

Uniwersytet Szczeciński

Instytut Biologii

Ewa Ostrycharz-Jasek/magister

**Ekspresja wybranych cząsteczek mikroRNA i ich genów docelowych w zakażeniu*****Lagovirus europaeus* – genotypami GI.1 i GI.2**

promotor: dr hab. Beata Hukowska-Szematowicz, prof. US

**Streszczenie rozprawy doktorskiej**

*Lagovirus europaeus* (*L. europaeus*) to wirus wywołujący ciężką chorobę u królików zwaną krwotoczną chorobą królików (RHD) i należy do rodzaju *Lagovirus*, rodziny *Caliciviridae*. W obrębie *L. europaeus* związanego z RHD wyróżniono dwa genotypy – GI.1 (RHDV) i GI.2 (RHDV2). Zakażenie *L. europaeus* prowadzi do zmian patologicznych w wątrobie, płucach, nerkach i śledzionie, przypominających ostrą niewydolność wątroby i niewydolność wielonarządową u ludzi.

MikroRNA (miR) to małe, niekodujące RNA o długości 17–25 nukleotydów, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. MiR mogą regulować ekspresję genów związanych z procesami biologicznymi zachodzącymi podczas chorób, a tym samym wpływać na aktywność szlaków sygnałowych. Dysregulacja ekspresji lub funkcji miR może prowadzić do zaburzeń ekspresji genów, co przyczynia się do patologii chorób. Wczesniejsze badania wykazały, że kluczową rolę w patogenezie RHD (wywołaną zakażeniem *L. europaeus*) odgrywa apoptoza, stres oksydacyjny oraz elementy wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Ekspresja miR gospodarza i ich wpływ na regulację krytycznych genów docelowych zaangażowanych w procesy biologiczne może odgrywać znaczącą rolę w patogenezie chorób o etiologii wirusowej. Jak dotychczas, w literaturze naukowej brakuje danych dotyczących molekularnych sygnatur regulacyjnych interakcji między miR, a apoptozą, stresem oksydacyjnym oraz wrodzoną odpowiedzią immunologiczną i zapalną w zakażeniu *L. europaeus*, patogenezie RHD. Stąd ten problem naukowy stał się celem badań podjętych w rozprawie doktorskiej. Materiał do badań stanowiły tkanki wątroby, płuc, nerek i śledziony

pobrane po eutanazji od królików zdrowych oraz pośmiertnie lub po eutanazji od królików eksperymentalnie zakażonych *L. europaeus* genotypem GI.1 i *L. europaeus* genotypem GI.2.

W celu wyboru miR oraz selekcji i przewidywania docelowych genów dla miR zaangażowanych w procesy biologiczne zachodzące w zakażeniach wirusowych posłużono się dogłębną analizą literatury oraz metodami *in silico* z wykorzystaniem baz danych dedykowanych do pracy z miR. W celu zbadania wybranych kluczowych miR i ich genów docelowych zaangażowanych w apoptozę, stres oksydacyjny oraz wrodzoną odpowiedź immunologiczną i zapalną w zakażeniu *L. europaeus* dwoma genotypami – GI.1 i GI.2 w czterech tkankach (wątrobie, płucach, nerkach i śledzionie) wykorzystano metody z zakresu biologii molekularnej w postaci pomiaru ekspresji miR i genów docelowych. Takie samo podejście metodyczne wykorzystano do zbadania biomarkerów apoptozy, stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego. Dla apoptozy wybrano: miR-21 (*PTEN, PDCD4*), miR-16b (*Bcl-2, CXCL10*) oraz miR-34a (*p53, SIRT1*); dla stresu oksydacyjnego: miR-132 (*Nrf-2*) i miR-122 (*Bach1*); dla wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i zapalnej: miR-155 (*MyD88, TAB2, p65, NLRP3*), miR-146a (*IRAK1, TRAF6*), miR-223 (*TLR4, IKK $\alpha$ , NLRP3*) oraz miR-125b (*NLRP3*). Dodatkowo zbadano na poziomie mRNA biomarkery apoptozy (*Bax*, stosunek *Bax/Bcl-2, PARP, kaspazę-3*), stresu oksydacyjnego (*HO-1*) oraz stanu zapalnego (*IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-18*) w wątrobie, płucach, nerkach i śledzionie po zakażeniu *L. europaeus* genotypami – GI.1 i GI.2.

