

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Eva BANDELJ

**POMEN IZRAŽANJA NEKATERIH mikroRNA V  
JETRIH GLEDE NA GENOTIP PRI BOLNIKI  
OKUŽENIH Z VIRUSOM HEPATITISA C**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Eva BANDELJ

**POMEN IZRAŽANJA NEKATERIH mikroRNA V JETRIH GLEDE  
NA GENOTIP PRI BOLNIKI OKUŽENIH Z VIRUSOM  
HEPATITISA C**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF SOME SPECIFIC microRNAs  
IN THE LIVER REGARDING THE GENOTYPE IN THE PATIENTS  
INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Reakcijo verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času smo izvajali na aparatu ABI 7900 na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila, po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu, imenovana prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorja je bil imenovan prof. dr. Damjan Glavač in za recenzentko prof. dr. Tatjana Avšič Županc.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok  
Somentor: prof. dr. Damjan Glavač  
Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: Doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Prof. dr. Damjan GLAVAČ  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

Članica: Prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za  
mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva Bandelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7.083 + 575:616.36-002(043)=163.6
KG	virusi/virus hepatitisa C/genotipi HCV/bolezni jeter/hepatitis C/biopsijski vzorci jeter/molekularna genetika/mikro RNA/izražanje miRNA/protivirusno zdravljenje/predpostavljeni ciljni geni
AV	BANDELJ, Eva
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica) / GLAVAC, Damjan (somentor) / AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	POMEN IZRAŽANJA NEKATERIH mikroRNA V JETRIH GLEDE NA GENOTIP PRI BOLNIKI OKUŽENIH Z VIRUSOM HEPATITISA C
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 57 str., 9 pregl., 17 sl., 1 pril., 83 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Hepatitis C je vnetje jeter, ki ga povzroča virus HCV. Dolgotrajno vnetje jeter lahko privede do kroničnega hepatitisa, ciroze ali raka na jetrih. Cepiva proti HCV še ne poznamo. Mikro RNA (miRNA) so kratke nekodirajoče RNA, ki so vključene v post-transkripcijsko utišanje genov. Poznavanje njihove vloge pri okužbah s HCV lahko pripomore k razvoju novih ali izboljšavo obstoječih metod zdravljenja. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali se izbrane mikro RNA ( <i>miR-122a</i> , <i>miR-126</i> , <i>miR-136</i> in <i>miR-181a</i> ) izražajo v jetrih bolnikov s HCV in ali so kakšne razlike v izražanju glede na genotip HCV. V raziskavo smo vključili 65 biopsijskih vzorcev jeter bolnikov okuženih z različnimi genotipi HCV. Iz parafinskih vzorcev smo izolirali RNA in analizirali izražanje miRNA s qPCR. S pristopi bioinformatike smo predpostavljali ciljne gene za izbrane miRNA. Dokazali smo, da se vse izbrane mikro RNA izražajo v jetrih bolnikov okuženih s HCV, in, da je izražanje izbranih miRNA glede na genotip HCV različno. V primerjavi z genotipom 1 HCV smo opazili: da se izražanje <i>miR-122a</i> zvišuje pri genotipih 1a, 1b in 3 (~1,27, 1,44 in 1,95-krat), da je izražanje <i>miR-126</i> zvišano pri genotipu 1b (~1,7-krat) in statistično značilno zvišano pri genotipih 1a in 3 (~1,79 in 5,15-krat); <i>miR-136</i> je pokazala zvišano izražanje pri genotipu 1b in 3 (~2,19 in 1,93-krat), medtem ko pri genotipu 1a ni bilo spremembe v izražanju; pri <i>miR-181a</i> je bilo izražanje znižano pri genotipu 1a (~0,88-krat) in zvišano pri genotipu 3 (~4,9-krat), pri genotipu 1b pa ni bilo sprememb v izražanju. Dokazali smo zvišano izražanje vseh 4 mikro RNA pri uživalcih drog glede na druge etiologije in pri ženskah v primerjavi z moškimi. Pri primerjavi glede na spol in genotip smo dobili statistično značilno zvišano izražanje <i>miR-122a</i> pri ženskah pri genotipih 1 (~2,25-krat) in 1b (~2,98-krat) HCV glede na moške. Tako raznolike rezultate je seveda potrebno upoštevati pri programiranju novih načinov zdravljenja okužb s HCV.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 578.7.083 + 575:616.36-002(043)=163.6  
 CX viruses/hepatitis C virus/genotypes of HCV/liver diseases/hepatitis C/FFPE samples of liver/molecular genetics/microRNAs/expression of miRNAs/antiviral therapy/candidate target genes  
 AU BANDELJ, Eva  
 AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor) / GLAVAC, Damjan (co-advisor) / AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2010  
 TI SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF SOME SPECIFIC microRNAs IN THE LIVER REGARDING THE GENOTYPE IN THE PATIENTS INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS  
 DT Graduation thesis (University studies)  
 NO XI, 57 p., 9 tab., 17 fig., 1 ann., 83 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Hepatitis C is a liver inflammation that is caused by HCV. The persistent inflammation of the liver could lead to chronic hepatitis, cirrhosis or liver cancer. For now the vaccine against HCV doesn't exist. MicroRNAs are small non-coding RNA that are involved in post-transcriptional gene silencing. The knowledge of their role in the HCV infection could help in development of new or improvement of existing treatment methods against HCV. The purpose of the graduation thesis was to define if the selected miRNAs (*miR-122a*, *miR-126*, *miR-136* and *miR-181a*) are expressed in HCV patients liver and if there are any differences in the expression of this miRNA regarding the HCV genotype. We included 65 patients infected with HCV (FFPE samples of liver). Molecular approaches, including isolation of RNA from FFPE samples and analysis of miRNA expression with qPCR, were used. Bioinformatics approaches were used for prediction of target genes of the selected miRNA. We proved that the selected miRNA are expressed in patients infected with HCV genotypes and that the expression is different regarding the genotype of HCV. Compared to the genotype 1 HCV we observed *miR-122a* up-regulation at genotypes 1a, 1b and 3 (~1,27, 1,44 and 1,95-fold), that *miR-126* up-regulation at genotype 1b (~1,7-fold) and statistically significant up-regulation at genotypes 1a and 3 (~1,79 and 5,15-fold); *miR-136* was up-regulated at genotypes 1b and 3 (~2,19 and 1,93-fold), while at genotype 1a there was no change in the expression. *miR-181a* was down-regulated at genotype 1a (~0,88-fold) and up-regulated at genotype 3 (~4,9-fold), at genotype 1b there was no change in the expression. We proved the up-regulation of the miRNAs in drug users compared to the other aetiology and in women compared to men. We proved statistically significant up-regulation of *miR-122a* in women at genotype 1 (~2,25-fold) and 1b (~2,98-fold) HCV compared to men. All of this different results have to be considered when programming new treatment methods against HCV infection.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 VIRUS HEPATITISA C (HCV) .....	2
<b>2.1.1 Razvrstitev virusnih hepatitisov.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Morfologija in biologija .....</b>	<b>2</b>
2.1.2.1 Organizacija genoma .....	3
2.1.2.1.1 Strukturni proteini .....	4
2.1.2.1.2 Nestrukturni proteini.....	4
2.1.2.2 Genotipi HCV.....	5
2.1.2.3 Življenjski krog HCV .....	6
2.1.2.3.1 Vezava, vstop in fuzija HCV.....	6
2.1.2.3.2 Translacija RNA HCV .....	6
2.1.2.3.3 Post-translacijski procesi .....	7
2.1.2.3.4 Replikacija HCV.....	7
2.1.2.3.5 Združevanje in sprostitvev virusov .....	8
<b>2.1.3 Prenos virusa.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4 Epidemiološke značilnosti.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.5 Klinična slika .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.6 Diagnoza .....</b>	<b>12</b>
2.1.6.1 Serološka diagnoza .....	12
2.1.6.2 Določanje virusne RNA .....	12
2.1.6.3 Določanje genotipa HCV .....	13
<b>2.1.7 Zdravljenje.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.8 Preprečevanje .....</b>	<b>14</b>
2.2 Mikro RNA.....	15
<b>2.2.1 Procesiranje miRNA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2 Aktivacija miRNP in kataliza.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.3 Funkcije miRNA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.4 Mikro RNA v terapevtske namene .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.5 miR-122a.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.6 miR-126.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.7 miR-136.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.8 miR-181a.....</b>	<b>19</b>

<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>20</b>
3.1 IZBIRA BOLNIKOV OKUŽENIH Z VIRUSOM HEPATITISA C.....	20
3.2 IZOLACIJA RNA .....	20
<b>3.2.1 Izolacija RNA iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin .....</b>	<b>20</b>
3.3 DOLOČANJE KOLIČINE IN KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA .....	21
<b>3.3.1 Merjenje koncentracije izolirane RNA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2 Določanje kakovosti izolirane RNA .....</b>	<b>21</b>
3.4 ANALIZA IZRAŽANJA miRNA.....	21
<b>3.4.1 Razgradnja DNA v vzorcih RNA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.2 Kontrola brez obratnega prepisovanja .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.3 Obratno prepisovanje .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.4 Analiza izražanja molekul miRNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.5 Detekcija pomnožene DNA.....</b>	<b>24</b>
3.5 ANALIZA PODATKOV DOBLJENIH S PCR V REALNEM ČASU.....	24
<b>3.5.1 Primerjalna Ct metoda .....</b>	<b>25</b>
3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	26
3.7 ISKANJE POTENCIALNIH CILJNIH GENOV ZA IZBRANE mikro RNA.....	26
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>27</b>
4.1 IZMERJENE KONCENTRACIJE IZOLIRANE RNA .....	27
4.2 DOLOČANJE KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA PRED IN PO OBDELAVI Z DNAZO .....	28
4.3 PCR V REALNEM ČASU IN PRIMERJALNA CT METODA.....	29
<b>4.3.1 Razlika v izražanju mikro RNA glede na genotip HCV .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.2 Razlika v izražanju mikro RNA glede na etiologijo.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.3 Razlika v izražanju mikro RNA glede na genotip HCV in glede na etiologijo .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.4 Razlike v izražanju mikro RNA glede na spol.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.5 Razlike v izražanju mikro RNA pri različnih genotipih HCV glede na spol .....</b>	<b>36</b>
4.4 REZULTATI PREDPOSTAVLJANJA POTENCIALNIH CILJNIH GENOV ZA PREUČEVANE miRNA .....	38
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>43</b>
5.1 RAZPRAVA.....	43
<b>5.1.1 Izolacija RNA.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.2 Določanje kakovosti izolirane RNA s pomočjo aparata Agilent 2100 .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.3 Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih.....</b>	<b>45</b>
5.2 SKLEPI.....	46
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>49</b>

**ZAHVALA**  
**PRILOGE**



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Virusi hepatitisa s pripadajočimi družinami in rodovi (Marolt-Gomišček, 2002; Drinovec, 2002).....	2
<b>Preglednica 2:</b> Zaporedja mikro RNA in interne kontrole iz podatkovne baze miRBase (Griffiths-Jones in sod., 2008).....	24
<b>Preglednica 3:</b> Izmerjene koncentracije izolirane RNA iz biopsijskih vzorcev jeter bolnikov okuženih s HCV .....	27
<b>Preglednica 4:</b> Določanje izražanja mikro RNA glede na genotip HCV z metodo qPCR. 29	
<b>Preglednica 5:</b> Določanje izražanja mikro RNA glede na etiologijo z metodo qPCR.....	31
<b>Preglednica 6:</b> Določanje izražanja mikro RNA glede na etiologijo in genotip HCV z metodo qPCR.....	32
<b>Preglednica 7:</b> Določanje izražanja mikro RNA glede na spol z metodo qPCR.....	35
<b>Preglednica 8:</b> Določanje izražanja mikro RNA glede na spol z metodo qPCR.....	36
<b>Preglednica 9:</b> Predpostavljeni ciljni geni za izbrane mikro RNA v jetrih v povezavi s HCV .....	39

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Struktura HCV genoma (Shackel in sod., 2009: 1376) .....	5
<b>Slika 2:</b> Življenjski krog HCV (Suzuki in sod., 2007: 1202).....	9
<b>Slika 3:</b> Prijavljeni primeri akutnega in kroničnega hepatitisa C v Sloveniji od leta 1999-2008 (Epidemiološko spremljanje..., 2009: 74) .....	11
<b>Slika 4:</b> Shematski prikaz miRNA biogeneze (Boštjančič in Glavač, 2008: 96).....	16
<b>Slika 5:</b> Kakovost malih RNA, izoliranih iz vzorcev jetrnih biopsij, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin .....	28
<b>Slika 6:</b> Kakovost malih RNA, izoliranih iz vzorcev jetrnih biopsij, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin pred in po obdelavi z DNazo .....	29
<b>Slika 7:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na genotip pri bolnikih okuženih z virusom hepatitisa C .....	30
<b>Slika 8:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi virusa hepatitisa C .....	31
<b>Slika 9:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede etiologijo pri genotipu 1 bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C.....	32
<b>Slika 10:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 1a bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C .....	33
<b>Slika 11:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 1b bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C .....	34
<b>Slika 12:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 3 bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C .....	34
<b>Slika 13:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na spol pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi HCV .....	35
<b>Slika 14:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1 bolnikov okuženih s HCV .....	36
<b>Slika 15:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1a bolnikov okuženih s HCV .....	37
<b>Slika 16:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1b bolnikov okuženih s HCV .....	37
<b>Slika 17:</b> Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na spol pri genotipu 3 bolnikov okuženih s HCV .....	38

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\Delta\Delta Ct$	deltadelta Ct (razlika razlike praznih ciklov med preiskovanim in referenčnim vzorcem)
$\Delta Ct$	delta Ct (razlika v praznem ciklu med preiskovano molekulo in endogeno kontrolo)
5', 3'	5-konec, 3-konec molekule
Ago	protein argonavt (angl. <u>argonaute</u> )
angl.	angleško
CDC	Centri za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. <u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and <u>P</u> revention)
cDNA	komplementarna DNA (angl. <u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u> )
Ct	prazni cikel (angl. <u>t</u> reshold <u>c</u> ycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dT	<u>d</u> eoksi <u>t</u> imin
EDTA	<u>e</u> tiledi <u>a</u> mi <u>n</u> et <u>e</u> t <u>r</u> acetat
ELISA	encimskoimunski test (angl. <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay)
FFPE	v formalinu fiksirano in v parafin vklopljeno tkivo (angl. <u>f</u> ormalin- <u>f</u> ixed <u>p</u> araffin- <u>e</u> mbbeded)
GTP	gvanozin trifosfat
HAV	virus hepatitisa A
HBV	virus hepatitisa B
HCV	virus hepatitisa C
HDV	virus hepatitisa D
HEV	virus hepatitisa E
HGV	virus hepatitisa G
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. <u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus)
HVR1	hipervariabilna regija 1 (angl. <u>h</u> ypervariable <u>r</u> egion 1)
IRES	notranje ribosomsko vezavno mesto (angl. <u>i</u> nternal <u>r</u> ibosome <u>e</u> ntry <u>s</u> ite)
kb	kilo baz (1000 baznih parov)
kDa	kilo Da (1000 Da)
min	minut
miRNA	<u>m</u> ikro <u>R</u> N <u>A</u>
mRNA	informacijska RNA (angl. <u>m</u> essenger <u>R</u> N <u>A</u> )
NANBH	ne-A, ne-B hepatitis (angl. <u>n</u> on- <u>A</u> , <u>n</u> on- <u>B</u> hepatitis)
ORF	odprt bralni okvir (angl. <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov $H_3O^+$
Pol II/III	<u>p</u> olimeraza RNA <u>II</u> in <u>III</u>
pre-miRNA	<u>p</u> rekurzorska molekula <u>m</u> ikro RNA
pri-miRNA	<u>p</u> rimarni prepis <u>m</u> ikro <u>R</u> N <u>A</u>
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <u>q</u> uantitative real-time PCR)

RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA (angl. <u>R</u> NA- <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>R</u> NA <u>p</u> olymerase)
RISC	RNA-inducirani utiševalni kompleks (angl. <u>R</u> NA- <u>i</u> nduced <u>s</u> ilencing <u>c</u> omplex)
RNA	ribonukleinska kislina
RNU6B	U6 RNA, mala jedrna <u>R</u> NA <u>U</u> 6 <u>B</u>
rRNA	ribosomska RNA (angl. <u>r</u> ibosomal <u>R</u> NA)
s	sekund
SPSS	statistični programski paket (angl. <u>s</u> tatistical <u>p</u> rogram for <u>s</u> ocial <u>s</u> cience)
tRNA	prenašalna RNA (angl. <u>t</u> ransfer <u>R</u> NA)
UTR	neprevedljiva regija (angl. <u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion)
vt./min.	vtlji na minuto
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)

## 1 UVOD

Virusni hepatitis C (HCV) povzroča izrazito kronično potekajočo okužbo jeter, ki lahko desetletja ali več poteka povsem prikrito, in po mnogih letih privede do ciroze ali celo raka na jetrih. Je tudi eden glavnih vzrokov za presaditev jeter pri odraslih (Marolt-Gomišček, 2002; UKC, 2009).

Letos mineva 21 let od odkritja virusa hepatitisa C. V Sloveniji je še vedno preveč neodkritih bolnikov, ki prepozno pridejo do zdravstvene oskrbe. Kljub temu, da imajo na voljo vsa sredstva za pravočasno odkrivanje bolezni in zdravljenje, ta še vedno ostaja pereč javno zdravstveni problem v Sloveniji kot po svetu (UKC, 2009).

Mikro RNA so kratke, 20-22 nukleotidov dolge, nekodirajoče RNA, ki so vključene v post-transkripcijsko utišanje genov. Njihova vezava na 3' UTR ciljne informacijske RNA (mRNA) vpliva na translacijo ali stabilnost transkriptov. Mikro RNA regulirajo različne razvojne in fiziološke procese, med drugimi tudi diferenciacijo matičnih celic in imunski odziv. Zanimive so predvsem kot potencialne terapevtske tarče in diagnostični markerji; poznavanje njihove vloge pri okužbah s HCV, bi lahko pripomoglo k razvoju novih ali izboljšavo obstoječih metod zdravljenja pri okužbah s HCV (Boštjančič in Glavač, 2008).

### 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kako oziroma če sploh se izražajo štiri izbrane mikro RNA pri okužbah z različnimi genotipi HCV in ali so kakšne razlike v izražanju teh mikro RNA glede na genotip. Izražanje *miR-122a* v jetrih so že dokazali, medtem ko izražanja ostalih treh mikro RNA v jetrih še niso uspeli pokazati. Večina raziskav je bila opravljenih na celičnih linijah in živalskih modelih, le redke raziskave pa na humanih vzorcih.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo različno izražanje nekaterih mikro RNA glede na genotip, in sicer:

- Pričakujemo spremenjeno izražanje *miR-122a* v jetrih glede na okužbe z različnimi genotipi HCV; ta mikro RNA velja za jetrno specifično in predstavlja kar 72% vseh mikro RNA v jetrih.
- *miR-126* in *miR-181a* sta vpleteni v imunski odgovor, zato pričakujemo spremenjeno izražanje v jetrih glede na okužbe z različnimi genotipi HCV; *miR-126* je poleg tega druga najpogosteje zastopana mikro RNA v jetrih.
- Pričakujemo tudi spremenjeno in sploh izražanje *miR-136* v jetrih glede na okužbe z različnimi genotipi HCV, saj njenega izražanja v jetrih še niso uspeli pokazati. Z raziskavo na celičnih linijah so uspeli pokazati, da reagira s HCV.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VIRUS HEPATITISA C (HCV)

Beseda hepatitis pomeni vnetje jeter. Vzrokov za nastanek hepatitisa je več: okužbe, pretirano uživanje alkohola, nekatera zdravila, kemične snovi in strupi, motnje v presnovi (npr. hemokromatoza) ali celo spremenjen lasten imunski odgovor (avtoimuni hepatitis). Najpogostejši vzrok so okužbe z virusi, med njimi največkrat tako imenovani hepatotropni virusi (virusi hepatitisa A, B, C, D, E in G). Lahko pa hepatitis povzročajo tudi različni drugi virusi, ki poleg drugih, za določeno obolenje značilnih bolezenskih znakov, ob tem povzročajo tudi vnetje jeter (npr. Virus Epstein-Barr, virus noric, virus herpes simpleks, idr.). Hepatitis povzročen z virusoma hepatitisa A in E je danes večinoma bolezen potnikov, ki potujejo v endemična (tropska in subtropska) področja; hepatitis povzročen z virusoma hepatitisa B in C pa lahko povzročata resne, kronično potekajoče bolezni (UKC, 2009; Brooks in sod., 1998).

#### 2.1.1 Razvrstitev virusnih hepatitisov

Vsak virus hepatitisa sodi v svojo družino in/ali rod. Omenjamo jih skupaj le zato, ker vsi primarno povzročajo vnetje jeter. Večina so to virusi z genomom RNA, edini virus z genomom DNA je virus hepatitisa B (HBV). Virus hepatitisa D (HDV) sodi v skupino satelitskih virusov. To so nepopolni virusi, ki se razmnožujejo le v prisotnosti ustreznega virusa pomočnika. Virus hepatitisa D se obda z ovojnico pomočniškega virusa hepatitisa B in tako dokonča svoje razmnoževanje (Marolt-Gomišček, 2002; Drinovec, 2002).

Preglednica 1: Virusi hepatitisa s pripadajočimi družinami in rodovi (Marolt-Gomišček, 2002; Drinovec, 2002)

Virus	Družina	Rod
Virus hepatitisa A (HAV)	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>
Virus hepatitisa B (HBV)	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>
Virus hepatitisa C (HCV)	<i>Flaviviridae</i> (flavivirusi)	<i>Hepacivirus</i> (hepacivirusi)
Virus hepatitisa D (HDV)	Ni podatka.	<i>Deltavirus</i>
Virus hepatitisa E (HEV)	<i>HEV-like viruses</i> *	Ni podatka.
Virus hepatitisa G (HGV)	<i>Flaviviridae</i>	Ni podatka.

\*(Shackel in sod., 2009)

V družino *Flaviviridae* prištevamo tudi rod *Flavivirus* v katerega sodijo virus rumene mrzlice, virus klopnega meningoencefalitisa, virus denge idr. (Drinovec, 2002).

#### 2.1.2 Morfologija in biologija

Choo in sodelavci so leta 1989 z metodami rekombinantne tehnologije DNA prvič odkrili in osamili genom virusa hepatitisa C (HCV). Do takrat so se znanstveniki na virus nanašali z imenom ne-A, ne-B hepatitis (angl. non-A, non-B hepatitis; NANBH). Šele 6 let kasneje so znanstveniki vzgojili virus v kulturi humanih limfoblastnih celic, ga zaznali z elektronskim mikroskopom in dokazali njegove posebnosti.

