# STRESZCZENIE PO POLSKU

**Wpływ polimorfizmu pojedynczego nukleotydu rs868 na wynik przeszczepu wątroby w wirusowym zapaleniu wątroby typu C**

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) jest główną przyczyną przewlekłego zapalenia wątroby, marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego (HCC). W USA i Europie, schyłkowa niewydolność wątroby związana z zakażeniem HCV pozostaje głównym wskazaniem do przeszczepienia wątroby. Dodatkowo, rokowanie u biorców przeszczepu wątroby zakażonych wirusem HCV (HCV+) jest gorsze w związku z powtórnym zakażeniem i zapaleniem przeszczepionej wątroby.

Różnorodność genetyczna odgrywa decydującą rolę w indywidualnie zmiennym przebiegu pooperacyjnym u HCV+ biorców przeszczepu wątroby. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) są najczęstszą formą odmian genetycznych. Liczne opracowania naukowe wykazały korelację między wynikiem przeszczepu wątroby a genotypem SNP biorcy i dawcy. Najlepiej udokumentowanymi SNP korelującymi z przebiegiem pooperacyjnym przeszczepienia wątroby są SNP genu *IL-28B*, enzymów związanych z metabolizmem i farmakokinetyką takrolimusu (*CYP3A4*, *CYP3A5* oraz *MDR1/ABCB1*), genów związanych z podatnością na infekcję po przeszczepieniu (*TLR2*, *TLR4*, *MBL2, NOD2*) oraz ostrym odrzucaniem przeszczepu (*CTLA-4* oraz *HLA-G*).

Zakażenie HCV wiąże się ze znacznie podwyższonym poziomem transformującego czynnika wzrostu β1 (TGF-β1) w surowicy oraz wątrobie. Cytokina ta jest odpowiedzialna za proces włóknienia, wywiera działanie immunosupresyjne oraz pobudza proliferację wirusa. Cytokiny z rodziny TGF-β działają poprzez aktywację receptorów transbłonowych typu I i II (TGFBR1 i TGFBR2). W niniejszej pracy przeprowadzono analizę SNP zlokalizowanych w rejonie 3’UTR genu *TGFBR1* u biorców i dawców przeszczepu wątroby po zakażeniu HCV. Rejon 3’UTR jest miejscem wiązania się cząsteczek microRNA do mRNA. Interakcja microRNA/mRNA wpływa na stabilność cząsteczek mRNA przez co stanowi ważny element potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu. Zmienność genetyczna, w tym SNP w rejonie 3’UTR, może mieć decydujący wpływ na ekspresję genu poprzez modyfikację interakcji microRNA/mRNA. Znaczenie SNP zlokalizowanych w rejonie 3’UTR wykazano na poziomie klinicznym w licznych procesach chorobowych oraz udowodniono ich wpływ na wiązanie microRNA. Cząsteczki microRNA odgrywają istotną rolę w przebiegu zakażenia HCV. Przykładem takiego wpływu jest specyficzny dla hepatocytów miR-122. Cząsteczka miR-122 stabilizuje RNA wirusa HCV poprzez wiązanie z rejonem 5’UTR genomu wirusa HCV i w ten sposób promuje zakażenie. Alternatywnie, interakcja HCV z microRNA komórek gospodarza może być oparta na wpływie na geny szlaków sygnałowych gospodarza i modulację układu immunologicznego, odpowiedzi zapalnej lub włóknienia.

Oczekiwanym wynikiem badania było zidentyfikowanie SNP mających wartość prognostyczną w przebiegu nawrotu zapalenia wątroby typu C po przeszczepieniu wątroby i zbadanie ich biologicznego mechanizmu działania. W tym celu w pierwszym etapie przeprowadzono genotypowanie DNA uzyskanego z archiwalnych bloczków parafinowych 95 par dawców i biorców HCV+ w kierunku dwóch SNP znajdujących się w rejonie 3’UTR genu *TGFBR1* i występujących z częstością >5% w populacji kaukaskiej (rs868 oraz rs334349). Przeprowadzono analizę korelacji genotypu z częstością i nasileniem nawrotu zapalenia wątroby typu C typując allel A SNP rs868 dawcy jako niekorzystny czynnik rokowniczy. Przeprowadzono analizę *in silico* SNP rs868 z wykorzystaniem programu TargetScan potwierdzając przyłączanie się cząsteczek microRNA z rodziny let-7/miR98 do mRNA TGFBR1 w locus tego SNP. Za pomocą plazmidu reporterowego zawierającego gen lucyferazy oraz wklonowany fragment rejonu 3’UTR genu *TGFBR1* obejmujący locus SNP rs868 potwierdzono jego działanie biologiczne w wątrobowej linii komórkowej. W dalszym etapie badania wykorzystując świeżo mrożone próbki biopsji HCV+ biorców przeszczepu wątroby potwierdzono ujemną korelację między microRNA z rodziny let-7/mir-98 a RNA HCV i mRNA TGFBR1. Korelacja ta była znacznie silniejsza i osiągnęła istotność statystyczną u nosicieli allelu G dla SNP rs868. Dodatkowo, pomiędzy poziomem mRNA TGFBR1 oraz HCV RNA zaobserwowano silną dodatnią korelację niezależnie od genotypu. Odnotowano również negatywną korelację między poziomem microRNA let-7/miR98 a histopatologicznymi parametrami stanu zapalnego tylko u nosicieli allelu G dla rs868.

