

Mikro-RNS-ek és szerepük hematológiai malignus betegségekből

Gaál Zsuzsanna oh. ■ Oláh Éva dr.

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,
Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ, Debrecen

A kis, nem kódoló RNS-ek közé tartozó mikro-RNS-ek poszttranszkripció szinten szabályozzák a génexpressziót. Target génjeik közül sok a sejtciklus, a sejtosztódás és az apoptózis szabályozásában tölt be központi szerepet, ennek megfelelően a mikro-RNS-ek a daganatok iniciációjának, progressziójának, szöveti inváziójának, valamint a metasztatizáció képződésének is aktív részesei. A mikro-RNS-profilok sok hasznos információval szolgálnak mind a tumorok szöveti eredetével, mind azok differenciáltsági fokával kapcsolatban. Ugyancsak kulcsfontosságúak a haemopoiesis folyamatában. Megváltozott expressziós szintjük gyakran megfigyelhető leukaemiában. Eredményes vizsgálatokról számoltak be a közelmúltban az akut lymphoblastos leukaemia és az akut myeloid leukaemia diagnosztikájában és a prognózis megállapításában történő alkalmazásokról. A mikro-RNS-expressziós szintek meghatározása segítséget nyújthat a különböző kemoterápiás gyógyszerek hatásosságának előrejelzésében. Emellett ígéretes terápiás célpontok, amelyek hozzájárulhatnak a jövőben a hematológiai malignus betegségek egyre inkább személyre szabott kezeléséhez. *Orv. Hetil.*, 2012, 153, 2051–2059.

Kulcsszavak: mikro-RNS, leukaemia, diagnózis, prognózis, terápia

MicroRNAs and their role in hematological malignant diseases

MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs regulating gene expression at posttranscriptional level. Their target genes include numerous regulators of cell cycle, cell proliferation as well as apoptosis. Therefore, they are implicated in the initiation and progression of cancer, tissue invasion and metastasis formation as well. MicroRNA profiles supply much information about both the origin and the differentiation state of tumours. MicroRNAs also have a key role during haemopoiesis. An altered expression level of those have often been observed in different types of leukemia. There are successful attempts to apply microRNAs in the diagnosis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. Measurement of the expression levels may help to predict the success of treatment with different kinds of chemotherapeutic drugs. MicroRNAs are also regarded as promising therapeutic targets, and can contribute to a more personalized therapeutic approach in haemato-oncologic patients. *Orv. Hetil.*, 2012, 153, 2051–2059.

Keywords: microRNA, leukemia, diagnosis, prognosis, therapy

(Beérkezett: 2012. október 26.; elfogadva: 2012. november 15.)

Rövidítések

ALL = akut lymphoid leukaemia; AML = akut myeloid leukaemia; BRCA = emlőtumorról elnevezett gén; CLL = krónikus lymphoid leukaemia; CLP = közös lymphoid progenitor; CML = krónikus myeloid leukaemia; CMP = közös myeloid progenitor; DNMT = DNS metiltranszferáz enzim; E2F = 2-es típusú elongációs faktor; EMP = erythrocyta-megakaryocyta prekursor; EP = erythrocyta prekursor; GMP = granulocyta-monocyta prekursor; HDAC = hiszton-deacetiláz enzim;

HSC = haemopoieticus őssejt; LNA = módosított, zárt szerkezetű nukleinsav; MDR = multidrogrezisztencia-fehérje; MEF2C = myocytaspecifikus serkentőfaktor 2C; miRNA = mikro-RNS; MP = megakaryocyta prekursor; piRNA = Piwi-fehérjével kölcsönható RNS; RISC = RNS által indukált csendesítő komplex; shRNS = rövid, hajtűszerkezetű RNS; siRNA = kis interferáló RNS; snoRNA = kis nukleoláris RNS; SUMO = kis ubiquitinszerű módosító fehérje; UTR = nem transzlálódó régió

A daganatos betegségek legfontosabb sajátosságai a növekedést fokozó jelek iránti túlzott érzékenység, a növekedést gátló jelek iránti érzéketlenség, az apoptózis elkerülése, a korlátlan replikációs képesség, a fokozott érképződés, a szöveti invázió, metasztázisok képzése, valamint a DNS-hibajavító rendszer károsodásából fakadó genomális instabilitás [1]. Korábban a rákot elsődlegesen genetikai eredetű betegségnek tartották, és legfőképpen a sejt genomjának módosulásaira vezették vissza [2]. Létrejöttében azonban az epigenetikai szabályozás zavarai szintén közvetlen szerepet játszanak, a rákot tehát epigenetikai betegségnek is kell tekintenünk [3].

Az epigenetika a génexpresszió azon reverzibilis és örökölhető változásaival foglalkozik, amelyek nem a DNS szekvenciaváltozása következtében jönnek létre. Tárgykörébe tartozik a DNS metilációja, a hisztonmodifikáció, illetve a kis, nem kódoló RNS-ek génexpressziót befolyásoló hatása [3]. A *DNS-metiláció* a citozin pirimidingyűrűjének 5' pozícióban történő kovalens módosítása, amelyet DNS metiltranszferáz enzimek (DNMT) katalizálnak, és amely a transzkripció gátlását eredményezi [2]. A *hisztonmodifikáció* tág csoportjába a hisztonfehérjék N-terminális végének acetilációja, metilációja, foszforilációja, ubiquitinációja, ADP-ribozilációja, szumoilációja tartozik. (Az említett módosítások során különböző enzimek a hisztonfehérjék N-terminális aminosavaihoz kapcsolnak acetil-, metil-, foszfát-csoportot, vagy a proteasomális lebontást előkészítő ubiquitin nevű szabályozó fehérjét, ADP-ribozil-csoportot, illetve az ubiquitinhez hasonló úgynevezett SUMO-fehérjét [szumoiláció].) Az ilyen módosítások eredményeképpen létrejövő mintázatot hisztonkódnak nevezzük [4]. A *kis, nem kódoló RNS-ek* jelen vannak az élő szervezetekben a baktériumoktól az emlősig [5]. Közéjük tartoznak a mikro-RNS-ek (miRNAs), a kis interferáló RNS-ek (siRNAs), a Piwi-fehérjékkel kölcsönható RNS-ek (piRNAs), valamint a kis nukleoláris RNS-ek (snRNAs) [6].