HCV so majhni sferični virusi, premera 40–65 nm (Brown in Gaglio, 2003; Ishida in sod., 2001). Genom je linearna molekula pozitivno polarne enoverižne RNA, ki kodira virusni poliprotein (Drinovec, 2002). Genom obdaja ikozaedrična kapsida ovita v lipidni dvosloj, t.i. ovojnico (Pawlotsky, 2006).

HCV preživi izven telesa pri sobni temperaturi v okolju najmanj 16 ur, ne pa več kot 4 dni (CDC, 2009). Vir okužbe za HCV je okužen človek, ki pa je tudi rezervoar virusa (Madigan in sod., 2003).

#### 2.1.2.1 Organizacija genoma

Virusni genom HCV je dolg 9,6 kb in ni segmentiran. Sestavljen je iz treh različnih delov: kratke 5' neprevedljive regije (angl. 5' untranslated region, 5' UTR), dolgega odprtega bralnega okvirja (angl. open reading frame, ORF) in kratke 3' neprevedljive regije (angl. 3' untranslated region, 3' UTR) (Moradpour in sod., 2002).

Regija 5' UTR, dolga 341-344 nukleotidov, je zelo ohranjena med različnimi izolati HCV in ima pomembno vlogo pri replikaciji virusne RNA. Prvih 125 nukleotidov regije 5' UTR je najmanjša dolžina zaporedja, ki je potrebna za replikacijo RNA HCV. Regija 5' UTR obsega dva različna elementa RNA: kratki 5' element RNA, od 1. do 43. nukleotida, ki lahko tvori strukturo lasnice, pri čemer sta udeležena nukleotida 5 in 20, ter predstavlja mesto za začetek transkripcije pozitivne verige virusne RNA; in daljše notranje ribosomsko vezavno mesto (angl. internal ribosome entry site, IRES), od 44. do 341. nukleotida, ki je odgovorno za vezavo ribosoma in za začetek translacije poliproteina. Zaporedje IRES vsebuje začetni kodon za translacijo AUG (De Francesco, 1999; Moradpour in sod. 2002; Rosenberg, 2001; Pawlotsky, 2006; Luo in sod., 2003).

Translacija ORF HCV vodi v sintezo edinstvenega poliproteina, dolgega od 3010 do 3033 amino kislin. Dolžina je odvisna od seva. Poliprotein je še kotranslacijsko in posttranslacijsko proteolitično modificiran, z gostiteljskimi in virusnimi proteazami, tako da nastanejo zreli strukturni ter nestrukturni proteini (De Francesco, 1999; Moradpour in sod., 2002).

Strukturni proteini so: nukleokapsidni protein C (angl. core), protein ARFP/F, protein p7 in dva ovojnična glikoproteina E1 (angl. envelope glycoprotein) ter E2 (angl. envelope glycoprotein). Nestrukturni proteini (angl. nonstructural proteins) pa so: cistein proteaza NS2, multifunkcionalni protein NS3, kofaktor proteaze NS4A, membranski protein NS4B, fosfoprotein NS5A in polimeraza RNA NS5B.

Dokazali so tudi obstoj alternativnega bralnega okvirja, ki se prekriva z zaporedjem za protein C. Rezultat je zapis za 17 kDa velik protein, ki so ga poimenovali F (angl. frameshift) ali ARFP (angl. alternate reading frame protein). ARFP naj bi nastal kot rezultat +1 ribosomskega premika bralnega okvirja. Funkcija ARFP do sedaj še ni znana (Wolf in sod., 2008).

Regijo 3' UTR razdelimo na tri dele, in sicer na: kratko spremenljivo zaporedje, dolgo približno 40 baz; notranji spremenljivo dolg poli-U/polipirimidinski trakt; in zelo ohranjen stabilen element RNA, dolg 98 nukleotidov (struktura lasnice), ki je nujen za podvojevanje virusa. Regija 3' UTR naj bi bila odgovorna za začetek replikacije virusnega genoma (Moradpour, 2002; Penin in sod., 2004).

#### 2.1.2.1.1 Strukturni proteini

Prvi strukturni protein kodiran na ORF HCV je bazični, dimerni,  $\alpha$ -helični protein C, ki se veže na RNA in omogoča tvorbo virusne nukleokapside (Moradpour, 2002; Szabo in Dolganiuc, 2008). Protein C lahko vpliva na celično signalizacijo, apoptozo, karcinogenezo in metabolizem lipidov (Szabo in Dolganiuc, 2008). Poleg tega lahko z vezavo na zunanjo membrano mitohondrija inducira tudi oksidativni stres (Osna in sod., 2008).

Proteina ovojnice E1 in E2 sta tip I integralna transmembranska glikoproteina z N-terminalno ektodomeno in kratko C-terminalno transmembransko domeno. Skupaj se povežeta v nekovalentne heterodimere. Transmembranska domena glikoproteinov igra pomembno vlogo pri tvorbi E1/E2 heterodimerov, membranskem sidranju in retenciji endoplazemskega retikuluma (Nakajima in sod., 2005; Pérez-Berná in sod., 2008).

Pri glikoproteinu ovojnice E2 so identificirali tudi hipervariabilno regijo 1 (angl. hypervariable region 1, HVR1), ki vsebuje 27 amino kislin in je glavni (a ne edini) nevtralizirajoči epitop HCV (Pawlotsky in sod., 2007).

Oba ovojnična proteina sta pomembna pri vstopu virusa v gostiteljsko celico, vezavi na receptorje, fuziji s celično membrano gostitelja in pri združevanju virusnih delcev (Pérez-Berná in sod., 2008).

P7 je majhen hidrofobni protein dolg 63 amino kislin. Je politopični membranski protein, ki so ga našli v endoplazemskem retikulumu in plazmalem gostiteljevih celic. Proteini p7 tvorijo ionske kanalčke v planarnih lipidnih dvoslojih in imajo vlogo pri sprostitvi in združevanju virionov (Premkumar in sod., 2004; Haqshenas in sod., 2007; Chew, 2009).

#### 2.1.2.1.2 Nestrukturni proteini

NS2 je membransko vezana cistein proteaza. N-konec NS2 ima enega ali več transmembranskih domen (Brass in sod., 2008).

NS3 je multifunkcionalni protein s serin proteazo na prvi tretjini N-konca (amino kisline od 1-180) in helikazo/NTPazo RNA na preostalem delu proteina, na C-koncu (amino kisline 181-631) (Brass in sod., 2008).

C-terminalna domena NS2 skupaj z N-terminalno tretjino NS3 tvori NS2-3 avtoproteazo, encim, ki katalizira cepitev med obema proteinoma. Čeprav NS2 ni nujen za replikacijo RNA, je cepitev med NS2 in NS3 nujna. NS2 ima lahko vlogo pri produkciji infektivnih virusov (Jones in sod., 2007).



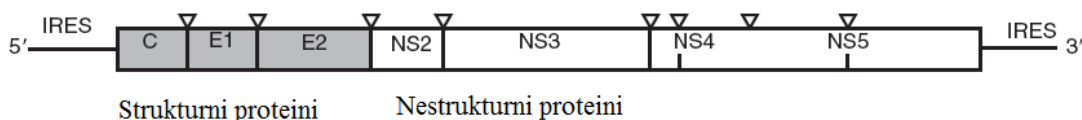
NS4A je nujen kofaktor za proteazno funkcijo NS3 proteina (Sillanpää in sod., 2009).

Encimske aktivnosti proteinov NS2, NS3 in NS4A so ključni elementi replikacijskega kompleksa HCV (Lai in sod., 2008). Replikacijski kompleks HCV je vezan na membrano, sestavljen pa je iz: vseh nestrukturnih proteinov, RNA HCV, ki se podvojuje, in gostiteljskih proteinov (Lai in sod., 2008).

NS4B je integralni membranski protein, ki se kotranslacijsko poveže z membrano endoplazemskega retikuluma (Penin in sod., 2004). Čeprav funkcija proteina ni povsem znana, je znano da sodeluje pri sestavi membranske mreže, ki naj bi služila kot ogrodje za nastanek replikacijskega kompleksa HCV (Sillanpää in sod., 2009; Penin in sod., 2004).

NS5A je membransko vezan fosfoprotein in nujna komponenta replikacijskega kompleksa HCV, saj sodeluje pri sestavi virusnih delcev in je vključen v odpornost virusov proti interferonom (Penin in sod., 2004; Sillanpää in sod., 2009; Lai in sod., 2008).

Protein NS5B je od RNA odvisna polimeraza RNA (angl. RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) in je ključni katalitični encim za replikazo HCV (Lai in sod., 2008).



Slika 1: Struktura HCV genoma (Shackel in sod., 2009: 1376).

### 2.1.2.2 Genotipi HCV

Na osnovi genetske raznolikosti med izolati HCV ločimo 6 genotipov, označenih z 1-6, in več kot 80 različnih podtipov, ki jih zasledimo v določenih zemljepisnih območjih. Genotip 1 prevladuje v Združenih državah Amerike (ZDA), medtem ko sta v Evropi in na Japonskem bolj razširjena genotipa 2 in 3. V Egiptu in na Srednjem vzhodu prevladuje genotip 4, genotip 5 je omejen na območje južne Afrike, genotip 6 pa je razširjen na območju Hong Konga in v drugih državah jugovzhodne Azije. Genotipe 4, 5 in 6 redko zasledimo izven afriških in azijskih območij (Czepiel in sod., 2008).

Izolate, dosedaj poimenovane kot genotipi 7-11, prištevamo k podtipom genotipov 3 (genotip 10) in 6 (genotipi 7, 8, 9 in 11) (Qiu in sod., 2009).

Razporeditev HCV genotipov v določenih geografskih področjih odraža način prenosa okužbe. V Evropi so podtipi 1a, 3a in 4 povezani z intravenskimi uživalci drog, medtem ko sta genotipa 1b in 2 povezana s transfuzijo krvi in nevarnimi medicinskimi postopki. Trenutno sta v Evropi najbolj pogosta genotipa 1 in 3, z nekaterimi izjemami, kot je južna Italija kjer je genotip 2 razširjen pri 25-30 % odraslih ljudi. Genotip 4 se je do nedavnega razmeroma redko zasledil v državah Evrope; trenutno pa v številnih državah opisujejo povečanje števila okužb s tem genotipom (Seme in sod., 2009).

V slovenskih izolatih virusa hepatitisa C v 56 % prevladuje genotip 1, sledijo mu genotipi 3 (v 37,8 %), 2 (v 5 %) in 4 (v 1,2 %) (Seme in sod., 2009).

Določitev genotipa HCV je pomemben klinični parameter, na katerem temelji odločitev glede načina zdravljenja, ki je lahko kombinirano s pegiliranim interferonom-alfa in ribavirinom, pri čemer je pomemben odmerek ribavirina, izvaja pa se tudi monitoring virusa hepatitisa C (Seme in sod., 2009).

### 2.1.2.3 Življenjski krog HCV

#### 2.1.2.3.1 Vezava, vstop in fuzija HCV

Prvi korak v življenjskem krogu HCV je vezava in vstop virusa v celico gostitelja. Da lahko virus vstopi v celico se mora s pomočjo strukturnih proteinov najprej vezati na receptorske molekule na površini ciljnih celic gostitelja (Suzuki in sod., 2007; Pawlotsky in sod., 2007).

Ovojnična glikoproteina HCV, E1 in E2, sta nujna za vstop virusa v gostiteljsko celico in za fuzijo s celico. Čeprav je zaporedje HVR1 zelo variabilno, je tudi zelo ohranjeno med vsemi genotipi HCV, kar kaže na njegovo pomembno vlogo v življenjskem krogu virusa. E2 je ključen pri začetnem koraku okužbe. Vezava virusa na gostiteljsko celico naj bi se začela z interakcijo med E2 in drugimi komponentami receptorskega kompleksa. Interakcija med bazično pozitivno nabitimi regijami HVR1 in negativno nabitimi molekulami na površini celice bi lahko igrala pomembno vlogo pri prepoznavanju, vezavi in kompartmentizaciji celic ali tkiva. E1 naj bi sodeloval pri znotrajcitoplazemski fuziji virusa z membrano gostiteljske celice (Pawlotsky in sod., 2007).

Receptorji HCV so različne molekule na celični površini, odgovorne za vezavo HCV. Te molekule so glikozaminoglikani, CD81, SR-BI, Claudin-1 in druge (Pawlotsky in sod., 2007).

Po vezavi virusa na celico se nukleokapsida HCV, kot rezultat fuzijskega procesa med virusno in celično membrano, sprosti v celično citoplazmo. Vstop HCV v celice je odvisen od pH in povezan z endocitozo odvisno od klatrina. Po vstopu v celico sledi fuzija znotraj kislega endosomskega mešička. Ovojnična proteina HCV uvrščamo v razred II fuzijskih proteinov, čeprav pri izločanju ne potrebujejo cepitve s celično proteazo. Transmembranska domena ovojničnih glikoproteinov naj bi igrala pomembno vlogo pri fuziji (Pawlotsky in sod., 2007).

#### 2.1.2.3.2 Translacija RNA HCV

Dekapsidacija virusne nukleokapside sprosti pozitivno-polarno genomsko RNA v celično citoplazmo, kjer skupaj z novo sintetizirano RNA služi kot mRNA za sintezo HCV poliproteina (Pawlotsky in sod., 2007).

Translacija genoma HCV je regulirana z zaporedjem IRES. To zaporedje posreduje od kape neodvisen začetek translacije znotraj poliproteina HCV, s pomočjo celičnih proteinov eIF2 in eIF3 ter virusnih proteinov (Pawlotsky in sod., 2007).

IRES lahko z direktno vezavo na podenoto ribosoma 40 S tvori stabilen preiniciacijski kompleks. Podenota 40 S se nato poveže z eIF3 in eIF2, GTP (gvanozin trifosfatom) in iniciacijsko prenašalno RNA (tRNA), nastane kompleks velik 48 S, v katerem se tRNA veže na mesto P podenote 40 S, in se tako veže na začetni kodon mRNA. Po hidrolizi GTP, sprosti eIF2 iniciacijsko tRNA in disociira iz kompleksa. Potreben je še en korak hidrolize GTP, kjer sodeluje iniciacijski faktor eIF5B, ki omogoča vezavo 60 S podenote, da nastane funkcionalna 80 S podenota; ta pa nato začne sintezo virusnega proteina (Pawlotsky in sod., 2007).

#### 2.1.2.3.3 Post-translacijski procesi

Vsaj dve gostiteljski celični peptidazi sta potrebni za procesiranje strukturnih proteinov HCV, vključno z gostiteljsko signalno peptidazo in signalno peptid peptidazo (Pawlotsky in sod., 2007).

Pri post-translacijskih procesih HCV sodelujeta tudi dve virusni peptidazi, in sicer NS2 in NS3/4A (Pawlotsky in sod., 2007).

Dolg prekursorski poliprotein, ki nastane s translacijo genoma HCV, se prenese v membrano endoplazemskega retikuluma, pri tem se ektodomena E1 prenese v lumen endoplazemskega retikuluma. Proces posreduje notranje signalno zaporedje, ki je med jedrnim zaporedjem in zaporedjem E1. Cepitev signalnega zaporedja z gostiteljevo signalno peptidazo sproži nastanek nezrele oblike proteina C (P23), ki ima verjetno vlogo pri združevanju virusov. Signalni peptid se naprej procesira z gostiteljevo signalno peptidazo, da nastane zrela oblika proteina C (P21) (Pawlotsky in sod., 2007).

Gostiteljeva signalna peptidaza omogoča tudi cepitev povezave E1-E2 v lumnu endoplazemskega retikuluma. Dodatna signalna peptidaza cepi E2 na C-koncu in med p7 in NS2, tako da nastane p7. Proteina E1 in E2 sta zrelostno procesirana z N-glikozilacijo, konformacijo in združevanjem v heterodimere E1E2. Avtoproteaza NS2-3 omogoča cepitev proteina NS3 od NS2. Tako se NS3 poveže s svojim kofaktorjem NS4A, poteče cepitev NS3-NS4A in vse poznejše povezave in sicer NS4A-NS4B, NS4B-NS5A in NS5A-NS5B (Pawlotsky in sod., 2007).

#### 2.1.2.3.4 Replikacija HCV

Virusne komponente, ki sodelujejo pri replikaciji so: NS5B ali od RNA odvisna polimeraza RNA (RdRp), NS5A, NS3 ali helikazna-NTPaza in NS4B. RNA strukturi HCV, ki sodelujeta pri replikaciji, pa sta 3' UTR in 5' UTR (Pawlotsky in sod., 2007).

Analogno ostalim pozitivno polarnim virusom z genomom RNA je tudi replikacija HCV semikonzervativna in asimetrična ter poteka v dveh korakih, v katerih sodeluje NS5B RdRp. V prvem koraku služi pozitivna veriga genoma RNA kot matrica za sintezo negativnopolarnega intermediata replikacije. V naslednjem koraku negativna veriga RNA služi kot matrica za sintezo več pozitivno polarnih verig, ki so pozneje uporabljene za translacijo v poliprotein, sintezo novih intermediatov replikacije ali pakiranje v nove virusne delce. Pozitivna veriga RNA se petkrat do desetkrat pogosteje prepisuje kot negativna veriga. Znanstveniki so dokazali, da je RdRp HCV v določenih pogojih sposobna iniciacije *de novo* sinteze RNA (Pawlotsky in sod., 2007).

#### 2.1.2.3.5 Združevanje in sprostitve virusov

Pri procesu združevanja in sprostitve virusov sodelujejo virusni proteini C, E1 in E2 (Pawlotsky in sod., 2007).

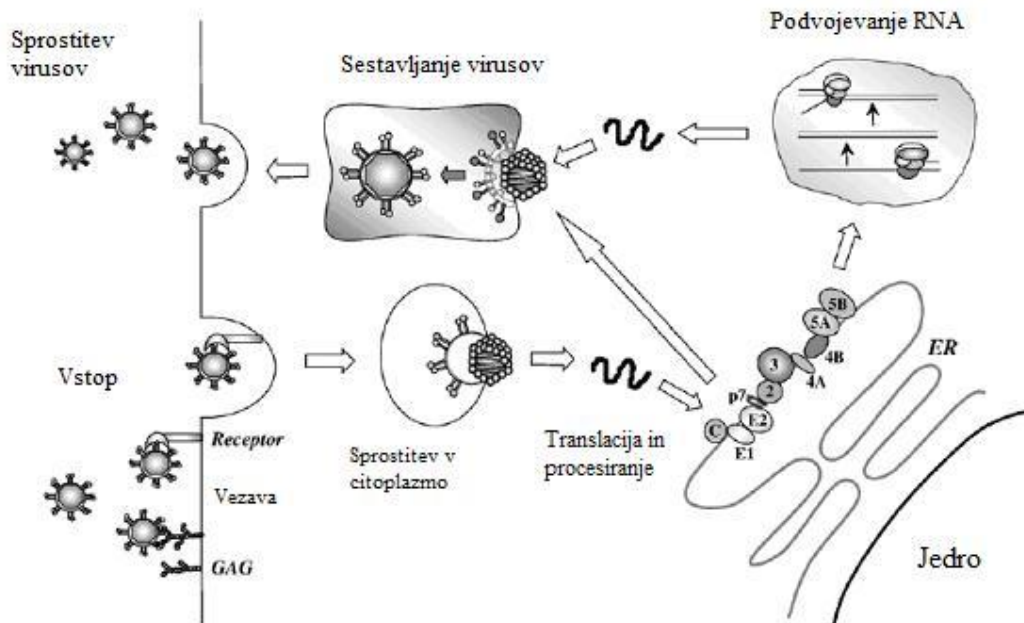
O tem procesu je malo znanega. Obstaja več oblik HCV, ki kroži v serumu okuženih gostiteljev, in sicer: prosti zreli virioni, virioni vezani na LDL (angl. low-density lipoproteins) in VLDL (angl. very-low-density lipoproteins), virioni vezani na imunoglobuline in pa nukleokapside brez ovojnice, ki kažejo različne fizikalno-kemijske in antigenske lastnosti (Suzuki in sod., 2007). Proteini C se lahko združijo in tvorijo nukleokapsidam podobne delce, sferične oblike, premera 60 nm, ampak brez prisotne nukleinske kisline (Pawlotsky in sod., 2007).

Nastanek virusnih delcev je verjetno povezan z interakcijo med proteinom C in genomsko RNA. Ta interakcija bi lahko igrala glavno vlogo pri prehodu iz procesa replikacije na pakiranje (Pawlotsky in sod., 2007).

Cepitev virusom podobnih delcev v lumnu endoplazemskega retikuluma naj bi vodilo do nastanka prevlečenih delcev. Glikoproteina E1 in E2 sta s transmembransko domeno vezana na membrano endoplazemskega retikuluma, kar kaže na to, da bi združevanje virusov lahko potekalo v endoplazemskem retikulumu (Pawlotsky in sod., 2007).

Strukturne proteine so našli tako v endoplazemskem retikulumu kot v Golgijevem aparatu, zato znanstveniki domnevajo, da sta oba kompartmenta lahko vključena v poznejše korake pri zorenju virusa (Pawlotsky in sod., 2007).

Novonastali virusi lahko zapustijo gostiteljsko celico s konstitutivno potjo izločanja (Pawlotsky in sod., 2007).



Slika 2: Življenjski krog HCV (Suzuki in sod., 2007: 1202).

### 2.1.3 Prenos virusa

Prvi in najpogostejši način prenosa virusa hepatitisa C je parenteralni prenos, torej prenos ob neposrednem stiku z okuženo krvjo in krvnimi pripravki (Matičič, 2008).

V preteklosti je bil parenteralni prenos predvsem povezan s transfuzijo okužene krvi, zato temu hepatitisu pravimo tudi posttransfuzijski hepatitis. Od prvega februarja leta 1993 se v Sloveniji vso darovano kri pregleda za prisotnost virusa hepatitisa C (Matičič, 2008).

Drugi dejavniki tveganja za ta način prenosa okužbe je izmenjava pribora za intravensko injiciranje drog. Odvisniki od drog so izrazito tvegana skupina za okužbe z virusom hepatitisa C. Pri tem gre lahko za prenos z okuženo iglo ali s kontaminiranim priborom. Njuhanje kokaina prav tako predstavlja dejavnik tveganja, predvsem če gre za menjavanje slamice, s katero njuhalci to izvajajo (Matičič, 2008).

V to skupino sodijo še drugi načini prenosa, predvsem neprofesionalna tetovaža ter neprofesionalno prebadanje kože in sluznic (Matičič, 2008).

