

Μοριακός Έλεγχος στα Νοσήματα του Ήπατος

Αιμιλία Χατζηγιάννη

Επ. Καθηγήτρια Βιοπαθολογίας –
Κλινικής Μικροβιολογίας

Μοριακός Έλεγχος

- Εξετάσεις με μεθόδους Μοριακής Βιολογίας
 - Ανίχνευση γενετικού υλικού (DNA/RNA)
 - Ευαίσθητη και ποσοτική
 - Μελέτη αλληλουχιών νουκλεοτιδίων
 - Γονότυποι
 - Πολυμορφισμοί

Τεχνικές - Μέθοδοι

- PCR με ειδικούς εκκινητές
 - real-time
- Υβριδισμός με ειδικούς ανιχνευτές
- RFLP
- Sequencing

Εφαρμογές στα Νοσήματα του Ήπατος

- Γενετικά νοσήματα
- Ιογενείς Ηπατίτιδες
 - Ιικό φορτίο
 - Ιική αντοχή
 - Γονότυποι
- *Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος - Ύνωση*

TABLE 1: Inherited liver diseases that predispose to early cirrhosis.

Disease	Incidence	Gene
Disorders of bile acid synthesis		
Wilson disease	1: 30,000	<i>ATP7B</i>
Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3	1: 100,000	<i>ABCB4</i>
Disorders of carbohydrate metabolism		
Hereditary fructose intolerance	1: 20,000	<i>ALDOB</i>
Glycogen storage disease type IV	1: 600,000	<i>GBE1</i>
Disorders of amino acids metabolism		
Tyrosinemia type I	1: 100,000	<i>FAH</i>
Urea cycle disorders		
Argininosuccinate lyase deficiency	1: 70,000	<i>ASL</i>
Citrin deficiency (CTLN2, NICCD)	CTLN2 1: 100,000 NICCD 1: 19,000	<i>SLC25A13</i>
Disorders of lipid metabolism		
Cholesteryl ester storage disease	1: 40,000 (Germany) 1: 300,000–1: 500,000	<i>LIPA</i>
Other diseases		
Alpha-1 antitrypsin deficiency	1: 2,000–1: 5,000	<i>SERPINA1</i>
Cystic fibrosis	1: 2,500	<i>CFTR</i>
Hereditary hemochromatosis	1: 250	<i>HFE</i>
Alström syndrome	1: 1,000,000	<i>ALMS1</i>
Congenital hepatic fibrosis	1: 20,000	Unknown

TABLE 2: Main characteristics of genetic liver disease that predispose to early cirrhosis.

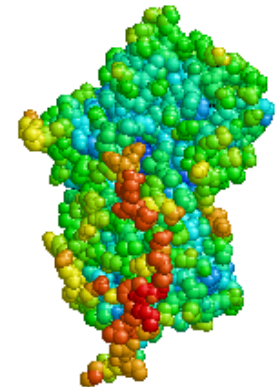
	Age at onset (ys)	Pathogenic mechanism of liver damage	Laboratory diagnosis	Molecular genetics
Alpha-1 antitrypsin deficiency	40–50	Accumulation of AAT polymers in hepatocytes	Low serum AAT; AAT alleles by isoelectric focusing	120 allelic variants in <i>SERPINA1</i> gene; ZZ genotype associated with liver cirrhosis
Cystic fibrosis	0–12	Altered activity of CFTR; increased bile flow that causes cholangitis and fibrosis	Sweat test	About 2000 known mutations in <i>CFTR</i> gene; no mutation specific for liver disease
Wilson disease	20–22	Copper hepatocyte increased levels dislocate the ATP7B protein impairing copper excretion through the bile	Low serum ceruloplasmin; high urine copper	About 300 known mutations in <i>ATP7B</i> gene; severe mutations (nonsense, frameshift) are associated with liver disease
Hereditary hemochromatosis	30–50	Iron-induced lipid peroxidation causes hepatocellular injury	Enhanced serum ferritin; high transferrin saturation	p.C282Y in <i>HFE</i> gene associated with liver cirrhosis
Type I tyrosinemia	Variable	The metabolite succinylacetone accumulates, resulting in toxicity to liver	Enhanced plasma/urine succinylacetone; high plasma tyrosine, methionine, and phenylalanine	Most frequent mutations analysis in <i>FAH</i> gene; no mutation specific for liver disease
Glycogen storage disease type IV	Variable	The altered stored glycogen impairs the osmotic pressure within the hepatocyte	/	Sequence analysis in <i>GBE1</i> gene; no mutation specific for liver disease
Argininosuccinate lyase deficiency	0–15	Decreased endogenous synthesis of arginine that leads to a decrease in arginine metabolites in various tissues	High serum citrulline; increased argininosuccinic acid in plasma/urine	<i>ASL</i> exons 4, 5, and 7 are hotspots of most frequent mutations; no mutation specific for liver disease
Citrin deficiency	NICCD: 0–1; CTLN2: 20–40	Defective aspartate export from the mitochondria to the cytosol and defects in the malate aspartate shuttle	Enhanced plasma ammonia, citrulline, and arginine. NICCD: high plasma threonine, methionine, tyrosine, bilirubin, and bile acids	Sequence analysis in <i>SLC25A13</i> gene; no mutation specific for liver disease
Cholesteryl ester storage disease	0–20	Accumulation of cholesteryl esters and triglycerides in lysosomal hepatocytes	High serum AST, ALT, cholesterol, and low HDL cholesterol	About 40 mutations in <i>LIPA</i> gene; (exons 16, 10, and 8 are hotspots of mutations); no mutation specific for liver disease
Alström syndrome	Variable	Unclear mechanism	/	About 80 mutations in <i>ALMS1</i> gene; no mutation specific for liver disease
Congenital hepatic fibrosis	Variable	Immature duct structures stimulate the formation of portal fibrous tissue	/	The disease gene is unknown
Hereditary fructose intolerance	Variable	Accumulation of fructose in hepatocytes; fibrosis	Breath test	About 45 known mutations in <i>ALDOB</i> gene; no mutation specific for liver disease
Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3	0–20	The defect of MDR3 results in impaired biliary phospholipid excretion that impairs bile formation	High serum γ -GT activity, normal serum cholesterol and moderately raised bile salts concentrations	Most of known mutations in <i>ABCB4</i> are point mutations

Ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης

- Αυτοσωματική υπολειπόμενη νόσος (codominant –συνεπικράτηση-συγκυρίαρχα γονίδια)
- Γονίδιο α1-AT στο χρωμόσωμα 14 (14q32.1)
- Κάθε αλληλίο υπεύθυνο για 50% των επιπέδων α1-AT
- Οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο SERPINA1 (serpin peptidase inhibitor, clade A) που κωδικογράφει την -πρωτεΐνη αναστολέα πρωτεασών σερίνης- AAT
- Παράγεται κυρίως στο ήπαρ, και αναστέλλει προφλεγμονώδεις πρωτεάσες όπως η neutrophil elastase, και με τον τρόπο αυτό προστατεύει τους πνεύμονες από πρωτεολυτιτικές βλάβες
- Μεταλλαγές οδηγούν σε αντικατάσταση αα (στη θέση γλουταμικού οξέος) και εμποδίζουν την έκκριση α1-AT (αλλαγή στη διάταξη)
- Ηπατική νόσος λόγω συσσώρευσης πολυμερών AAT
- Περίπου 120 μεταλλαγές (allelic variants) έχουν περιγραφεί
- Επίπτωση 1 : 2,000–5,000 (υποδιάγνωση)

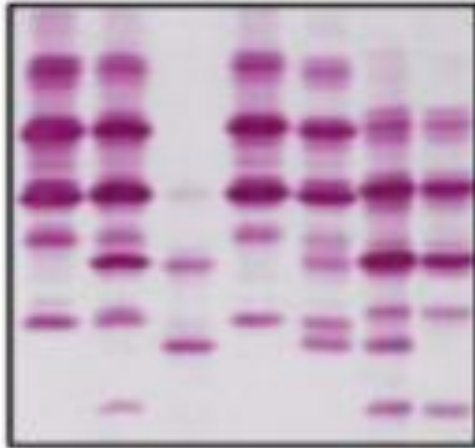
Διαγνωστικές Εξετάσεις για Ανεπάρκεια α1-AT

- Ποσοτικός προσδιορισμός α1-AT
 - Φυσιολογικές Τιμές 90-200 mg/dL
- Φαινοτυπική ανάλυση με ισοηλεκτρική εστίαση
- Ανάλυση γονιδιακή
 - Ασθενείς με επίπεδα ορού <125 mg/dL
- Βιοψία ήπατος



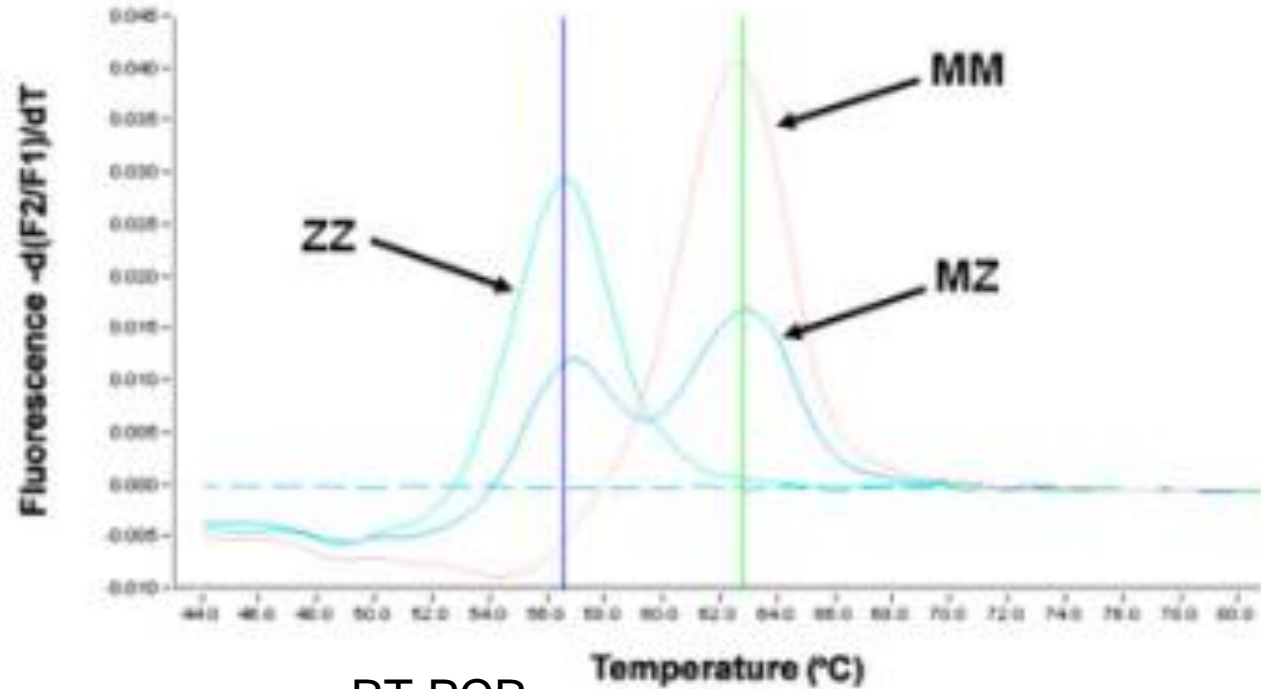
A Φαινοτυπική Ανάλυση

MM MS ZZ MM MZ SZ SS



isoelectric focusing + IFX

B Γονοτυπική Ανάλυση



RT-PCR

Αλλήλιο Z σχετίζεται με τη μέγιστη ανεπάρκεια α1-AT

- Συχνότητα ZZ στις ΗΠΑ σε πληθυσμό Ευρωπαϊκής καταγωγής 1 στους 3500
- Περίπου 60,000
- Σε Σκανδιναβικές χώρες αυξημένη συχνότητα



