpha < 0,05$).

3.2 Vpliv indukcije izražanje gena *LDLR* s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji na izražanje krožne RNA

Želeli smo preveriti, kako indukcija izražanja gena za zapis *LDLR* gena s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji vpliva na izražanje krožne RNA. Zato smo celice Huh7 tretirali s plazmidi za izražanje cirkadianih transkripcijskih faktorjev pT7-CLOCK in pFLAG-BMAL 48 ur, nato izolirali celokupno RNA in s qPCR preverili izražanje treh RNA prepisov iz gena *LDLR*, torej *LDLR*, *hsa_circRNA_0003892* in *hsa_circRNA_0002579* (Slika 2B).

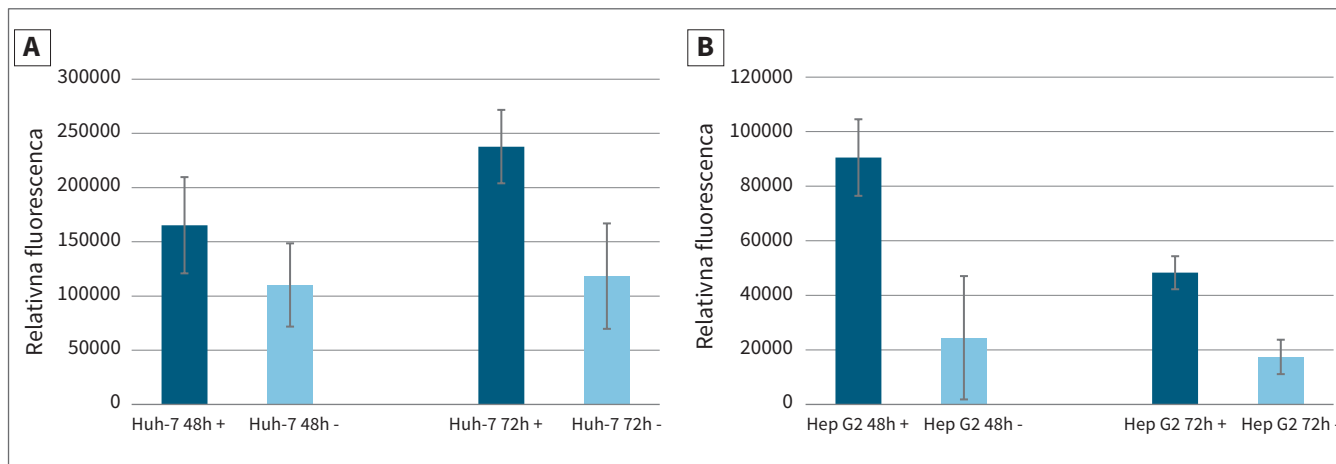
Po primerjavi rezultatov z dvosmernim Studentovim



Slika 2: Izražanje RNA prepisov gena *LDLR*.

Stolpčni diagrami prikazujeje primerjavo izražanja treh RNA prepisov gena *LDLR* pri kontrolnih celicah in celicah Huh7, tretiranih z mimikom *hsa-miR-17* (A), tretiranih s plazmidi za izražanje cirkadianih transkripcijskih faktorjev (B) in tretiranih s plazmidi za izražanje cirkadianih transkripcijskih faktorjev ter s *hsa-miR-17* mimikom (C). Prikazano je povprečje treh ponovitev s standardno deviacijo.

t-testom smo ugotovili, da pri nobenem od treh prepisov gena *LDLR* v tem primeru ne gre za statistično značilno razliko v izražanju genov ($\alpha < 0,05$).



Slika 3: Primerjava relativne fluorescence pri celicah Hep G2 po 48 in 72 urah.

Stolpična diagrama prikazujeta primerjavo razlike v količini lipidnih kapljic, barvanih z barvilom Oil Red O, izmerjene s pomočjo relativne fluorescence pri celicah Hep G2 po 48 in 72 urah (A) in pri celicah Huh7 po 48 in 72 urah (B). Opomba: oznaka » + « pomeni tretiranje s kontrolnim mimikom, oznaka » - « pa tretiranje s hsa-miR-17 mimikom.

