

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW C) stanowi poważny problem zdrowia publicznego. Szacuje się, że około 130 do 170 milionów osób światowej populacji jest zarażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV). Według Flisiaka i wsp., w Polsce liczba osób u których występują przeciwciała anty-HCV wynosi ok. 730 tysięcy, z czego około 230 tysięcy to osoby z aktywną wirusamią. Przewlekłe zakażenie HCV uważane jest za główną przyczynę rozwoju marskości i raka wątroby. Każdego roku notuje się ok. 350 tysięcy zgonów z powodu chorób wątroby o etiologii HCV. Włóknienie, jako nieodłączny proces przewlekłych chorób wątroby stanowi poważny problem medycyny klinicznej. Obecnie „złotym standardem” oceny stopnia zaawansowania włóknienia oraz aktywności zmian zapalnych w wątrobie jest badanie histopatologiczne wycinków biopsyjnych. Metoda ta jest inwazyjna i niepozbawiona skutków ubocznych, dlatego też istnieje potrzeba poszukiwania nieinwazyjnych markerów nasilenia zmian patologicznych w wątrobie. Dotychczas zidentyfikowano kilka genetycznych czynników kluczowych dla rozwoju i przebiegu chorób wątroby o etiologii HCV. Jednym z najlepiej udokumentowanych jest polimorfizm rs738409 (C>G) genu *PNPLA3* (ang. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3), znanego również jako adiponutryna. Wykazano częstsze występowanie genotypu GG u chorych z przewlekłym WZW C (pWZW C) oraz jego związek z wyższym ryzykiem zaawansowanego włóknienia i zapalenia wątroby u tych chorych. Mimo prowadzonych badań nad *PNPLA3* w patogenezie HCV-zależnych chorób wątroby, nadal epigenetyczny mechanizm regulacji tego genu oraz jego wpływ na rozwój zmian patologicznych w wątrobie nie został wyjaśniony. W ostatnich kilku latach uwagę naukowców zwróciły małe cząsteczki RNA, zwane miRNA (miRNA, miR), które uważane są za jedne z ważniejszych regulatorów potranskrypcyjnej ekspresji genów. Odkrycie miRNA uruchomiło falę intensywnych badań nad ich biologiczną rolą zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym również w pWZW C. Wśród miRNA o aktywności sprzyjającej włóknieniu wątroby wymienia się m.in. miR-17-5p, miR-21, miR-181b, miR-221/222; natomiast przeciwny charakter postuluje się dla miR-101, miR-122, miR-146, miR-214 itd. Obecnie prowadzone badania mają na celu poznanie mechanizmu ich działania w kontekście rozwoju i progresji chorób wątroby. Analizy *in silico* pozwoliły ustalić, że ekspresja genu *PNPLA3* jest bezpośrednio regulowana przez miRNA-335-5p. Niezależne badania wstępne potwierdziły zwiększoną ekspresję miRNA-335-5p u chorych z pWZW C względem zdrowych dawców.

Celem naukowym projektu jest poznanie znaczenia miRNA-335-5p w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu *PNPLA3* oraz wykazanie związku interakcji miR-335-5p—*PNPLA3* z rozwojem włóknienia i marskości wątroby u chorych z pWZW C.

Uzyskane wyniki pozwolą na **weryfikację następujących hipotez**:

1. Istnieje związek między poziomem ekspresji miRNA-335-5p a ekspresją genu *PNPLA3* na poziomie mRNA i białka w linii komórkowej Huh7.
2. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphisms, SNPs) w miejscach wiązania miRNA-335-5p do mRNA genu *PNPLA3* wpływają na siłę wiązania tego miRNA i ekspresję genu na poziomie mRNA i białka.
3. Analiza ekspresji miRNA-335-5p oraz ocena występowania wariantów polimorficznych w miejscu wiązania miRNA-335-5p do mRNA *PNPLA3* jest przydatna do przewidywania zaawansowania zmian patologicznych w wątrobie chorych z pWZW C.

Materiał do badań będzie stanowiła krew żylna pobrana od 100 chorych z pWZW C oraz od 100 zdrowych dawców. Badania *in vitro* będą prowadzone z wykorzystaniem linii komórkowej Huh7. Ocena znaczenia miRNA-335-5p w regulacji ekspresji *PNPLA3* *in vitro* obejmie: (1) eksperymentalną walidację interakcji miRNA-335-5p z mRNA *PNPLA3* (2) ocenę zależności między ekspresją miRNA-335-5p a ekspresją *PNPLA3* na poziomie mRNA i białka (3) ocenę wpływu wybranych SNPs na siłę wiązania miRNA-335-5p do mRNA genu *PNPLA3* oraz jego ekspresję. W ostatnim etapie badań zależności obserwowane *in vitro* zostaną zweryfikowane *in vivo* tj. w grupie chorych z pWZW C oraz osób zdrowych.

Proponowane w niniejszym projekcie badania mają **wyraźnie nowatorski charakter**. Nie ma **wyników badań** wykazujących znaczenie miRNA-335-5p w regulacji genu *PNPLA3*. Nie przeprowadzono analiz *in vitro* oceniających wpływ miRNA-335-5p na ekspresję *PNPLA3* na poziomie mRNA oraz białka. Nie zbadano również wpływu występowania SNPs w miejscu wiązania miRNA-335-5p do mRNA genu *PNPLA3* na siłę tego wiązania oraz na regulację ekspresji *PNPLA3*. Co więcej, nie ma żadnych danych dotyczących znaczenia miRNA-335-5p w rozwoju marskości wątroby oraz wyników badań pokazujących jak ekspresja miRNA-335-5p koreluje ze stopniem zaawansowania zmian patologicznych w wątrobie chorych z pWZW C. Poznanie wyżej wymienionych zależności umożliwi wgląd w mechanizm leżący u podstaw rozwoju zmian patologicznych w wątrobie. Ponadto poszerzy obecną wiedzę na temat znaczenia miRNA-335-5p w regulacji ekspresji genu *PNPLA3* oraz znaczenia oddziaływań miRNA-335-5p—*PNPLA3* w rozwoju włóknienia i marskości wątroby u chorych z pWZW C.