Leukaemia kialakulása során a haemopoeticus progenitor sejtek egy csoportja a sejtek működésének komplex szabályozási zavarai következtében kontrollálatlan osztódási képességre tesz szert. Létrejöttében a genetikai változások mellett a DNS-metilációt, a hisztonmo-

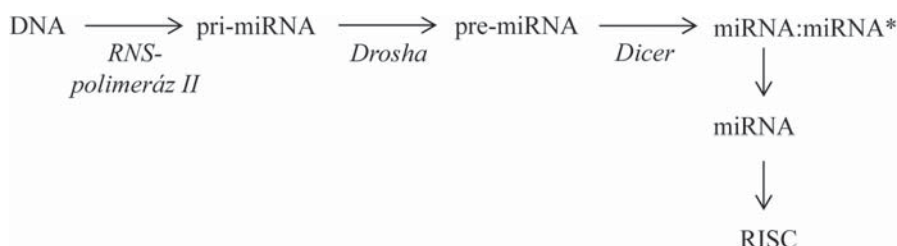
difikációt és a mikro-RNS-ek funkcióját érintő eltérések mind lényeges etiológiai tényezők [2].

Az érett mikro-RNS-ek kialakulása, hatásmechanizmusa és szerepe a különböző sejtfunkciók finomhangolásában

A mikro-RNS-ek a nem kódoló RNS-ek közé tartozó, 19–24 nukleotidhosszúságú molekulák [7]. Pontos hosszuk növényekben többnyire 21, állatokban és emberben 22–23 nukleotid [8]. Közülük elsőként a *Caenorhabditis elegans* differenciációját szabályozó lin-4-et, illetve let-7-et fedezték fel [8]. Nagyfokú konzerválódás jellemző rájuk az evolúció során: a *Caenorhabditis elegans*-ban azonosított mikro-RNS-ek több mint egyharmadának homológja az emberben is jelen van [8].

A mikro-RNS-eket kódoló gének elszórtan, illetve klaszterek formájában vannak jelen a genomban [9], és az Y-kromoszóma kivételével valamennyi kromoszómán megtalálhatóak [10]. Kifejeződésüket ugyanazok a mechanizmusok szabályozzák, mint a fehérjekódoló génekét: mutáció, deletio, amplifikáció, a heterozigotáság elvesztése, transzlokáció, DNS-metiláció, illetve hisztonmodifikáció révén is megváltozhat az expressziós szintjük [4]. A mikro-RNS-ek körülbelül negyed része fehérjekódoló gének intronjaiban kódolt, ami lehetővé teszi a fehérjék és a mikro-RNS-ek összehangolt expresszióját [8]. Az intronokban kódolt mikro-RNS-eket miRtronoknak is nevezik [5].

Az érett mikro-RNS kialakulása során az RNS-polimeráz II által átírt prekursor alak több, egymást követő processzálo lépésen megy keresztül (*1. ábra*) [11]. A primer transzkriptumból (pri-miRNA) a Drosha nevű RNáz III típusú endonukleáz révén pre-mikro-RNS (pre-miRNA) képződik. A pre-mikro-RNS az Exportin-5 által, Ran-GTP-függő módon a sejtmagból a citoplazmába transzportálódik, ahol a Dicer (szintén RNáz III típusú endonukleáz enzim) hasítja [7]. A képződő miRNA:miRNA* duplex két szálát helikáz enzimek csavarják szét [12]. A letekert szálak egyike beépül az úgynevezett RISC-be (RNS által indukált csendesítő komplex), a másik szál (miRNA*) pedig legtöbbször degradálódik [12]. A miRNA* szálát passenger/minor RNS-szálnak is nevezik [13]. A RISC-nek esszenciális



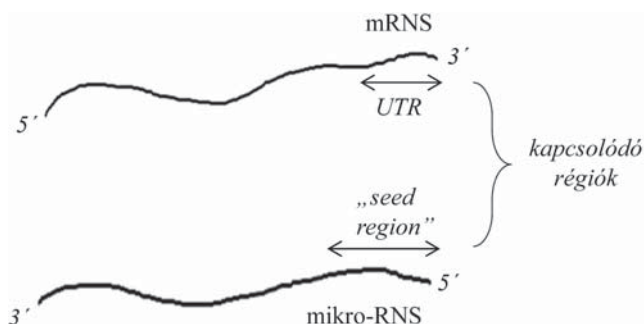
1. ábra

Az érett mikro-RNS kialakulása

miRNA = mikro-RNS; RISC = RNS által indukált csendesítő komplex

1. táblázat | A mikro-RNS-ek nevezéktana

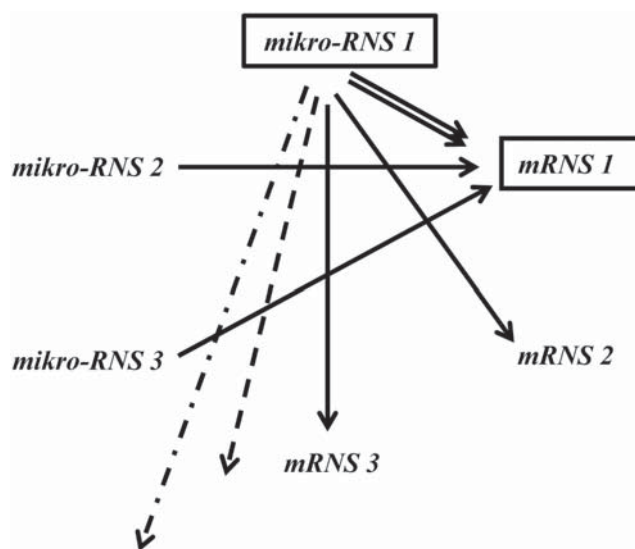
MiR-XXa/b	Egy vagy két nukleotidnyi különbség van az érett alakok szekvenciájában
MiR-XX-1/2	Az érett alakok szekvenciája megegyezik, a prekurzorokat különböző régiók kódolják
MiR-XX-3p/5p	Ugyanazon prekurzor ellenkező végeiről lehasadt érett alakok

2. ábra | A mikro-RNS-ek hatásmódja
UTR = nem transzlálódó régió

komponensei az Argonaute családba tartozó fehérjék, amelyek két konzervált RNS-kötő domént tartalmaznak (PAZ, illetve PIWI) [9]. A mikro-RNS-ek nevezéktanában használatos jelöléseket az 1. táblázatban tüntettük fel [13].