3.3 Vpliv nadizražanja hsa-miR-17 in indukcije izražanja s cirkadianimi transkripcijskimi faktorji na izražanje *LDLR* mRNA in krožne RNA

Želeli smo preveriti, ali nadizražanje hsa-miR-17 prepreči povišanje izražanja mRNA *LDLR* s cirkadianimi transkripcijskimi dejavniki, vendar ne tudi krožne RNA. Celice Huh7 smo zato hkrati tretirali s hsa-miR-17 mimikom in plazmidi s transkripcijskimi dejavniki za izražanje cirkadianih genov 48 ur, nato izolirali celokupno RNA in s qPCR preverili izražanje treh RNA prepisov iz gena *LDLR*, torej *LDLR*, *hsa_circRNA_0003892* in *hsa_circRNA_0002579* (Slika 2C).

Po primerjavi rezultatov z dvosmernim Studentovim t-testom smo ugotovili, da pri nobenem od treh prepisov gena *LDLR* v tem primeru ne gre za statistično značilno razliko v izražanju genov ($\alpha < 0,05$).

3.4 Učinek hsa-miR-17 mimika na velikost lipidnih kapljic v Hep G2 celicah (primerjava slik)

Da bi preverili učinek hsa-miR-17 na kopičenje lipidnih kapljic v celicah Hep G2, smo jih tretirali s hsa-miR-17 mimikom, jih pobarvali z barvilom Oil Red O in nato celice po 48 ter 72 urah pogledali pod mikroskopom z rdečo fluorescenco ter primerjali količino lipidnih kapljic med celicami Hep G2, tretiranimi s hsa-miR-17 mimikom in celicami Hep G2, tretiranimi

s kontrolnim mimikom. V nadaljevanju smo želeli razliko v količini lipidnih kapljic prikazati tudi kvantitativno, zato smo razliko v površini fluorescence zaradi razlik v količini lipidnih kapljic med celicami Hep G2, tretiranih s kontrolnim mimikom in celicami Hep G2, tretiranih s hsa-miR-17 mimikom tudi grafično prikazali (Slika 3A). Pri analizi rezultatov smo s Studentovim t-testom ugotovili, da obstaja statistično značilna razlika ($p < 0,05$) v relativni fluorescenci med celicami Hep G2, tretiranimi s kontrolnim mimikom in celicami Hep G2, tretiranimi s hsa-miR-17 mimikom po 48 in 72 urah.

3.5 Učinek hsa-miR-17 mimika na velikost lipidnih kapljic v Huh7 celicah (primerjava slik)

Da bi preverili učinek hsa-miR-17 na kopičenje lipidnih kapljic v celicah Huh7, smo jih tretirali s hsa-miR-17 mimikom, jih pobarvali z barvilom Oil Red O in nato celice po 48 ter 72 urah pogledali pod mikroskopom z rdečo fluorescenco ter primerjali količino lipidnih kapljic med celicami Huh7, tretiranimi s hsa-miR-17 mimikom in celicami Huh7, tretiranimi s kontrolnim mimikom. Pri analizi rezultatov smo s Studentovim t-testom ugotovili, da obstaja statistično značilna razlika ($p < 0,05$) v relativni fluorescenci med celicami Huh7, tretiranimi s kontrolnim mimikom in celicami Huh7, tretiranimi s hsa-miR-17 mimikom po 72 urah, ne pa po 48 urah (Slika 3B).

4 Razprava

Pri izvedbi poskusa nas je zanimal vpliv transkripcijskih dejavnikov cirkadianega ritma in miRNA na izražanje mRNA in krožnih RNA iz istega genskega lokusa, to je gena LDLR (receptor LDL). Zanimalo nas je, kako se na ravni gena za zapis LDLR iz homeostaze holesterola srečajo različne signalne poti – cirkadiana in miRNA. Rezultati statistično pomembnega vpliva niso pokazali.

4.1 Pomen vpliva hsa-miR-17

Navedene metabolne povezave med hsa-miR-17 in metabolizmom lipidov ter patogenezo različnih jetrnih bolezni lahko pridobijo klinični pomen.

Hsa-miR-17 bi lahko postala tarča zdravljenj, saj obstaja pomembna povezava med ravno izražanja in izidom maligne bolezni (HCC in tudi drugih). Morda bi lahko bodisi z znižanjem ali z blokado delovanja hsa-miR-17 preko povečanega izražanja CYP7A1 zaustavili napredovanje bolezni ali celo omogočili regeneracijo tkiva, kot nakazujejo nekatere raziskave (14).