Nevarni so tudi naključni vbodi z odvrženo iglo. Zato so zdravstveni delavci lahko pogosto izpostavljeni takemu načinu prenosa, predvsem zaradi naključnih vbodov pri različnih medicinskih postopkih. V preteklosti so bili tveganju za okužbo izpostavljeni tudi določeni bolniki, na primer v hemodializnih enotah, ali hemofiliki, ki so redno prejeli krvne pripravke. Danes je na vseh teh nivojih zdravstvenega sistema zelo dobro poskrbljeno za preprečevanje okužbe z virusom hepatitisa C (Matičič, 2008).

Drugi način prenosa je vertikalni prenos (prenos z okužene matere na novorojenca). Ta oblika prenosa ni zelo pogosta, ocenjujejo ga na 5 %. Če pa je mati hkrati okužena z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus, HIV), se tveganje zelo poveča (Matičič, 2008).

Tretji način prenosa je prenos pri tveganih spolnih odnosih, torej pri nezaščitenih spolnih odnosih z okuženim partnerjem. Če gre za osebo, ki pogosto menjava spolne partnerje, je tveganje za prenos okužbe med 6-7 %, v primeru stalne partnerske zveze se tveganje zmanjša na največ 2 % (Matičič, 2008).

Najpomembnejša tekočina za prenos okužbe je kri, lahko pa se okužba prenese tudi z drugimi telesnimi tekočinami, vendar je za prenos pomembna sočasna prisotnost krvi v teh tekočinah. Tako se lahko okužba prenese tudi med družinskimi člani ali člani skupnega gospodinjstva, vendar gre takrat vedno za neupoštevanje osnovnih higienskih načel npr. menjavanje zobne ščetke, manikirnega pribora in pribora za britje med družinskimi člani. Na teh predmetih je lahko prisotna zelo majhna količina krvi, ki je s prostim očesom nevidna, vendar v določenih pogojih zadostuje, da se okužba lahko prenese (Matičič, 2008).

Še vedno pa ni pojasnjen način prenosa okužbe pri 20-30 % okuženih, kar pomeni, da še zdaleč ne poznajo vseh ukrepov za preprečevanje širjenja okužbe z virusom hepatitisa C (UKC, 2009). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (angl. World Health Organization, WHO) in Centrov za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) se HCV ne prenaša s kihanjem, objemanjem, vsakdanjimi stiki, kašljanjem, z vodo in hrano, pri souporabi jedilnega pribora in preko žuželk (WHO, 2009; CDC, 2009).

V Sloveniji je intravensko uživanje drog najpogostejša pot prenosa HCV (34,3%), sledi okužba z neprimernimi medicinskimi postopki (9,8%) in hemodializa (2,7%). V manjših odstotkih opazamo še naslednje načine prenosa HCV: rizični spolni odnosi (1,7%), poklicna izpostavljenost (1,1%), neprofesionalne tetovaže (0,5%), prenos med družinskimi člani (0,3%) in prenos iz matere na otroka (0,1%) (Seme in sod., 2009).

Okužbe intravenskih uživalcev drog s HCV so pogosto povezane z okužbo z genotipom 3, medtem ko je okužba pri transfuziji krvi ali s krvnimi pripravki pogosteje povezana z genotipom 1 (Seme in sod., 2009).

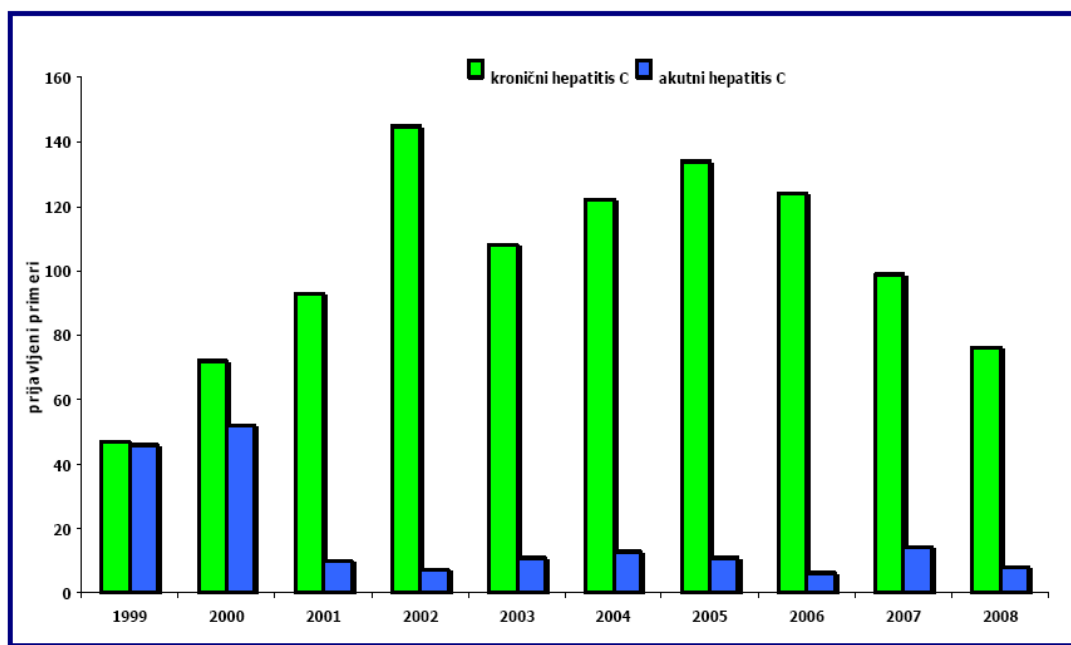
#### **2.1.4 Epidemiološke značilnosti**

HCV je prisoten po vsem svetu. Ocenjujejo, da je na svetu 170 milijonov (3 % svetovnega prebivalstva) okuženih s HCV. Vsako leto se na novo okuži 3-4 milijone oseb. HCV je bil povzročitelj večine posttransfuzijskih ne-A, ne-B hepatitisov, preden so začeli testirati krvodajalce na prisotnost protiteles proti HCV. Virus hepatitisa C povzroča tri četrtine vseh kroničnih hepatitisov. Je glavni vzrok jetrnoceličnega karcinoma in najpogostejši razlog za presaditev jeter pri odraslih (WHO, 2009).

Natančnejše podatke o prekuženosti s HCV imamo pri krvodajalcih, pri katerih so prisotna protitelesa v 0,02-19 %, odvisno od zemljepisnega območja, v Sloveniji pa v povprečju 1-2,5 % (Marolt-Gomišček, 2002, Seme in sod., 2009). Večja prekuženost je med prebivalci južne Italije, Španije, srednje Evrope, Japonske in v deželah srednjega Vzhoda; kot na primer, 20% krvodajalcev v Egiptu ima protitelesa proti HCV (Marolt-Gomišček, 2002).

V Sloveniji je s hepatitisom C okuženih približno 0,5 % populacije (UKC, 2009).

Seme in sod. (2009) so pokazali, da je med okuženimi s HCV več moških (69,4%) kot žensk (30,6%). Povprečna starost bolnikov je bila  $36,6 \pm 15,4$  let. Največ bolnikov je bilo starih od 21-30 let (Seme in sod., 2009).



Slika 3: Prijavljeni primeri akutnega in kroničnega hepatitisa C v Sloveniji od leta 1999-2008 (Epidemiološko spremljanje ..., 2009: 74).

### 2.1.5 Klinična slika

Akutna okužba s HCV poteka brez kliničnih znakov pri skoraj 85 % okuženih (Marolt-Gomišček, 2002). Pri ostalih 15 % se simptomi pojavijo po 15-150 dneh inkubacijske dobe (povprečno po 6-7 tednih inkubacije) (Marolt-Gomišček, 2002; WHO, 2009; CDC, 2009). Simptomi so; vročina, utrujenost, izguba apetita, slabost, bruhanje, abdominalna bolečina, temen seč, glinena obarvanost blata, bolečine v sklepih, zlatenica (rumena obarvanost kože ali oči); simptomi so lahko izraženi v blažji ali hujši obliki (CDC, 2009). Včasih se virus spontano odstrani iz telesa, a je mogoča ponovna okužba (Marolt-Gomišček, 2002).

Smrtnost je v akutnem obdobju manj kot 1 % (Marolt-Gomišček, 2002).

Pri približno 80 % okuženih bolnikov bolezen ne izzveni, ampak preide v kronično obliko. Večina ljudi s kroničnim HCV ne kaže kliničnih znakov. Pri osebah brez simptomov zaznajo hepatitis C med rutinskim pregledom krvi za spremljanja delovanja jeter in pri merjenju ravnih jetrnih encimov (proteini, ki jih izdelujejo jetra) (CDC, 2009). Kronični hepatitis C je resna bolezen, ki lahko povzroča dolgoročne zdravstvene težave kot npr. odpoved jeter, jetrno cirozo, rak jeter ali celo smrt. Vsako leto umre približno 8.000-10.000 ljudi zaradi boleznih povezanih s hepatitisom C (CDC, 2009). Kronični hepatitis se razvije od enega do štirih let po okužbi (Marolt-Gomišček, 2002).

Pri 10-20 % ljudi od tistih, pri katerih se je razvila kronična oblika okužbe s HCV, pride do ciroze jeter; pri 1-5 % okuženih pa se razvije jetrocelični karcinom v obdobju 20-30 let po okužbi (Marolt-Gomišček, 2002; Mindikoglu in Miller, 2009). Mehanizem razvoja karcinoma jeter po okužbi s HCV ni povsem znan (WHO, 2009). Potek je dolgotrajen, pogoste so ponovitve (Marolt-Gomišček, 2002).

Veliko kroničnih oblik HCV opazimo pri alkoholikih s cirozo jeter, za katero so menili, da jo povzroča alkohol. Videti je, da alkohol deluje sinergistično s HCV v patogenezi kroničnega jetrnega obolenja (Marolt-Gomišček, 2002).

Dolgoročno gledano: na 100 ljudi okuženih s HCV se bo pri približno 75-85 ljudeh razvila kronična oblika okužbe HCV, od teh se bo pri 60-70 ljudeh razvila kronična bolezen jeter, pri 5-20 ljudeh se bo razvila ciroza jeter v roku 20-30 let in 1-5 ljudi bo umrlo zaradi ciroze ali raka jeter (CDC, 2009).

## **2.1.6 Diagnoza**

### **2.1.6.1 Serološka diagnoza**

Serološka diagnoza okužbe s HCV temelji na dokazovanju specifičnih protiteles proti HCV (anti-HCV) v serumskih vzorcih bolnikov. Testiranje izvajajo z uporabo presejalnih encimskoimunskih testov (angl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) tretje ali četrte generacije in v primeru reaktivnosti presejalnega testa lahko serumski vzorec dodatno testirajo s potrditvenim imunoblot testom četrte generacije. Dokaz prisotnosti specifičnih protiteles anti-HCV v serumu preiskovanca še ne pomeni, da ima preiskovanec hepatitis C. Približno 25% okuženih s HCV namreč lahko v nekaj mesecih uspešno premaga okužbo z lastnim imunskim sistemom in ozdravi. Osebe, pri katerih dokažejo protitelesa anti-HCV, razdelimo v dve skupini. V prvi so tiste, ki so prišle v stik z virusom in so okužbo že prebolele, in teh je med anti-HCV pozitivnimi osebami v Sloveniji dobra četrtina. V drugi skupini so osebe, ki so prišle v stik z virusom in so še vedno okužene (Poljak in sod., 2006).

### **2.1.6.2 Določanje virusne RNA**

Da bi določili, ali prisotnost protiteles anti-HCV v serumu bolnika pomeni preboleli hepatitis C ali še aktivno okužbo s HCV, uporabljajo kvalitativno različico verižne reakcije s polimerazo (angl. PCR). S kvalitativno PCR v serumu anti-HCV pozitivnega bolnika določajo RNA HCV.



Če ima testirana oseba poleg protiteles anti-HCV še RNA HCV, je skoraj zanesljivo kronično okužena s HCV, razen če ne gre za zelo zgodnje obdobje akutnega hepatitisa C, kar pa je redko. Nasprotno lahko pri več kot 95 % anti-HCV pozitivnih oseb, ki nimajo RNA HCV v serumu, zagotovo trdijo, da so preboleli hepatitis C. Kvalitativna različica PCR je tudi ključna metoda za dokaz akutnega hepatitisa C v zelo zgodnjem obdobju bolezni pred pojavom protiteles anti-HCV, za razlikovanje okužbe s HCV od pasivnega prenosa protiteles anti-HCV pri novorojenčkih in dojenčkih anti-HCV pozitivnih mater in za izključevanje oziroma dokazovanje okužbe s HCV pri osebah s trenutno neopredeljivim rezultatom potrditvenih seroloških testov (Poljak in sod., 2006).

Ker so številne raziskave v preteklosti pokazale, da zaradi relativno dolgega obdobja serokonverzije presejalni testi, ki temeljijo samo na odkrivanju anti-HCV protiteles, ne zadostujejo za zanesljivo izključevanje okužbe s HCV, so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani nedavno posodobili presejalno testiranje za okužbo s HCV. Tako od maja 2004 v vseh anti-HCV negativnih vzorcih dodatno določajo prisotnost RNA HCV s kvalitativno različico PCR po strategiji združevanja vzorcev v t. i. »mini-pool«, s čimer se je obdobje serološkega okna občutno skrajšalo (Poljak in sod., 2006).

#### 2.1.6.3 Določanje genotipa HCV

Pred vsako odločitvijo o zdravljenju je potreben še mikrobiološki test, s katerim določijo genotip virusa (Poljak in sod., 2006).

#### 2.1.7 Zdravljenje

Zdravljenje akutne oblike hepatitisa, ki je posledica okužbe s HCV, je simptomatsko. Pri kronični obliki pa je cilj zdravljenja uničiti virus ali vsaj preprečiti prehod v cirozo in nastanek jetrnega raka (Marolt-Gomišček, 2002).

Terapija z interferonom alfa je edina, do sedaj dostopna, učinkovita, protivirusna terapija za zdravljenje okužbe s HCV. Trenutno se priporoča jemanje kombinacije interferona alfa (pegiliranega in konvencionalnega) in ribavirina 24-48 tednov (Webster in sod., 2009).

Ribavirin (1-beta-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksamid) (Virazol®) spada med nukleozidne analoge. Po zgradbi je podoben gvanozinu in inozinu. Protivirusno deluje različno, med drugim zavira dejavnost virusnih polimeraz in izdelovanje virusnih mRNA. V celičnih kulturah in poskusnih živalih je učinkovit proti mnogim virusom z RNA ali DNA, v kliničnih raziskavah pa je pokazal spremenljive učinke in precejšnjo toksičnost za kostni mozeg in jetra (Koren in Poljak, 2002).

Interferoni so beljakovine, ki preprečujejo virusno razmnoževanje neposredno in posredno s spodbujanjem imunskega odgovora. So vrstno specifični (človeški interferoni zavarujejo le človeške celice), niso pa virusno specifični (učinkujejo na različne vrste virusov) (Koren in Poljak, 2002).

Interferoni v okuženi celici sprožijo sintezo dveh encimov, oligoadenilatne polimeraze in beljakovinske kinaze. Oligoadenilatna polimeraza izdeluje kratke verižice adenilatov, ki aktivirajo celično endoribonukleazo. Sledi razgradnja virusne mRNA. Beljakovinska kinaza fosforilira določene ribosomske beljakovine in tako onemogoči prevajanje virusne mRNA (Koren in Poljak, 2002).

Bolniki večinoma dobro prenašajo vbrizgavanje interferonov v mišico, veno ali pod kožo. Najpogostejši neželeni stranski učinki so povišana telesna temperatura, slabo počutje, utrujenost, glavobol, bolečine v mišicah, bruhanje ter rdečina, bolečina in zatrdlina na mestu vbrizgavanja. Pri visokih odmerkih so pogoste okvare kostnega mozga (levkopenija, trombocitopenija) in jeter. Vsi do sedaj znani stranski učinki so reverzibilni, izginejo že nekaj dni po prenehanju jemanja interferonskih pripravkov (Koren in Poljak, 2002).

Ribavirin brez souporabe interferona nima posebnega vpliva na nivo HCV RNA (Shackel in sod., 2009). Optimalno trajanje zdravljenja in odmerek ribavirina sta predvsem odvisna od genotipa HCV, s katerim je bolnik okužen. Bolnike, okužene z genotipom 1, je potrebno zdraviti dalj časa in z večjim odmerkom ribavirina kot bolnike, okužene z genotipoma 2 in 3 (Poljak in sod., 2006; Seme in sod., 2009). Kljub temu je učinkovitost kombiniranega zdravljenja pri genotipu 1 le 42-46 %, medtem ko je pri genotipih 2 in 3 učinkovitost nekoliko višja in sicer 76-88 % (Shackel in sod., 2009). Pri zdravljenju okužbe z drugimi genotipi HCV (4, 5 ali 6) še ni zanesljivih smernic, zato se zanje v praksi uporablja enaka shema zdravljenja kakor za bolnike, okužene z genotipom 1 (Poljak in sod., 2006).

Pri cirozi jeter je zdravljenje sporno, vendar so znanstveniki dokazali, da zdravljenje pomaga pri zaviranju bolezni, dodatnih okvarah jeter in pri razvoju oziroma nadaljevanju bolezenskega stanja v jetrnega raka. V hujših primerih okvare jeter je mogoča tudi transplantacija (Shackel in sod., 2009).

### **2.1.8 Preprečevanje**

Krvodajalce v Sloveniji od prvega februarja leta 1993 testirajo na prisotnost HCV. Priporočljivo bi bilo testirati vse ljudi, ki so prejeli transfuzijo ali so bili na večjem operativnem posegu pred letom 1993 (Matičič, 2008).

Pri delu z bolniki, okuženimi s HCV, je potrebno upoštevati navodila za preprečevanje okužb, ki se prenašajo s krvjo in telesnimi izločki (Marolt-Gomišček, 2002; Šumak, 2006).

Za zdaj cepiva za HCV še ni na voljo (Marolt-Gomišček, 2002).

## 2.2 Mikro RNA

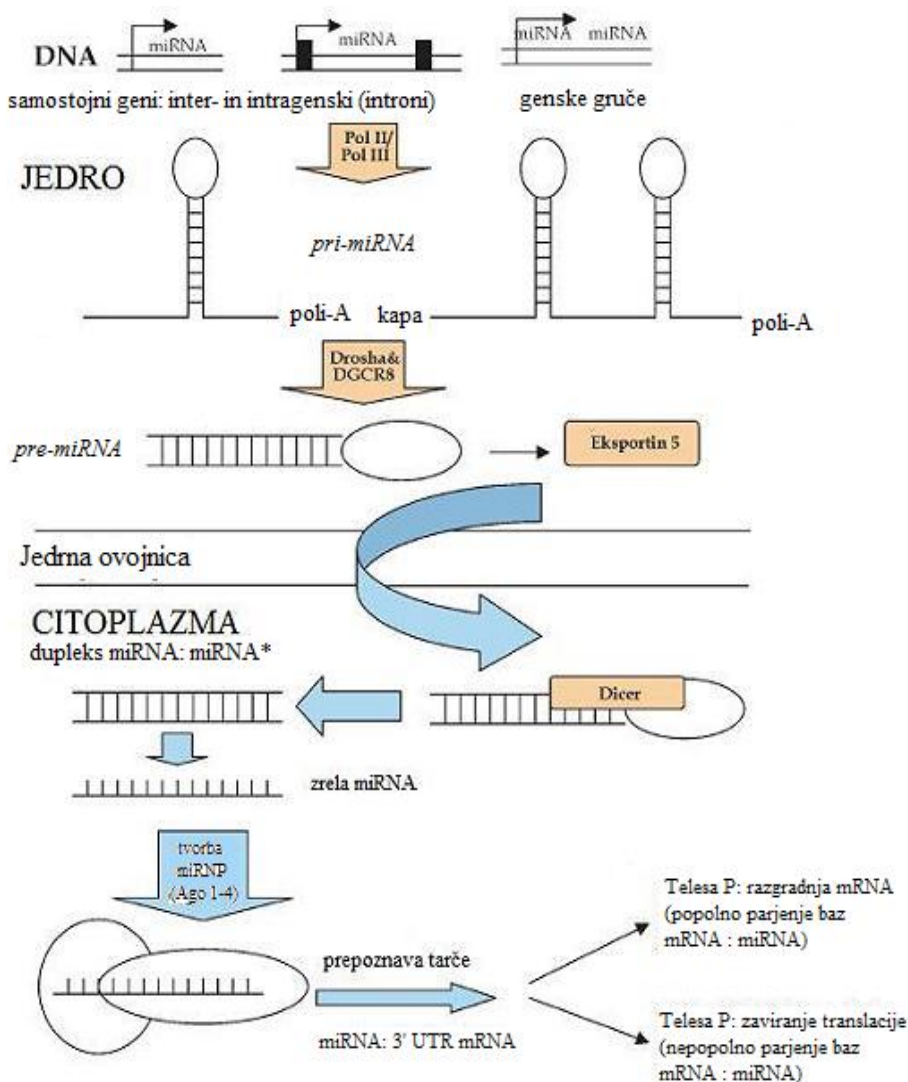
Pot genske ekspresije se začne s procesom transkripcije v jedru, kjer nastane pre-mRNA. Le-ta je nadalje tarča procesov kot so: izrezovanje intronov, post-transkripcijska regulacija in končno translacija v proteine. Med procesom izrezovanja intronov iz pre-mRNA, se eksoni povežejo v zrelo mRNA. Izrezovanje intronov poteka z izrezovalno-povezovalnim kompleksom (angl. spliceosom). Eksoni se lahko izrezujejo tudi alternativno, kar pomeni, da so lahko tako vključeni kot izključeni iz končnega zrelega transkripta mRNA (Shomron in Levy, 2009).

Poleg genov, ki kodirajo proteine, obstajajo tudi nekodirajoči geni, ki se prav tako prepisujejo. Mikro RNA (miRNA) so skupina približno 22 nukleotidov dolgih nekodirajočih RNA, ki inhibirajo gensko ekspresijo z vezavo na 3' UTR regijo ciljnega transkripta mRNA. Znanstveniki domnevajo, da obstaja na stotine miRNA, specifičnih za določeno vrsto ali ohranjenih med vrstami, ki uravnava izražanje ogromno genov. Napovedi računalniških programov kažejo, da miRNA uravnavajo izražanje več kot 30 % vseh človeških kodirajočih genov. miRNA so povezane s številnimi celičnimi procesi, kot so diferenciacija, rast in apoptoza. Motnje v izražanju miRNA vodijo v nastanek raznih bolezni, med drugim tudi raka. V zadnjih nekaj letih so znanstveniki ugotovili, da imajo miRNA ključno vlogo v uravnavanju izražanja genov (Shomron in Levy, 2009).

Po podatkih podatkovne zbirke microRNA.org (Betel in sod., 2008) obstaja 677, po podatkih podatkovne zbirke miRBase (Griffiths-Jones in sod., 2008) pa 721 mikro RNA pri človeku.