A mikro-RNS-ek a fehérjekódoló gének expresszióját poszttranszkripció, mRNS-szinten szabályozzák (2. ábra) [5]. A mikro-RNS-ek 5' végén, a 2–8. pozícióban helyet foglaló hét nukleotid a target mRNS felismeréséhez nélkülözhetetlen régió („seed region”) [8]. Ezen szakasz a target mRNS 3' UTR (nem transzlálódó, fehérjévé nem átíródó) régiójához kapcsolódik [7], amelynek mutációja vagy polimorfizmusa a meglévő mikro-RNS-kötő hely elvesztését vagy egy új kötőhely létrejöttét is eredményezheti [9]. A pontos hatásmechanizmust a mikro-RNS és a target mRNS kapcsolódó szakaszának komplementaritási foka határozza meg [14]. Ha ez teljes vagy közel tökéletes, az mRNS degradációja következik be. Részleges komplementaritás esetén a transzláció gátlása az eredmény [13]. Emlősökben ez utóbbi a jellemzőbb [15]. Ilyenkor az mRNS-ek a citoplazmában a transzlációs apparátustól távol elhelyezkedő processzálo vagy P-testecskébe kerülnek, ahol további sorsuk tárolódás vagy lebomlás [9]. A legutóbbi irodalmi adatok szerint a mikro-RNS-ek az mRNS-ek transzlációjának citoplazmában történő gátlása mellett a sejtmagban, transzkripció szinten, a promóterre hatva is szabályozhatják a génexpressziót [11].

A sejt teljes mikro-RNS-készlete (microRNAome) a fehérjekódoló gének több mint 60%-ának kifejeződését szabályozza [16]. Egy-egy mikro-RNS hozzávetőlegesen 100–200 különböző targetre hat, egy adott fehérje expressziós szintjét pedig többféle mikro-RNS is szabá-



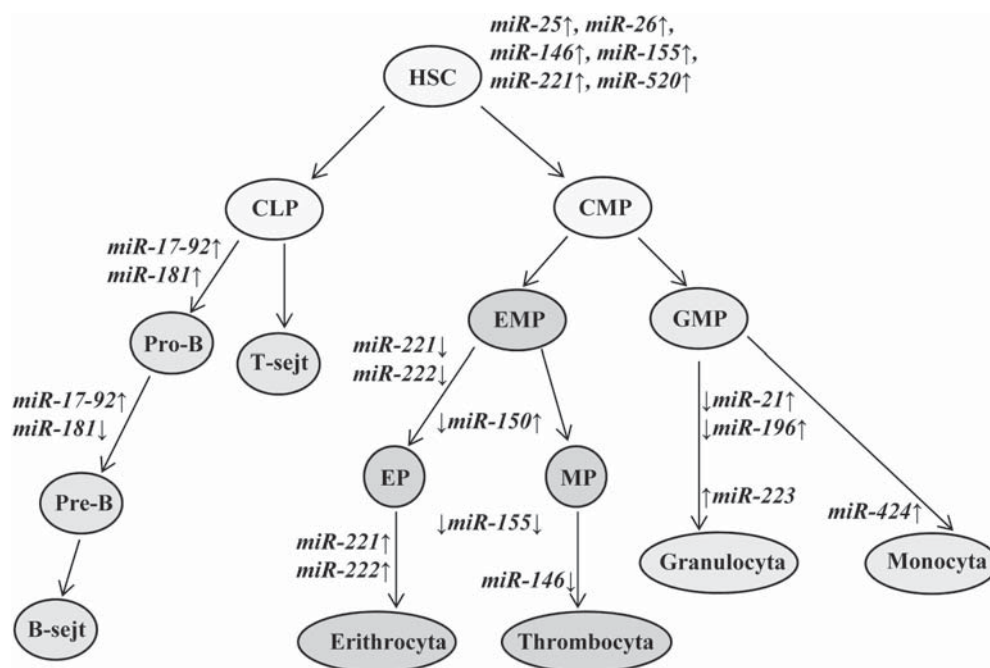
3. ábra | Mikro-RNS-ek és targetjeik

lyozhatja (3. ábra) [17]. A mikro-RNS-ek valószínűsített molekuláris célpontjai internetes programok segítségével elérhetőek. A három legismertebb a TargetScan, a miRBase és a PicTar [18]. A targetként feltüntetett gének közül a legalább két program által jelzettek elfogadásával jelentősen csökkenthető a fals pozitív találatok száma [18].

A mikro-RNS-ek sokféle sejtfunkció finomhangolásában játszanak kulcsszerepet [16]. Szabályozzák, többek között, a sejtek differenciációját, a sejtproliferációt, az apoptózis folyamatát, az őssejteket, metabolikus és egyéb jelátviteli útvonalakat. Befolyásolják az immunrendszer működését, a gyulladást, a stresszre adott választ, fontos szerepük van a haemopoiesis és a karcinogenezis során [9, 15, 19]. A mikro-RNS-eknek a neurogenézis mellett a glió- és szinaptogenezis szabályozásában, valamint a szinaptikus plaszticitásban is jelentőséget tulajdonítanak [10]. Az érrendszer integritásának, továbbá a glükóz- és lipidháztartás egyensúlyának fenntartásában szintén nélkülözhetetlenek [10]. Ezek alapján nem meglepő, hogy a mikro-RNS-ek expressziós szintjének megváltozása fontos biológiai funkciók szabályozási zavarait és ezáltal sokszor betegség kialakulását eredményezi.

A mikro-RNS-ek haemopoiesisben betöltött szerepe

A mikro-RNS-ek expressziós szintje a haemopoietikus sejtek differenciálódása közben dinamikusan változik, szabályozószerepük azonban az érett sejtek működésének, funkciójának befolyásolására is kiterjed [20]. A szabályozás összetettségét jelzi, hogy egy-egy mikro-RNS több sejtípus érésére is hatással van, valamint egy adott mikro-RNS expressziós szintje ugyanazon sejtípus differenciálódásának különböző állomásain jelentősen eltérő lehet (4. ábra).



4. ábra A mikro-RNS-ek haemopoesisben betöltött szerepe

HSC = haemopoieticus őssejt; CLP = közös lymphoid progenitor; CMP = közös myeloid progenitor; EMP = erythrocyta-megakaryocita prekursor; EP = erythrocyta prekursor; MP = megakaryocita prekursor; GMP = granulocyt-monocyt prekursor

A CD34+ haemopoieticus őssejtben (HSC) a miR-520 expressziós szintje a legmagasabb, jelentős mennyiségben van jelen ezenkívül a miR-25, a miR-26, a miR-155 és a miR-221 is [20]. Szintén magas a miR-146 szintje, ami gátolja átalakulásukat közös lymphoid (CLP), illetve közös myeloid (CMP) progenitorokká [21].