- PiMM: 100% (φυσιολογικό)
- PiMS: 80% επιπέδων A1AT
- PiSS: 60% επιπέδων A1AT (264Glu:Val)
- PiMZ: 60% επιπέδων A1AT
- PiSZ: 40% επιπέδων A1AT
- PiZZ: 10-15% επιπέδων (342Glu:Lys)



Αιμοχρωμάτωση

- Κληρονομική (ΗΗ)

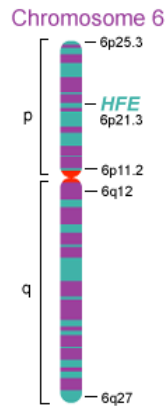
Τύπου I—HFE -6p21.3

- C282Y ομοζυγώτες
- C282Y : H63D
συνδυασμένοι
ετεροζυγώτες
- Άλλες σπάνιες μεταλλάξεις

- Τύποι 2, 3, και 4—Μη-HFE
μεταλλάξεις

- Δευτεροπαθής

- Σοβαρή χρόνια αιμόλυση και μη
αποδοτική ερυθροποίηση
- Πολλαπλές μεταγγίσεις
- Μεσογειακή αναιμία
- Παρεντερικά συμπληρώματα
σιδήρου
- Χρόνιες Ηπατοπάθειες
- Πορφυρία cutanea tarda



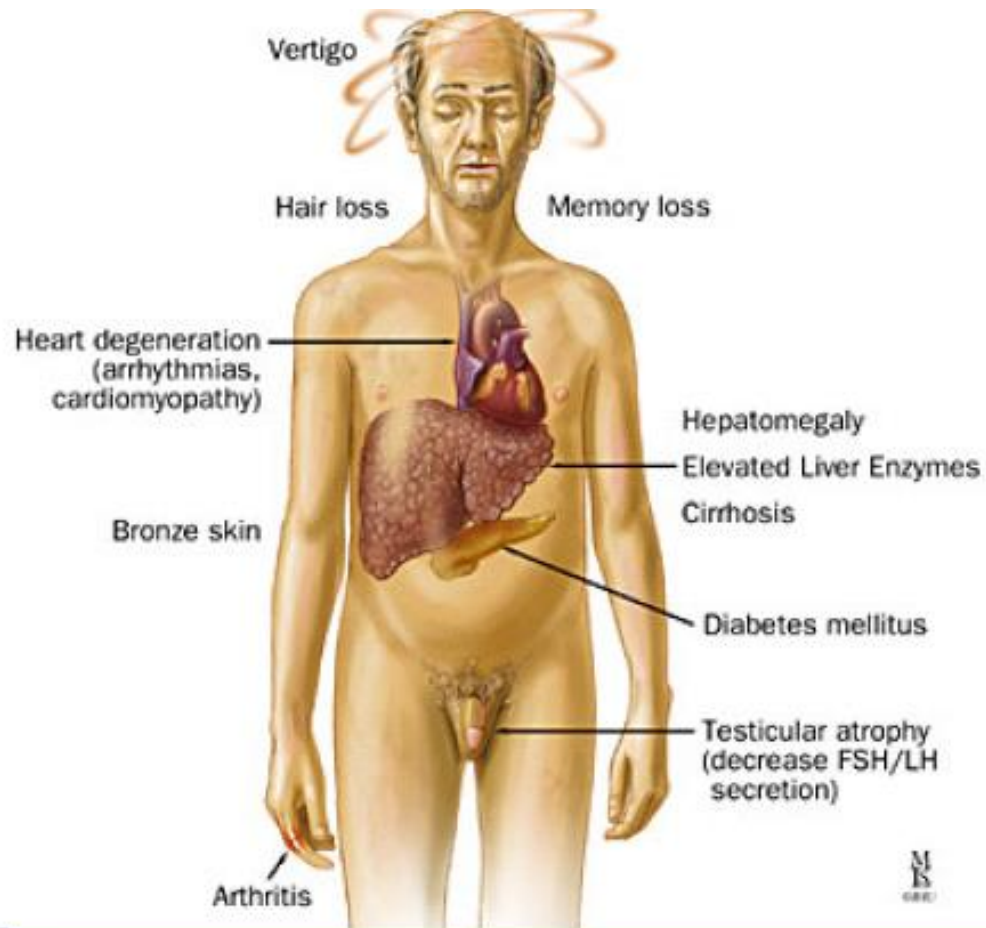
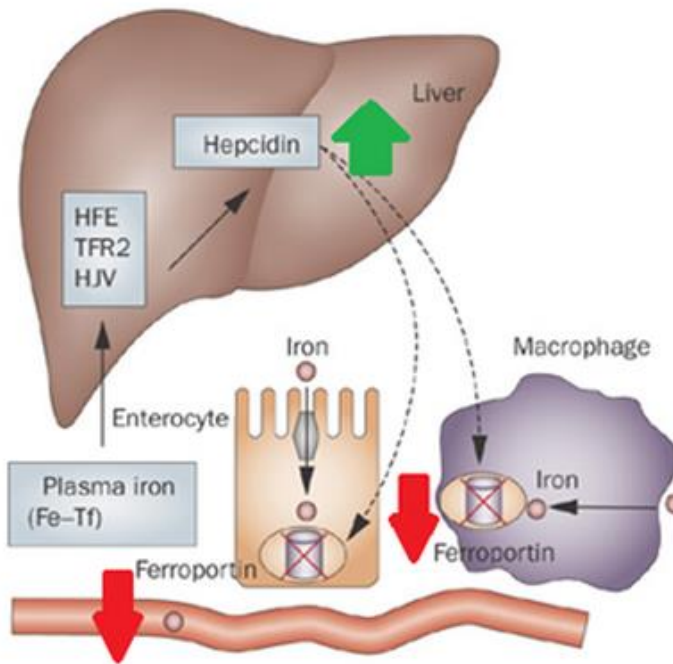
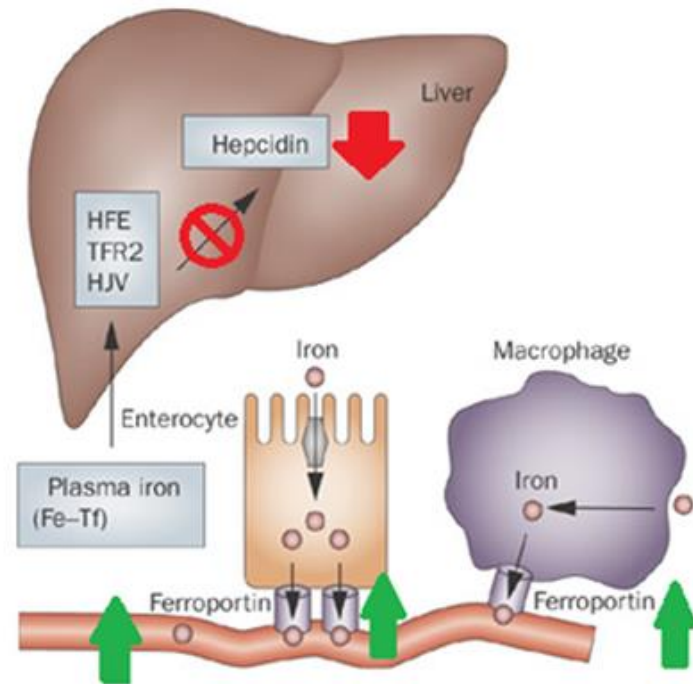


Figure 3. Symptoms and signs of hemochromatosis.