### 2.2.1 Procesiranje miRNA

miRNA so v genomu zapisane v intergenskih regijah (kodirane kot samostojen gen ali gruča genov) ali v intragenskih (intronskih) regijah. V svojem življenjskem krogu so miRNA obsežno post-transkripcijsko modificirane (Boštjančič in Glavač, 2008). Pot se začne s transkripcijo (največkrat z RNA polimerazo II ali III) RNA kodirajočega gena (Shomron in Levy, 2009; Boštjančič in Glavač, 2008). Primarni prepis, ki nastane, imenovan *pri-miRNA* (z repom poli-A in 7-metilgvanozinsko kapo), je procesiran v jedru z encimom RNaza III, imenovan Drosha, in vezavnim proteinom, DGCR8, ki se veže na dvoverižno RNA (Boštjančič in Glavač, 2008). Ti proteini delujejo v kompleksu več proteinov imenovan mikroprocesor (Shomron in Levy, 2009). Mikroprocesor cepi *pri-miRNA* tako, da nastane 70 nukleotidov dolga struktura v obliki lasnice, imenovana *pre-miRNA* (Shomron in Levy, 2009; Boštjančič in Glavač, 2008). Struktura lasnice se prenese iz jedra v citoplazmo s pomočjo prenašalnega proteina eksportin 5. Dvoverižni del *pre-miRNA* se veže in cepi z encimom Dicer, drugo RNazo III, tako da nastane zrela molekula miRNA dolga 20-22 nukleotidov. Ena od dveh verig miRNA, znana kot vodilna veriga (angl. guide strand), se nato vključi v kompleks RISC (RNA-inducirani utiševalni kompleks) (angl. RNA-induced silencing complex, RISC) in se pari z zaporedji baz s komplementarnimi zaporedji; druga veriga (miRNA\*, angl. passenger strand) pa naj bi se razgradila (Boštjančič in Glavač, 2008).



Slika 4: Shematski prikaz miRNA biogeneze (Boštjančič in Glavač, 2008: 96)

### 2.2.2 Aktivacija miRNP in kataliza

Komplementarnost prvih 6-8 nukleotidov (angl. seed region) na 5' koncu miRNA in mRNA naj bi bila odgovorna za specifičnost interakcij med miRNA in ciljno mRNA (Pedersen in sod., 2007). Popolna komplementarnost med miRNA in ciljno mRNA pomeni razgradnjo ciljne mRNA, nepopolno parjenje baz med tema dvema molekulama pa pomeni inhibicijo translacije. Predvsem pri živalih, miRNA inhibirajo translacijo mnogih različnih mRNA, ne da bi pri tem uničile ciljno mRNA. Proteini argonavti (angl. Ago) so katalitične komponente kompleksa RISC in so v specifičnih regijah v citoplazmi, ki jim pravimo telesa P. To so mesta z visoko stopnjo razgradnje ali sekvestracije mRNA (Boštjančič in Glavač, 2008; Shomron in Levy, 2009).

Ena mikro RNA lahko regulira več različnih mRNA (npr. ena miRNA lahko vpliva tudi na 200 ciljnih genov) in več mikro RNA lahko regulira eno mRNA (Boštjančič in Glavač, 2008; Shomron in Levy, 2009).

### 2.2.3 Funkcije miRNA

Vlogo endogeno izražene miRNA (prva odkrita miRNA je bila *lin-4*) v zniževanju ravni izražanja genov so prvi opisali Ambros in sod. leta 1993 za *Caenorhabditis elegans*, čeprav je bil izraz mikro RNA prvič vpeljan leta 2001 (Boštjančič in Glavač, 2008).

Ko je RNA eksogena in izhaja iz okužbe z virusom z RNA genomom, ali iz laboratorijskih manipulacij, se RNA prenese neposredno v citoplazmo in cepi v kratke fragmente s pomočjo encima Dicer (Boštjančič in Glavač, 2008).

Novejše raziskave so pokazale, da imajo miRNA pomembno vlogo pri normalnem delovanju celic. Pri nastopu bolezni pa so vzorci izražanja miRNA drugačni v primerjavi z zdravimi (Boštjančič in Glavač, 2008).

miRNA so pomembne pri regulaciji razvoja, predvsem pri regulaciji morfogeneze in pri vzdrževanju nediferenciranih ali nepopolnoma diferenciranih celičnih vrst (diferenciacija matičnih celic, razvoj srčnih in skeletnih mišic, nevrogeneza in tako naprej) (Boštjančič in Glavač, 2008).

miRNA so vključene v številne fiziološke procese kot npr. izločanje insulina, metabolizem holesterola, imunski odgovor in bolezni srca (Boštjančič in Glavač, 2008).

miRNA naj bi bile vključene v kancerogenezo. Nižja raven izražanja mikro RNA v rakavih tkivih v primerjavi z normalnimi tkivi kaže na pomembno vlogo mikro RNA pri tvorbi tumorjev in regulaciji celičnega ciklusa. 50% mikro RNA genov se nahaja znotraj ali blizu krhkih mest kromosomov, v minimalnih potrebnih regijah za izgubo heterozigotnosti in v običajnih mejnih vrednostih, ki so povezana z nastankom raka (Boštjančič in Glavač, 2008; Varnholt in sod., 2008).

### 2.2.4 Mikro RNA v terapevtske namene

V prihodnosti predstavljajo mikro RNA potencialne terapevtske tarče. Za mikro RNA, ki je izražena v premajhnih količinah, bi ponovni vnos zrele mikro RNA v prizadeto tkivo pomenil ponovno vzpostavitev zaviranja izražanja njenega ciljnega gena. Raven čezmerno izražene mikro RNA lahko znižamo z uravnavanjem količine zrele mikro RNA preko direktnega ciljanja mikro RNA ali z znižanjem komponent biogeneze mikro RNA. Slednji pristop je mogoč le kratek čas in pod omejenimi pogoji (Boštjančič in Glavač, 2008).

### 2.2.5 *miR-122a*

*miR-122a* je jetrno specifična mikro RNA, njena raven je visoka v jetrih odraslega človeka in v jetrih zarodka in ploda, kjer predstavlja več kot 72 % vseh mikro RNA. Najbolj znana funkcija *miR-122a* v jetrih sesalcev je regulacija metabolizma lipidov in holesterola.

Raven izražanje *miR-122a* je bila znižana pri raku jeter pri glodalcih in ljudeh, kar pomeni, da je funkcija *miR-122a* povezana s hepatokancerogenzo (Lin in sod., 2008).

Novejša raziskava je pokazala, da se lahko regija 5' UTR oziroma zaporedje IRES HCV veže na jetrno specifično *miR-122a*, posledično se poveča podvojevanje RNA HCV (Suzuki in sod., 2007). To dognanje bi lahko predstavljalo novo tarčo protivirusnega delovanja (Pawlotsky in sod., 2007).

Po podatkih drugih raziskovalcev je *miR-122a* v zvezi s HCV pomembna, ker:

- *miR-122* je marker specifične diferenciacije hepatocitov in je pomembna determinanta v nadzoru migracije in vdora celic (Coulouarn in sod., 2009).
- *miR-122* morda predstavlja učinkovito molekularno tarčo za jetrnocelični karcinom (Fornari in sod., 2009).
- ima vlogo pri regulaciji izražanja oksigenaze-1/Bach-1 v hepatocitih (Shan in sod., 2007).
- znižano izražanje *miR-122a* pri posameznikih, ki so okuženi s HCV, pomeni posledično slabši odziv na zdravljenje z interferonom (Sarasin-Filipowicz in sod., 2009).
- preprečeno izražanje *miR-122a* v jetrnih celičnih linijah, zniža raven translacije HCV, medtem ko dodatek *miR-122a* stimulira translacijo HCV v jetrnih celičnih linijah in pa tudi v celicah HeLa (Henke in sod., 2008).
- BCL-w je direktna tarča *miR-122a*, BCL-w je endogeni dejavnik apoptoze v celičnih linijah humanega jetrnoceličnega karcinoma (Lin in sod., 2008).
- *miR-122a* močno poveča replikacijo HCV v nejetrnih celicah, čeprav za ta proces ni nujno potrebna (Chang in sod., 2008).
- ciklin G1 je tarča *miR-122a* v humanem jetrnoceličnem karcinomu (Gramantieri in sod., 2007).

### 2.2.6 *miR-126*

*miR-126* je druga najpogostejša mikro RNA v jetrih in predstavlja približno 6 % vseh mikro RNA v tem organu. Po podatkih microRNA.org (Betel in sod., 2008), naj bi bila *miR-126* najpogosteje zastopana v srcu, in sicer 42,8 % vseh miRNA v tem organu.

Endotelijske celice igrajo pomembno vlogo pri ohranjanju žilne celovitosti, angiogenezi in celjenju ran. Endotelijsko specifična mikro RNA, *miR-126*, modulira žilno celovitost in angiogenezo *in vivo* (Wang in sod., 2008).

Zhang in sod. (2008) so dokazali, da je *miR-126* supresor celične rasti, pri čemer inhibira prehod iz faze G1/G0 v fazo S celičnega cikla, ne vpliva pa na apoptozo. Dokazali so tudi, da je *miR-126* negativni regulator proteina IRS-1. IRS-1 ima pomembno vlogo pri celični rasti in proliferaciji. Konstitutivna aktivacija IRS-1 je običajen pojav pri tumorjih (Zhang in sod., 2008).

### 2.2.7 *miR-136*

Za *miR-136* še ni bilo pokazano, da se izraža v jetrih.

V eni od raziskav so to mikro RNA povezali z regulacijo replikacije virusnega genoma HCV, kar pa so nato ovrgli. *miR-136* naj bi imela ciljno zaporedje v zapisu za protein NS3, na N- in C-terminalnem delu, poleg tega pa naj bi uravnavala replikacijo HCV, delovala kot supresor infektivnosti HCV pri genotipih 1b in 2a (Murakami in sod., 2009).

Po podatkih microRNA.org (Betel in sod., 2008), se *miR-136* najbolj izraža v celicah nevroblastoma, in sicer predstavlja 4,7 % mikro RNA izraženih v teh celicah.

### **2.2.8 *miR-181a***

*miR-181a* ni med najpogosteje zastopanimi mikro RNA v jetrih, saj predstavlja le 0,5 % mikro RNA v jetrih. Po podatkih microRNA.org (Betel in sod., 2008), je *miR-181a* najbolj izražena v srednjih možganih odraslega človeka, in sicer predstavlja 8,3 % mikro RNA v tem tkivu.

*miR-181a* je tumor supresor, inhibira rast, inducira apoptozo in inhibira vdor celic glioma (Shi in sod., 2008).

Občutljivost celic T na antigene je intrinzično uravnavana med zorenjem, s tem se zagotovi pravilen razvoj imunskega odgovora in tolerance. Zvišano izražanje *miR-181a* v zrelih celicah T povečuje občutljivost na peptidne antigene, medtem ko inhibicija izražanja *miR-181a* v nezrelih celicah T zniža občutljivost in slabi pozitivno in negativno selekcijo. Kvantitativna regulacija *miR-181a* občutljivosti celic T omogoča zrelim celicam T, da prepoznajo antagonistne – inhibitorne peptidne antigene - kot agoniste (Li in sod., 2007).

Zvišano izražanje *miR-181a* je povezano s povečano občutljivostjo celic T (v obdobju nezrelih celic T), kar kaže na to, da je *miR-181a* intrinzični antigen oziroma »reostat«  
občutljivosti med razvojem celic T (Li in sod., 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 IZBIRA BOLNIKOV OKUŽENIH Z VIRUSOM HEPATITISA C

V raziskavo smo vključili 65 biopsijskih vzorcev jeter bolnikov okuženih s HCV, ki so bili pregledani na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vse tkivne vzorce, ki so bili takoj po odvzemu fiksirani v pufranem formalinu in po 24-urni fiksaciji vklopljeni v parafin, smo dobili v arhivu inštituta.

Klinične podatke o bolnikih, kot so starost, spol, genotip virusa, smo povzeli iz dokumentacije Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Celoten seznam vzorcev, ki smo jih testirali je podan v Prilogi A.

#### 3.2 IZOLACIJA RNA

##### 3.2.1 Izolacija RNA iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin

Za izolacijo RNA iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin (FFPE, angl. formalin-fixed paraffin-embedded tissue), smo uporabili komercialno dostopen komplet miRNeasy FFPE (Qiagen, Nemčija).

Vsi reagenti so bili od proizvajalca Qiagen, razen etanola (Merck, ZDA) in ksilena (Merck, ZDA). Vzorce tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, smo iz parafinskih blokov s pomočjo mikrotoma (Leica, Nemčija) narezali na 20 µm debele rezine. Rezine vzorcev smo shranili v mikrocentrifugirkah pri temperaturi 4 °C. Za izolacijo smo uporabili 3 rezine, ki smo jim parafin odstranili z dodatkom 1 ml ksilena in mešanjem na vibracijskem mešalniku (Vibromix 104EV, Tehtnica, Slovenija). Ksilen smo odstranili z 2-minutnim centrifugiranjem pri najvišji hitrosti (5415R, Eppendorf, Nemčija) in spiranjem z 1 ml 100-odstotnega etanola ter nato etanol odstranili z dvominutnim centrifugiranjem. Usedlino smo sušili v odprtih epruveh 10 min pri sobni temperaturi ali pri 37 °C (Termomixer comfort, Eppendorf, Nemčija). Suhi usedlini smo dodali 0,24 ml pufra za razgradnjo (angl. Buffer PKD) in 10 µl raztopine proteinaze K, zmešali z vibracijskim mešalnikom ter inkubirali 15 min pri 55 °C in 15 min pri 80 °C. Suspenziji smo dodali 0,5 ml pufra RBC ter mešali na vibracijskem mešalniku. Mešanico smo prenesli na kolono gDNA (angl. gDNA Eliminator spin column) ter centrifugirali 30 s pri 12.000 vrt./min. Eluatu smo dodali 1,75 ml 100-odstotnega etanola ter previdno premešali s pipetiranjem. Mešanico smo prenesli na kolono (angl. RNeasy MinElute spin column) in za 30 s centrifugirali pri 12.000 vrt./min. RNA, vezano na kolono, smo dvakrat spirali z 0,5 ml pufra RPE in centrifugiranjem pri 12.000 vrt./min, prvič za 30 s in drugič 2 min. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri najvišji hitrosti za 5 min. Nato smo RNA eluirali s 30 µl vode brez nukleaz in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. RNA smo shranili pri -70 °C.



### 3.3 DOLOČANJE KOLIČINE IN KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA

#### 3.3.1 Merjenje koncentracije izolirane RNA

Izolirani RNA smo izmerili koncentracijo z merjenjem absorbance pri 260 nm s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA). Aparat smo umerili z 1  $\mu$ l vode brez nukleaz. Za merjenje koncentracije smo uporabili 2  $\mu$ l izolirane RNA. Pri merjenju smo upoštevali tudi razmerje  $A_{260}/A_{280}$ , katerega meja za zadovoljivo čistost je nad 1,9 (Qiagen, 2006b).

#### 3.3.2 Določanje kakovosti izolirane RNA

Tako smo tudi mi v določenih primerih kakovost in integriteto izoliranih malih RNA molekul (< 200 nukleotidov) ter prisotnost miRNA v tej frakciji preverili s kapilarno gelsko elektroforezo na poliakrilamidnem gelu z aparatom Agilent2100 (Agilent Technologies, ZDA). Pri nanosu in analizi vzorcev smo uporabili komplet Agilent Small RNA Kit (določanje količine razpona malih RNA je med 1-20 ng/ $\mu$ l; koncentracija celokupne RNA pa naj bi bila 1-100 ng/ $\mu$ l) (Agilent Technologies, ZDA) in navodila proizvajalca. Metoda temelji na ločevanju fragmentov RNA na osnovi velikosti, in sicer malih RNA, velikih 6-150 nukleotidov. Ločevanje poteka z detekcijo fluorescence z nadzorom emisije med 670 in 700 nm (Masotti in sod., 2010). Analizator za vsak vzorec izriše elektroferogram in sliko podobno gelu, določi faktor, ki meri kakovost RNA in izračuna delež molekul rRNA in tRNA v vzorcih RNA (Toplak, 2006; Masotti in sod., 2010).

Naenkrat smo analizirali 11 vzorcev in za analizo uporabili 1  $\mu$ l izolirane RNA. Kot kontrolo velikosti in razgradnje izolirane RNA smo uporabili lestvico Small RNA Ladder, v velikosti 6-150 nukleotidov (Agilent Technologies, ZDA).

### 3.4 ANALIZA IZRAŽANJA miRNA

PCR je verižna reakcija pomnoževanja DNA s polimerazo DNA (angl. polymerase chain reaction, PCR). Princip reakcij PCR je v cikličnem pomnoževanju DNA. Tipičen cikel sestavljajo tri faze: denaturacija dvoverižne DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in sinteza DNA (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2005).

Najpogosteje uporabljena encima za PCR sta *Taq* DNA polimeraza (iz *Thermus aquaticus*) in *Pfu* DNA polimeraza (iz *Pyrococcus furiosus*). Oba encima lahko ustvarjata nove verige DNA z uporabo matrice DNA in začetnih oligonukleotidov ter sta odporna na visoke temperature. Ta lastnost je pomembna, ker je potrebno po vsakem ciklu kopiranja DNA, dvoverižno DNA denaturirati pri visokih temperaturah. Nato pri nižji temperaturi sledi prileganje začetnih oligonukleotidov na novo enoverižno matrico DNA. Polimeraza DNA tako začne podaljševati verigo z dodajanjem posameznih komplementarnih nukleotidov in tako ustvarja novo verigo DNA, ki se nato uporabi v novem ciklu pomnoževanja (Valasek in Repa, 2005).

Princip metode PCR v realnem (angl. real-time PCR) času temelji na detekciji pomnoževanega dela DNA med samo PCR (Bustin in sod., 2005; Baebler, 2006).

Pomembna razlika metode PCR v realnem času od klasične metode PCR je v tem, da je od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja nukleinske kisline odvisno, koliko ciklov bo potrebnih, da lahko zaznamo fluorescenco poročevalske molekule (Bustin in sod., 2005; Baebler, 2006).

Največja omejitev DNA polimeraz (in tako tudi PCR), je da uporabljajo kot matrico za pomnoževanje DNA. RNA na tak način ni mogoče pomnoževati. To težavo rešimo z uporabo drugega encima, to je reverzna transkriptaza, ki iz RNA matrice izdelata komplementarno DNA (ali cDNA). Ta DNA se nato uporablja v PCR. Obratno prepisovanje lahko poteka z naključnimi začetnimi oligonukleotidi, oligo (dT) začetnimi oligonukleotidi ali gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (Valasek in Repa, 2005).

V našem primeru so bili vsi reagenti od proizvajalca Qiagen, razen aparata Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System, na katerem smo izvajali metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo PCR v realnem času, ki je bil od proizvajalca Applied Biosystems. V naravi miRNA niso poliadenilirane zato se v reakciji obratnega prepisovanja poliadenilirajo s polimerazo poli(A). Reverzna transkriptaza nato pretvori RNA v cDNA s pomočjo začetnih oligonukleotidov oligo-dT. Začetni oligonukleotidi oligo-dT imajo univerzalno označeno zaporedje na 5' koncu. Ta univerzalna oznaka omogoča pripenjanje univerzalnega začetnega oligonukleotida v reakciji qPCR (kvantitativna PCR v realnem času; angl. quantitative real-time PCR, qPCR) skupaj z začetnim oligonukleotidom specifičnim za miRNA (Qiagen, 2007: 9).

Po vsakem koncu cikla med reakcijo qPCR zaznavamo signal s fluorescentnim barvilom SYBR Green, ki prepoznava dvoverižno DNA.

### 3.4.1 Razgradnja DNA v vzorcih RNA

Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, zaradi nespecifičnega zaznavanja eno- in dvoverižne DNA, ki lahko ostaja kot stranski produkt med izolacijo in se nato lahko pomnožuje med reakcijo qPCR, smo najprej izvedli razgradnjo DNA v vzorcih RNA z uporabo DNaze I. DNaza I je endonukleaza, izolirana iz govejega pankreasa. Reže enoverižno in dvoverižno DNA. DNA lahko razgradi tudi v dupleksih DNA/RNA in DNA-proteinskih kompleksih (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

#### Postopek razgradnje DNA

Uporabili smo 1 µg (5 µl) RNA, okužene z genomsko DNA, ki smo ji dodali 2 µl pufra za DNazo (angl. 10 x DNase buffer) v naslednji sestavi: 500 mM Tris-Cl, pH 8,0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT. Nato smo mešanici dodali 10 enot inhibitorja RNaz (angl. RNase inhibitor), 0,5 enote Kunitz DNaze (angl. DNase I, RNase-free) in dopolnili reakcijsko mešanico do 20 µl z vodo brez nukleaz. Inkubirali smo 30 min pri 37 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemčija) in ustavili delovanje DNaze z dodatkom 2 µl 0,14 M EDTA (Calbiochem, ZDA) ter 5-minutno inkubacijo pri 65 °C. Ponovno smo izmerili koncentracijo RNA z uporabo aparata NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA).

### 3.4.2 Kontrola brez obratnega prepisovanja

S tem korakom smo preverili, če je v vzorcih RNA po razgradnji z DNazo še prisotna DNA. Uporabili smo vse reagente za qPCR, le da smo izpustili korak obratnega prepisovanja; namesto 10-krat redčene cDNA smo uporabili 10 ng RNA in poskus izvedli z interno kontrolo *RNU6B*. Za 15 µl mešanico qPCR smo uporabili 7,5 µl 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1,5 µl miScript univerzalnega začetnega oligonukleotida (angl. 10 x miScript Universal primer) in 1,5 µl začetnega nukleotida (angl. 10 x miScript Primer Assay, v tem primeru *RNU6B*) ter do 15 µl vode brez nukleaz. Če smo med reakcijo qPCR dobili signal, je to pomenilo, da je v vzorcu bilo še vedno prisotne nekaj genomske DNA.

### 3.4.3 Obratno prepisovanje

Za obratno prepisovanje smo uporabili komercialno dostopen komplet miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Nemčija). S tem kompletom obratno prepisujemo RNA v koncentraciji od 10 pg do 1 µg.

Mešanica za obratno prepisovanje miScript vsebuje poli(A) polimerazo in reverzno transkriptazo. miScript RT pufer pa vsebuje Mg<sup>2+</sup>, dNTP-je, naključne in oligo-dT začetne oligonukleotide (Qiagen, 2007: 9).