A lymphopoesis során a miR-17-92 klaszter elősegíti a pro-B-sejtek képződését és a pro-B–pre-B átalakulást is. Ezzel szemben a miR-181 csak a pro-B-sejtek képződését serkenti, a pro-B–pre-B átalakulást gátolja [20], így a B-lymphocyták érésének ebben a stádiumában expressziós szintjének csökkenése szükséges. A thymusban detektált magas szintje alapján azt feltételezhetjük, hogy a miR-181 a T-sejtek fejlődésére szintén jelentős hatással van [19].

Az erythroid irányú differenciáció kezdeti szakaszában a miR-150 expressziós szintjének csökkenése jellemző, míg annak megnövekedése a közös erythrocyta-megakariocita prekursor sejtek (EMP) megakaryocita prekursorra (MP) történő differenciálódásának irányában hat [20]. A miR-150 egyik targetje a c-myc transzkripciós faktor. Kimutatták, hogy a trombopoetin a miR-150 expressziós szintjének növekedését idézi elő, ami a c-myc szintjének következményes csökkenése révén segíti elő a megakaryocyták differenciációját [21]. A fentiekben már említett miR-146 alacsony szintje szintén a zavartalan megakaryopoesis feltétele [20]. Az erythropoesis korai szakaszában a miR-221 és a miR-222 expressziója lecsökken [21], a vörösvértestképzés késői szakaszában viszont mindkét mikro-RNS szintje megemelkedik [20]. Az irodalomban multifunkciós

mikro-RNS-ként emlegetett miR-155 a gyulladásos folyamatok és az immunválasz befolyásolása mellett a haemopoesisben is fontos szabályozószereppel bír [22]. Az EMP-sejtek megfelelő differenciálódásához, az érett vörösvértestek és thrombocyták képződéséhez szintén a miR-155 expressziós szintjének csökkenése szükséges [20].

A közös granulocyt-monocyt prekursor sejtek (GMP) differenciálódásában szintén fontos szerepet játszanak a mikro-RNS-ek. A granulopoesis során nagymértékben növekszik a miR-223 expressziós szintje, amely a MEF2C transzkripciós faktor expressziójának gátlásán keresztül antiproliferatív hatást fejt ki [23]. Szintén fékezi ezen sejtek osztódását a miR-34a az E2F3 transzkripciós faktor downregulációja révén [24]. A granulocyt irányú differenciációhoz szükséges továbbá a miR-21 és a miR-196b expressziós szintjének csökkenése is. A miR-21 overexpressziója a monocytairányú differenciációt segíti elő, a miR-196b szintjének növekedése pedig a granulocyták képződésére gátlóhatású. A miR-424 szintjének növekedése a GMP-sejtek monocyt irányú differenciálódását segíti elő [20].

A mikro-RNS-ek karcinogenezis során betöltött szerepe

A mikro-RNS-ek több mint 50%-a úgynevezett rákkal asszociált régiókban, illetve fragilis helyeken kódolt [12]. A tumorsejtekben sok esetben deletálódó vagy amplifikálódó régiók és a kromoszómák gyakori töréspontjai közül sok kódol mikro-RNS-eket [23]. Elsőként

a 13q14 régióban kódolt miR-15 és miR-16 megváltozott expressziós szintjét hozták összefüggésbe malignus betegség kialakulásával: downreguláció vagy deletio útján bekövetkező funkcióvesztésük gyakoriságát B-sejtes CLL-ben szenvedő betegek körében 65%-nál magasabbnak találták [9]. Ezt követően számos további mikro-RNS karcinogenezis során betöltött szerepe igazolódott, mostanra pedig elfogadott nézetté vált, hogy gyakorlatilag minden humán daganatos megbetegedés patogenezisének aktív résztvevői [25]. Targetjeik között számos olyan gént megtalálunk, amelyek fontos szerepet töltenek be a sejtciklus, a sejtosztódás, az apoptózis, a sejtadhézió, a DNS-hibajavítás és az angiogenezis szabályozásában [10, 16], mindazon folyamatokban, amelyek zavarai kulcsfontosságúak a karcinogenezis szempontjából.

A mikro-RNS-ek kifejeződési mintázata az egészséges és a malignusan elfajult sejtekben jelentősen különbözik [15]. Tumorszövetekben a mikro-RNS-ek globális downregulációja mellett bizonyos mikro-RNS-ek specifikus overexpressziója is megfigyelhető [2, 26]. Számos vizsgálat bizonyította, hogy az expressziós szintekben bekövetkező változások nem tekinthetők véletlen eseményeknek [27], hanem fontos szerepet játszanak a tumorok iniciációjában, progressziójában és a metasztázisok képződésében is [28]. Bizonyos mikro-RNS-ek esetén az expressziós szint csökkenése, másoknál pedig annak emelkedése jelenthet fokozott kockázatot a rák kialakulására [11].

A mikro-RNS-ek mind onkogénként, mind tumorsuppresszorként funkcionálhatnak [29]. Előbbiket oncomiR, utóbbiakat anti-oncomiR néven említik az irodalomban [16]. Az oncomiR-ek a karcinogenezist tumorsuppresszor targetjeik downregulációját okozva segítik elő [27], ennek megfelelően daganatsejtekben az expressziós szintjük megnövekedése a jellemző [12]. Ezzel szemben a tumorsuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-ek szintje csökken a karcinogenezis során [12], ami onkogén targetjeik aktivációjához és ezáltal a sejtek kontrollálatlan szaporodásához vezet [27]. Érdekes, hogy a miR-29 leukaemiában tumorsuppresszorként, szolid tumorokban viszont oncomiR-ként viselkedik [28]. Ez a szabályozási folyamatok összetettsége mellett arra is jó példa, hogy a mikro-RNS-ek funkcióját nagyban befolyásolja az adott sejtípus és szöveti környezet, amelyben kifejeződnek [30].

