

## Streszczenie

**Wprowadzenie:** Aktualna sytuacja epidemiczna uwydatnia problem medyczny infekcji wirusowych, szczególnie wirusami RNA. Badania prezentowane w rozprawie prowadzono na opracowanym modelu detekcji zakażeń PERV, w którym komórkami infekowanymi były fibroblasty ludzkie NHDF. W toku realizowanych prac eksperymentalnych udoskonaleniu poddano również system selekcji sond włączanych do analizy mikromacierzowej. Analizę zmian profilu ekspresji na poziomie mRNA przeprowadzono wobec receptorów HuPAR-1 i HuPAR-2, czynnika TFAP-2C oraz plejotropowej rodziny czynników restrykcyjnych TRIM. Podjęto także analizę interakcji między miRNA, a mRNA genów kodujących czynniki restrykcyjne z rodziny TRIM.

**Metodyka:** Pulę sond do detekcji mRNA genów związanych z systemem obrony przeciwwirusowej komórek typowano wieloetapowo, korzystając z bazy literaturowej, Affymetrix oraz Metascope. Wyselekcjonowane sondy zostały użyte podczas dalszych etapów analizy. Ludzkie komórki NHDF hodowano według ustalonego modelu, w czterech oddzielnych warunkach - 2 monokultury: kontrolna (N), traktowana LPS (NL) i 2 wspólne hodowle ze świńskimi komórkami PK15: bez LPS (NP) i traktowana LPS (NLP). W badaniu zastosowano bakteryjny LPS, jako induktor zapalenia w komórkach NHDF. Zakażenie wirusami PERV zostało potwierdzone w kokulturach (NP i NLP) metodą qPCR i RTqPCR. Ekstrakty RNA i miRNA posłużyły jako matryca dla mikromacierzy HGU 133A 2.0 i miRNA 2.0. Walidację mikromacierzy mRNA HGU 133A 2.0 dla wybranych genów przeprowadzono metodą RTqPCR, w oparciu o algorytm programu REST © 2009. Do identyfikacji miRNA, które różnicują badane geny w każdych warunkach, zastosowano program Transcriptome Analysis Console 4.0 (Affymetrix).

**Wyniki:** Badana w modelowym układzie infekcja retrowirusowa, po ekspozycji ludzkich komórek NHDF na wirusy PERV uwalniane z komórek PK15, została potwierdzona obecnością DNA i mRNA PERV-A. Sugeruje to integrację wirusowego materiału genetycznego z genomem zakażonych komórek. Infekcja wirusami PERV-B została potwierdzona jedynie obecnością genu *env* na poziomie mRNA. W przypadku hodowli NLP DNA PERV-A oraz mRNA obu subtypów PERV została potwierdzona doświadczalnie, przy czym DNA PERV-A była znacznie niższa niż w komórkach niestymulowanych LPS (NP). W mikromacierzy miRNA 2.0

zidentyfikowano 346 miRNA jako komórki różnicujące NHDF we wszystkich analizowanych warunkach,  $p < 0,05$ . Zgodnie z analizą za pomocą platformy mirTAR i bazy danych Microna.org żaden z wybranych miRNA nie miał potencjału do regulacji wybranych genów z rodziny TRIM.

**Wnioski:** Skonstruowanie odtwarzalnego modelu infekcyjnego w warunkach *in vitro* jest kluczowe w badaniach, w których brana jest pod uwagę analiza poszczególnych etapów wirusowego cyklu replikacyjnego. Skuteczna analiza dużych zbiorów danych wymaga integracji zestawu aktualnych baz biologicznych oraz zastosowania dopracowanego toku analitycznego, w celu uzyskania rzetelnych i reprezentatywnych wyników. Traktowanie komórek NHDF LPS zmniejszyło stopień integracji prowirusa PERV-A i zwiększyło ekspresję mRNA PERV-A. Samo zakażenie PERV nie modulowało ekspresji HuPAR-1, HuPAR-2 i TFAP-2C, a oddziaływało na obniżenie ekspresji TRIM14. Obserwowane zjawisko było unikatowe wyłącznie dla grupy komórek poddanych monoinfekcji wirusowej. Badane cząsteczki miRNA nie miały istotnego potencjału do regulowania ekspresji wybranych czynników restrykcyjnych z grupy TRIM.