Vse reagente smo po ekvilibraciji in odtajanju na ledu pred uporabo premešali na vibracijskem mešalniku ter za kratek čas centrifugirali (angl. short spin). Pripravili smo 15 µl reakcijsko mešanico za obratno prepisovanje, ki je vsebovala, 3 µl pufera za obratno prepisovanje (angl. 5 x miScript RT buffer), 0,75 µl mešanice encima za obratno prepisovanje (angl. miScript Reverse Transcriptase mix) in 10 enot (0,33 µl) inhibitorja RNaz (angl. RNase inhibitor, Qiagen). Za vsak vzorec smo reakcijski mešanici dodali 100 ng RNA in dopolnili z vodo brez nukleaz do 15 µl. Sledila je 60-minutna inkubacija pri 37 °C in 5-minutna inkubacija pri 95 °C. cDNA smo shranili na -20 °C.

### 3.4.4 Analiza izražanja molekul miRNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času

Postopek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času:

Vse reagente smo najprej ekvalibrirali in odtajali na ledu in jih premešali v vibracijskem mešalniku. Pripravili smo 15 µl reakcijsko mešanico za qPCR, ki je vsebovala 7,5 µl reakcijske mešanice qPCR (angl. 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix), 1,5 µl univerzalnega začetnega oligonukleotida (angl. 10 x miScript Universal Primer), 1,5 µl začetnega oligonukleotida, specifičnega za izbrano miRNA (angl. 10 x miScript Primer Assay). cDNA smo redčili 10-krat, in 4,5 µl uporabili za vsako reakcijo qPCR. Mešanico smo do 15 µl dopolnili z vodo brez nukleaz. Kot notranjo/interno kontrolo smo uporabili *RNU6B*. Vse reakcije qPCR so bile izvedene v treh ponovitvah.

Reakcija qPCR je potekala po naslednjem programu:

Stopnja	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	15 min
35 ciklov		
Denaturacija	94 °C	15 s
Prileganje	55 °C	30 s
Podaljševanje	70 °C	30 s

Signal smo zaznavali na koncu vsakega cikla. Po amplifikaciji smo naredili še analizo talilnih krivulj produktov PCR, da bi preverili specifičnost pomnoženega produkta. Analiza talilnih krivulj je potekala po programu 1 °C/60 s za 60–95 °C.

Preglednica 2: Zaporedja mikro RNA in interne kontrole iz podatkovne baze miRBase (Griffiths-Jones in sod., 2008):

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5' – 3' orientacija)
<i>Hsa-miR-122a</i>	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
<i>Hsa-miR-126</i>	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
<i>Hsa-miR-136</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
<i>Hsa-miR-181a</i>	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA
<i>RNU6B</i>	CTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTTT
Human (HeLa) U6 small nuclear RNA *	

\*(Sri-Widada in sod., 1981)

### 3.4.5 Detekcija pomnožene DNA

SYBR Green I se veže na mali žleb dvoverižne DNA in oddaja 1000-krat večjo fluorescenco kot ko je prost v raztopini. Tako večja kot je količina dvoverižne DNA, večji je fluorescenčni signal SYBR Green I (Valasek in Repa, 2005). Detekcija poteka v fazi podaljševanja PCR v realnem času (Qiagen, 2006a).

### 3.5 ANALIZA PODATKOV DOBLJENIH S PCR V REALNEM ČASU

Glede na količino kontrolne RNA (endogena kontrola) smo posredno izračunali izražanje preučevane miRNA relativno glede na endogeno kontrolo v naših vzorcih. Primerjali smo razlike v relativnem izražanju molekul miRNA v jetrih glede na genotip HCV.

Podatke dobljene iz reakcij PCR v realnem času smo analizirali s programom SDSv2.1 (Applied Biosystems, ZDA), ki nam je podal Ct (angl. Cycle threshold) vrednost za vsak vzorec posebej. Vrednosti Ct so obratno-sorazmerne s količino ciljnih molekul in na osnovi le-teh smo primerjali vzorce med seboj (Baebler, 2006).

Za analizo podatkov po koraku qPCR smo uporabili relativno kvantifikacijo, in sicer primerjalno Ct metodo.

### 3.5.1 Primerjalna Ct metoda

S primerjalno Ct metodo primerjamo vrednosti Ct miRNA, ki nas zanimajo, z vrednostmi Ct endogene kontrole, v kontrolnem in preiskovanem vzorcu (npr. normalno tkivo in okuženo tkivo). Primerjalna Ct metoda se imenuje tudi  $\Delta\Delta Ct$  (Livak in Schmittgen, 2001).

Razliko v izražanju določenega gena v testiranem glede na kalibratorski vzorec izrazimo tako, kot prikazuje enačba 1.

$$\text{Razlika v izražanju gena} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \dots (1)$$

$\Delta\Delta Ct$  opisuje razliko med povprečno vrednostjo  $\Delta Ct$  vzorca, ki nas zanima in povprečno vrednost  $\Delta Ct$  za referenčni vzorec. Referenčni vzorec je znan tudi kot kalibrator saj so vsi vzorci med relativno kvantifikacijo normalizirani na kalibrator. Izračun vrednosti  $\Delta\Delta Ct$  prikazuje enačba 2.

$$\Delta\Delta Ct = \text{povprečje } \Delta Ct_{\text{preiskovana skupina}} - \text{povprečje } \Delta Ct_{\text{referenčna skupina}} \quad \dots (2)$$

$\Delta Ct$  opisuje razliko med Ct vrednostjo ciljnega gena in Ct vrednostjo endogene kontrole kot npr. gospodinjski geni.  $\Delta Ct$  izračunamo tako, kot prikazuje enačba 3.

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{endogena kontrola} \quad \dots (3)$$

(Qiagen, 2006a)

Prav tako smo izračunali še standardni odklon (SD) za vsak vzorec.

Nato smo izračunali, za vsako mikroRNA in endogeno kontrolo, povprečni standardni odklon glede na genotip HCV.

Tako smo izračunali  $\Delta SD$  za posamezni genotip po enačbi 4.

$$\Delta SD_{\text{genotip}} = \frac{\sqrt{SD_{EK}^2 + SD_{PG}^2}}{\sqrt{n}} \quad \dots (4)$$

Kjer je EK endogena kontrola, PG preiskovani gen, n pa število ponovitev. Po temu je bilo potrebno izračunati še  $\Delta\Delta SD$  po enačbi 5.

$$\Delta\Delta SD = \sqrt{\Delta SD_{GENOTIPx}^2 + \Delta SD_{GENOTIPy}^2} \quad \dots (5)$$

Tako smo končno lahko izračunali napako pri razliki v izražanju gena (angl. fold change error) po enačbi 6.

$$FC_{\text{error}} = \ln(2) * \Delta\Delta SD * FC \quad \dots (6)$$

Kjer je FC (angl. Fold change) =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  oz. razlika v izražanju gena.

### 3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Zaradi manjšega števila vzorcev smo za statistično analizo razlik v izražanju miRNA uporabili neparametrično statistično metodo Mann-Whitney, ki omogoča primerjavo izražanja med dvema neodvisnima skupinama vzorcev. Test je bil vključen v programski paket SPSSv16. Če je bila vrednost  $p < 0,05$ , smo spremembe v izražanju miRNA pri preučevani skupini v primerjavi z referenčno skupino opredelili kot statistično značilne (SPSS for Windows Documentation, 2007).

### 3.7 ISKANJE POTENCIALNIH CILJNIH GENOV ZA IZBRANE mikro RNA

Z računalniškimi programi PicTar (Krek in sod., 2005) in miRecords (Xiao in sod., 2009) smo predpostavili gene, na katere bi lahko delovale izbrane miRNA. Našteta programa uporabljata različne parametre za izračun verjetnosti funkcionalnega vezavnega mesta za ciljne mRNA. Oba navedena računalniška algoritma raziskovalcu omogočata vnos specifičnega simbola gena ali miRNA, nato algoritem izračuna vsa za miRNA predpostavljena vezavna mesta znotraj gena oziroma vsa vezavna mesta v različnih genih za izbrano miRNA. Pomembno je uporabiti različne algoritme, ker različni programi pogosto kot rezultat izračunajo različna vezavna mesta.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZMERJENE KONCENTRACIJE IZOLIRANE RNA

Koncentracija izolirane RNA in razmerje  $A_{260}/A_{280}$  sta podana v preglednici 3.

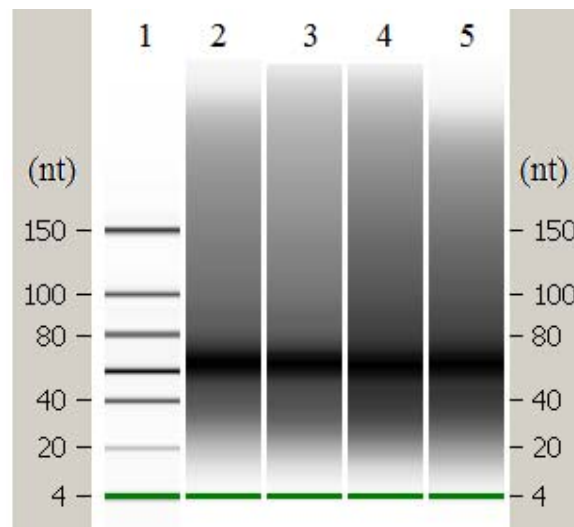
Preglednica 3: Izmerjene koncentracije izolirane RNA iz biopsijskih vzorcev jeter bolnikov okuženih s HCV

Vzorci po letih	Koncentracija RNA(ng/μl)	$A_{260}/A_{280}$	Vzorci po letih	Koncentracija RNA(ng/μl)	$A_{260}/A_{280}$
2003			Vzorec 7/05	8,8	1,45
Vzorec 1/03	15,3	2,04	Vzorec 8/05	3,3	1,08
Vzorec 2/03	45,1	2	Vzorec 9/05	21,5	1,81
Vzorec 3/03	26,2	1,97	Vzorec 10/05	64,4	1,77
Vzorec 4/03	52,6	1,76	Vzorec 11/05	33,9	1,89
Vzorec 5/03	28,9	1,8	Vzorec 12/05	36,2	1,85
Vzorec 6/03	38,6	1,9	Vzorec 13/05	37,1	1,78
Vzorec 7/03	65	1,96	Vzorec 14/05	54	1,92
Vzorec 8/03	19,6	1,57	Vzorec 15/05	18,5	1,75
Vzorec 9/03	20,4	1,82	Vzorec 16/05	27,6	1,73
Vzorec 10/03	70,8	1,8	2006		
Vzorec 11/03	47,2	2,02	Vzorec 1/06	79,4	1,91
2004			Vzorec 2/06	61,5	1,9
Vzorec 1/04	82,35	1,97	Vzorec 3/06	75,6	1,93
Vzorec 2/04	8,75	1,41	Vzorec 4/06	21,1	1,85
Vzorec 3/04	55	1,91	Vzorec 5/06	67,5	1,96
Vzorec 4/04	55,2	1,86	Vzorec 6/06	26,5	1,91
Vzorec 5/04	20,7	1,96	Vzorec 7/06	30,1	1,73
Vzorec 6/04	36,9	1,88	Vzorec 8/06	33	1,66
Vzorec 7/04	37,3	1,97	Vzorec 9/06	51,6	1,88
Vzorec 8/04	26,3	2	Vzorec 10/06	22,4	1,82
Vzorec 9/04	12,7	1,58	Vzorec 11/06	5,1	1,38
Vzorec 10/04	57,4	1,75	Vzorec 12/06	17,6	1,97
Vzorec 11/04	135,3	1,92	Vzorec 13/06	26,7	1,83
Vzorec 12/04	6,9	1,7	2007		
Vzorec 13/04	14,45	1,41	Vzorec 1/07	33	1,85
Vzorec 14/04	55,6	1,83	Vzorec 2/07	50,5	1,7
Vzorec 15/04	24,1	1,87	Vzorec 3/07	32	1,8
2005			Vzorec 4/07	20,5	1,93
Vzorec 1/05	39,5	1,96	Vzorec 5/07	38,1	1,93
Vzorec 2/05	7,1	1,87	Vzorec 6/07	105,1	1,95
Vzorec 3/05	4,3	1,19	Vzorec 7/07	16,2	1,68
Vzorec 4/05	3,6	1,68	Vzorec 8/07	20,7	1,8
Vzorec 5/05	24,8	1,02	Vzorec 9/07	74,5	1,92
Vzorec 6/05	14,8	1,63	Vzorec 10/07	42,3	1,76

## 4.2 DOLOČANJE KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA PRED IN PO OBDELAVI Z DNazo

Kakovost izolirane RNA smo preverjali s pomočjo aparata Agilent2100, in sicer pred in po obdelavi z DNazo. Rezultati so prikazani na slikah 5 in 6.

Na sliki 5 vidimo, da so glede na uporabljeno lestvico (6-150 nt) prisotne male RNA v velikosti pribl. 20 nukleotidov v RNA izolirani iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, ki ni bila obdelana z DNazo (Agilent Technologies, 2008).

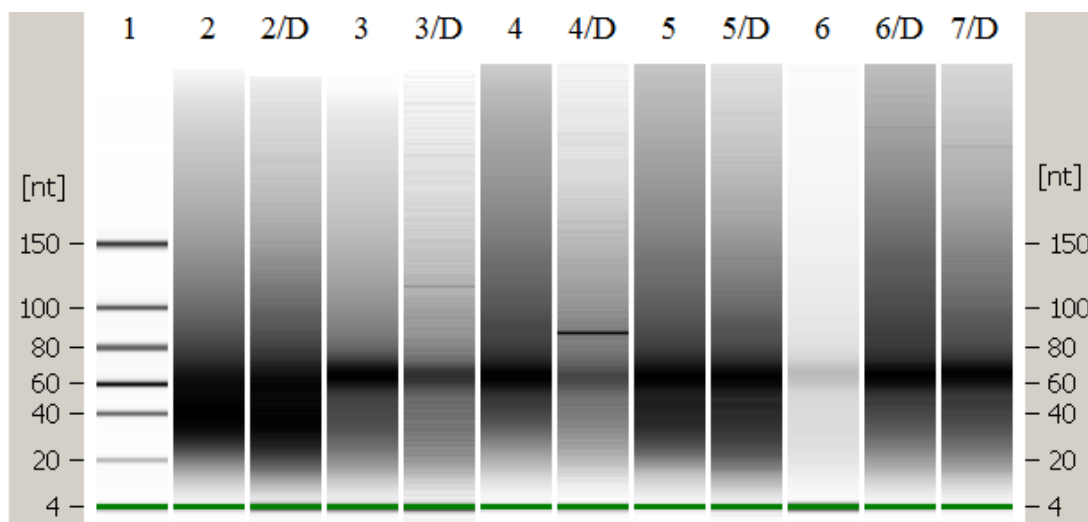


Slika 5: Kakovost malih RNA, izoliranih iz vzorcev jetrnih biopsij, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin

Legenda (od leve proti desni): 1 lestvica (6-150 nt); od 2 do 5 male RNA izolirane iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin.

V nadaljevanju raziskave smo primerjali RNA izolirano iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, ki smo jo naknadno obdelali z DNazo. Na istem gelu smo primerjali iste vzorce pred in po obdelavi z DNazo. Rezultati primerjave so prikazani na sliki 6.





Slika 6: Kakovost malih RNA, izoliranih iz vzorcev jetrnih biopsij, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin pred in po obdelavi z DNazo

Legenda (od leve proti desni): 1 lestvica (6-150 nt); od 2 do 7 male RNA izolirane iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin pred (vzorci označeni s številkami 2,3,4,5 in 6) in po obdelavi z DNazo (vzorci z oznakami 2/D, 3/D, 4/D, 5/D, 6/D in 7/D).

### 4.3 PCR V REALNEM ČASU IN PRIMERJALNA Ct METODA

Kontrola brez obratnega prepisovanja v vzorcih RNA, izolirane iz tkiv, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, ni pokazala prisotnosti genomske DNA. V nobenem vzorcu, tako obdelanem kot neobdelanem z DNazo, nismo zaznali signala pomnoženega produkta pri reakciji qPCR.

#### 4.3.1 Razlika v izražanju mikro RNA glede na genotip HCV

Od 65 vzorcev je bilo 12 vzorcev z genotipom 1 HCV, 15 z genotipom 1a, 14 z genotipom 1b, 15 z genotipom 3, 2 z genotipom 2, 2 z genotipom 1a/1b, 2 z genotipom 2a/2c, 2 z genotipom 2 b in 1 vzorec z genotipom 4 HCV. Rezultati vrednosti Ct in njihovi standardni odkloni so prikazani v preglednici 4. Zaradi majhnega števila vzorcev pri genotipih 2, 1a/1b, 2a/2c, 2b in 4 teh rezultatov nismo prikazali.

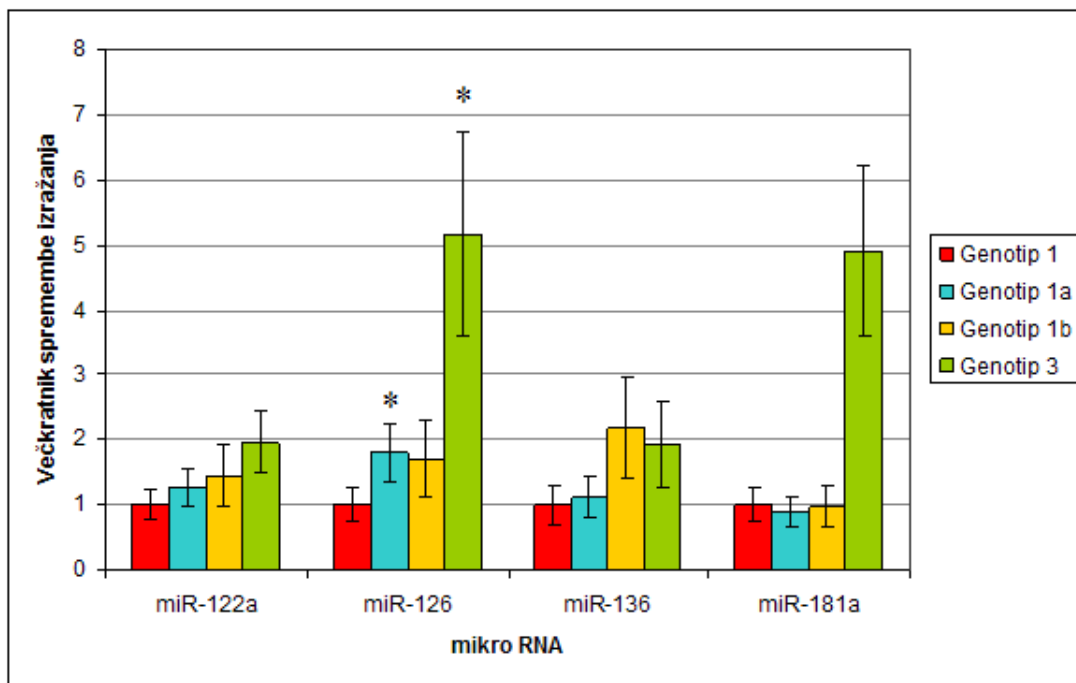
Preglednica 4: Določanje izražanja mikro RNA glede na genotip HCV z metodo qPCR:

Genotip	<i>RNU6B</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-122a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-126</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-136</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-181a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD
1	18,14±0,35	17,81±0,21	22,85±0,29	31,02±0,39	25,36±0,26
1a	17,00±0,34	16,33±0,18	20,76±0,19	29,73±0,33	24,41±0,33
1b	18,36±0,66	17,50±0,21	22,30±0,33	30,11±0,26	25,62±0,19
3	20,29±0,40	18,99±0,20	24,25±0,45	31,41±0,53	27,02±0,32

Način izračuna relativnega izražanja posameznih mikro RNA ( $\Delta C_t$ , razlika v praznih ciklih) glede na endogeno kontrolo je podan v točki 3.5.1 Vse razlike praznih ciklov smo primerjali glede na genotip 1 (referenčna skupina), ki je v Sloveniji najbolj pogost. Način izračuna razlike razlike praznih ciklov ( $\Delta\Delta C_t$ ) in večkratnika spremembe je opisan v točki 3.5.1.

S statistično metodo Mann-Whitneyevega testa smo primerjali  $\Delta C_t$  izražanja *miR-122a*, *miR-126*, *miR-136* in *miR-181a*, analiziranih s qPCR, med posameznimi skupinami.

Rezultati večkratnika spremembe izražanja pri posameznih genotipih glede na genotip 1 so prikazani na sliki 7.



Slika 7: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na genotip pri bolnikih okuženih z virusom hepatitisa C

Legenda: zvezdica (\*) – statistično značilna sprememba v izražanju.

Iz slike je razvidno, da se izražanje *miR-122a* zvišuje pri genotipih 1a, 1b in 3 (~1,27, 1,44 in 1,95-krat) v primerjavi z genotipom 1 HCV. Prav tako se *miR-126* drugače izraža glede na genotip HCV, in sicer zvišano izražanje smo opazili pri genotipu 1b (~1,7-krat) in statistično značilno zvišano izražanje pri genotipih 1a (~1,79-krat,  $p=0,038$ ) in 3 (5,15-krat,  $p=0,05$ ) glede na genotip 1 HCV. *miR-136* je pokazala zvišano izražanje pri genotipu 1b in 3 (~2,19 in 1,93-krat), medtem ko pri genotipu 1a ni bilo spremembe v izražanju glede na genotip 1 HCV. Pri *miR-181a* je bilo izražanje znižano pri genotipu 1a (~0,88-krat) in zvišano pri genotipu 3 (~4,9-krat), pri genotipu 1b pa ni bilo sprememb v izražanju glede na genotip 1 HCV.

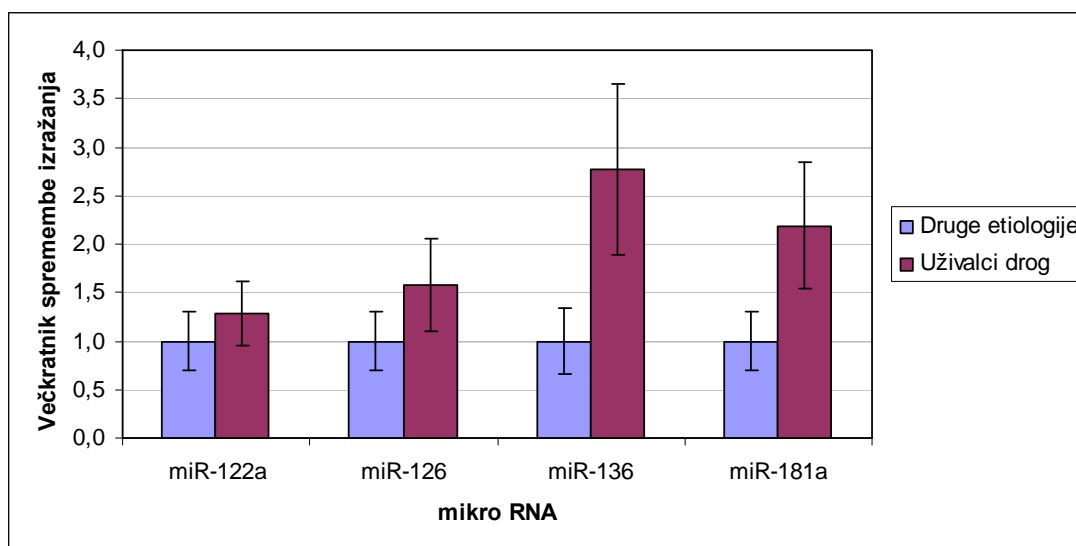
### 4.3.2 Razlika v izražanju mikro RNA glede na etiologijo

Od 65 vzorcev je bilo 28 uživalcev drog in 37 vzorcev z drugimi etiologijami. Rezultati vrednosti Ct in njihovi standardni odkloni so prikazani v preglednici 5. Pomembnejših razlik v praznih ciklih (Ct) glede na etiologijo nismo opazili.