Azt, hogy kialakul-e daganatos megbetegedés, sok egyéb tényező mellett genetikai és epigenetikai mechanizmusok együttesen, egymással szoros kölcsönhatásban hatva határozzák meg. Ezért a mikro-RNS-ek karcinogenezisben betöltött szerepe csak a sokféle szabályozó-mechanizmus által alkotott komplex hálózatot tekintve vizsgálható. Például a DNS-hibajavításban szerepet játszó, a HDAC2 enzim aktivitását is szabályozó BRCA1 tumorsuppresszor gén mutációja az onkogén tulajdonságú miR-155 expressziójának gátlás alóli felszaba-

dulását eredményezi a hisztonfehérjék acetilációjának megváltozása miatt [11].

A rák kialakulásához azonban a sejtosztódást szabályozó gének mikro-RNS-ek által előidézett funkciózavarára éppúgy hozzájárulhat, mint a mikro-RNS-ek expressziós szintjének imént említett módosulása a genom szekvenciájában létrejött változások következtében [9]. Ezt jól mutatja, hogy a tumorsuppresszor gének Knudson-hipotézisben „találat”-nak nevezett funkcióvesztését nemcsak mutáció, hanem epigenetikai mechanizmusok is okozhatják [3]. Az epigenetikai úton megvalósuló géncsendesítés a promóteren végbemenő DNS-metiláció és hisztonmodifikáció mellett az mRNS 3' UTR-régiójához kötődő mikro-RNS-ek révén is létrejöhet [11].

A hiszton acetiláció-deacetiláció és a DNS-metiláció enzimei egymással is kölcsönhatásban állnak, aktivitásuk szabályozásában pedig a mikro-RNS-ek is részt vesznek [3], amelyek funkcióját az előbb említett két mechanizmus szintén befolyásolja [31]. Például a DNMT3a génje a miR-29 családnak, a DNMT3b génje a miR-29 család mellett a miR-148-nak is targetje [11, 32], valamint CLL-ben a miR-34a, ALL-ben pedig a miR-34b és a miR-34c expressziós szintje gyakran promóter hipermetiláció következtében csökken [4].

A mikro-RNS prekursor alakok processziójának zavarai, az érett mikro-RNS és a target mRNS-ek kapcsolódásának módosulása, továbbá a sejtek által kibocsátott endoszomális eredetű, 50–100 nm nagyságú, sok egyéb molekulaféleség mellett mikro-RNS-eket is tartalmazó exoszómák szintén hozzájárulhatnak a malignus betegségek kialakulásához [33, 34].

Eltérések a mikro-RNS-ek expressziós szintjében a leukaemia különböző típusai esetén

A mikro-RNS-ek megváltozott expressziós szintje leukaemiában nagyon gyakran megfigyelhető. Ezek az eltérések a betegség progressziójában igazoltan szerepet játszanak, sok esetben azonban még nem világos, hogy a betegség patogenezisének pontosan mely állomásával függenek össze [27]. A következő években ez várhatóan intenzív kutatás tárgyát képezi majd.

A 2. táblázatban összefoglaltunk néhány olyan, a mikro-RNS-ek expressziós szintjét érintő változást, amelyek a leukaemia bizonyos típusaira jellemzőek (hivatkozásokat lásd a táblázatnál). Az ismertetett példák esetén gyakran egy oncomiR vagy egy anti-oncomiR megnövekedett, illetve lecsökkent expressziós szintje és a leukaemia valamelyik típusa között figyelhető meg összefüggés. Az oncomiR-ek szintje általában emelkedett, az anti-oncomiR-eké pedig csökkent, de ez alól kivételek is vannak. Az érintett mikro-RNS-ek közül néhány a haemopoiesis szabályozásában is fontos szerepet tölt be. A feltüntetett targetekkel kapcsolatban ér-

2. táblázat | Mikro-RNS-ek expressziós szintjének változásai a leukaemia különböző típusaiban

Mikro-RNS	Targetek	Összefüggések a leukaemia típusaival
MiR-10a	HOXA1	NPM1-mutációval társuló AML-ben ↑
MiR-15	Bcl-2, ciklinD1, ciklinE1, c-myc	CLL-ben ↓
MiR-16	Bcl-2, ciklinD1, ciklinE1, c-myc	CLL-ben ↓, CML-ben ↓
MiR-17-92 klaszter	p21, PTEN	Gyakori az amplifikáció és az overexpresszió
MiR-21	PTEN	AML M5 MLL-gén átrendeződésével ↑
MiR-34a	Bcl-2, CDK4, CDK6, E2F3	CEBPA-mutációval társuló AML-ben ↓, CLL-ben ↓
MiR-34b	Bcl-2, CDK4, CDK6, CREB	ALL-ben ↓
MiR-34c	Bcl-2, CDK4, CDK6	ALL-ben ↓
MiR-100	RBSP3	AML M1-ben ↑, M2-ben ↑, M3-ban ↑
MiR-124	CDK6, CEBPA	Gyakori a downreguláció
MiR-127	Bcl-6	AML M3-ban ↑, AML M4 inv(16) esetén ↓
MiR-155	SHIP1	FLT3-ITD-mutációval társuló AML-ben ↑
MiR-196a	HOXB	NPM1-mutációval társuló AML-ben ↑
MiR-203	ABL1, BCR-ABL1	Philadelphia kromoszóma esetén ↓
MiR-222	p27, PTEN	MiR-222: gyermekkori hiperdiploid ALL-ben ↑
Let-7 család	Ras, CDK6, ciklinD2, c-myc	AML M2-ben és M4 inv(16) esetén let-7b ↓ és let-7c ↓

ABL = v-abl Abelson rágcéló leukaemia virális onkogén homológja; BCR = töréspont klaszter régió; CDK = ciklindependens kináz; CEBPA = CCAAT/enhanszer régióhoz kötődő fehérje α; CREB = cAMP válaszadó elemhez kötődő fehérje; FAB = francia-amerikai-brit; FLT3 = fms-szerű tirozinkináz-3; HOX = homeoboxgének; ITD = belső tandemismétlődés; MAPK = mitogénaktivált proteinkináz; MLL = kevert vonalú leukaemia; NPM1 = nukleofoszin 1 gén; PTEN = foszfatáz- és tenzinhomológ; RBSP3 = RB1 szerinofoszfatáz a 3-as kromoszómáról; SHIP1 = SH2 domént tartalmazó inozitol 5'-foszfatáz.

A táblázatban használt M1–M5 megjelölések a FAB szerinti osztályozásnak megfelelő AML-altípusokat jelentik.