Ker ima kemoterapija pri zdravljenju HCC omejeno učinkovitost, bi bilo potrebno v sklopu raziskav najti nove tarče zdravljenja, ki bi omogočile boljši izid bolezni (16). Predhodne raziskave so pokazale, da lahko mehanizem zavore tumorske rasti poteka preko indukcije apoptoze in zavore celičnega cikla preko aktivacije več tarč v MYC signalni poti, ki je pogosto spremenjena v celicah HCC (16). Gre prav za preveliko izražanje transkripcijskega faktorja MYC, ki je pomemben patogenetski mehanizem, ki pri HCC privede do nenadzorovane rasti in delitve celic (16). Vključuje se v izražanje številnih genov, ki so vključeni v proces karcinogeneze in nadzorujejo metabolizem, obnovo, proliferacijo in preživetje celic, zaradi česar so se v veliko raziskavah osredinili na transkripcijski faktor MYC kot tarča zdravljenja HCC (16). Ker nobena od možnosti zdravljenja ni delovala neposredno na transkripcijski faktor MYC, so se raziskave posledično osredinile na raziskovanje posrednega vpliva na dejavnike, ki vplivajo na njegovo izražanje. Osredinili so se na hsa-miR-17, saj so predhodne raziskave pokazale pomembno povezavo med povišanjem hsa-miR-17 v celicah HCC in slabšim izidom ter hitrejšim napredovanjem bolezni, še dodatno pa je zanimanje spodbudil sum, da je povišana raven hsa-miR-17 povezana tudi s previsokim izražanjem transkripcijskega faktorja MYC (16). Odločili so se za preverjanje učinkovitosti anti-miR-17 terapije, ki so jo aplicirali preko lipidnega

nano delca (*angl.* LNP – lipid nanoparticle) (16). Pri miših, tretiranih z anti-miR-17, je prišlo do počasnejšega napredovanja rasti tumorja, nastalo je tudi manj novih tumorskih mas kot pri miših, ki so jim aplicirali kontrolo (16). Zaključek je, da transkripcijski faktor MYC povzroči povečano izražanje anti-miR-17, kar zavre celično smrt (16).

Potrjena hipoteza bi prav tako razkrila pomen hsa-miR-17 pri vplivu na izražanje LDL receptorja, ki igra pomembno vlogo pri odstranjevanju serumskega LDL holesterola in je tako pomemben dejavnik pri patogenezi metabolnega sindroma (16). Pri HCC pogosto pride do paraneoplastične hiperholesterolemije (17). Mehanizem poteka preko znižanja ali okvare LDL receptorja na površini celic HCC. Z imunohistokemičnim barvanjem celic HCC bolnikov s hiperholesterolemijo se je izkazalo, da je količina LDL receptorja na površini celic HCC pomembno zmanjšana v primerjavi z zdravimi celicami in celicami HCC pri bolnikih brez hiperholesterolemije (17). HCC je torej možen vzrok za hiperholesterolemijo (17).

Z našim poskusom smo želeli preveriti, ali na to vpliva prav krožna RNA hsa-miR-17, a tega nismo uspeli potrditi.

4.2 Pomen vpliva transkripcijskih faktorjev cirkadianih genov

V primeru potrjene povezave med LDL receptorjem in transkripcijskimi faktorji, ki uravnavajo cirkadiani ritem, bi, glede na pomembne povezave med jetrnimi boleznimi in motnjami v delovanju produktov cirkadianih genov, dobili pomembno farmakološko tarčo za zdravljenje metabolnih bolezni, prav tako bi svetovanje glede higiene spanja in ozaveščanja o pomenu ustaljene rutine spanja pomembno vplivalo na izid bolezni kot dodatna terapija ali bi veljal kot pomemben dejavnik tveganja za razvoj jetrnih bolezni.

Izkazalo se je, da alkohol v jetrih zmoti izražanje cirkadianih genov in na metabolne spremembe v jetrih vpliva tudi s tega vidika (18).