Normal



Hereditary Hemochromatosis



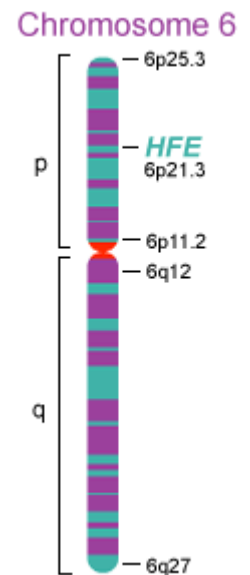
Διάγνωση

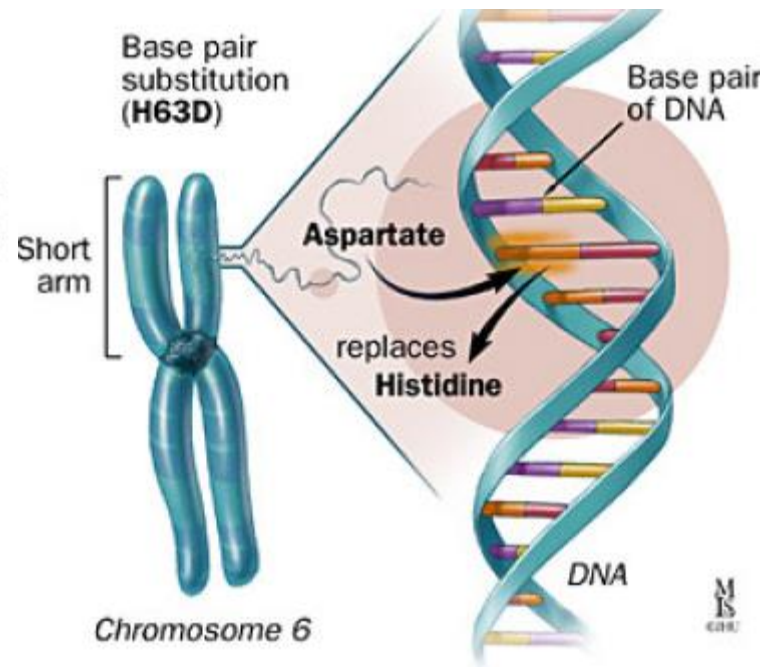
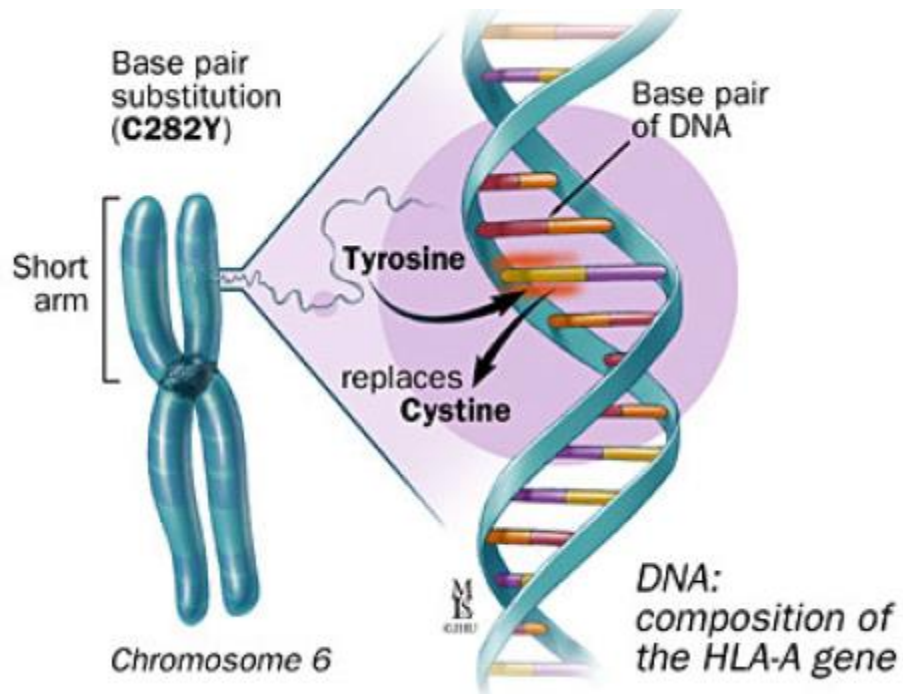
- Αυξημένη φερριτίνη στον ορό
- Αυξημένος σίδηρος (στο ήπαρ)
- Αυξημένος κορεσμός τρασνφερρίνης

- Μοριακή ανάλυση για επιβεβαίωση
- Χαμηλή ευαισθησία (μεταλλαγές διαφέρουν γεωγραφικά)

Γονίδιο HFE (*HFE* for *High Iron Fe*)

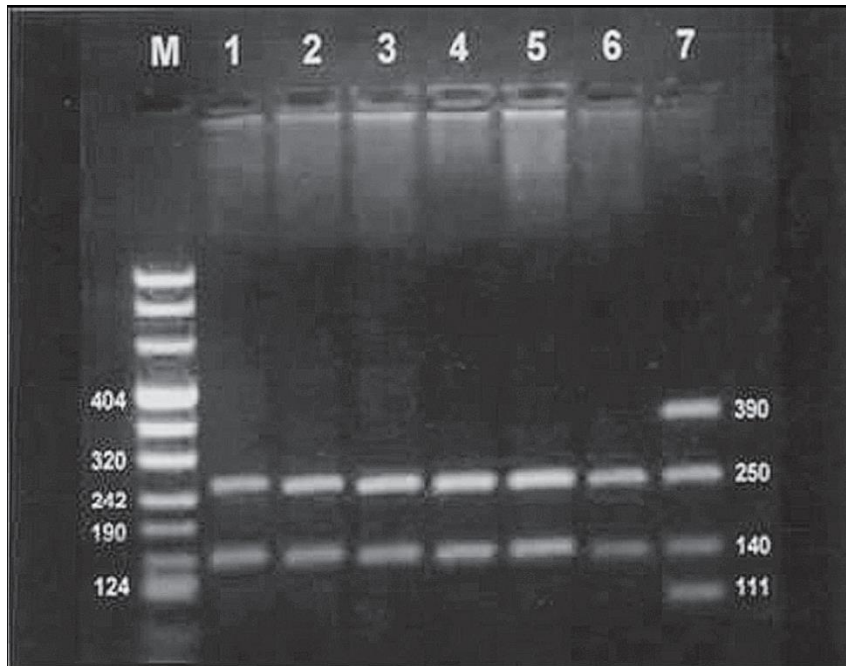
- Περιγράφηκε το 1996
- Ομοιότητα με HLA αντιγόνα τάξης 1
- C282Y A/α 282 τυροσίνη αντί κυστεΐνης
- 83% -100% ομοζυγώτες C282Y
- 4% H63D, στη θέση 63 + C282Y (compound heterozygote)