W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy, wykazano, że podczas zakażenia *L. europaeus*/GI.1 i GI.2 dochodzi do zmian ekspresji miR-21, miR-16b i miR-34a zaangażowanych w proces apoptozy. MiR-16b i miR-34a mogą wpływać na nasilenie apoptozy w badanych narządach, a z drugiej strony hamować, co obserwowano w przypadku miR-21. Na podstawie zbadanych biomarkerów apoptozy *Bax* i stosunku *Bax/Bcl-2* można wysnuć wniosek, że proces apoptozy był silniej wyrażony po zakażeniu królików *L. europaeus*/GI.2. MiR-122 i miR-132 regulują dwa szlaki stresu oksydacyjnego w patogenezie RHD, wywołanej zakażeniem *L. europaeus*/GI.1 i GI.2 związane z uszkodzeniem tkanek. Biomarker *HO-1* w RHD wskazuje na oksydacyjne uszkodzenie tkanek. Wykazano, że głównymi regulatorami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i zapalnej w zakażeniu *L. europaeus* /GI.1 i GI.2 są miR-155, miR-223 i miR-146a. Ekspresja miR-125b była ograniczona i dotyczyła wątroby i śledziony. Wykazano, że podczas zakażenia *L. europaeus*/GI.1 i GI.2 miR-155 ma działanie pro- i przeciwzapalne w wątrobie, jak i działanie przeciwzapalne w nerkach i śledzionie; miR-146a ma działanie przeciwzapalne w wątrobie, płucach i nerkach; miR-223 ma działanie przeciwzapalne we wszystkich tkankach; miR-125b ma działanie przeciwzapalne tylko

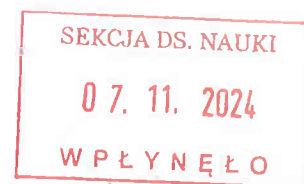
w wątrobie. W każdym przypadku taki efekt może być wyznacznikiem patogenezы RHD. MiR mogą regulować wrodzone szlaki odpowiedzi immunologicznej i zapalnej w zakażeniu *L. europaeus*, a na wynik tej regulacji może mieć wpływ mikrośrodowisko tkankowe. W badaniach po raz pierwszy przedstawiono profil ekspresji biomarkerów stanu zapalnego (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *IL-18*) na poziomie mRNA w czterech tkankach po zakażeniu *L. europaeus*/GI.1 i GI.2. W efekcie czego zaproponowano trzy profile zapalenia (płucny, nerkowy oraz wątrobowo-śledzionowy) w odpowiedzi na zakażenie *L. europaeus*/GI.1 i GI.2.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej istotnie pogłębiły wiedzę dotyczącą patogenezы RHD (wywołanej zakażeniem *L. europaeus* dwoma genotypami – GI.1 i GI.2) z uwzględnieniem mikrośrodowiska tkankowego wątroby, płuc, nerek i śledziony. Przyczyniły się do częściowego poznania roli cząsteczek miR w zakażeniu *L. europaeus* i dostarczyły nowych danych pozwalających lepiej zrozumieć patogenezę RHD w zakresie molekularnej regulacji, apoptozy, stresu oksydacyjnego oraz wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i zapalnej przez miR.

7.11.2026  
Ewa Ostycka-Jasek

**Słowa kluczowe:** *Lagovirus europaeus*/GI.1, *Lagovirus europaeus*/GI.2, wirus krwotocznej choroby królików (RHDV), krwotoczna choroba królików (RHD), mikroRNA, ekspresja genów, apoptoza, stres oksydacyjny, wrodzona odpowiedź immunologiczna, zapalenie, biomarker, królik.

University of Szczecin  
Institute of Biology



**Ewa Ostrycharz-Jasek/master**

**Expression of selected microRNA molecules and their target genes  
in *Lagovirus europaeus* infection –GI.1 and GI.2 genotypes**

supervisor: dr hab. Beata Hukowska-Szematowicz, prof. US

**Summary of doctoral dissertation**

*Lagovirus europaeus* (*L. europaeus*) is a virus that causes severe disease in rabbits called rabbit hemorrhagic disease (RHD) and belongs to the genus *Lagovirus*, the family *Caliciviridae*. Two genotypes of *L. europaeus* associated with RHD have been distinguished: GI.1 (RHDV) and GI.2 (RHDV2). Infection with *L. europaeus* leads to pathological changes in the liver, lungs, kidneys, and spleen, resembling acute liver failure and multi-organ failure in humans.

MicroRNAs (miRs) are small, non-coding RNAs of 17–25 nucleotides in length, that regulate gene expression at the post-transcriptional level. MiRs can regulate the expression of genes related to biological processes occurring during diseases and thus affect the activity of signaling pathways. Dysregulation of miR expression or function can lead to gene expression disorders, contributing to disease pathology. Previous studies have shown that apoptosis, oxidative stress and elements of innate and adaptive immune and inflammatory responses play a key role in the pathogenesis of RHD (induced by *L. europaeus* infection). The expression of host miRs and their influence on the regulation of critical target genes involved in biological processes may play a significant role in the pathogenesis of viral diseases. So far, there is a lack of data in the scientific literature on the molecular regulatory signatures of interactions between miRs and apoptosis, oxidative stress, and innate immune and inflammatory response in *L. europaeus* infection, RHD pathogenesis. Hence, this scientific problem became the goal of the research undertaken in the doctoral dissertation. The material for the study consisted of

liver, lung, kidney, and spleen tissues collected after euthanasia from healthy rabbits and postmortem or after euthanasia from rabbits experimentally infected with *L. europaeus* genotype GI.1 and *L. europaeus* genotype GI.2.