Ker ima melatonin ugodne učinke na številne metabolne procese v jetrih, so se v nekaterih raziskavah osredinili tudi nanj, kot na potencialno terapevtsko možnost za zdravljenje in preprečevanje jetrnih bolezni (18). Pri miših, zdravljenih z melatoninom, je prišlo do zavore jetrne steatoze, fibroze in ciroze (18). Dodatno se je izkazalo tudi, da imajo pacienti z mutacijo MT1 melatoninskega receptorja povišano verjetnost za razvoj HCC, na podlagi česar so sklepali tudi na vlogo melatonina pri razvoju te bolezni (18). Povišano

izločanje melatonina v jetrih pri miših zavre rast tumorjev in s tem predstavlja možno terapevtsko rešitev (18). Mehanizem je potekal preko zavore sprememb izražanja cirkadianih genov *Clock*, *Bmal1* (pri induciranjem HCC pri miših se izražanje povečata), *Per1*, *Per2* in *Cry11* (pri induciranjem HCC pri miših se izražanje znižajo) (18). Dodatno se je izkazalo, da melatonin tudi poveča občutljivost celic HCC na kemoterapijo s sorafenibom, saj je prišlo do počasnejše proliferacije, migracije in invazije celic v zdravo tkivo (18).

Pri transplantaciji jeter, ki se jo uporablja za zdravljenje jetrne odpovedi, pogosto pride do t. i. ishemično-reperfuzijske okvare, ki ob reperfuziji tkiva vodi v oksidativni stres, vnetje in potencialno tudi v odpoved transplanta (18). V raziskavah se je izkazalo, da premedikacija z melatoninom pri podganah zniža pooperativne vrednosti ALT (alanin aminotransferaza) in AST (aspartat aminotransferaza), kar nakazuje na potencialno terapevtsko možnost tudi v tem primeru (18).

Melatonin se je tako izkazal kot možna terapevtska možnost na širokem področju zdravljenja jetrnih bolezni. Raziskave imajo sicer omejeno vrednost, saj so bile izvedene na živalih in tako terapevtska vrednost pri ljudeh še ni jasna, a bi bilo zanimivo učinkovitost preveriti tudi na študijah na pacientih z jetrnimi boleznimi ali povečano verjetnostjo za njihov nastanek (18).

4.3 Omejitve izvedene študije

V poskusih nismo uporabili kontrol uspešnosti transfekcije ali izražanja transkripcijskih dejavnikov, zato ne moremo zagotovo trditi, da ti dejavniki ne vplivajo na izražanje gena *LDLR*. Ker je nadizražanje mimika hsa-miR-17 povečalo lipidne kapljice v obeh celičnih linijah, lahko sklepamo, da je bila transfekcija uspešna. Da bi lahko zagotovo potrdili uspešnost transfekcije in dejansko aktivnost preučevanih dejavnikov v celičnih linijah, bi morali izmeriti še izražanje genov, za katere zagotovo vemo, da se spremenijo v pogojih poskusa.

Pomemben dejavnik, ki vpliva na rezultat, je tudi razlika v kompleksnosti in odsotnosti komunikacije

in soodvisnosti celic v tumorskem tkivu živega organizma in izoliranih celic nesmrtnih celičnih linij. V jetrnem tkivu živega organizma soobstajajo številne celice, ki pomembno vplivajo druga na drugo in imajo pomemben vpliv na izražanje genov, zaradi česar bi se le-ti v živem organizmu izražali drugače, kot so se v celičnih linijah, uporabljenih v predstavljenem poskusu.

Ob interpretaciji rezultatov se moramo tudi vprašati, koliko lastnosti celic hepatocelularnega karcinoma se je dejansko ohranilo v celičnih linijah Hep G2 in Huh7, ki smo ju uporabili pri poskusu. Večletno presajanje in različni vplivi iz okolja bi lahko pomembno vplivali na metabolno aktivnost opazovanih celic in s tem na izražanje genov ter dobljene rezultate.

5 Zaključek

Izveden poskus in članek temeljita na predhodno izvedenih študijah, ki so nakazovale na pomembne povezave med različnimi jetrnimi boleznimi, (npr. MAFLD, NASH in HCC) in miRNA ter produkti genov, ki se izražajo cirkadiano. S poskusom smo želeli konkretnije prikazati to povezavo in se osrediniti na specifične RNA molekule, ki posredno vplivajo na iztirjenje metabolnih procesov. Na podlagi rezultatov smo želeli ugotoviti predvsem klinični pomen do sedaj manj znanih dejavnikov, ki vplivajo na razvoj jetrnih bolezni. Ugotavljanje dodatnih dejavnikov je pomembno tako s farmakološkega vidika (določanje novih tarč zdravil) kot tudi s preventivnega vidika (pomen izmenskega dela v kombinaciji z drugimi dejavniki tveganja za razvoj bolezni). Končni cilj bi bil preprečiti bolezen oz. izboljšati izid bolezni in tako izboljšati kakovost življenja bolnikov ter podaljšati njihovo pričakovano preživetje.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Uredniški komentar

Članek je nastal na podlagi nagrajene študentske Prešernove raziskovalne naloge v letu 2020/2021.