A táblázatot az alábbi közlemények alapján állítottuk össze:

[2], [4], [5], [11], [14], [16], [21], [23], [24], [27], [30], [32], [35], [36], [37], [38], [39].

dekkességképpen megemlíthető, hogy az oncomiR-ek targetjei között többféle foszfatázt, az anti-oncomiR-ek targetjei közt pedig számos kinázt megtalálhatunk.

Gyógyszer-rezisztencia és terápiára adott válasz összefüggése a mikro-RNS-ek expressziós szintjével

Bizonyos mikro-RNS-ek megváltozott expressziós szintje összefüggésben állhat nemcsak a leukaemia típusával, hanem az alkalmazott gyógyszeres kezelés eredményességével is. A miR-128b a rákos megbetegedések számos típusa, köztük ALL esetén is elősegíti a gyógyszer-rezisztencia kifejlődését [40]. A gyógyszer-molekulákat a sejtekből kipumpáló MDR1 fehérje szintje negatív korrelációt mutat a miR-27a és a miR-296 kifejeződésének mértékével [10, 40]. A miR-708 szintje gyermekkori ALL-ben a prednizonkezelésre jól reagálóknál magasnak bizonyult, míg a nem reagáló csoportban alacsony volt [40]. Szintén gyermekkori ALL-ben, relapsus esetén magas miR-708 és alacsony miR-223 expressziós szinteket észleltek [40], emellett a miR-454 szintje aszparagináz rezisztencia esetén alacsony, a miR-99a, a miR-100 és a miR-125b szintje pedig vinkrisztin-

és daunorubicin rezisztencia esetén magas volt [30]. Fludarabinnal kezelt CLL-es betegeknél rezisztencia esetén magas miR-148a-, miR-181a-, miR-221- és miR-222-szint, illetve alacsony miR-17-5p-, miR-29a-, miR-29c- és miR-34a-szint volt jellemző [2]. CML-es betegek esetében az imatinibkezelés sikerességének előrejelzésében szintén segítséget nyújthatnak a mikro-RNS-ek: rezisztencia esetén a miR-191 upregulációját és 18-féle mikro-RNS (miR-7, miR-23a, miR-26a, miR-29a, miR-29c, miR-30b, miR-30c, miR-100, miR-126*, miR-134, miR-141, miR-183, miR-196b, miR-199, miR-224, miR-326, miR-422b és miR-520a) downregulációját tapasztalták [2]. A korábbiakban már említett exoszómáknak a gyógyszer-rezisztenciában is szerepe van. Általuk a szükségtelen endogén anyagok mellett kemo-terápiás szerek, például a doxorubicin, szintén eliminálódhatnak a sejtekből [41].

Mikro-RNS-ek a hematológiai malignus betegségek diagnosztikájában

A diagnosztikában a mikro-RNS-ek alkalmazhatóságának alapját az egészséges és a beteg emberekre jellemző expressziós szintek különbözősége teremti meg [10]. Mikro-RNS-ek jelen vannak a vérben és egyéb szöve-

tekben is [10]. A keringő mikro-RNS-ek szintjének meghatározása a rák korai stádiumban történő kimutatásának hasznos eszközévé válhat [38], a normálistól eltérő szintek pedig sokszor már premalignus állapotban is kimutathatóak [25]. A mikro-RNS-ek expressziós profilja a tumor típusáról és annak differenciáltsági fokáról is sok hasznos információval szolgál [26], emellett a metasztatizáló és a metasztázist nem adó tumorok elkülönítésében is hasznos lehet [11]. Az mRNS-profillal szembeni előnyük, hogy pontosabb tumorklasszifikációt tesznek lehetővé [31], és intaktak maradnak formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákban is [26]. Nehézséget jelent azonban, hogy a különböző detektálási módszerek eltérő eredményeket produkálhatnak, a reprodukálhatóság pedig egy adott módszer esetében sem mindig megfelelő [10]. Ezért a későbbiekben mindenképpen szükség lesz e módszerek standardizálására.

Nemrégiben közölték, hogy az AML-t és az ALL-t 97–99%-os biztonsággal el lehet különíteni egymástól az alábbi négy mikro-RNS közül bármelyik kettő expressziós szintjének meghatározása segítségével: miR-128a, miR-128b, let-7b és miR-223. Az első kettőre ALL-ben, az utóbbi kettőre pedig AML-ben jellemző magasabb expressziós szint. Ha csak egyet választunk ki közülük, a helyes diagnózis valószínűsége 84–94%, legnagyobb a miR-223 szintjének meghatározása esetén [42].

Mikro-RNS-ek lehetséges alkalmazása a prognózis megállapításában

AML-ben az egyik legerősebb független prognosztikai faktor a diagnózis idején megállapított karyotípus. Ugyanakkor magas a citogenetikai eltérést nem hordozó AML-es betegek aránya: az egyik tanulmányban a vizsgált betegek 41%-ának karyotípusa normális volt [43]. E betegek prognosztikai szempontból heterogén csoportot alkotnak. Az AML-es betegek prognózisának megállapítása során ezért a hagyományos citogenetika mellett egyre nagyobb teret nyernek a molekuláris genetikai módszerek [43]. A citogenetikai és molekuláris genetikai alcsoportokkal korreláló mikro-RNS-expressziós mintázatok segítségével pedig az AML még árnyaltabb klasszifikációja valósulhat meg [39].

AML-ben a miR-25 magas expressziós szintje, illetve a miR-26a, a miR-29b, a miR-146a és a miR-196b alacsony szintje jó prognózist jelez [44], míg a miR-155, a miR-191 és a miR-199a magas expressziós szintje kedvezőtlen prognózissal társul [22, 45].

ALL-es betegeknél a kromoszóma abnormalitások mellett a molekuláris genetikai eltérések szintén nagyon fontosak a kockázatbecslés szempontjából. A miR-146a és a miR-181a magas szintje rossz prognózissal, a miR-221 magas szintje pedig jó prognózissal társul [44].

Az itt említett mikro-RNS expressziós szintváltozásai alkalmazhatóságát a prognózis előrejelzésében to-

vábbi vizsgálatokkal szükséges megerősíteni. A betegség kimenetelének pontosabb előrejelzése a jövőben nagy segítséget jelenthet a legmegfelelőbb terápia kiválasztásában.

Mikro-RNS-ek alkalmazása a terápiában

A mikro-RNS-ek szintjének modulálása a jövőben a leukaemia kezelésében is helyet kaphat [23]. A tumorsuppresszor mikro-RNS-ek expresszióját fokozni, az oncomiR-ek expresszióját gátolni szükséges a féktelen sejtszétválás visszaszorítása érdekében [7]. Az expressziós szintekben előidéztet változások hatásainak vizsgálatában nagy segítséget nyújtanak a knock-out, illetve knock-in állatmodellek [23].