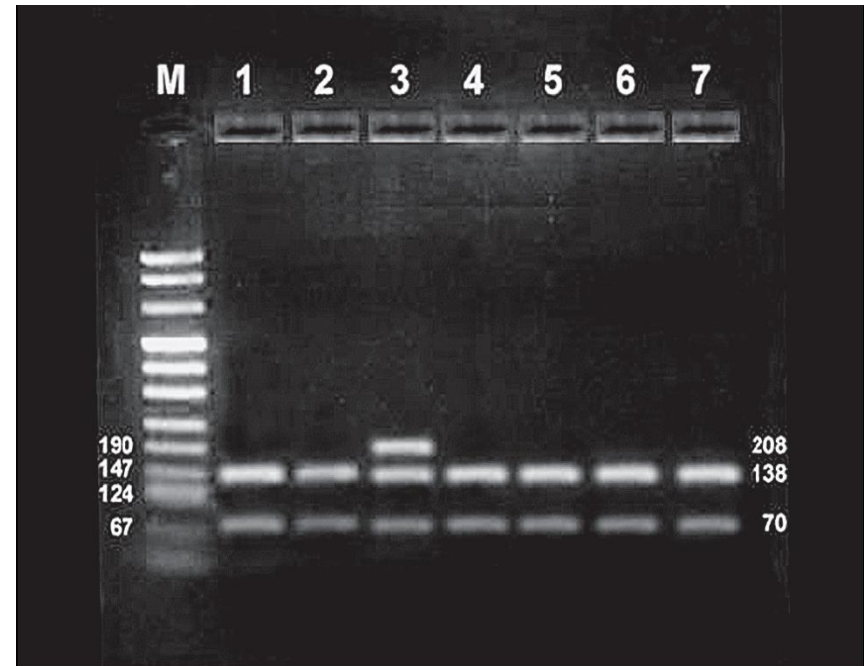


PCR-RFLP

C282Y

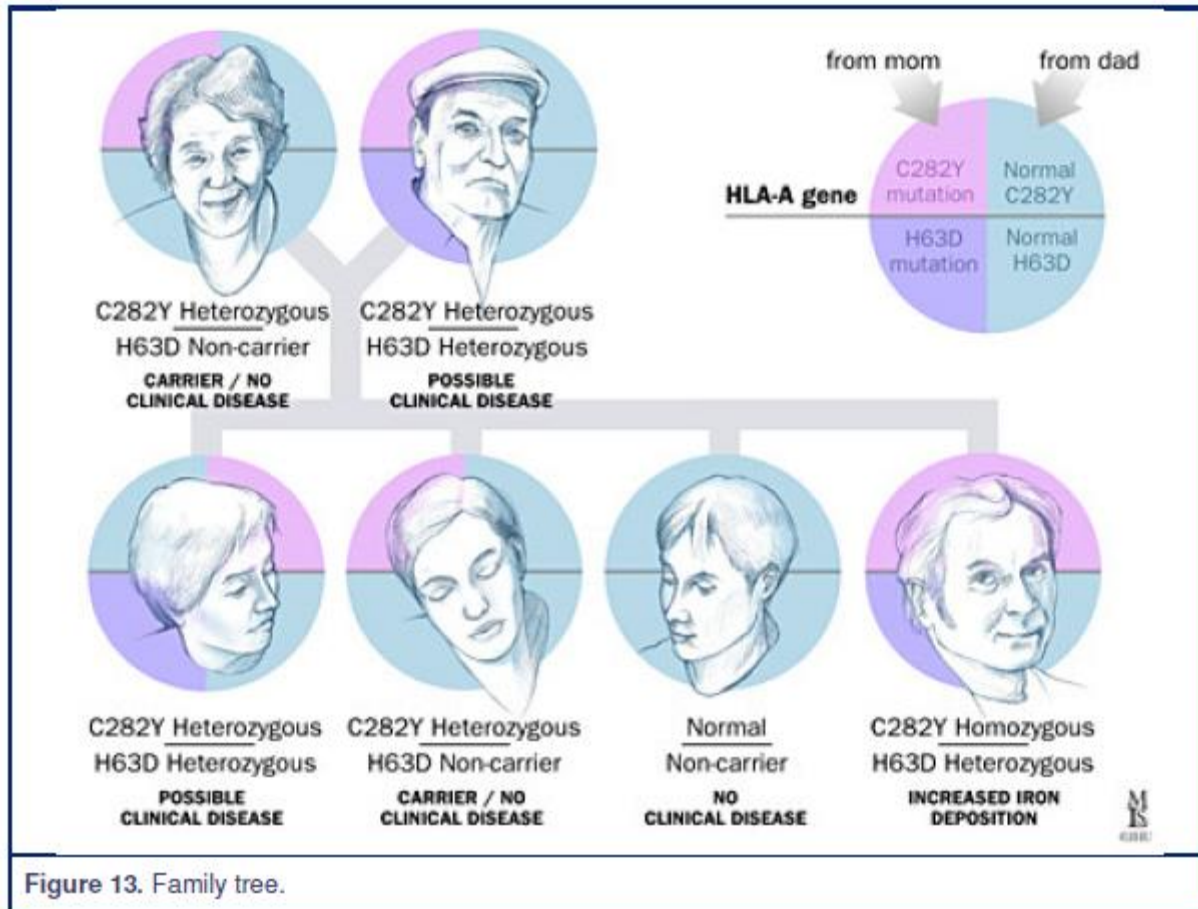


H63D

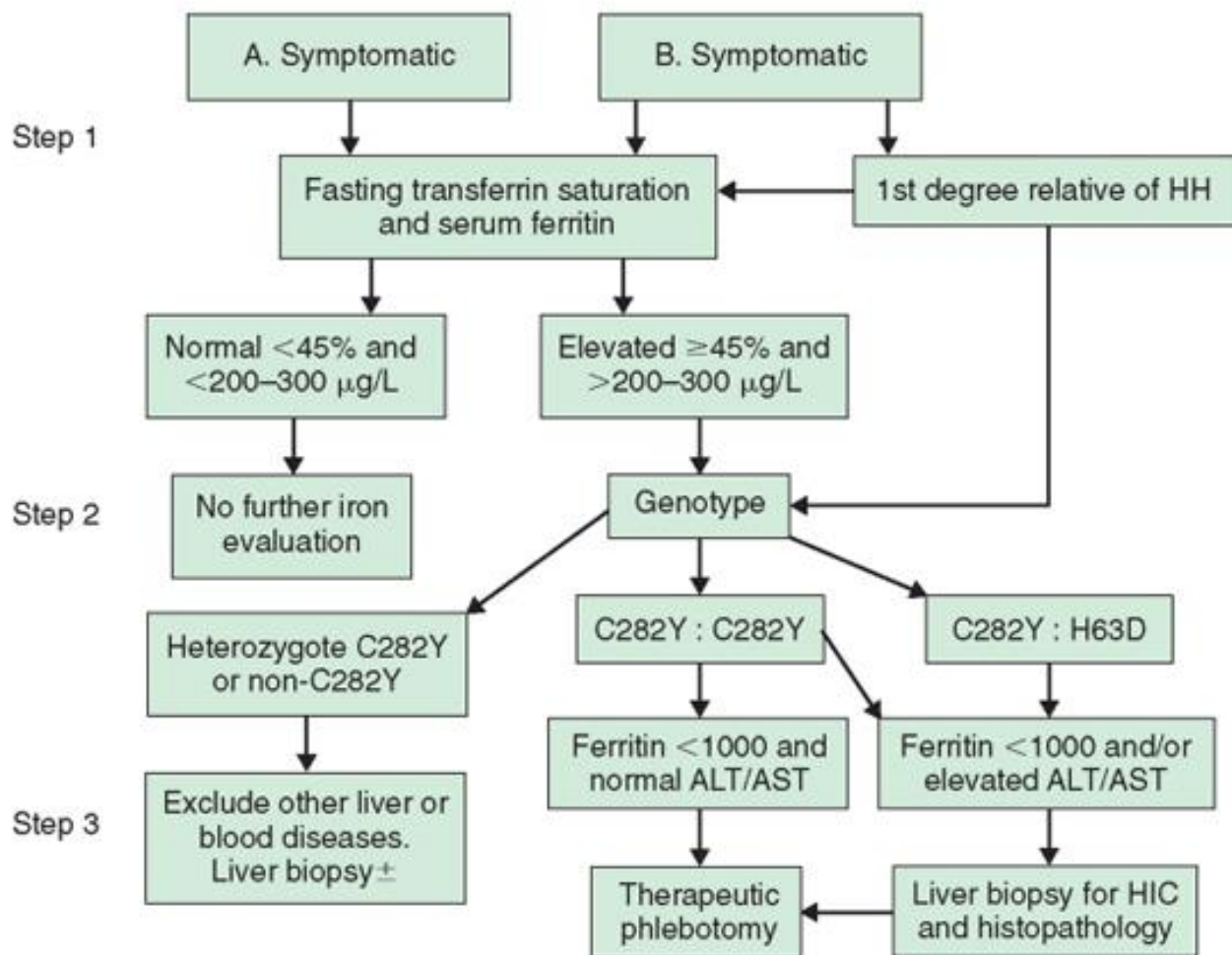


HFE εξέταση

- Συγγένεια με άτομα με αιμοχρωμάτωση
- Δύο εξετάσεις έχουν δείξει υψηλά επίπεδα σιδήρου (φεριτίνη- τρανσφερίνη)
- Διάγνωση αιμοχρωμάτωσης

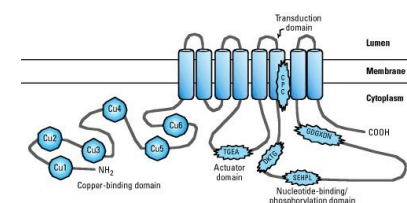
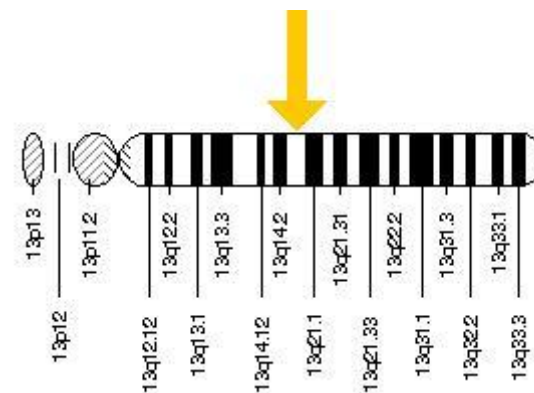
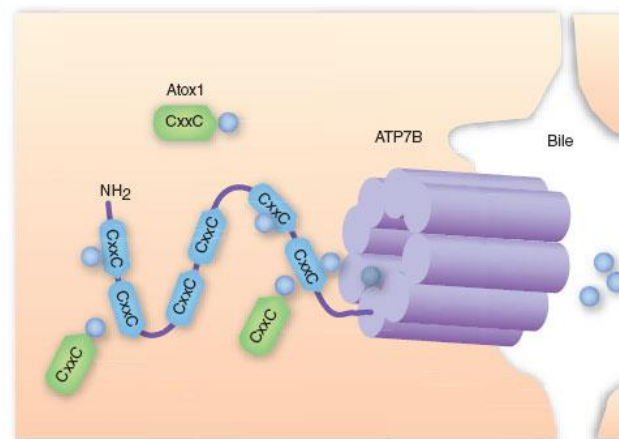


