

STRESZCZENIE

Wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW C) stanowi poważny problem zdrowia publicznego. Szacuje się, że wirusem C zapalenia wątroby (*hepatitis C virus*, HCV) zakażonych jest ok. 71 milionów ludzi na świecie, co stanowi ok. 1% populacji ogólnej. W Polsce szacowany odsetek osób z przeciwciałami anti-HCV wynosi ok. 1%, z czego ok. 200 tys. (0,5%) to osoby z aktywną replikacją wirusa (obecność HCV RNA). U ok. 80% zakażonych zapalenie przechodzi w postać przewlekłą (pWZW C) i w ciągu wielu lat trwania choroby prowadzi do postępującego uszkodzenia wątroby. Każdego roku notuje się ok. 400 tys. zgonów z powodu HCV-zależnych chorób wątroby, głównie marskości i raka wątrobowokomórkowego. Aktualnie stosowane leczenie, celujące bezpośrednio w wirusa, jest wysoce skuteczne, jednak nadal wiele osób nie jest świadomych zakażenia, stanowiąc potencjalne źródło szerzenia infekcji. Co więcej, zapobieganie nowym zakażeniom jest także problematyczne ze względu na brak szczepionki przeciwko HCV.

MiRNA to krótkie, jednoniciowe, endogenne cząsteczki RNA, których główną rolą jest potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów. Wiele badań wskazuje, że miRNA pełnią funkcję przekaźników podczas interakcji wirus-gospodarz, modulując odpowiedź przeciwwirusową oraz progresję uszkodzenia wątroby w pWZW C. Ponadto cząsteczki te są stabilne i możliwe do oznaczenia w płynach ustrojowych, w związku z czym stanowią potencjalne źródło nieinwazyjnych markerów prognostycznych i predykcyjnych w pWZW C. Nadal niewiele jest funkcjonalnych badań nad biologiczną rolą miRNA w pWZW C oraz wpływem tych cząsteczek na cykl życiowy i infekcyjność HCV. W związku z tym istnieje potrzeba poszerzenia badań nad interakcją miRNA z genomem HCV oraz nad znaczeniem tych cząsteczek dla eliminacji wirusa i przebiegu choroby. Powyższe przesłanki oraz nadal niewyjaśniony mechanizm przetrwania HCV skłonił do podjęcia badań ekspresji oraz oddziaływania wybranych miRNA z docelowymi mRNA w pWZW C.

Głównym celem pracy doktorskiej było poznanie znaczenia wybranych miRNA dla rozwoju i przebiegu pWZW C. Cel zrealizowano poprzez analizę ekspresji 179 wybranych miRNA w osoczu chorych z pWZW C oraz ocenę wpływu miR-106b-3p, miR-331-3p i miR-335-3p na funkcję hepatocytów i replikację HCV *in vitro* w linii komórek wątroby Huh7.5. Przeprowadzono również analizę oddziaływań badanych miRNA z potencjalnie docelowymi mRNA oraz oceniono ich wpływ na replikację HCV.

W pracy zbadano ekspresję 179 krążących miRNA u chorych z pWZW C oraz zdrowych dawców. Wykazano, że zakażenie HCV istotnie zmienia profil ekspresji wybranych miRNA w osoczu. Na tej podstawie wytypowano 5 miRNA o istotnie podwyższonej ekspresji u chorych względem osób zdrowych tj. miR-106b-3p, miR-145-5p, miR-324-5p, miR-331-3p oraz miR-335-3p. Wykazano słabą dodatnią zależność ekspresji miR-145-5p z poziomem AST i GGTP oraz miR-106b-3p i miR-331-3p z poziomem AST w osoczu chorych z pWZW C. Natomiast nie wykazano

związku ekspresji analizowanych miRNA z poziomem HCV RNA w osoczu. Do dalszych analiz funkcjonalnych wytypowano miRNA o najwyższej różnicy ekspresji między chorymi z pWZW C oraz zdrowymi dawcami tj.: miR-106b-3p, miR-331-3p i miR-335-3p. Wykazano, że miR-106b-3p istotnie obniża proliferację, spowalnia cykl komórkowy oraz zmniejsza apoptozę komórek linii Huh7.5. Podobnie miR-335-3p obniża tempo proliferacji i zwalnia cykl komórkowy, jednak powoduje nasilenie apoptozy komórek. Z kolei miR-331-3p powoduje przyspieszenie cyklu oraz nasilenie apoptozy komórek linii Huh7.5. Następnie oceniono wpływ ww. miRNA na replikację HCV *in vitro*. Po raz pierwszy wykazano, że miR-106b-3p, miR-331-3p oraz miR-335-3p zmniejszają replikację HCV w komórkach linii Huh7.5. Dla tych miRNA na podstawie analiz *in silico* wytypowano docelowe mRNA, które mogą mieć znaczenie w regulacji cyklu życiowego HCV oraz rozwoju uszkodzenia wątroby w przebiegu pWZW C. Oryginalnym osiągnięciem pracy było wykazanie bezpośredniej interakcji miR-106b-3p z *STAT5B* oraz miR-335-3p z *PNPLA3*. Wiązanie miRNA w obrębie 3' UTR ww. genów powoduje spadek ich ekspresji na poziomie mRNA i białka w komórkach linii Huh7.5. Jednakże odnotowany spadek replikacji wirusa pod wpływem miR-106b-3p i miR-335-3p nie zachodzi bezpośrednio poprzez obniżanie ekspresji *STAT5B* i *PNPLA3* przez te miRNA. Przeciwnie w przypadku wyciszenia *STAT5B* odnotowano wzrost replikacji oraz infekcyjności HCV. Natomiast wyciszenie *PNPLA3* pozostawało bez wpływu na te procesy. Wykazano również, że SNP rs886057602 w miejscu wiązania miR-335-3p w obrębie regionu 3' UTR *PNPLA3* osłabia wiązanie miRNA i negatywną regulację transkryptu. Nie wykazano występowania polimorfizmu rs886057602 w badanej grupie osób z pWZW C oraz zdrowych dawców.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują na wpływ miR-106b-3p, miR-331-3p oraz miR-335-3p na rozwój i przebieg pWZW C. Stwierdzono, że ocena ekspresji badanych miRNA w osoczu nie jest przydatna do prognozowania przebiegu pWZW C oraz przewidywania odpowiedzi na leczenie pegIFN- α i RBV. Wydaje się, że miR-106b-3p, miR-331-3p i miR-335-3p poprzez wykazany wpływ na badane procesy komórkowe oraz negatywną regulację replikacji HCV mogą modulować przebieg zakażenia, rozwój zmian patologicznych w wątrobie oraz przetrwanie wirusa w warunkach presji środowiska. Poznanie dokładnej roli tych miRNA oraz szlaków sygnałowych poprzez które wpływają na replikację HCV i funkcje hepatocytów wymaga dalszych badań. Identyfikacja miRNA wraz z ich docelowymi mRNA może w dalszej perspektywie być przydatna do opracowania markerów prognostycznych oraz spersonalizowanych terapii chorych z pWZW C.