Az úgynevezett kromatinmodifikáló hatóanyagok közül a demetilációt okozó szerek, például az 5-azacitidin segítségével helyreállítható a promóter hipermetiláció révén csendesített tumorsuppresszor mikro-RNS-ek expressziója [31]. Jogosan merül fel ugyanakkor a demetiláló ágensekkel szembeni aggodalom, mivel a genom egészének hipometilációját okozva egyéb betegségek létrejöttét segíthetik elő [46]. A metilációs szint DNMT-inhibitorokkal is csökkenthető, amelyek főként citozinanalógok [3].

A mikro-RNS-ek expressziós szintje többféleképpen is növelhető. A Dicer enzim produktumával ekvivalens dupla szálú mikro-RNS, illetve a Dicer által a későbbiekben még processzáldó shRNS-ek egyaránt expresszálnak a sejtekben [47]. Például AML-ben terápiás lehetőségként felmerül a tumorsuppresszor miR-29b „pótlása” szintetikus oligonukleotidok segítségével [23], a blastok differenciációját pedig miR-223 oligonukleotiddal történő kezeléssel sikeresen helyreállították [23].

Az expressziós szint csökkentésének szintén több módja lehetséges. Az érett forma elleni antiszensz oligonukleotidok valószínűleg a RISC-ben lévő mikro-RNS-hez kötődnek, és a komplex felbomlását gyorsítják [47]. Az érett mikro-RNS-eknek nemcsak a funkciója, hanem a képződése is meggátolható a processzálsukban részt vevő fehérjék „kikapcsolásával” [47]. A mikro-RNS-inhibitorok új típusa a „miRNA sponges” nevű család, amelyekben antiszensz szekvenciák ismétlődnek, és képesek a mikro-RNS-eket endogén targetjeiktől elvonva, a szivacsához hasonló módon összegyűjteni [48].

Az első mikro-RNS-t célzó gyógyszer, amely a humán klinikai vizsgálatok fázisáig eljutott, az LNA-antimiR-122 volt [23]. Az LNA-szerkezetre a ribóz 2' oxigén- és 4' szénatomja közötti extra híd jellemző. E módosítás következtében az LNA-próbák a konvencionális DNS-vagy RNS-próbáknál jóval nagyobb affinitással kötődnek a komplementer RNS-szekvenciához [10].

A mikro-RNS-ek más kezelési stratégiák, például a génterápia eredményeinek javításához szintén hozzájárulhatnak [9]. Vizsgálni szükséges továbbá az ismert

daganatellenes terápiáknak a mikro-RNS-ek expressziós szintjére gyakorolt hatását is [38].

Következtetések

A malignus betegségeket mind genetikai, mind epigenetikai jellemzőiket tekintve nagymértékű heterogenitás jellemzi. A karcinogenezis során a számos genetikai változás mellett az epigenetikai szabályozómechanizmusok szintén mélyreható zavarokat szenvednek, amelyeknek az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet szentelnek. A DNS-metiláció, a hisztonmodifikáció és a kis, nem kódoló RNS-ek egymást is kölcsönösen szabályozó, a génexpressziót együttesen koordináló hálózatot alkotnak. Bonyolult kölcsönhatásairól kevés információ áll rendelkezésre, amelynek jelentős része az elmúlt néhány évben látott napvilágot.

A kis, nem kódoló RNS-ek közé tartozó mikro-RNS-ek sokféle sejtfunkció finomhangolásáért felelősek, ezért az őket érintő változások a betegségek széles spektrumának kialakulásában közrejátszanak. A targetjeik között nagy számban megtalálhatók a sejtciklus és sejtosztódás szabályozásában részt vevő gének, amelyek funkciózavarai a malignus betegségek legközvetlenebb etiológiai tényezői közé tartoznak.

Láthattuk, hogy a haemopoiesis szabályozásában kulcsszerepet játszó mikro-RNS-ek közül több tumorszuppresszorként vagy onkogénként funkcionál, megváltozott expressziós szintjüket pedig a leukaemia sokféle típusában detektálták, és összefüggésbe hozták a betegség patogenezisével.

A mikro-RNS-ek expressziós szintjének meghatározása az mRNS-profilnál pontosabb tumorklasszifikációt tesz lehetővé. Információt nyújt a rák típusáról és annak differenciáltsági fokáról egyaránt. A megváltozott mikro-RNS-szintek lehetővé teszik a malignus folyamat korai stádiumban történő észlelését, premalignus állapotban történő kimutatásuk pedig a betegség megelőzésének terén hozhat jelentős előrelépést.

Az expressziós profil sok esetben korrelál a betegség prognózisával: segítséget nyújthat például különböző prognózisú alcsoportok elkülönítésében a normális karyotipusú leukaemiás betegek, illetve az azonos citogenetikai eltérést hordozók körében. A kimenetel pontosabb becslése könnyebbé teszi a leginkább megfelelő terápia kiválasztását. Specifikus eltérések révén előre jelezhető lehet bizonyos gyógyszerekkel szembeni rezisztencia is.

A rákellenes hatás eléréséhez az oncomiR-ek szintjét csökkenteni, az anti-oncomiR-ekét pedig növelni szükséges. Mindkettőre létezik többféle lehetőség is. A mikro-RNS-ek expressziós szintjének módosítása befolyásolhatja az egyéb terápiás stratégiák révén elért eredményeket. A kezelési eljárások mikro-RNS-ek szintjére gyakorolt hatásait szintén tanulmányozni szükséges.

Az elmúlt években közölt eredmények sokasága ellenére még messze nem tekinthető tisztázottnak a mikro-RNS-ek malignus betegségekből betöltött pontos szerepe. Funkciójuk és ezen keresztül a rák molekuláris alapjainak jobb megértése utat nyithat az egyre inkább személyre szabott kezelési lehetőségek felé a hematológiai onkológiában.