In order to select miRs and to select and predict target genes for miRs involved in biological processes occurring in viral infections, an in-depth literature analysis and silico methods using databases dedicated to working with miRs were used. In order to examine selected key miRs and their target genes involved in apoptosis, oxidative stress, and innate immune and inflammatory response in *L. europaeus* infection with two genotypes – GI.1 and GI.2 in four tissues (liver, lung, kidney, spleen), molecular biology methods were used in the form of measurement of miR expression and target genes. The same methodological approach was used to examine apoptosis, oxidative stress, and inflammation biomarkers. For apoptosis, the following were selected: miR-21 (*PTEN, PDCD4*), miR-16b (*Bcl-2, CXCL10*) and miR-34a (*p53, SIRT1*); for oxidative stress: miR-132 (*Nrf-2*) and miR-122 (*Bach1*); for innate immune and inflammatory response: miR-155 (*MyD88, TAB2, p65, NLRP3*), miR-146a (*IRAK1, TRAF6*), miR-223 (*TLR4, IKK $\alpha$ , NLRP3*), miR-125b (*NLRP3*). Additionally, biomarkers of apoptosis (*Bax, Bax/Bcl-2* ratio, *PARP, caspase-3*), oxidative stress (*HO-1*), and inflammation (*IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-18*) were examined at the mRNA level in the liver, lungs, kidneys, and spleen after infection with *L. europaeus* genotypes – GI.1 and GI.2.

Our research has unveiled novel insights into the role of miRs in the pathogenesis of RHD during *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection. We observed significant changes in the expression of miR-21, miR-16b, and miR-34a, all of which are involved in the apoptosis process. MiR-16b and miR-34a can influence the intensification of apoptosis in the examined organs and, on the other hand, inhibit it, as observed in the case of miR-21. Based on the examined *Bax* biomarkers and the *Bax/Bcl-2* ratio, it can be concluded that the apoptosis process was more strongly expressed after infection of rabbits with *L. europaeus*/GI.2. MiR-122 and miR-132 were shown to regulate two oxidative stress pathways in the pathogenesis of RHD, caused by *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection associated with tissue damage. The biomarker *HO-1* in RHD indicates oxidative tissue damage. The main regulators of the innate immune and inflammatory response in *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection were shown to be miR-155, miR-223, and miR-146a. The expression of miR-125 was very limited and restricted to the liver and spleen. During *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection, miR-155 was shown to have pro- and anti-inflammatory effects in the liver, as well as anti-inflammatory effects in the kidney and spleen; miR-146a has anti-inflammatory effects in the liver, lung, and kidney; miR-223 has anti-inflammatory effects in all tissues; and miR-125b has anti-inflammatory effects

only in the liver. In each case, such an effect may be a determinant of the pathogenesis of RHD. MiRs may regulate innate immune and inflammatory pathways in *L. europaeus* infection, and the outcome of this regulation may be influenced by the tissue microenvironment. MiRs may regulate innate immune response pathways and inflammation in *L. europaeus* infection, and the outcome of this regulation may be influenced by the tissue microenvironment. The study presented for the first time the expression profile of inflammatory biomarkers (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *IL-18*) at the mRNA level in four tissues after *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection. As a result, three inflammation profiles (pulmonary, renal, and hepato-splenic) were proposed in response to *L. europaeus*/GI.1 and GI.2 infection.

The results obtained during the implementation of this doctoral dissertation significantly deepened the knowledge of the pathogenesis of RHD (caused by *L. europaeus* infection with two genotypes – GI.1 and GI.2), taking into account the tissue microenvironment of the liver, lungs, kidneys, and spleen. They contributed to the partial cognition of the role of miR molecules in *L. europaeus* infection and provided new data allowing for a better understanding of the pathogenesis of RHD in terms of molecular regulation, apoptosis, oxidative stress, and innate immune and inflammatory response by miR.

7.11.2026

Ewa Ostrowska-Jaselska

**Keywords:** *Lagovirus europaeus*/GI.1, *Lagovirus europaeus*/GI.2, rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), rabbit hemorrhagic disease (RHD), microRNA, gene expression, apoptosis, oxidative stress, innate immune response, inflammation, biomarker, rabbit.