Uzyskane wyniki wskazują na wpływ genotypu rs868 dawcy na przebieg nawrotu zapalenia wątroby typu C po przeszczepieniu wątroby. Allel A tego SNP u dawcy jest allelem niekorzystnym rokowniczo. W świetle przedstawionej literatury oraz biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny cząsteczek microRNA, SNP ten może być wykorzystywany jako nieinwazyjny marker rokowniczy po przeszczepieniu wątroby u pacjentów HCV+ oraz jako czynnik przewidujący wyniki leczenia opartego na technologii microRNA w przyszłości.

.

# STRESZCZENIE PO ANGIELSKU

# The impact of rs868 single nucleotide polymorphism on the course of hepatitis type C recurrence after liver transplantation

HCV infection is one of the main etiologies of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). According to USA and European liver transplantation registries, end-stage liver disease related to HCV infection remains the main indication for liver transplantation (LT). Additionally, the outcome of LT in HCV infected patients (HCV+) is impaired due to the inevitable reinfection and inflammation of the transplanted liver.

Genetic diversity plays a crucial role in the heterogeneity of postoperative course in HCV+ LT recipients. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common form of genetic variation. Many studies identified correlations between recipient and donor SNPs and the outcome of LT. The best documented are the SNPs of *IL-28B* gene, enzymes responsible for tacrolimus metabolism and pharmacokinetics (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *MDR1/ABCB1*), genes related to susceptibility to infection after LT (*TLR2*, *TLR4*, *MBL2, NOD2*) and acute graft rejection (*CTLA-4* and *HLA-G*).

HCV infection leads to significant increase of transforming growth factor β 1 (TGF‑β1) levels in liver and serum. This cytokine is responsible for fibrosis, increase of HCV proliferation and has an immunosuppressive effect. TGF-β cytokines act by binding to their type I and II transmembrane receptors (TGFBR1 and TGFBR2). Single nucleotide polymorphisms located within the 3’UTR region of transforming growth factor type I receptor gene (*TGFBR1)* are the subject of this study*.* 3’UTR region is a docking site for microRNA molecules that bind to mRNA. MicroRNA/mRNA interaction affect mRNA stability and pose an important posttranscriptional gene regulation mechanism. Genome polymorphisms located in the 3’UTR region, and among them SNPs, can modify this interaction and have a significant effect on gene expression. The clinical implications of SNPs located in the 3’UTR region have been proven in numerous diseases and their effect on microRNA/mRNA binding has been demonstrated. MicroRNA molecules, as an important host regulatory factor, play a significant role in HCV infection. The best example is the liver specific miR-122. This molecule binds to the 5’UTR region of HCV genome and stabilizes the HCV RNA leading to infection propagation. Alternatively, HCV/host microRNA interaction can be based on modification of the intracellular signaling pathways of the host cells. This can modify the immunological system, inflammation and fibrosis.

The main expected result of this study was identification of SNPs that can act as non-invasive prognostic makers of the severity of hepatitis C recurrence after liver transplantation and assessment of the biological mechanism of their action. For this purpose in the first stage of the study, 95 pairs of archival paraffin embedded samples of the donor and recipient livers were genotyped for two SNPs located in the 3’UTR region of *TGFBR1* gene that have an incidence of over 5% in Caucasian population (rs868 and rs334349). The genotypes were correlated with the incidence and severity of hepatitis C recurrence and the donor A allele of rs868 SNP was identified as a risk associated allele. The *in silico* analysis of rs868 using the TargetScan software revealed that it is located in the docking site for let-7/miR98 microRNA family within the 3’UTR of TGFBR1 mRNA. A fragment of *TGFBR1* 3’UTR encompassing the rs868 SNP was cloned into a firefly luciferase containing plasmid, in the 3’position in regard to luciferase gene, and the biological effect of rs868 was confirmed in a liver cell line model. In the second stage of the study fresh frozen liver biopsy samples from HCV+ LT recipients were used to confirm a negative correlation between the levels of TGFBR1 mRNA and HCV load with the levels of let-7/miR-98 microRNAs. This correlation was more pronounced and reached statistical significance in the biopsies of rs868 G-allele carriers. Additionally, strong positive correlation was observed between TGFBR1 mRNA and HCV RNA load regardless of rs868 genotype. A negative correlation was also detected between histopathological markers of chronic hepatitis and the levels of let-7/miR-98 microRNAs in the samples derived from rs868 G-allele carriers.

Based on the presented results, the effect of the donor rs868 genotype on the course of hepatitis C recurrence after liver transplantation has been demonstrated. The donor A allele is identified as a risk associated allele. Taking into account the presented literature and microRNA therapeutical potential, the rs868 SNP can be employed as a non-invasive marker in the care of HCV+ transplant recipients and as prognostic factor for future microRNA based therapies.