Literatura

1. Asafo-Agyei KO, Samant H. Hepatocellular Carcinoma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Aug 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559177/>.
2. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. 2021;73:4-13. DOI: 10.1002/hep.31288 PMID: 32319693

3. Balogh J, Victor D, Asham EH, et al. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*. 2016;3:41-53. DOI: [10.2147/JHC.S61146](https://doi.org/10.2147/JHC.S61146) PMID: [27785449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27785449/)
4. Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2020;116(7):1254-74. DOI: [10.1093/cvr/cvz338](https://doi.org/10.1093/cvr/cvz338) PMID: [31834409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31834409/)
5. Dr C Humphreys. NAFLD vs. NASH. S.l.: Medicine Specifics; 2020 [cited 2021 Nov 2]. Available from: <https://medicinespecifics.com/naflid-vs-nash/>.
6. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93. PMID: [11584554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584554/)
7. Farhud D, Aryan Z. Circadian Rhythm, Lifestyle and Health: A Narrative Review. *Iran J Public Health*. 2018;47(8):1068-76. PMID: [30186777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30186777/)
8. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93. PMID: [11584554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584554/)
9. Menet JS, Pescatore S, Rosbash M. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev*. 2014;28(1):8-13. DOI: [10.1101/gad.228536.113](https://doi.org/10.1101/gad.228536.113) PMID: [24395244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24395244/)
10. Mukherji A, Bailey SM, Staels B, Baumert TF. The circadian clock and liver function in health and disease. *J Hepatol*. 2019;71(1):200-11. DOI: [10.1016/j.jhep.2019.03.020](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.020) PMID: [30930223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30930223/)
11. Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81(9):2826-30. DOI: [10.1073/pnas.81.9.2826](https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2826) PMID: [6326146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6326146/)
12. Torres M, Becquet D, Franc JL, François-Bellan AM. Circadian processes in the RNA life cycle. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(3):e1467. DOI: [10.1002/wrna.1467](https://doi.org/10.1002/wrna.1467) PMID: [29424086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29424086/)
13. Nolte C, Staiger D.. RNA around the clock - regulation at the RNA level in biological timing. *Front Plant Sci*. 2015;6:311. DOI: [10.3389/fpls.2015.00311](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00311) PMID: [25999975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999975/)
14. Gong R, Lv X, Liu F. MiRNA-17 encoded by the miR-17-92 cluster increases the potential for steatosis in hepatoma cells by targeting CYP7A1. *Cell Mol Biol Lett*. 2018;23:16. DOI: [10.1186/s11658-018-0083-3](https://doi.org/10.1186/s11658-018-0083-3) PMID: [29721023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29721023/)
15. Yau TO, Wu CW, Tang CM, Chen Y, Fang J, Dong Y, et al. MicroRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(2):1559-68. DOI: [10.18632/oncotarget.6403](https://doi.org/10.18632/oncotarget.6403) PMID: [26621842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26621842/)
16. Dhanasekaran R, Gabay-Ryan M, Baylot V, Lai I, Mosley A, Huang X, et al. Anti-miR-17 therapy delays tumorigenesis in MYC-driven hepatocellular carcinoma (HCC). *Oncotarget*. 2017;9(5):5517-28. DOI: [10.18632/oncotarget.22342](https://doi.org/10.18632/oncotarget.22342) PMID: [29464015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29464015/)
17. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*. 1987;76(3):504-7. DOI: [10.1161/01.cir.76.3.504](https://doi.org/10.1161/01.cir.76.3.504) PMID: [3621516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3621516/)
18. Sato K, Meng F, Francis H, Wu N, Chen L, Kennedy L, et al. Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: functional roles and potential therapies. *J Pineal Res*. 2020;68(3):e12639. DOI: [10.1111/jpi.12639](https://doi.org/10.1111/jpi.12639) PMID: [32061110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32061110/)