Preglednica 5: Določanje izražanja mikro RNA glede na etiologijo z metodo qPCR:

Etiologija	<i>RNU6B</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-122a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-126</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-136</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-181a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD
Druge etiologije	18,24±0,50	17,59±0,18	22,40±0,24	30,34±0,33	25,49±0,24
Uživalci drog	18,58±0,31	17,56±0,19	22,47±0,36	30,58±0,41	25,61±0,37

Način izračuna relativnega izražanja posameznih mikro RNA ( $\Delta$ Ct, razlika v praznih ciklih) glede na endogeno kontrolo je podan v točki 3.5.1 Vse razlike praznih ciklov smo primerjali glede na druge etiologije (referenčna skupina), način izračuna razlike razlike praznih ciklov ( $\Delta\Delta$ Ct) in večkratnika spremembe je opisan v točki 3.5.1. Rezultati večkratnika spremembe izražanja pri uživalcih drog glede na druge etiologije so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi virusa hepatitisa C

Pri vseh štirih mikro RNA je izražanje zvišano pri uživalcih drog glede na ostale etiologije. Najbolj zvišano izražanje smo opazili pri *miR-136* (~2,77-krat), najbolj znižano pa pri *miR-122a* (~1,29-krat) vendar to so statistično neznačilne razlike.

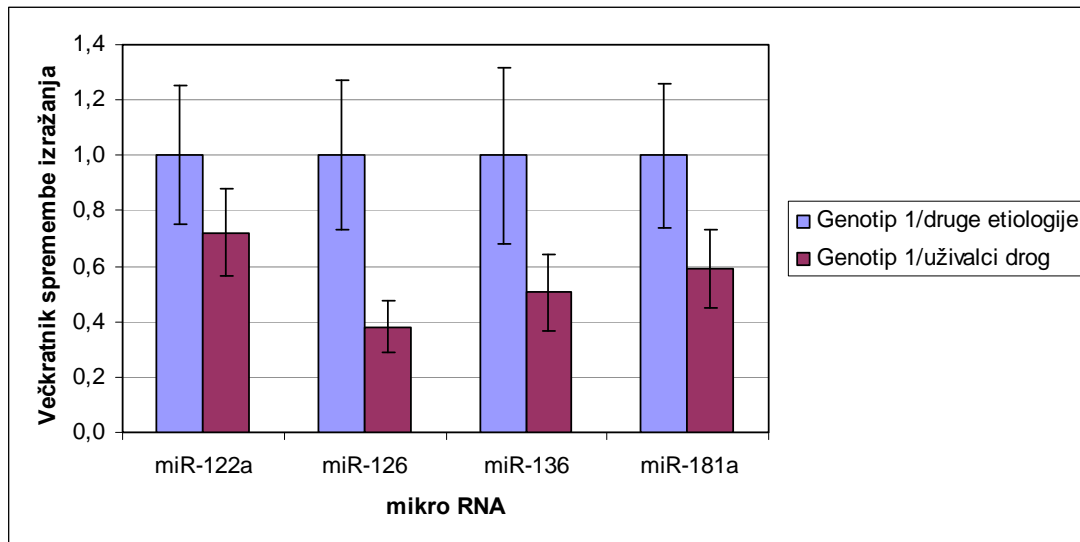
### 4.3.3 Razlika v izražanju mikro RNA glede na genotip HCV in glede na etiologijo

Rezultati vrednosti Ct in njihovi standardni odkloni so prikazani v preglednici 6. Zaradi majhnega števila vzorcev pri genotipih 2, 1a/1b, 2a/2c, 2b in 4 teh rezultatov nismo prikazali.

Preglednica 6: Določanje izražanja mikro RNA glede na etiologijo in genotip HCV z metodo qPCR:

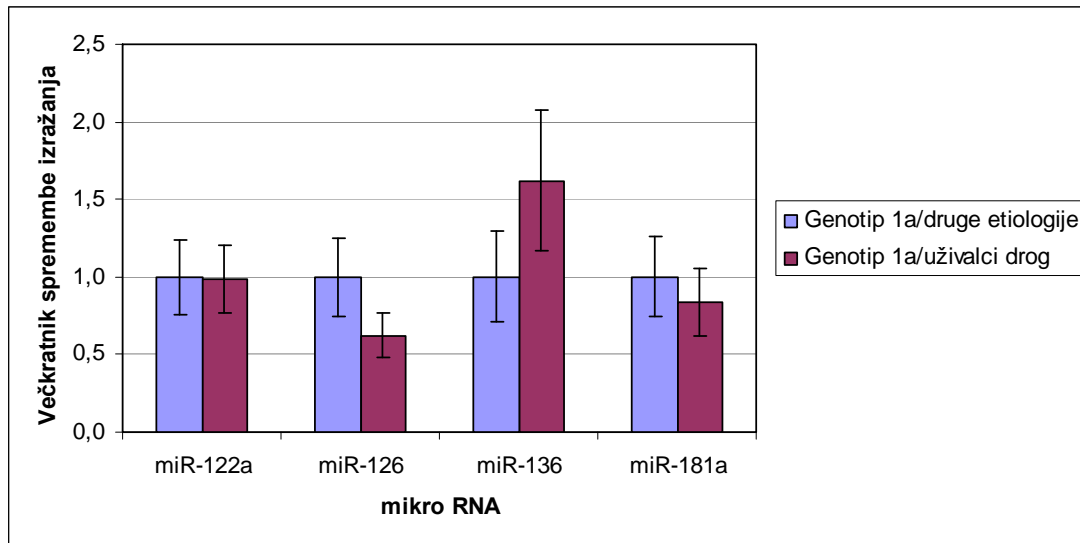
Genotip/ etiologija	Število vzorcev	<i>RNU6B</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-122a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-126</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-136</i> Povprečno število ciklov Ct±SD	<i>Hsa-miR-181a</i> Povprečno število ciklov Ct±SD
1/N	5	16,73±0,32	16,68±0,20	22,26±0,29	30,19±0,36	24,40±0,27
1	7	19,14±0,38	18,62±0,22	23,27±0,29	31,61±0,42	26,05±0,26
1a/N	11	17,12±0,33	16,46±0,21	20,67±0,21	29,67±0,37	24,60±0,36
1a	4	16,66±0,39	15,97±0,10	21,02±0,16	29,90±0,24	23,88±0,24
1b/N	1	17,31±0,44	16,23±0,01	22,92±0,41	31,28±0,35	25,38±0,08
1b	13	18,44±0,69	17,60±0,22	22,26±0,32	30,02±0,26	25,64±0,20
3/N	10	20,37±0,27	18,89±0,19	23,97±0,55	31,69±0,56	26,89±0,34
3	5	20,12±0,69	19,21±0,23	24,95±0,18	30,85±0,47	27,24±0,29

Način izračuna relativnega izražanja posameznih mikro RNA ( $\Delta Ct$ , razlika v praznih ciklih) glede na endogeno kontrolo je podan v točki 3.5.1 Vse razlike praznih ciklov smo primerjali glede na druge etiologije (referenčna skupina), način izračuna razlike razlike praznih ciklov ( $\Delta\Delta Ct$ ) in večkratnika spremembe je opisan v točki 3.5.1. Rezultati večkratnika spremembe izražanja pri uživalcih drog glede na druge etiologije so prikazani na slikah 9, 10, 11 in 12.



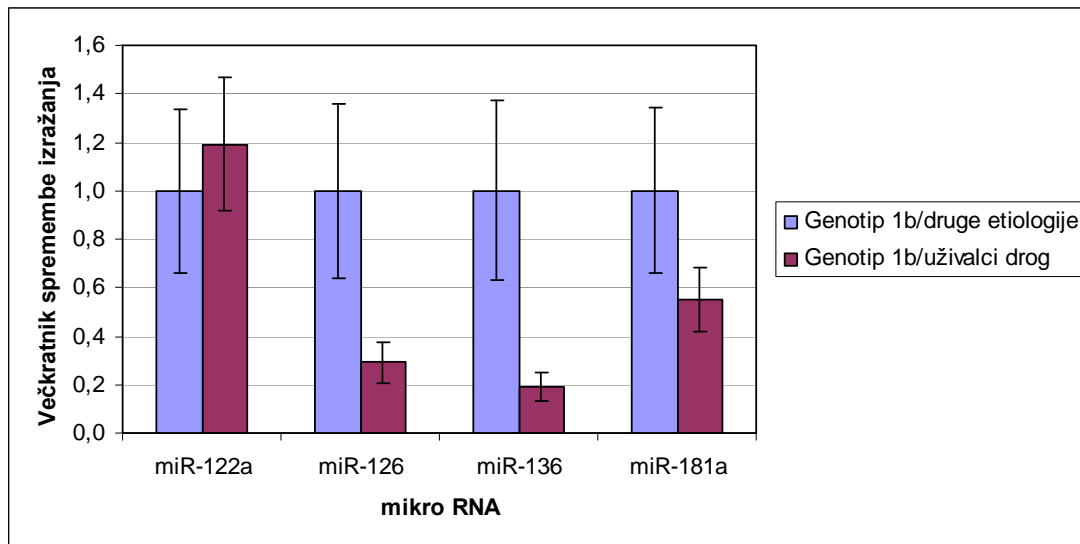
Slika 9: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede etiologijo pri genotipu 1 bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C

Pri vseh štirih mikro RNA je izražanje nižano pri uživalcih drog glede na ostale etiologije pri genotipu 1 HCV. Najbolj nižano izražanje smo opazili pri *miR-126* (~0,38-krat), najbolj zvišano pa pri *miR-122a* (~0,72-krat) vendar pri tem nismo dobili statistično značilnih razlik.



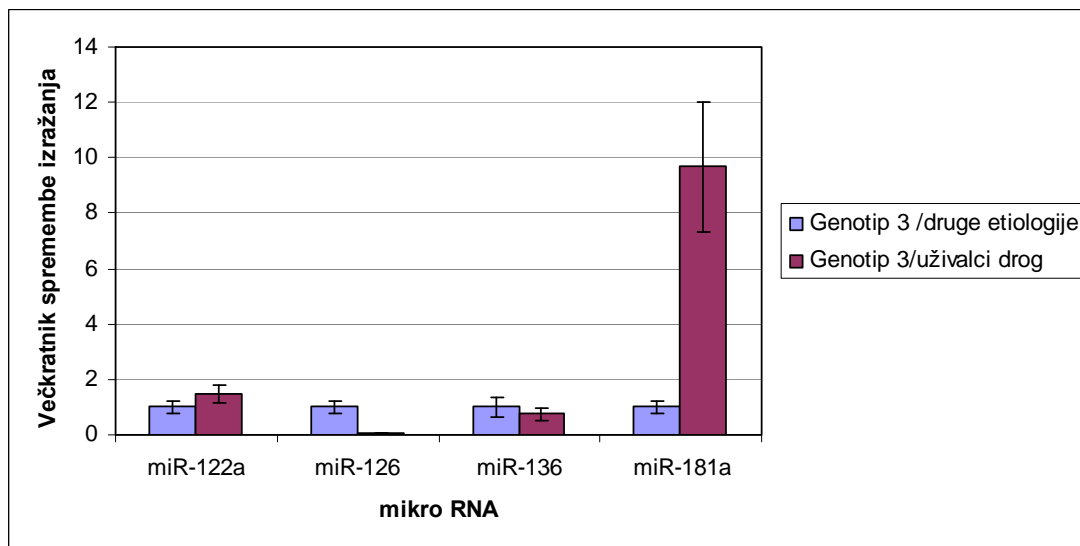
Slika 10: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 1a bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C

Pri uživalcih drog ni bilo sprememb v izražanju *miR-122a* glede na druge etiologije pri genotipu 1a HCV. Izražanje *miR-126* in *miR-181a* je nižano (~0,62-krat in 0,84-krat) medtem ko je izražanje *miR-136* (~1,62-krat) zvišano pri uživalcih drog glede na druge etiologije pri genotipu 1a HCV. Te razlike niso statistično značilne.



Slika 11: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 1b bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C

Pri genotipu 1b HCV je izražanje *miR-122a* zvišano (~1,19-krat) medtem ko je izražanje ostalih mikroRNA znižano glede na druge etiologije. Razlike niso statistično značilne.



Slika 12: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na etiologijo pri genotipu 3 bolnikov okuženih z virusom hepatitisa C

Izražanje *miR-122a* in *miR-181a* je zvišano (~1,48-krat in 9,69-krat) pri uživalcih drog glede na druge etiologije pri genotipu 3 HCV medtem ko je izražanje *miR-126* in *miR-136* znižano (~0,07-krat in 0,74-krat). Razlike niso statistično značilne.

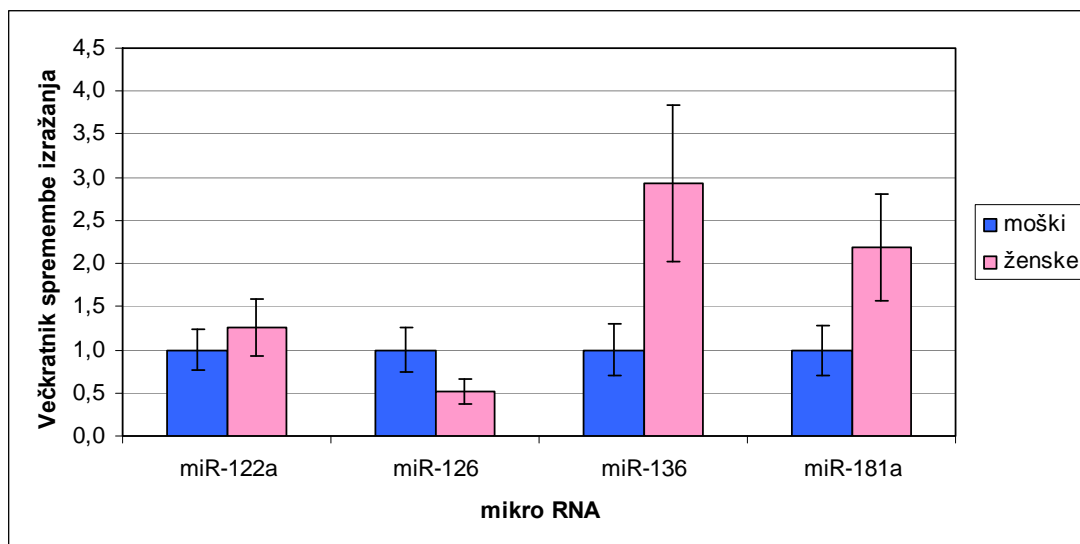
#### 4.3.4 Razlike v izražanju mikro RNA glede na spol

Med 65 vzorci je bilo 40 moških in 25 žensk. Rezultati vrednosti Ct in njihovi standardni odkloni so prikazani v preglednici 7. Zaradi majhnega števila vzorcev pri genotipih 2, 1a/1b, 2a/2c, 2b in 4 teh rezultatov nismo prikazali. Pomembnejših razlik v praznih ciklih (Ct) glede na spol nismo opazili.

Preglednica 7: Določanje izražanja mikro RNA glede na spol z metodo qPCR:

Spol	<i>RNU6B</i>	<i>Hsa-miR-122a</i>	<i>Hsa-miR-126</i>	<i>Hsa-miR-136</i>	<i>Hsa-miR-181a</i>
	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD
Moški	18,40±0,40	17,71±0,16	22,37±0,25	30,40±0,37	25,60±0,32
Ženske	18,37±0,43	17,35±0,23	22,53±0,37	30,51±0,35	25,46±0,25

Način izračuna relativnega izražanja posameznih mikro RNA ( $\Delta$ Ct, razlika v praznih ciklih) glede na endogeno kontrolo je podan v točki 3.5.1 Vse razlike praznih ciklov smo primerjali glede na moški spol (referenčna skupina), način izračuna razlike praznih ciklov ( $\Delta\Delta$ Ct) in večkratnika spremembe je opisan v točki 3.5.1. Rezultati večkratnika spremembe izražanja pri ženskah glede na moške so prikazani na sliki 13.



Slika 13: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na spol pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi HCV

Izražanje *miR-122a*, *miR-136* in *miR-181a* je zvišano (~1,26-krat, 2,93-krat in 2,19-krat), medtem ko je izražanje *miR-126* znižano (~0,52-krat) pri ženskah glede na moške. Te razlike niso statistično značilne.

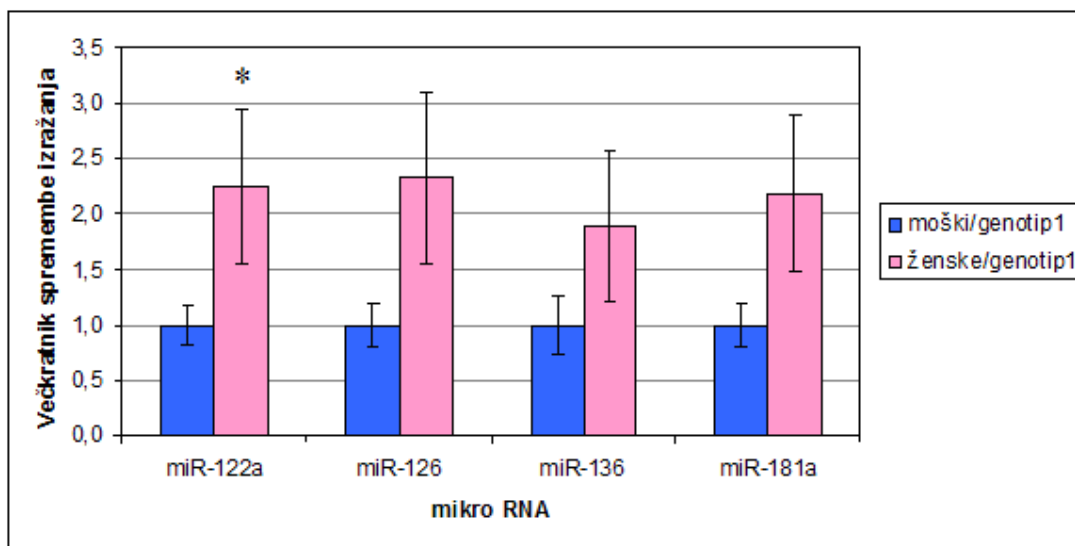
### 4.3.5 Razlike v izražanju mikro RNA pri različnih genotipih HCV glede na spol

Rezultati vrednosti Ct in njihovi standardni odkloni so prikazani v preglednici 8. Zaradi majhnega števila vzorcev pri genotipih 2, 1a/1b, 2a/2c, 2b in 4 teh rezultatov nismo prikazali.

Preglednica 8: Določanje izražanja mikro RNA glede na spol z metodo qPCR:

Genotip/ spol	Število vzorcev	<i>RNU6B</i>	<i>Hsa-miR-122a</i>	<i>Hsa-miR-126</i>	<i>Hsa-miR-136</i>	<i>Hsa-miR-181a</i>
		Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD	Povprečno število ciklov Ct±SD
1/m	7	17,40±0,25	17,56±0,18	22,62±0,25	30,66±0,38	25,09±0,23
1/ž	5	19,17±0,48	18,16±0,26	23,17±0,35	31,52±0,42	25,74±0,30
1a/m	11	17,21±0,45	16,39±0,19	21,03±0,21	29,85±0,32	24,54±0,28
1a/ž	4	16,42±0,09	16,18±0,15	19,94±0,14	29,40±0,36	24,04±0,45
1b/m	8	18,03±0,75	17,85±0,18	22,27±0,27	30,06±0,26	25,65±0,25
1b/ž	6	18,80±0,61	17,04±0,25	22,35±0,41	30,18±0,27	25,58±0,11
3/m	9	20,70±0,31	19,41±0,13	24,31±0,34	31,42±0,52	27,18±0,33
3/ž	6	19,66±0,54	18,36±0,32	24,17±0,58	31,40±0,55	26,73±0,31

Način izračuna relativnega izražanja posameznih mikro RNA ( $\Delta Ct$ , razlika v praznih ciklih) glede na endogeno kontrolo je podan v točki 3.5.1 Vse razlike praznih ciklov smo primerjali glede na moški spol (referenčna skupina), način izračuna razlike praznih ciklov ( $\Delta\Delta Ct$ ) in večkratnika spremembe je opisan v točki 3.5.1. Rezultati večkratnika spremembe izražanja pri ženskah glede na moške so prikazani na slikah 14, 15, 16 in 17.



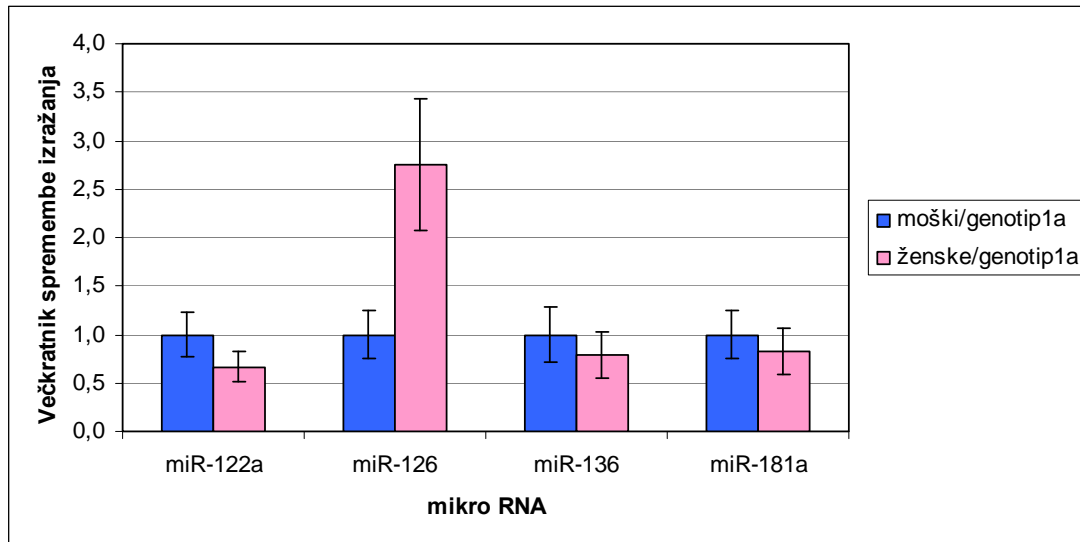
Slika 14: Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1 bolnikov okuženih s HCV

Legenda: zvezdica (\*) – statistično značilna sprememba v izražanju.