Irodalom

- [1] Hanahan, D., Weinberg, R. A.: The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000, 100, 57–70.
- [2] Florea, C., Schmeckenburger, M., Grandjean, C., et al.: Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics*, 2011, 3, 581–609.
- [3] Brait, M., Sidransky, D.: Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol. Mech. Methods*, 2011, 21, 275–288.
- [4] Agirre, X., Martínez-Climent, J. Á., Otero, M. D., et al.: Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia*, 2012, 26, 395–403.
- [5] Vaz, C., Ahmad, H. M., Sharma, P., et al.: Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. *BMC Genomics*, 2010, 11, 288.
- [6] Yu, Z., Pestell, R. G.: Small non-coding RNAs govern mammary gland tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2012, 17, 59–64.
- [7] Nikitina, E. G., Urazova, L. N., Stegny, V. N.: MicroRNAs and human cancer. *Exp. Oncol.*, 2012, 34, 2–8.
- [8] Bartel, D. P.: MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116, 281–297.
- [9] Wiemer, E. A. C.: The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur. J. Cancer*, 2007, 43, 1529–1544.
- [10] Planell-Saguer, M., Rodicio, M. C.: Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal. Chim. Acta*, 2011, 699, 134–152.
- [11] Malumbres, M.: miRNAs and cancer: An epigenetics view. *Mol. Aspects Med.*, 2012 Jul 4. [Epub ahead of print] <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam>
- [12] Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., et al.: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 2006, 302, 1–12.
- [13] Bernardo, B. C., Charchar, F. J., Lin, R. C., et al.: A MicroRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques. *Heart Lung Circ.*, 2011, 21, 131–142.
- [14] Manikandan, J., Aarthi, J. J., Kumar, S. D., et al.: Oncomirs: The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation*, 2008, 2, 330–334.
- [15] Palmero, E. I., de Campos, S. G., Campos, M., et al.: Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet. Mol. Biol.*, 2011, 34, 363–370.
- [16] Satoh, J., Tabunoki, H.: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Min.*, 2011, 4, 17.
- [17] Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., et al.: A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129, 1401–1414.
- [18] Zhang, H., Luo, X. Q., Zhang, P., et al.: MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS One*, 2009, 4, e7826.
- [19] Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., et al.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303, 83–86.
- [20] Havelange, V., Garzon, R.: MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am. J. Hematol.*, 2010, 85, 935–942.
- [21] Bhagavathi, S., Czader, M.: MicroRNAs in benign and malignant hematopoiesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2010, 134, 1276–1281.

- [22] Zhu, Y. D., Wang, L., Sun, C., et al.: Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med. Oncol.*, 2012, 29, 2323–2331.
- [23] Marcucci, G., Mrózek, K., Radmacher, M. D., et al.: The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011, 117, 1121–1129.
- [24] Pulikkan, J. A., Peramangalam, P. S., Dengler, V., et al.: C/EBP α regulated microRNA-34a targets E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations. *Blood*, 2010, 116, 5638–5649.
- [25] Calin, G. A., Croce, C. M.: MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. *Cancer Res.*, 2006, 66, 7390–7394.
- [26] Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., et al.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435, 834–838.
- [27] Bousquet, M., Lodish, H. F.: MicroRNAs: the primary cause or a determinant of progression in leukemia? *Expert Rev. Hematol.*, 2011, 4, 121–123.
- [28] Volinia, S., Galasso, M., Costinean, S., et al.: Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res.*, 2010, 20, 589–599.
- [29] Wong, K. Y., So, C. C., Loong, F., et al.: Epigenetic inactivation of the miR-124-1 in haematological malignancies. *PLoS One*, 2011, 6, e19027.
- [30] Schotte, D., Menezes, R. X., Akbari Moqadam, F. A., et al.: MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2011, 96, 703–711.
- [31] Saito, Y., Jones, P. A.: Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*, 2006, 5, 2220–2222.
- [32] Rouibi, A., Mager, D. L., Humphries, R. K. et al.: MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mamm. Genome*, 2008, 19, 517–525.
- [33] Lee, E. J., Baek, M., Gusev, Y., et al.: Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA*, 2008, 14, 35–42.
- [34] Iero, M., Valenti, R., Huber, V., et al.: Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.*, 2008, 15, 80–88.
- [35] He, X., He, L., Hannon, G. J.: The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res.*, 2007, 67, 11099–11101.
- [36] Zheng, Y. S., Zhang, H., Zhang, X. J., et al.: MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 2012, 31, 80–92.
- [37] Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., et al.: Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.*, 2007, 67, 1424–1429.
- [38] Brase, J. C., Wuttig, D., Kuner, R., et al.: Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol. Cancer*, 2010, 9, 306.
- [39] Jongen-Lavrencic, M., Sun, S. M., Dijkstra, M. K., et al.: MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111, 5078–5085.
- [40] Han, B. W., Feng, D. D., Li, Z. G., et al.: A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum. Mol. Genet.*, 2011, 20, 4903–4915.
- [41] Zhang, H. G., Grizzle, W. E.: Exosomes and cancer: A newly described pathway of immune suppression. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17, 959–964.
- [42] Mi, S., Lu, J., Sun, M., et al.: MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 19971–19976.
- [43] Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., et al.: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 2010, 116, 354–365.
- [44] Wang, Y., Li, Z., He, C., et al.: MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2010, 44, 191–197.
- [45] Zhang, H., Chen, Y.: New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Sci. China C. Life Sci.*, 2009, 52, 224–231.
- [46] Li, X. Q., Guo, Y. Y., De, W.: DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2012, 18, 882–888.
- [47] Esau, C. C., Monia, B. P.: Therapeutic potential for microRNAs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2007, 59, 101–114.
- [48] Kluiver, J., Gibcus, J. H., Hettinga, C., et al.: Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PLoS One*, 2012, 7, e29275.

(Oláh Éva dr.,
Debrecen, Nagyerdei krt. 98., 4032
e-mail: colah@med.unideb.hu)

Tisztelt Szerzőink, Olvasóink!

Az Orvosi Hetilapban megjelenő/megjelent közlemények elérhetőségére több lehetőség kínálkozik.

Rendelhető különnyomat, melynek áráról bővebben a www.akkrt.hu honlapon (kiadványok, folyóirat, különnyomat menüpontok alatt) vagy Szerkesztőségünkben tájékozódhatnak.

A közlemények megvásárolhatók pdf-formátumban is, illetve igényelhető Optional Open Article (OOpenArt).

Adott díj ellenében az online közlemények bárki számára hozzáférhetők honlapunkon (a közlemények külön linket kapnak, így más oldalról is linkelhetővé válnak).

Bővebb információ a hirdetes@akkrt.hu címen vagy különnyomat rendelése esetén a Szerkesztőségtől kérhető.