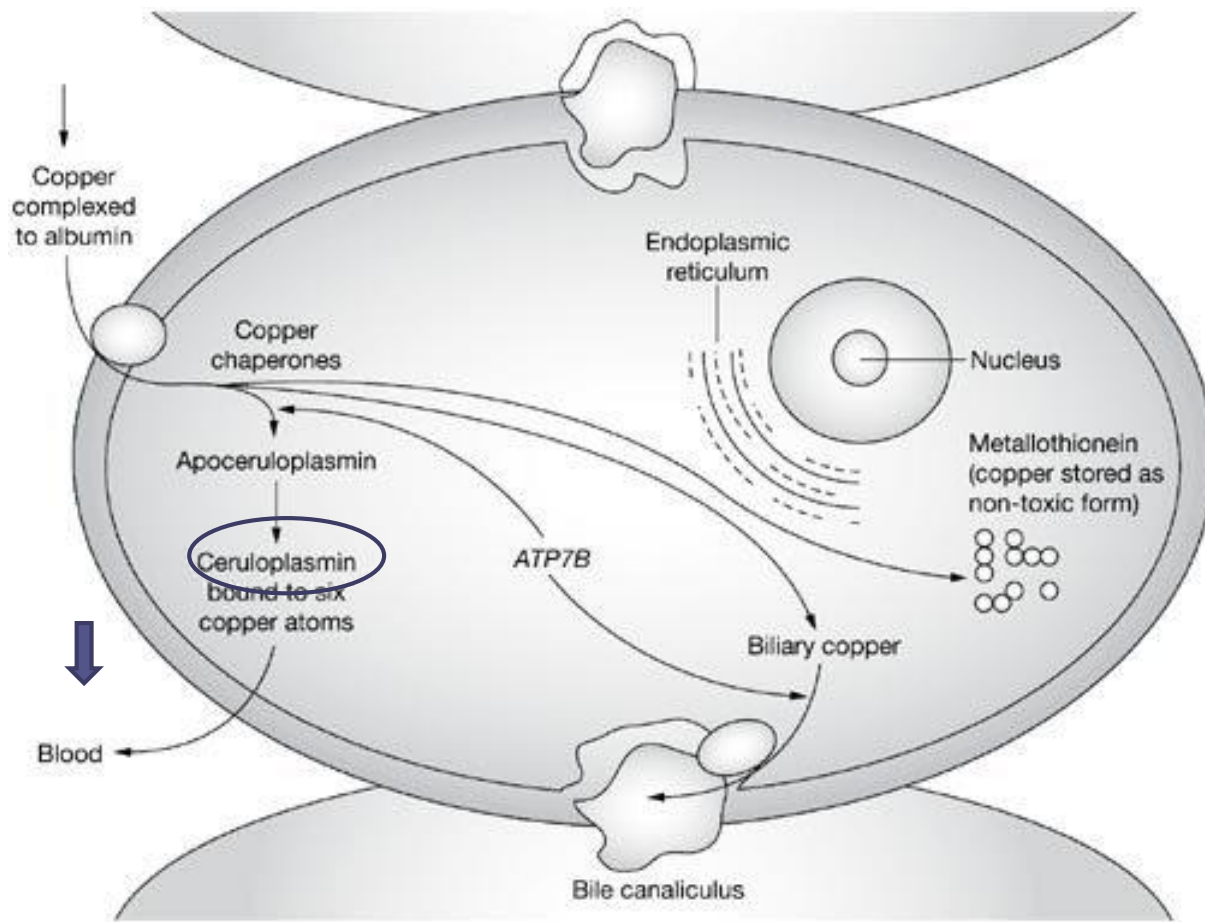
TARGET POPULATION

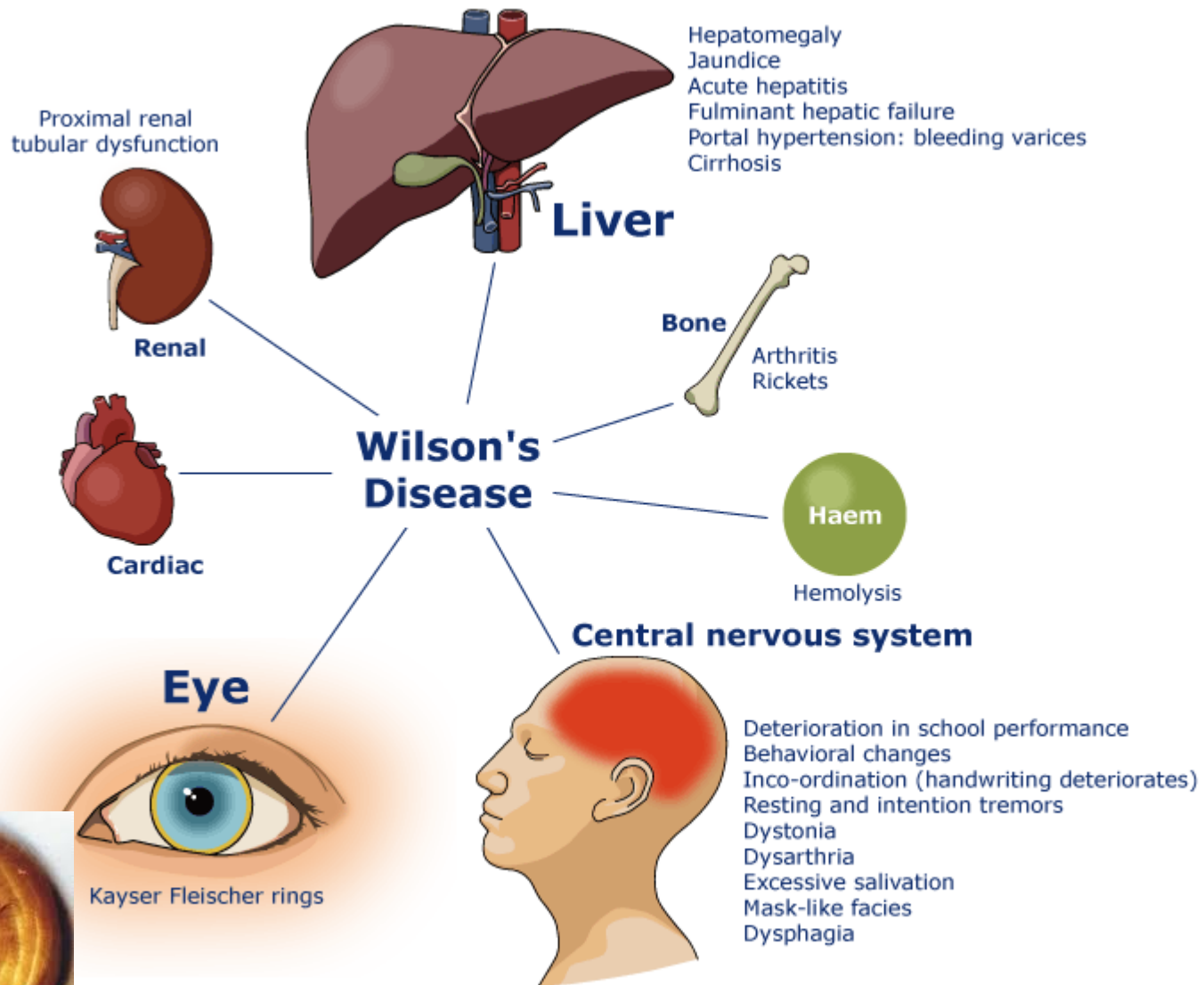


Νόσος Wilson

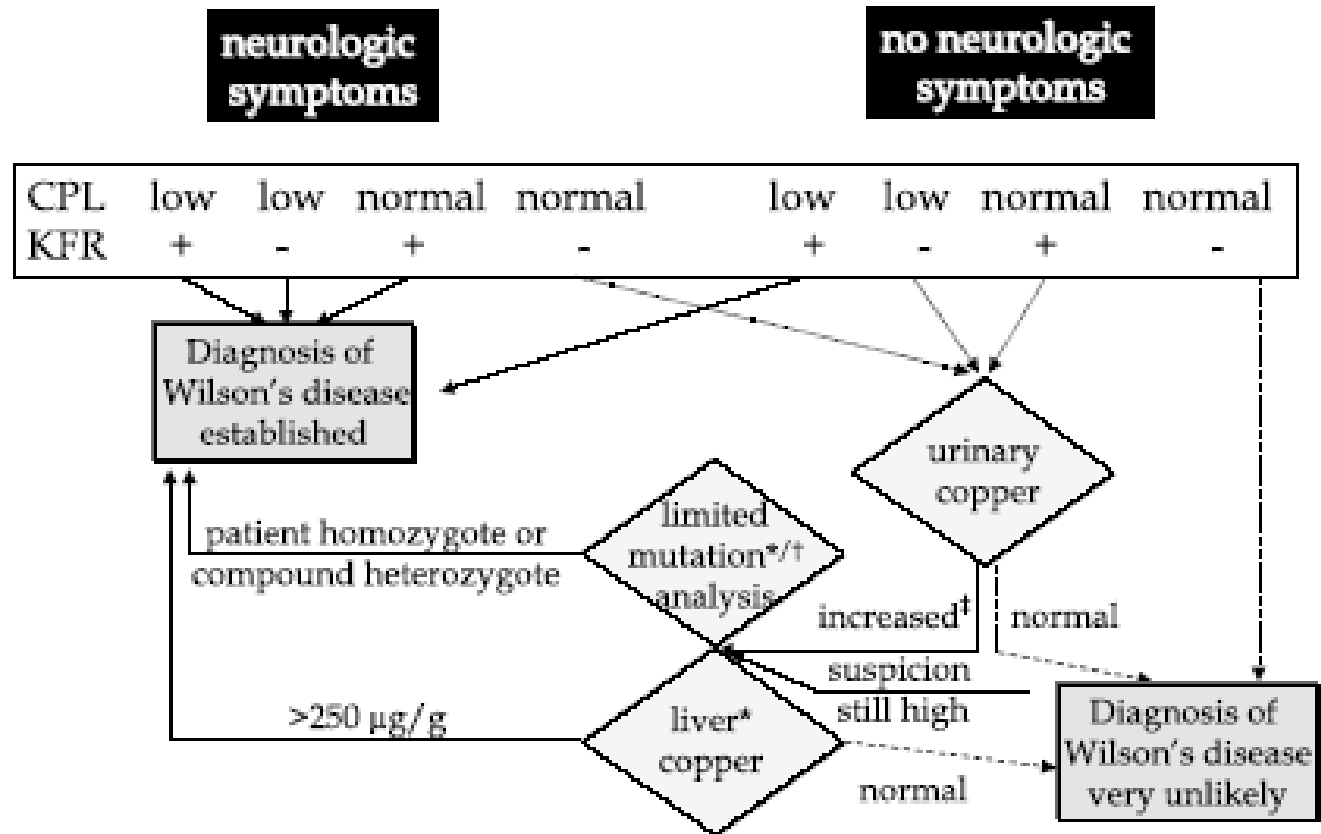
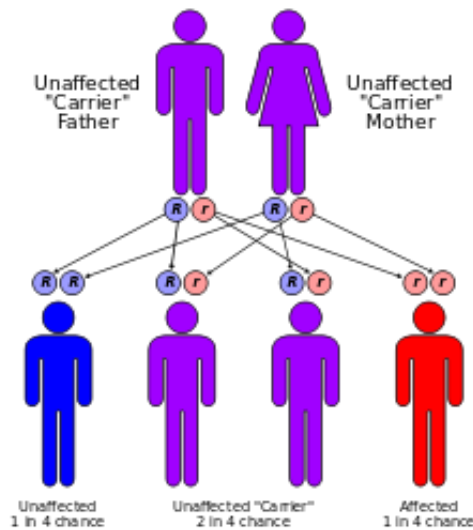
- ATP7B πρωτεΐνη (μεταφορέας χαλκού) υπεύθυνη για τη WD
- ATP7B γονίδιο κλωνοποιήθηκε το 1993
- >380 μεταλλαγές σε ασθενείς
- H1069Q η πιο συχνή -72%