Pri vseh štirih mikro RNA je izražanje zvišano pri ženskah glede na moške pri genotipu 1 HCV.

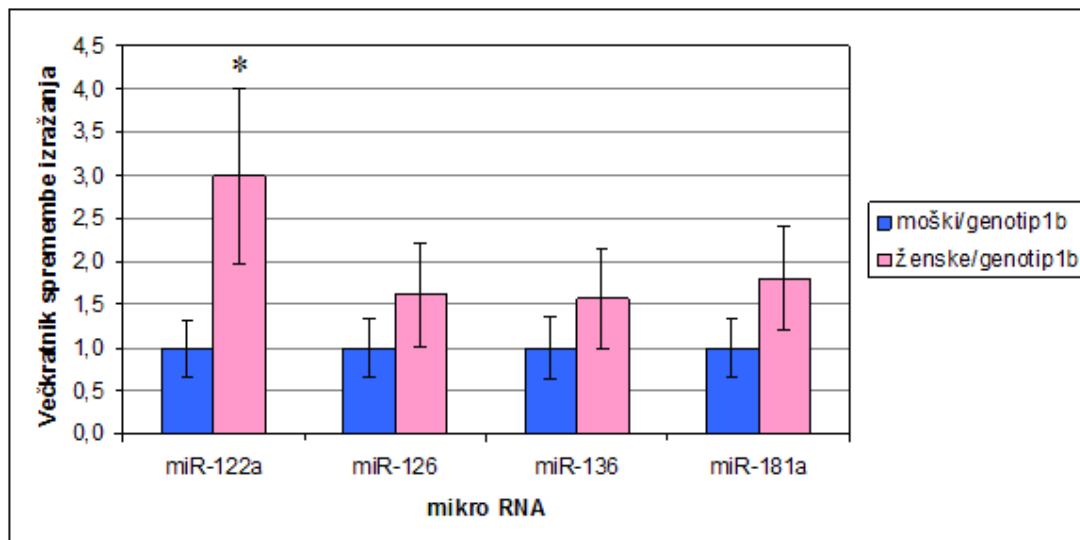


S statistično metodo Mann-Whitneyevega testa smo ugotovili statistično značilno zvišano izražanje *miR-122a* pri ženskah (~2,25-krat,  $p = 0,042$ ) glede na moške z genotipom 1 HCV.



Slika 15: Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1a bolnikov okuženih s HCV

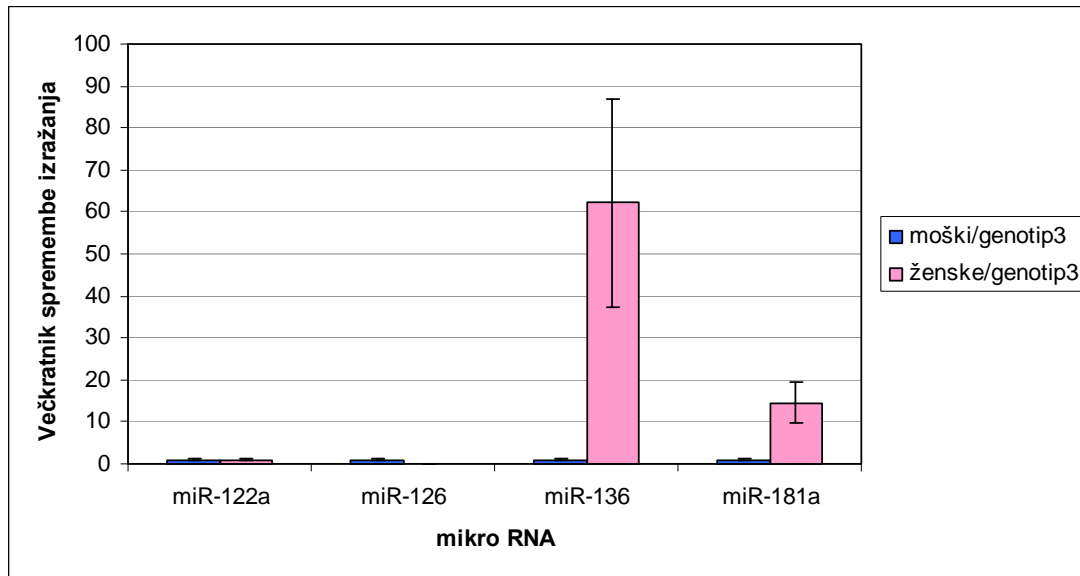
Izražanje *miR-126* je zvišano (~2,75-krat), medtem ko je izražanje ostalih mikroRNA znižano pri ženskah glede na moške pri genotipu 1a HCV. Te razlike niso statistično značilne.



Slika 16: Izražanje nekaterih mikro RNA glede na spol pri genotipu 1b bolnikov okuženih s HCV

Legenda: zvezdica (\*) – statistično značilna sprememba v izražanju.

Pri vseh štirih mikro RNA je izražanje zvišano pri ženskah glede na moške pri genotipu 1b HCV. S statistično metodo Mann-Whitneyevega testa smo ugotovili statistično značilno zvišano izražanje *miR-122a* pri ženskah (~2,98-krat,  $p = 0,028$ ) glede na moške pri genotipu 1b HCV.



Slika 17: Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih glede na spol pri genotipu 3 bolnikov okuženih s HCV

Izražanje *miR-136* in *miR-181a* je zvišano (~62,1-krat in 14,6-krat) pri ženskah glede na moške pri genotipu 3 HCV medtem ko je izražanje *miR-126* znižano (~0,08-krat). Razlike v izražanju *miR-122a* glede na spol pri genotipu 3 HCV nismo opazili. Te razlike niso statistično značilne.

#### 4.4 REZULTATI PREDPOSTAVLJANJA POTENCIALNIH CILJNIH GENOV ZA PREUČEVANE miRNA

Z računalniškimi programi PicTar (Krek in sod., 2005) in miRecords (Xiao in sod., 2009) smo predpostavili potencialne ciljne gene, na katerih bi lahko delovale izbrane miRNA. Upoštevali smo samo tiste gene, ki se izražajo v jetrih in so povezani z virusom hepatitisa C. Rezultati so prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Predpostavljeni ciljni geni za izbrane mikro RNA v jetrih v povezavi s HCV

miRNA	Predpostavljeni ciljni geni		Funkcija
	Simbol gena	Ime gena	
<i>miR-122a</i>	TNRC6A	angl. trinucleotide repeat containing 6A	Protein, ki ga ta gen kodira ima funkcijo v post-transkripcijskem utišanju genov z mikro RNA.
<i>miR-126</i>	PLK2	angl. polo-like kinase 2	Vloga pri normalni delitvi celic.
	PTPN9	angl. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	PTP so signalne molekule, ki regulirajo številne celične procese med drugimi tudi celično rast, diferenciacijo, mitotičen cikel, onkogenezo in fagocitozo.
<i>miR-136</i>	PTPN13	angl. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase	Vloga pri Fas posredovani programirani celični smrti.
	PTPRG	angl. protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	Kandidat za tumor supresorski gen.
	PPARGC1A	angl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1	Protein je transkripcijski koaktivator, ki regulira gene vključene v energijski metabolizem in je morda tudi vključen v nadzor krvnega tlaka, regulacijo celične homeostaze holesterola ter razvoj debelosti.
	RARB	angl. retinoic acid receptor, beta	Ta protein naj bi omejeval rast številnih celic preko regulacije ekspresije genov. Gen so prvič identificirali v jetrnoceličnem raku na vstopnem mestu virusa hepatitisa B.
	MAPK14	angl. mitogen-activated protein kinase 14	Ta kinaza ima vlogo pri transkripciji povezani s stresom in regulaciji celičnega cikla ter genotoksičnem odgovoru na stres.

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 9: Predpostavljene ciljni geni za izbrane mikro RNA v jetrih v povezavi s HCV

miRNA	Predpostavljene ciljni geni		Funkcija
	Simbol gena	Ime gena	
<i>miR-181a</i>	KLF6	angl. Kruppel-like factor 6	To je transkripcijski aktivator in deluje kot tumor supresor. Nekatero transkripcijske variante tega gena so vpletene v kancerogenezo.
	FOXP1	angl. FOXP1 forkhead box P1	Ima pomembno vlogo pri regulaciji tkivno in celično specifične transkripcije genov med razvojem osebk in v odrasli dobi. Gen lahko deluje kot supresor tumorjev
	MPP5	angl. membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	Deluje kot supresor tumorjev. Receptorje združuje v skupke tako, da nastanejo multiproteinski kompleksi s transmembranskimi, citoskeletnimi in citoplazemskimi signalnimi proteini.
	CPD	angl. carboxypeptidase D	CPD je homolog gp180 pri racah, ta pa je vezavni protein virusa hepatitisa B.
	NSMAF	angl. neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	Vloga v regulaciji od TNF posredovanega celičnega odgovora kot npr. vnetja.

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 9: Predpostavljeni ciljni geni za izbrane mikro RNA v jetrih v povezavi s HCV

miRNA	Predpostavljeni ciljni geni		Funkcija
	Simbol gena	Ime gena	
<i>miR-181a</i>	PCGF2	angl. polycomb group ring finger 2	Protein je negativen regulator transkripcije in ima tumorsko supresorsko aktivnost. Lahko tudi negativno regulira izražanje različnih citokinov, kemokinov in kemokinskih receptorjev in ima tako vlogo v diferenciaciji in migraciji limfocitov ter v imunskem odzivu.
	EEF1A1	angl. eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Sodeluje pri translaciji. Izoforma alfa se izraža tudi v jetrih.
	IL1A	angl. interleukin 1, alpha	Citokin je vključen v številne imunske odgovore, vnetne procese.
	ADAMTS1	angl. ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	Izražanje tega gena je lahko povezano z različnimi vnetnimi procesi. Gen je nujen za normalno rast, plodnost in morfolgijo ter funkcijo organov.
	KPNA1	angl. karyopherin alpha 1	Vloga v procesu pri katerem nastanejo geni za imunoglobuline in T-celične receptorje.
	PTPN9	angl. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	PTP so signalne molekule, ki regulirajo številne celične procese med drugimi tudi celično rast, diferenciacijo, mitotičen cikel, onkogenezo in fagocitozo.

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 9: Predpostavljeni ciljni geni za izbrane mikro RNA v jetrih v povezavi s HCV

miRNA	Predpostavljeni ciljni geni		Funkcija
	Simbol gena	Ime gena	
<i>miR-181a</i>	SON	angl. SON DNA binding protein	Protein se veže na specifično zaporedje DNA humanega virusa hepatitisa B (HBV). S to vezavo represira aktivnost osrednjega dela promotorja HBV, transkripcijo HBV genov in nastanek HBV virionov. Morda ima vlogo pri zaščiti celic pred apoptozo in pri pre-mRNA izrezovanju.
	ATRN	angl. attractin	Ena od transkripcijskih variant tega proteina je receptor vključen v nadzor debelosti. Druga transkripcijska varianta pa je protein, ki je vključen v prvotno združevanje imunskih celic med vnetnimi odzivi.
	TNFSF11	angl. tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	Protein je vključen v regulacijo od T celic odvisnega imunskega odziva in ima morda vlogo v regulaciji celične apoptoze.
	STC1	angl. stanniocalcin 1	Gen ima spremenjeno izražanje v jetnoceličnem raku.
	TOX	angl. thymocyte selection-associated high mobility group box	Protein ima morda funkcijo v regulaciji razvoja T-celic.
	DKN1B	angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	Razgradnja tega proteina je potrebna za celični prehod iz mirovanja v proliferativno stanje.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Hepatitis C virus (HCV) je glavni vzrok za kronične jetrne bolezni, kot sta ciroza jeter in jetrnocelični karcinom ter posledično glavni vzrok presaditve jeter. Za sedaj ne obstaja nobenega učinkovitega in odobrenega cepiva proti HCV. Trenutne terapije zdravljenja, ki temeljijo na pegiliranem interferonu in ribavirinu pa imajo številne pomanjkljivosti med katerimi prednjačijo nizka učinkovitost, visoka cena in znatni stranski učinki (Shan in sod., 2007; Lupberger in sod., 2008). Klinični razvoj novih protivirusnih zdravil je upočasnen zaradi težav pri varnosti in trdovratni odpornosti virusa. Tako se nove protivirusne strategije zdravljenja osredotočajo na interakcije med virusom in gostiteljskimi celicami pri vstopu, podvojevanju, sestavljanju in iznosu virusa izven celic, da bi dopolnile obstoječe terapije zdravljenja in bile učinkovitejše pri boju proti HCV virusu. HCV virus naj bi izkoriščal celični lastni sistem signalne transdukcije in si tako omogočil lažji vstop v celice in lažje podvojevanje (Pan in sod., 2007). Randall in sod. so z genskim utišanjem z malimi RNA dokazali nove interakcije med HCV in gostiteljem med življenjskim krogom virusa. Ta spoznanja bodo zagotovo pripomogla k boljšemu razumevanju virusnega življenjskega kroga in bodo morda pomagala odkriti nove tarče za nove, nujno potrebne, protivirusne terapije zdravljenja (Lupberger in sod., 2008).

Tudi v diplomskem delu smo se osredotočili na gensko utišanje. Zanimalo nas je kako oz. če sploh se izražajo *miR-122a*, *miR-126*, *miR-136* in *miR-181a* pri različnih genotipih virusa HCV, in, ali so kakšne razlike v izražanju teh mikro RNA glede na genotip in etiologijo.

Želeli smo pokazati, da se *miR-126*, *miR-136* in *miR-181a* izražajo v jetrih pri človeku saj do sedaj takih raziskav še niso delali. Večina raziskovalcev se je osredotočila na *miR-122a* saj je v jetrih prisotna v več kot 70 % glede na vse mikro RNA.

#### 5.1.1 Izolacija RNA

Najprej smo iz vzorcev jetrnih biopsij fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin izolirali RNA s komercialnim kitom miRNeasy FFPE (Qiagen, Nemčija). S tem kitom naj bi bili izolirani vsi uporabni fragmenti RNA za nadaljnjo analizo s pomočjo qPCR (Qiagen, 2006b).

Po operacijskem postopku bi moralo biti tkivo čim hitreje fiksirano v 4-10% formalinu, pri čemer inkubacija ne bi smela trajati dlje od 24 ur, ker se tako RNA lahko zelo hitro razgradi. Pred vklopljenjem v parafin pa bi moral biti vzorec dehidriran (Qiagen, 2006b). Sveže tkivo je lahko shranjeno tudi v stabilizacijski mešanici RNAlater.

Zaradi fiksacije v formalinu in vklapljanja v parafin so nukleinske kisline v FFPE vzorcih zelo razgrajene in kemično modificirane. Z miRNeasy FFPE kompletom (Qiagen, Nemčija) se modifikaciji vzorcev s formaldehidom izognemo kolikor je možno. Izogniti si želimo dvoverižni DNA kar ta komplet tudi omogoča zato ni potrebne inkubacije čez noč ali razgradnje z DNazo (Qiagen, 2006b).

Do fragmentacije RNA lahko pride zaradi različnih vzrokov: RNA se lahko degradira že med časom od operacijskega postopka do fiksacije v formalinu, inkubacija pri visokih temperaturah pri procesu vklapljanja v parafin in dolgoletno shranjevanje takih vzorcev lahko tudi vodi v fragmentacijo RNA. Shranjevanje vzorcev lahko vodi v oksidacijo RNA na izpostavljeni površini in obarvanje rezin lahko tudi vpliva na kakovost RNA (von Ahlfen in sod., 2007).

Fiksacija v formalinu omogoča ohranjanje celičnih proteinov, morfoloških značilnosti in arhitekture tkiva vendar pa zelo zniža predelavo in kakovost RNA (Doleshal in sod., 2008; von Ahlfen in sod., 2007). Navzkrižne povezave med RNA in proteini med postopkom fiksacije sprožijo odpornost RNA proti ekstrakciji. Razgradnja encimov, ki poteka pred in med fiksacijo tako kot kemična razgradnja ima za posledico manjši donos in integriteto RNA. Končno, formalin je odgovoren za nastanek mono-metilol aduktov z bazami nukleinskih kislin zlasti z adeninom. Ta kovalentna modifikacija zmanjša učinkovitost obratnega prepisovanja in kvantitativne PCR v realnem času in negativno vpliva na delovanje RNA vzorcev pri ostalih vzdolžnih aplikacijah (Doleshal in sod., 2008).

Omejena količina vzorca (nekaj rezin po 20  $\mu\text{m}$ ) je pogojena z zmožnostjo kolone, da se ne zamaši (Qiagen, 2006b).

### 5.1.2 Določanje kakovosti izolirane RNA s pomočjo aparata Agilent 2100

Kakovost začetne RNA vpliva na natančnost vrednotenja genskega izražanja. Čistost in integriteta RNA sta kritična elementa za skupen uspeh analiz, ki temeljijo na RNA. Integriteta uporabljene RNA ima še posebej pomen pri kvantitativnem RT-PCR, mikromrežah, in situ hibridizaciji, RNA mapiranju, in vitro translaciji, izdelavi cDNA knjižnice itd. (Fleige in Pfaffl, 2006).

Kvaliteta izolirane RNA je variabilna saj je RNA v takem primeru nestabilna. Še posebej so na razgradnjo občutljivi do 10 kb dolgi mRNA fragmenti. To se lahko zgodi med delom z RNA vzorci z vnosom RNaz. Zato je potrebna posebna pozornost pri izolaciji in pripravi celotne RNA; upoštevati je potrebno naslednja merila:

- odsotnost proteinov (absorbanca 260nm/280nm)
- odsotnost genske DNA
- odsotnost encimskih inhibitorjev za RT in PCR reakcije, ki je odvisna od ustreznosti metode izolacije RNA
- odsotnost substanc, ki bi se vezale na bistvene kofaktorje reakcije ( $\text{Mg}^{2+}$  ali  $\text{Mn}^{2+}$ )
- odsotnost nukleaz za daljše shranjevanje (Fleige in Pfaffl, 2006)

Seveda pa so tukaj še druge težave kot na primer izvor RNA, tehnike vzorčenja (materiali biopsij, vzorčenje enojne celice, laserska mikro-disekcija) kot tudi tehnike izolacije RNA, ki so od laboratorija do laboratorija različne (Fleige in Pfaffl, 2006).

Običajne metode niso dovolj občutljive ali dovolj specifične za enoverižno RNA in so izpostavljene motnjam zaradi kontaminantov, ki so prisotni v vzorcu.



RNA integriteto se lahko oceni z različnimi metodami: s klasičnim gelskim merjenjem optične gostote, s pomočjo modernega NanoDropa, s staromodno denaturirajočo agarozno gelsko elektroforezo ali z visoko inovativno »lab-on-chip« tehnologijo kot sta Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA) in Experion (Bio-Rad Laboratories, ZDA) (Fleige in Pfaffl, 2006).

### 5.1.3 Izražanje nekaterih mikro RNA v jetrih

Primerjali smo izražanje jetrno specifične mikro RNA *miR-122a* in ostalih mikro RNA (*miR-126*, *miR-136* in *miR-181a*) v jetrnih bolnikov okuženih z različnimi genotipi glede na genotip 1 HCV, ki je v Sloveniji najbolj pogost.

Dokazali smo, da se vse štiri izbrane mikro RNA izražajo v jetrih pri različnih genotipih virusa HCV. Dokazali smo tudi, da je izražanje izbranih miRNA glede na genotip HCV različno. Izražanje *miR-122a* se zvišuje pri genotipih 1a, 1b in 3 (~1,27, 1,44 in 1,95-krat) v primerjavi z genotipom 1 HCV.

Najpomembnejša ugotovitev je bila, da se *miR-126* drugače izraža glede na genotip HCV, in sicer zvišano izražanje smo opazili pri genotipu 1b (~1,7-krat) in statistično značilno zvišano izražanje pri genotipih 1a (~1,79-krat,  $p=0,038$ ) in 3 (~5,15-krat,  $p=0,05$ ) glede na genotip 1 HCV. Vloga *miR-126* v jetrih še ni dokazana, domnevamo lahko le da je ta mikro RNA, ki sodeluje v imunskem odgovoru, zvišano izražena pri genotipih 1a, 1b in 3 glede na genotip 1 HCV, ker je genotip 1 najbolj trdovraten glede zdravljenja. Imunski sistem se tako težje spopade z genotipom 1 HCV in ta ostaja v telesu dlje časa.

*miR-136* je pokazala zvišano izražanje pri genotipu 1b in 3 (~2,19 in 1,93-krat), medtem ko pri genotipu 1a ni bilo spremembe v izražanju glede na genotip 1 HCV. Pri *miR-181a* je bilo izražanje znižano pri genotipu 1a (~0,88-krat) in zvišano pri genotipu 3 (~4,9-krat), pri genotipu 1b pa ni bilo sprememb v izražanju glede na genotip 1 HCV.

Zvišano izražanje vseh štirih mikro RNA pri uživalcih drog glede na druge etiologije bi lahko razložili s tem, da imajo uživalci drog večjo verjetnost, da so izpostavljeni različnim okužbam in tako večjo verjetnost za oslabilen imunski sistem. Zvišano izražanje *miR-122a* kaže na to, da se virus bolj pomnožuje, vnetni *miR-126* in *miR-181a* pa sta povečano izraženi ravno zaradi boja proti virusu.

Chandrasekar in Dreyer (2009) sta pokazala, da mikro RNA regulirajo nekatere aksonske molekule, ki so vključene v odvisnost s kokainom. Dokazala sta tudi, da je po uživanju kokaina raven izražanja *miR-181a* zvišana. *miR-181a* ima tarčna mesta na vsaj štirih genih, ki so supresirani od kokaina. Kokain močno inducira *miR-181a* v srednjih možganih. Te raziskave kažejo na to, da so lahko za zlorabo drog krivi mehanizmi utišanja genov z mikro RNA (Chandrasekar in Dreyer, 2009).

S temi ugotovitvami lahko tako razložimo povečano izražanje *miR-181a* pri uživalcih drog glede na druge etiologije.

Pri uživalcih drog se pri genotipu 3 HCV zvišano izraža *miR-181a* glede na druge etiologije saj je ta genotip v tej populaciji najbolj pogost. Razlike niso statistično značilne. Pri primerjavi glede na spol nismo dobili statistično značilnih sprememb.

Pri primerjavi glede na spol in genotip pa smo dobili statistično značilno zvišano izražanje *miR-122a* pri ženskah pri genotipih 1 (~2,25-krat,  $p=0,042$ ) in 1b (~2,98-krat,  $p=0,028$ ) HCV glede na moške.

