Identyfikacja i charakterystyka potencjału funkcjonalnego stabilnych degradantów RNA powstających w systemie hodowli komórkowej wirusa zapalenia wątroby typu C

mgr inż. Anny Hojka-Osińskiej

STRESZCZENIE

Jedną z konsekwencji, obserwowanego w ostatnich latach, niezwykle szybkiego rozwoju wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania było istotne poszerzenie naszej wiedzy na temat małych regulatorowych RNA. Stwierdzono między innymi, iż w wyniku niepełnej degradacji dojrzałych RNA powstawać mogą nowe funkcjonalne cząsteczki zwane generalnie fragmentami RNA. Wykazano, że fragmenty RNA powstają u wszystkich rodzajów organizmów, ich akumulacja jest zwykle komórkowo-, tkankowo- lub organospecyficzna i zależy od toczących się procesów fizjologicznych lub patologicznych. Niestety zarówno proces biogenezy jak i funkcje fragmentów RNA pozostają w większości przypadków nieznane. Wykazano, że niektóre z nich mogą brać udział w interferencji RNA, bądź wpływać na przebieg translacji poprzez oddziaływanie z rybosomami lub czynnikami inicjującymi translację. Obecnie badania fragmentów RNA prowadzone są głównie na ludzkich liniach komórkowych, w tym szczególnie często na linach nowotworowych. Nadal niewiele jest wiadomo na temat biogenezy, akumulacji oraz funkcji fragmentów RNA powstających w komórkach zakażonych wirusami. Stąd podstawowym celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie była identyfikacja i wstępna charakterystyka potencjału funkcjonalnego fragmentów RNA występujących w systemie hodowli komórkowej wirusa zapalenia wątroby typu C.

W pierwszym etapie badań do scharakteryzowania puli fragmentów RNA wykorzystano dwukierunkową elektroforezę w żelach poliakrylamidowych. Uzyskiwane przy jej zastosowaniu wyniki były bardzo powtarzalne i pozwalały szybko ocenić profil akumulacji wysokokopijnych fragmentów RNA. Przeprowadzone analizy wykazały, że zakażenie komórek Huh-7.5 HCV nie wpływa znacząco na akumulację wysokokopijnych fragmentów RNA.W kolejnym etapie badań w celu zidentyfikowania możliwie szerokiej grupy fragmentów RNA posłużono się metodą masowego wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Stwierdzono, że w poddanej sekwencjonowaniu frakcji RNA (od 15 do 80 nt), oprócz dobrze znanych regulatorowych RNA takich jak miRNA, występują równie liczne fragmenty RNA, które w specyficzny i powtarzalny sposób powstają z praktycznie wszystkich klas komórkowych RNA. Szczegółowe analizy wykazały, że zidentyfikowane fragmenty nie są produktami przypadkowej degradacji, lecz powstają ze ściśle zdefiniowanych regionów cząsteczek macierzystych. Najczęściej są to regiony zawierające konserwatywne motywy odpowiedzialne za oddziaływania z białkami lub innymi cząsteczkami DNA czy RNA. Przeprowadzone w ostatnim etapie badań analizy *in silico* pozwoliły wyłonić fragmenty wykazujące najwyższy potencjał funkcjonalny w procesach wyciszania RNA oraz składania pre-mRNA. Dodatkowo w przypadku jednego fragmentu (RNA HCVII-pochodzącego z nici minus genomowej cząsteczki HCV), wykazano, iż *in vitro* zaburza on inicjację translacji zależnej od HCV IRES, nie wpływając na proces translacji niezależnej od IRES.