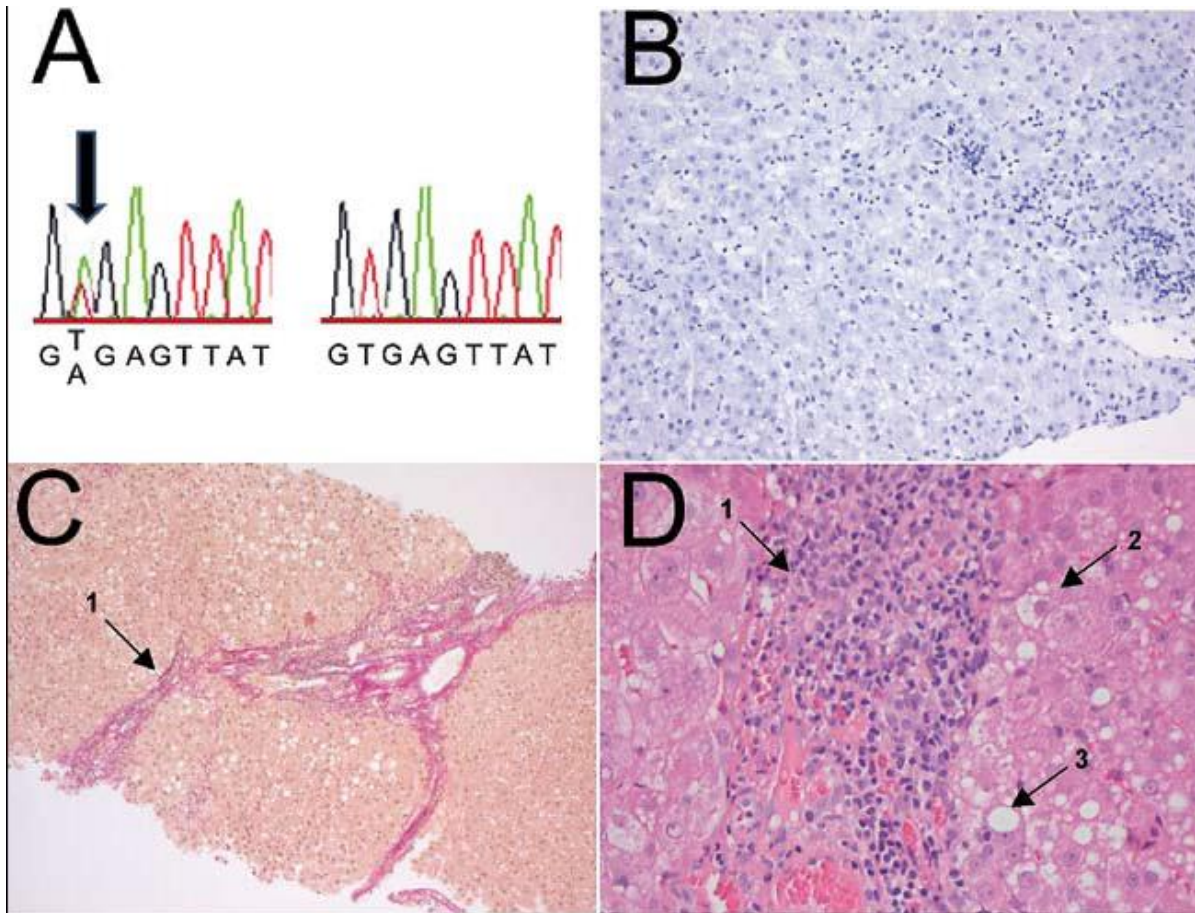




Υπολειπόμενος Χαρακτήρας



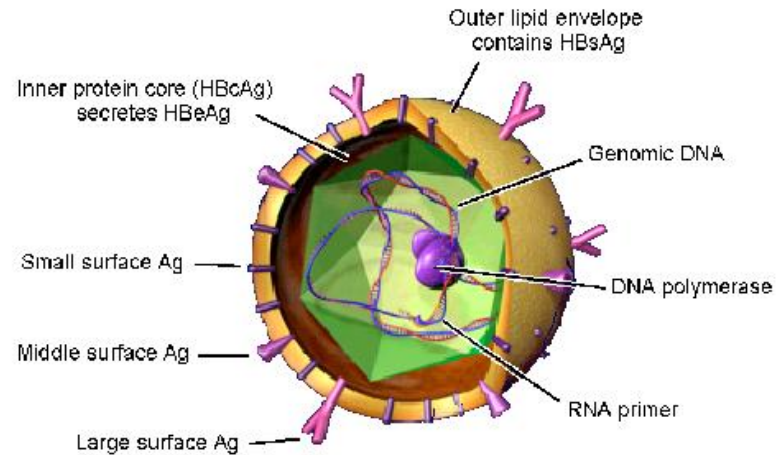
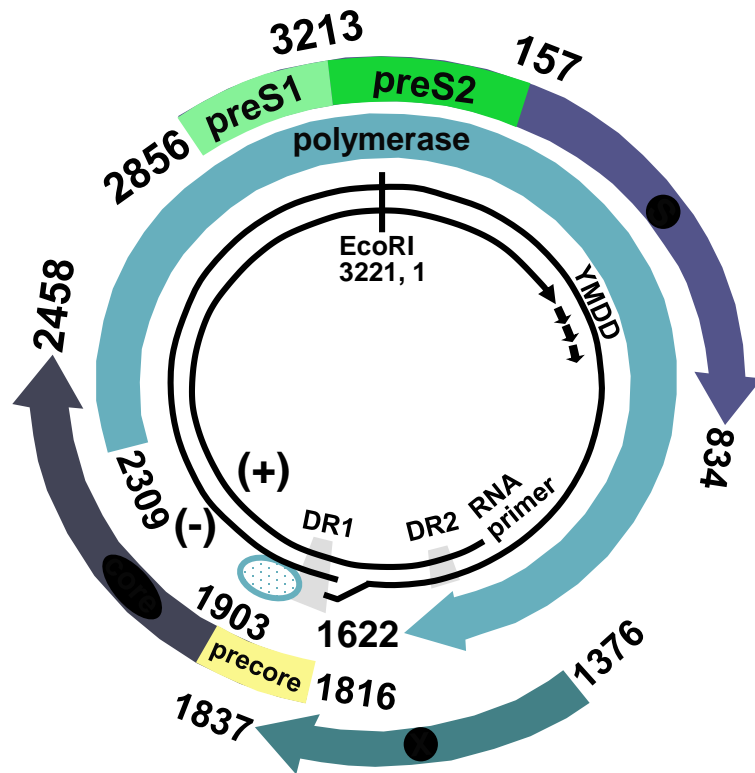
A) sequence analysis of ATP7B gene
B-D) Liver biopsy Wilson's disease



Ιογενείς Ηπατίτιδες

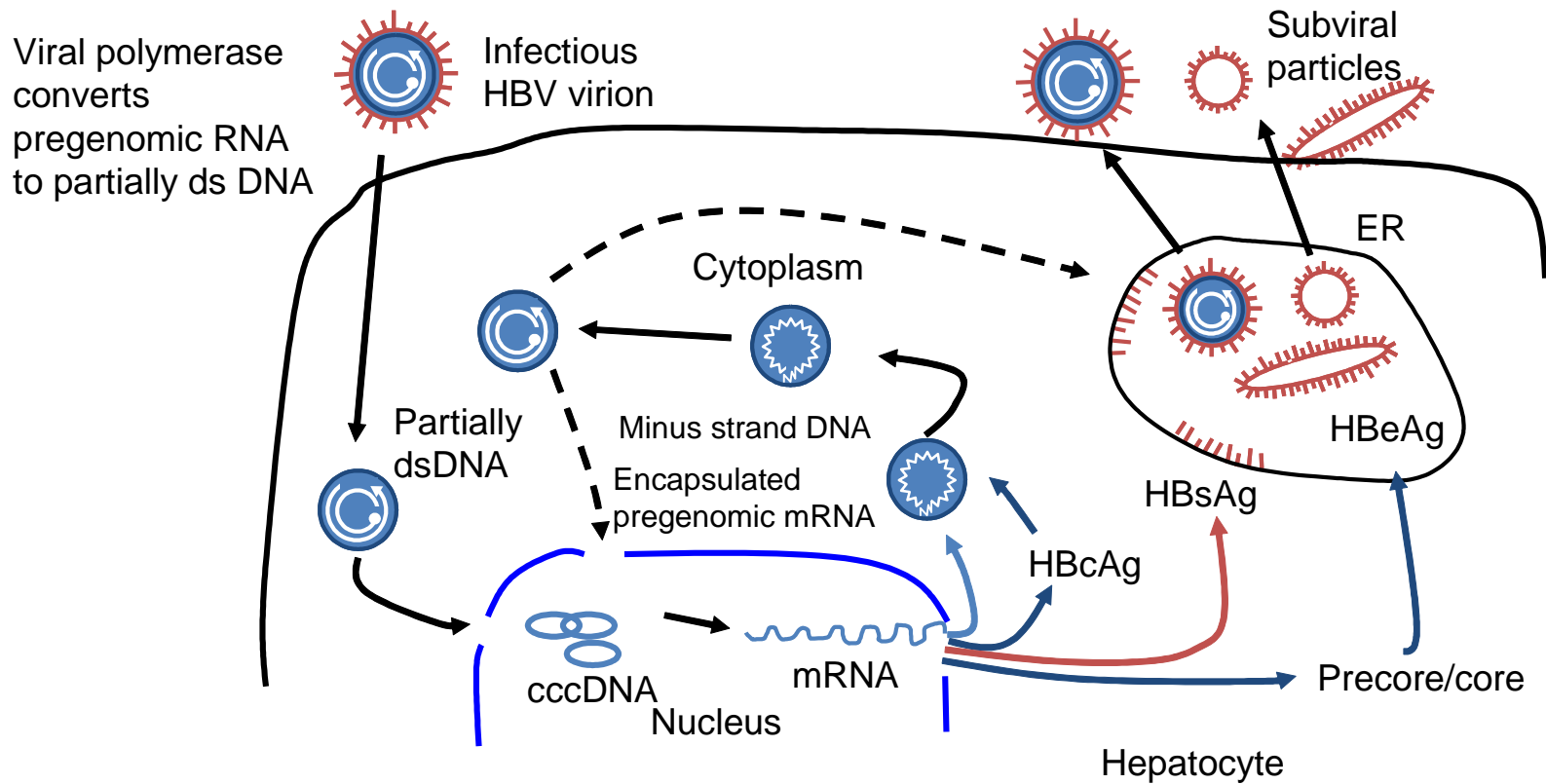
- Μοριακός έλεγχος για τη διάγνωση και παρακολούθηση HCV και HBV λοιμώξεων
- Ανίχνευση - Ποσοτικός Προσδιορισμός Ιού
- Γονότυπος
- Ιική Αντοχή

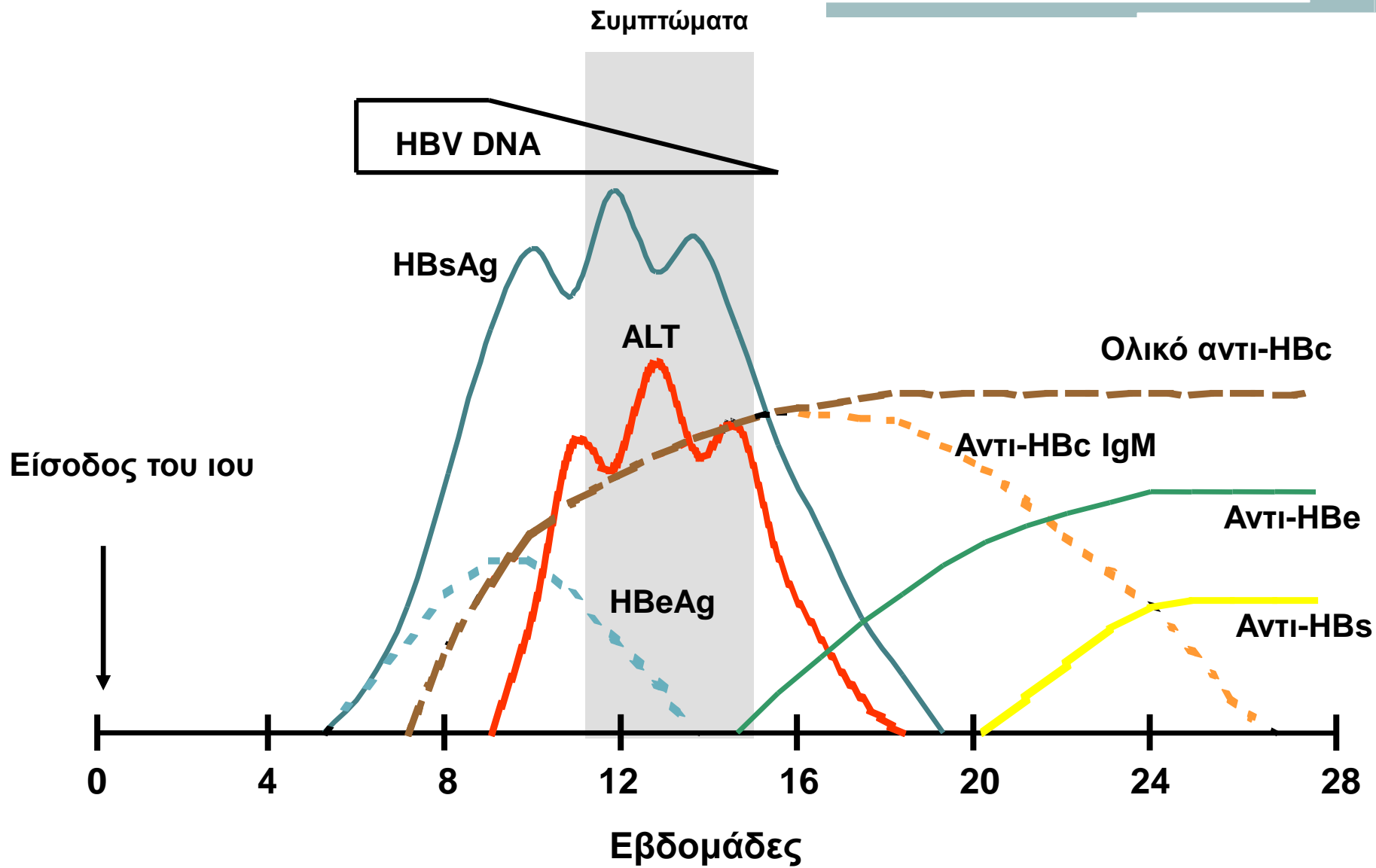
Ο ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV)