*miR-181a* je vključena tudi v možganske bolezni kot je shizofrenija (Chandrasekar in Dreyer, 2009). V naši raziskavi je bilo izražanje *miR-181a* zvišano pri ženskah pri vseh genotipih razen pri genotipu 1a HCV. K shizofreniji pa so bolj nagnjeni moški in tako lahko domnevamo, da je pri tej bolezni raven izražanja *miR-181a* znižana (Kocmur, 2010).

## 5.2 SKLEPI

- *miR-122a*, *miR-126*, *miR-136* in *miR-181a* se izražajo v vzorcih jetrnih biopsij fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafinu
- Obstajajo razlike v izražanju vseh štirih mikro RNA glede na genotip HCV
- Zvišano izražanje *miR-126* pri genotipih 1a in 3 glede na genotip 1 HCV je statistično značilno
- mikro RNA se različno izražajo tudi glede na etiologijo okužbe s HCV
- obstajajo razlike v izražanju mikro RNA glede na genotip in etiologijo
- mikro RNA se različno izražajo tudi glede na spol
- izražanje mikro RNA je različno glede na spol in genotip HCV
- Zvišano izražanje *miR-122a* pri genotipih 1 in 1b pri ženskah glede na moške je statistično značilno

Tako raznolike rezultate je seveda potrebno upoštevati pri programiranju novih načinov zdravljenja okužb s HCV.

## 6 POVZETEK

HCV je glavni vzrok za razvoj kroničnega hepatitisa in jetrnoceličnega raka. Trenutno ni dostopnega nobenega cepiva proti HCV in več raziskovalcev je uporabilo miRNA pristope kot tarčo za HCV replikacijo. HCV spada v družino *Flaviviridae* in ima 9,6 kb dolg RNA genom. Ker ne obstaja nobenega sistema celičnih kultur za HCV replikacijo, so raziskovalci v vseh študijah uporabljali replikonske sisteme Huh-7 celic kot model podvojevanja HCV. Ti replikoni podpirajo HCV RNA transkripcijo in sintezo proteinov vendar ne podpirajo sinteze kužnih virusov. Tarčne regije so: ohranjene regije v kapsidi, NS3, NS4A7B, NS5B in 5' UTR. 5' UTR regija HCV RNA je potencialno dobra tarča, ker je najbolj ohranjena regija HCV genoma in vsebuje IRES zaporedje, ki je nujno za translacijo (Haasnoot in Berkhout, 2006).

Mikro RNA so kratke nekodirajoče RNA, ki so vključene v post-transkripcijsko utišanje genov. Poznavanje njihove vloge pri okužbah s HCV, bi lahko pripomoglo k razvoju novih ali izboljšavo obstoječih metod zdravljenja pri okužbah s HCV.

V diplomskem delu smo delali z vzorci jetrnih biopsij fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin. Le redki znanstveniki so uporabljali take vzorce saj naj bi bil donos RNA iz takih vzorcev nizek. Naši rezultati pa kažejo, da so lahko raziskave opravljene na FFPE vzorcih tudi smiselne za analize izražanja miRNA.

V raziskavo smo vključili 65 biopsijskih vzorcev jeter bolnikov okuženih z različnimi genotipi HCV. Uporabili smo naslednje molekularne tehnike: izolacijo RNA iz parafinskih vzorcev in analizo izražanja miRNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. S pristopi bioinformatike smo predpostavljali ciljne gene za izbrane miRNA.

Primerjava izražanja jetrno specifične *miR-122a* in ostalih *miR-126*, *miR-136* ter *miR-181a* v jetrih bolnikov okuženih z različnimi genotipi virusa hepatitisa C kaže, da so analizirane miRNA vključene v patogenezo HCV kar do sedaj za *miR-126*, *miR-136* in *miR-181a* še ni bilo dokazano.

V jetrih bolnikov okuženih s HCV smo pokazali, da so se vse 4 izbrane mikro RNA izražale v FFPE vzorcih jeter pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi virusa HCV, in, da je izražanje izbranih miRNA glede na genotip HCV različno. V primerjavi z genotipom 1 HCV smo opazili; da je bilo izražanje *miR-122a* višje pri genotipih 1a, 1b in 3 (~1,27, 1,44 in 1,95-krat), da je izražanje *miR-126* zvišano pri genotipu 1b (~1,7-krat) in statistično značilno zvišano pri genotipih 1a in 3 (~1,79 in 5,15-krat); *miR-136* je pokazala zvišano izražanje pri genotipu 1b in 3 (~2,19 in 1,93-krat), medtem ko pri genotipu 1a ni bilo spremembe v izražanju; pri *miR-181a* je bilo izražanje znižano pri genotipu 1a (~0,88-krat) in zvišano pri genotipu 3 (~4,9-krat), pri genotipu 1b pa ni bilo sprememb v izražanju. Dokazali smo zvišano izražanje vseh štirih mikro RNA pri primerjavi med uživalci drog glede na druge etiologije in pri primerjavi med ženskami glede na moške.

Pri primerjavi glede na spol in genotip smo dobili statistično značilno zvišano izražanje *miR-122a* pri ženskah pri genotipih 1 (~2,25-krat) in 1b (~2,98-krat) HCV glede na moške, statistično zvišano izražanje *miR-126* pri genotipih 1a in 3 v primerjavi z genotipom 1 HCV in statistično zvišano izražanje *miR-122a* pri genotipih 1 in 1b HCV pri ženskah v primerjavi z moškimi.

V bodoče bi morda lahko v raziskave vključili čim večje število mikro RNA, najprej preverili izražanje miRNA v zdravem tkivu nato izzvali bolezensko stanje ter ponovno preverili ekspresijski profil miRNA v primeru bolezni. Vendar pa pri tem obstajajo številne zanke saj je trenutno več kot 700 odkritih mikro RNA, nekateri opisujejo, da jih je verjetno več kot 1000. Mnogim od miRNA pa še niso uspeli določiti funkcije in pomena. Za njihove vloge, morebitno uporabo v diagnostiki in pri zdravljenju pa so potrebne nadaljnje raziskave.

## 7 VIRI

- Agilent Technologies. 2008. Agilent small RNA kit guide. Santa Clara, Agilent Technologies: 32 str.
- Baebler Š. 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y<sup>NTN</sup>. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 109 str.
- Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S., Sander C. 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*, 36, Database issue: D149-D153  
<http://www.microrna.org/microrna/home.do> (24.7.2008): 1 str.
- Boštjančič E., Glavač D. 2008. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, 17, 3: 95-102
- Brass V., Berke J.M., Montserret R., Blum H.E., Penin F., Moradpour D. 2008. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 38: 14545-14550
- Brooks G.F., Butel J.S., Ornston L.N. 1998. Hepatitis viruses. V: Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 21<sup>st</sup> ed. Norwalk, Appleton & Lange: 425-443
- Brown R.S.Jr, Gaglio P.J. 2003. Scope of worldwide hepatitis C problem. *Liver Transplantation*, 9, 11, Suppl. 3: S10-S13
- Bustin S.A. Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34, 3: 597-601
- CDC. 2009. Hepatitis C FAQs for the public. Atlanta, CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 9.junij 2009  
<http://www.cdc.gov/hepatitis/C/cFAQ.htm#overview> (2. julij 2009): 1 str.
- Chandrasekar V., Dreyer J.L. 2009. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 42, 4: 350-362
- Chang J., Guo J.T., Jiang D., Guo H., Taylor J.M., Block T.M. 2008. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus nonhepatic cells. *Journal of Virology*, 82, 16: 8215-8223
- Chew C.F. 2009. Towards an atomic model of the Hepatitis C virus p7. *Biophysical Journal*, 96, 3, Suppl. 1: 432a-432a

- Coulouarn C., Factor V.M., Andersen J.B., Durkin M.E., Thorgeirsson S.S. 2009. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*, 28, 40: 3526-3536
- Czepiel J., Biesiada G., Mach T. 2008. Viral hepatitis C. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 118, 12: 734-740
- De Francesco R. 1999. Molecular virology of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 31, Suppl. 1: 47-53
- Doleshal M., Magotra A.A., Choudhury B., Cannon B.D., Labourier E., Szafranska A.E. 2008. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10, 3: 203-211
- Drinovec B. 2002. Poimenovanje in razvrstitev virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-21
- Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008. 2009. Letno poročilo. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije in Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 74-74
- Fleige S., Pfaffl M.W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2: 126-139
- Fornari F., Gramantieri L., Giovannini C., Veronese A., Ferracin M., Sabbioni S., Calin G.A., Grazi G.L., Croce C.M., Tavolari S., Chieco P., Negrini M., Bolondi L. 2009. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Research*, 69, 14: 5761-5767
- Gramantieri L., Ferracin M., Fornari F., Veronese A., Sabbioni S., Liu C.G., Calin G.A., Giovannini C., Ferrazzi E., Grazi G.L., Croce C.M., Bolondi L., Negrini M. 2007. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 67, 13: 6092-6099
- Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., Enright A.J. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36, Database issue: D154-D158  
<http://www.mirbase.org/> (5.10.2009): 1 str.
- Haasnoot J., Berkhout B. 2006. RNA interference: Its use as antiviral therapy. V: RNA towards medicine. Handbook of experimental pharmacology. Erdmann V., Barciszewski J., Brosius J. (eds.). Berlin, Springer: 117-150
- Haqshenas G., Dong X., Ewart G., Bowden S., Gowans E.J. 2007. A 2a/1b full-length p7 inter-genotypic chimeric genome of hepatitis C virus is infectious in vitro. *Virology*, 360, 1: 17-26

- Henke J.I., Goergen D., Zheng J., Song Y., Schüttler C.G., Fehr C., Jünemann C., Niepmann M. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO Journal*, 27, 24: 3300-3310
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije. Teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 34-35
- Ishida S., Kaito M., Kohara M., Tsukiyama-Kohora K., Fujita N., Ikoma J., Adachi Y., Watanabe S. 2001. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Research*, 20, 3: 335-347
- Jones C.T., Murray C.L., Eastman D.K., Tassello J., Rice C.M. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*, 81, 16: 8374-8383
- Kocmur H. 2010. Oni se bolje znajdejo v prostoru, one med ljudmi. Kako delujejo ženski in moški možgani. *NeDELO*, 16, 3: 6-7
- Koren S., Poljak M. 2002. Kemoterapija virusnih bolezni. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 143-154
- Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K.C., Stoffel M., Rajewsky N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37, 5: 495-500  
<http://pictar.mdc-berlin.de/> (september 2009): 1 str.
- Lai C.K., Jeng K.S., Machida K., Lai M.M. 2008. Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *Journal of Virology*, 82, 17: 8838-8848
- Li Q.J., Chau J., Ebert P.J., Sylvester G., Min H., Liu G., Braich R., Manoharan M., Soutschek J., Skare P., Klein L.O., Davis M.M., Chen C.Z. 2007. Mir-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 129, 1:147-161
- Lin C.J., Gong H.Y., Tseng H.C., Wang W.L., Wu J.L. 2008. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, 3: 315-320
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Luo G., Xin S., Cai Z. 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*, 77, 5: 3312-3318

- Lupberger J., Brino L., Baumert T.F. 2008. RNAi: a powerful tool to unravel hepatitis C virus-host interactions within the infectious life cycle. *Journal of Hepatology*, 48, 3: 523-525
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice Hall: 851-851
- Marolt-Gomišček M. 2002. Hepatitis. V: *Infekcijske bolezni 2*. Ljubljana, Tangram: 327-353
- Masotti A., Caputo V., Prudente S., Bottazzo G.F. 2010. Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 bioanalyzer. Application note. Santa Clara, Agilent Technologies: 6 str. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-5215EN.pdf>
- Matičič M. 2008. Tihi ubijalec. *Lepa in zdrava*, 5, 7: 62-64
- Mindikoglu A.L., Miller R.R. 2009. Hepatitis C in the elderly: Epidemiology, natural history, and treatment. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7, 2: 128-134
- Moradpour D., Brass V., Gosert R., Wölk B., Blum H.E. 2002. Hepatitis C: Molecular virology and antiviral targets. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 10: 476-482
- Murakami Y., Aly H.H., Tajima A., Inoue I., Shimotohno K. 2009. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *Journal of Hepatology*, 50, 3: 453-460
- Nakajima H., Cocquerel L., Kiyokawa N., Fujimoto J., Levy S. 2005. Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with CD81 large extracellular loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, 4: 1091-1100
- Osna N.A., White R.L., Krutik V.M., Wang T., Weinman S.A., Donohue T.M.Jr. 2008. Proteasome activation by hepatitis C core protein is reversed by ethanol-induced oxidative stress. *Gastroenterology*, 134, 7: 2144-2152
- Pan Q.W., Henry S.D., Scholte B.J., Tilanus H.W., Janssen H.L., van der Laan L.J. 2007. New therapeutic opportunities for hepatitis C based on small RNA. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 33: 4431-4436
- Pawlotsky J.M. 2006. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *Journal of Hepatology*, 44, Suppl. 1: S10-S13
- Pawlotsky J.M., Chevaliez S., McHutchison J.G. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target of new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 132, 5: 1979-1998
- Pedersen I.M., Cheng G., Wieland S., Volinia S., Croce C.M., Chisari F.V., David M. 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 449, 7164: 919-922



- Penin F., Dubuisson J., Rey F.A., Moradpour D., Pawlotsky J.M. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 39, 1: 5-19
- Pérez-Berná A.J., Guillén J., Moreno M.R., Gómez-Sánchez A.I., Pabst G., Laggner P., Villalaín J. 2008. Interaction of the most membranotropic region of the HCV E2 Envelope glycoprotein with membranes. Biophysical characterization. *Biophysical Journal*, 94, 12: 4737-4750
- Poljak M., Seme K., Babič D.Z. 2006. Virus hepatitisa C. V: Spolno prenosljive okužbe. III. Spominski sestanek prof. Dr. Lidije Andolšek-Jeras, Ljubljana, 8. dec. 2006. Bokal E.V., Jančar N. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za reproduktivno medicino: 42-44
- Premkumar A., Wilson L., Ewart G.D., Gage P.W. 2004. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Letters*, 557, 1: 99-103
- Qiagen. 2006a. Critical factors for successful real-time PCR. Hilden, Qiagen: 48 str.
- Qiagen. 2006b. RNeasy FFPE handbook. For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Hilden, Qiagen: 28 str.
- Qiagen. 2007. miScript system handbook. Hilden, Qiagen: 40 str.
- Qiu P., Cai X.Y., Ding W., Zhang Q., Norris E.D., Greene J.R. 2009. HCV genotyping using statistical classification approach. *Journal of Biomedical Science*, 16:62, doi: 10.1186/1423-0127-16-62: 9 str.
- Rosenberg S. 2001. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *Journal of Molecular Biology*, 313, 3: 451-464
- Sarasin-Filipowicz M., Krol J., Merkiewicz I., Heim M.H., Filipowicz W. 2009. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nature Medicine*, 15, 1: 31-33
- Seme K., Vrhovac M., Močilnik T., Maticič M., Lešničar G., Baklan Z., Meglič Volkar J., Rajter M., Štepec S., Lunar M., Poljak M. 2009. Hepatitis C virus genotypes in 1,504 patients in Slovenia, 1993-2007. *Journal of Medical Virology*, 81, 4: 634-639
- Shackel N.A., Patel K., McHutchison J. 2009. Diagnosis, management and disease mechanisms of hepatitis in the era of genomic medicine. *Genomic and personalized medicine*. Willard H.F., Ginsburg G.S. (eds.). San Diego, Elsevier: 1375-1389
- Shan Y., Zheng J., Lambrecht R.W., Bonkovsky H.L. 2007. Reciprocal effects of microRNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes. *Gastroenterology*, 133, 4: 1166-1174

- Shi L., Cheng Z., Zhang J., Li R., Zhao P., Fu Z., You Y. 2008. Hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Research*, 1236: 185-193
- Shomron N., Levy C. 2009. MicroRNA-biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article number 594678, doi: 10.1155/2009/594678: 6 str.
- Sillanpää M., Melén K., Porkka P., Fagerlund R., Nevalainen K., Lappalainen M., Julkunen I. 2009. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virology Journal*, 6:84, doi: 10.1186/1743-422X-6-84: 12 str.
- SPSS for Windows Documentation. 2007. SPSS 16.0 Algorithms. Chicago, SPSS Inc., an IBM Company Headquarters: 975 str.
- Sri-Widada J., Liautard J.P., Assens C., Brunel C. 1981. Primary structure identification of snRNAs present in highly purified snRNPs from HeLa cells. *Molecular Biology Reports*, 8,1: 29-36  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/174943?report=genbank> (5.10.2009): 1 str.
- Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 12: 1200-1212
- Szabo G., Dolganiuc A. 2008. Hepatitis C core protein – The »core« of immune deception? *Journal of Hepatology*, 48, 1: 8-11
- Šumak I. 2006. Zdravstvena nega infekcijskega bolnika. Učbenik za srednje zdravstvene šole za program tehnik zdravstvene nege pri predmetu zdravstvena nega in prva pomoč – zdravstvena nega infekcijskega bolnika v 4.letniku. 1.izd. Maribor, Založba Pivec: 116-117
- Toplak N. 2006. Proučevanje molekularnih mehanizmov odpornosti proti virusu PVY<sup>NTN</sup> v gensko spremenjenih rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor'. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 194 str.
- UKC. 2009. Anonimno brezplačno testiranje na okužbo z virusoma hepatitisa B in C. Ljubljana, UKC-Univerzitetni klinični center Ljubljana. 20. maj 2009  
<http://www3.kclj.si/index.php?m=5&s=6&id=378&d=0> (29. junij 2009): 1 str.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 3: 151-159
- Varnholt H., Drebber U., Schulze F., Wedemeyer I., Schirmacher P., Dienes H.P., Odenthal M. 2008. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47, 4: 1223-1232

- von Ahlfen S., Missel A., Bendrat K., Schlumpberger M. 2007. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS ONE*, 2, 12: e1261, doi: 10.1371/journal.pone.0001261: 7 str.
- Wang S., Aurora A.B., Johnson B.A., Qi X., McAnally J., Hill J.A., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. 2008. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental Cell*, 15, 2: 261-271
- Webster D.P., Klenerman P., Collier J., Jeffery K.J. 2009. Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 2: 108-117
- WHO. 2009. Hepatitis C. Geneva, WHO-World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (2. julij 2009): 1 str.
- Wolf M., Dimitrova M., Baumert T.F., Schuster C. 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Research*, 36, 9: 3054-3064
- Xiao F., Zuo Z., Cai G., Kang S., Gao X., Li T. 2009. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 37, Database issue: D105-D110  
<http://mirecords.umn.edu/miRecords/> (september 2009): 1 str.
- Zhang J., Du Y.Y., Lin Y.F., Chen Y.T., Yang L., Wang H.J., Ma D. 2008. The cell growth suppressor, miR-126, targets IRS-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 136-140
- Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2005. Navodila za vaje iz predmeta mikrobna genetika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 56-56

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok se zahvaljujem za sprejeto mentorstvo in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem somentorju prof. dr. Damjanu Glavaču za vse napotke, dosledno pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Tatjani Avšič-Županc za recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Boštjanu Luzarju za dostop ter pomoč pri izbiri vzorcev, za pregled in popravke diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem dr. Emanueli Boštjančič za potrpežljivost, vodenje in nesebično pomoč tako pri praktičnem laboratorijskem delu kot pri pripravi diplomske naloge. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim Oddelka za molekularno genetiko za strokovno pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi svojim staršema za vso podporo tekom študija.

Danielu se zahvaljujem za vse vzpodbudne besede, pomoč in podporo.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in najboljši cimri Tjaši za prijetnejše prebivanje skozi študij.

Na koncu se zahvaljujem še fantastičnim štirim (Brigiti, Petri, Tadeju in Tanji) brez katerih lepih spominov na faks sploh ne bi bilo.

## PRILOGE

Priloga A: Biopsijski vzorci jeter bolnikov okuženih s HCV, ki smo jih testirali:

Vzorci po letih	Etiologija	Genotip	Ostalo	Vzorci po letih	Etiologija	Genotip
2003				2006		
Vzorec 1/03	N	1a	astmatični bronhitis	Vzorec 11/06	N	3
Vzorec 2/03	N	3		Vzorec 12/06	N	3
Vzorec 3/03	?	1a/1b		Vzorec 13/06	N	1
Vzorec 4/03	N	1a		2007		
Vzorec 5/03	?	1a		Vzorec 1/07	transf	1b
Vzorec 6/03	transf	3		Vzorec 2/07	N	1a
Vzorec 7/03	?	1b		Vzorec 3/07	N, alkohol	3
Vzorec 8/03	transf	1b		Vzorec 4/07	delo	3
Vzorec 9/03	?	1b		Vzorec 5/07	N	1
Vzorec 10/03	?	3		Vzorec 6/07	?	1b
Vzorec 11/03	?	2b		Vzorec 7/07	N, sex, pretep	3
2004				Vzorec 8/07	N	1a
Vzorec 1/04	N	1a		Vzorec 9/07	N, sex	1a
Vzorec 2/04	N	3	prebolel zlatenico	Vzorec 10/07	operacija	1b
Vzorec 3/04	N	3				
Vzorec 4/04	N	1				
Vzorec 5/04		1b				
Vzorec 6/04		2a/2c				
Vzorec 7/04		1				
Vzorec 8/04	transpl	2				
Vzorec 9/04	N	3				
Vzorec 10/04		1b	prebolel hep B			
Vzorec 11/04		1				
Vzorec 12/04		4				
Vzorec 13/04	N	1a				
Vzorec 14/04		1a				
Vzorec 15/04		2b				
2005						
Vzorec 1/05	alkohol	3	prebolel hep B			
Vzorec 2/05	N, alkohol	1a				
Vzorec 3/05	sex	1b				
Vzorec 4/05	N	1a/1b				
Vzorec 5/05	N, sex	3				
Vzorec 6/05	sex	1a				
Vzorec 7/05	alkohol, krvodajalstvo	1b				
Vzorec 8/05	transf	1b				
Vzorec 9/05	N	1a				
Vzorec 10/05		1				
Vzorec 11/05	N	1				
Vzorec 12/05		1	HIV			
Vzorec 13/05	?	3				
Vzorec 14/05		2				
Vzorec 15/05	?	1				
Vzorec 16/05		1				
2006						
Vzorec 1/06	transf	1b				
Vzorec 2/06	N	1				
Vzorec 3/06		2a/2c				
Vzorec 4/06	N	1a				
Vzorec 5/06	N	1a				
Vzorec 6/06	N	3				
Vzorec 7/06	N	1b				
Vzorec 8/06		1				
Vzorec 9/06	?	1b				
Vzorec 10/06	?	1a				

Legenda:

N	Droga
Transf	Transfuzija
Transpl	Transplantacija
Sex	Rizični spolni odnosi
Delo	Okužba med delom
?	Neznana etiologija

Vzorci so zaradi varovanja osebnih podatkov drugače označeni.