MMWR. 2003;52:1-33. Ott MJ and Aruda M. J Pediatr Health Care. 1999;13:211-216. Ribeiro RM, et al. Microbes and Infection. 2002;4:829-835

Αναπαραγωγή

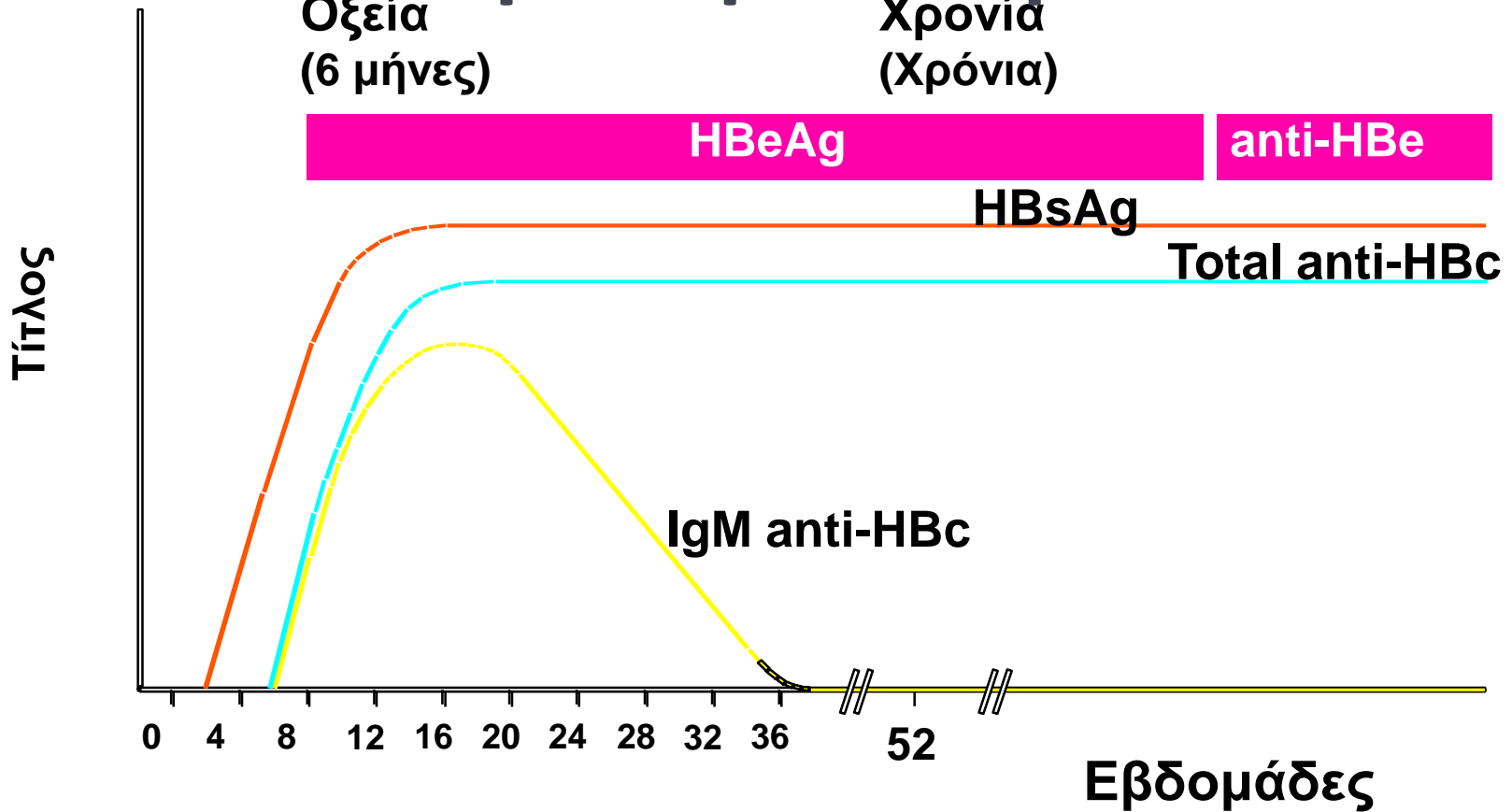




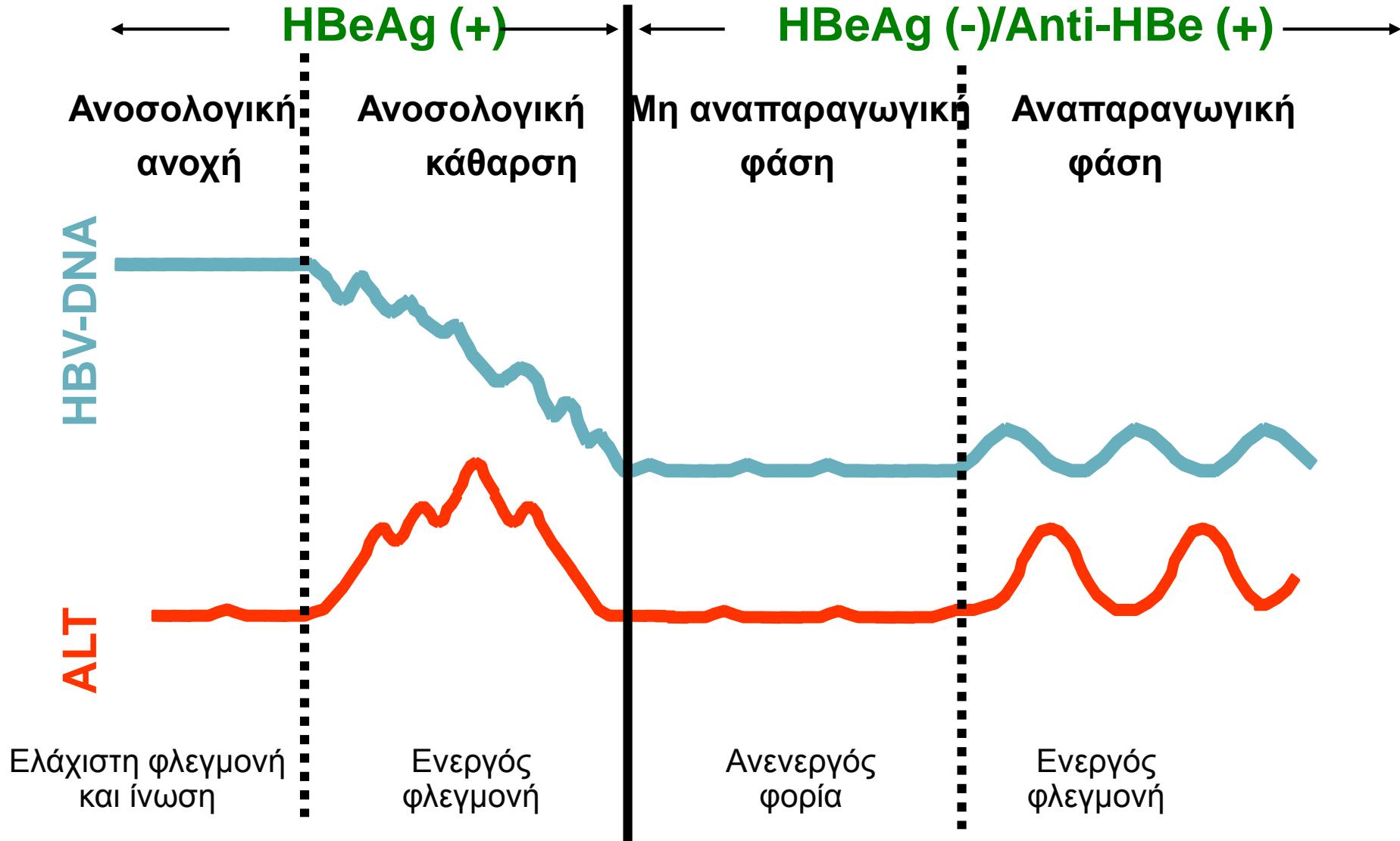
Μετάπτωση σε Χρονιότητα

Οξεία
(6 μήνες)

Χρονία
(Χρόνια)



Φυσική Ιστορία Χρόνιας Ηπατίτιδας Β



Hadziyannis SJ, *Viral Hepat Rev* 1995
Yim HJ, et al. *Hepatology*, 2006

HBV DNA- στη Χρόνια Ηπατίτιδα Β

- Ανίχνευση ιαιμίας
- Εκτίμηση ενεργότητας νόσου
- Πρόβλεψη κινδύνου ανάπτυξης ΗΚΚ και κίρρωσης
- Διαφοροποίηση ανενεργού φορέας από ΗΒεΑg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα Β
- Απόφαση χορήγησης θεραπείας
- Παρακολούθηση θεραπείας
- Πρόβλεψη κινδύνου ανάπτυξης αντοχής στη θεραπεία
- Ανίχνευση αντοχής σε αντιικά
- Εκτίμηση μολυσματικότητας

Λανθάνουσα (κρυπτική) HBV Λοίμωξη

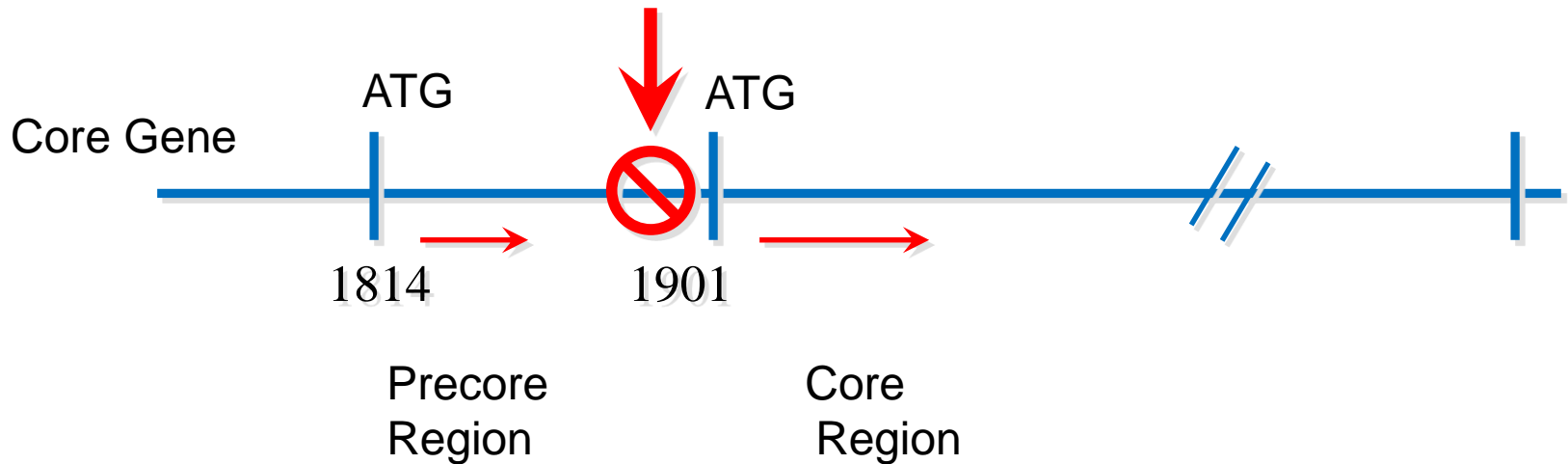
- Η **απουσία HBsAg** στον ορό ασθενών θετικών για **HBV DNA** στον ορό ή σε ιστό με ευαίσθητη PCR με εκκινητές από διαφορετικές HBV περιοχές (S, C ή X), ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους ορολογικούς δείκτες

Ανίχνευση Μεταλλαγών

- Αντιγόνο επιφάνειας : αποτυχία ανοσοποίησης
- Πολυμεράση: αντοχή σε αντιικά
- Προπυρηνική περιοχή (precore stop codon):
HBeAg-αρνητική χρόνια ηπατίτιδα
- Μεταλλαγές στο βασικό πυρηνικό εκκινητή:
προοδευτική επιδείνωση και ανάπτυξη ΗΚΚ

Μεταλλαγή σε Προπυρηνικό Κωδικόνιο Τερματισμού Αποκλείει την Παραγωγή ΗΒεΑg

G 1896 = stop codon TAG

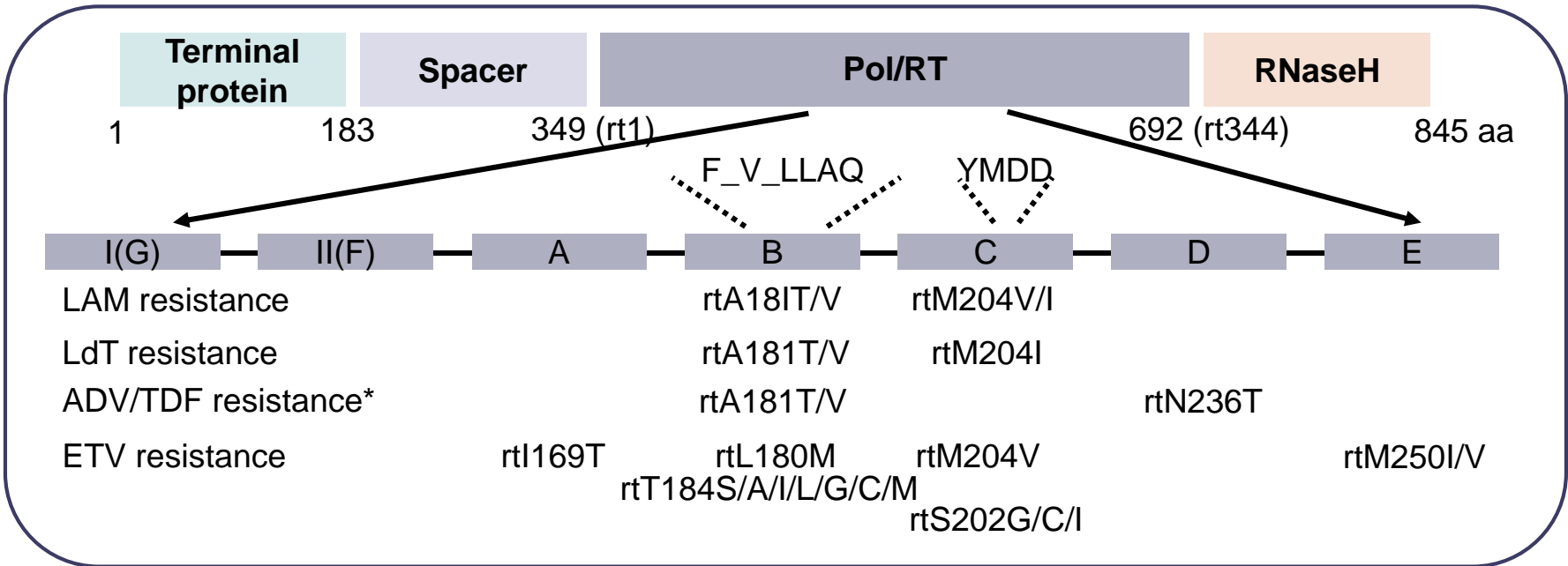


HBcAg

HB~~e~~Ag



Γονοτυπική Αντοχή



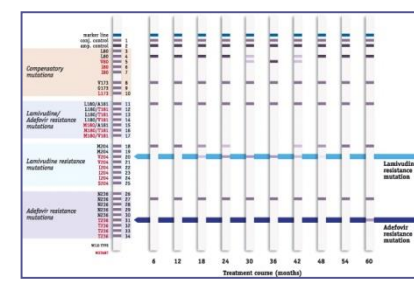
Μέθοδος αναφοράς sequencing (HBV polymerase gene)

Ανάστροφος υβριδισμός (Line-probe assays)

5% πληθυσμού

Γνωστές μεταλλαγές

Gene chip technology: ανίχνευση πολυμορφισμών

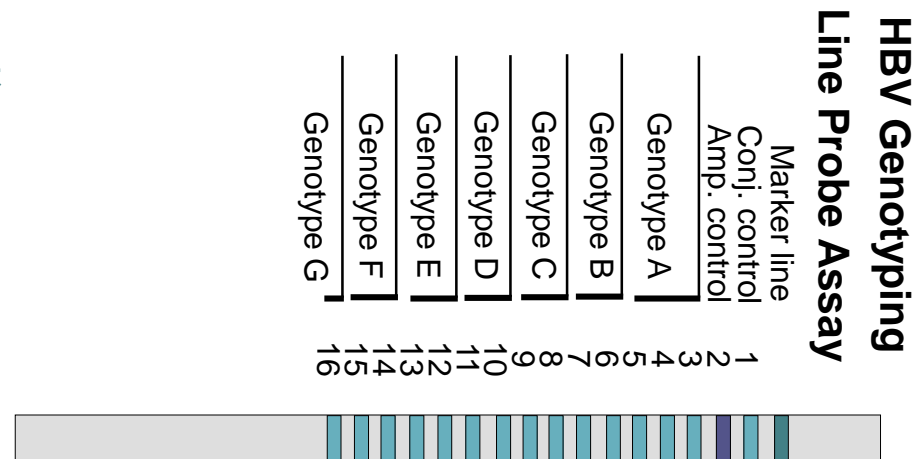


Allen MI, et al. *Hepatology*. 1998;27:1670-1677. Tenney D, et al. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3498-3507.

Qi X, et al. *Antivir Ther*. 2007;12:355-362, Clarke 2002, Tran 2006, Pas 2008, Vincenti 2009, Niesters 2010

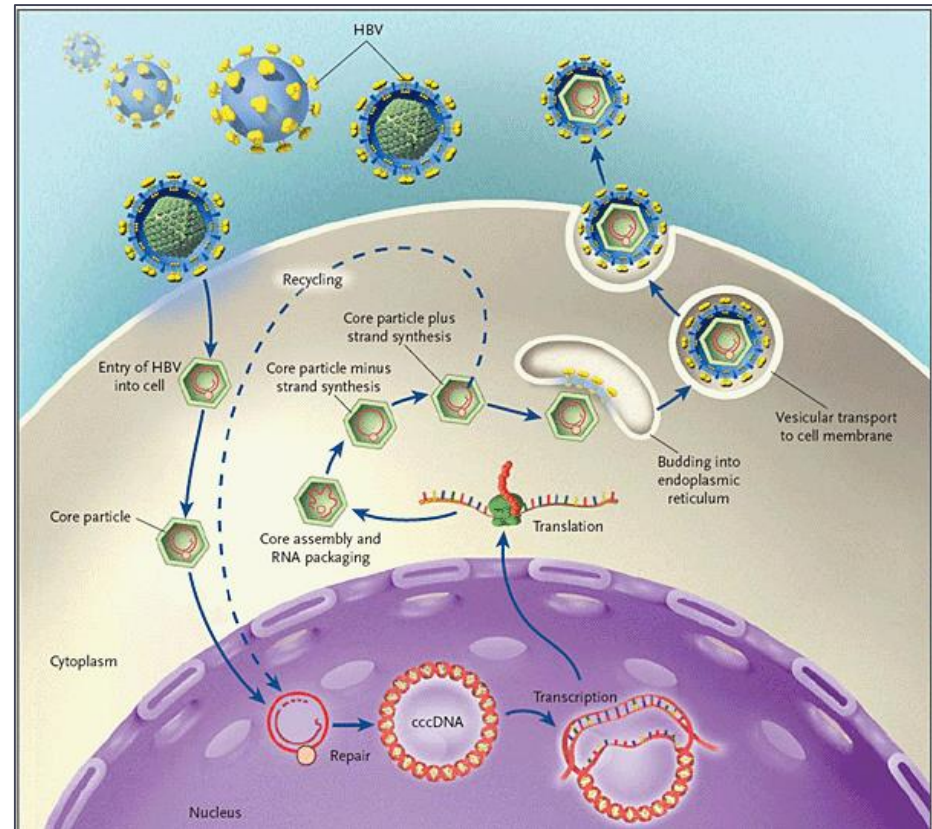
Γονότυπος και Εξέλιξη Νόσου

- Γονότυπος C
 - Συσχέτιση με πιο βαριά ηπατική νόσο και ΗΚΚ σε σχέση με τον γονότυπο B
- Γονότυπος B
 - Συσχέτιση με οροαναστροφή από ΗΒεΑg σε anti-ΗΒε σε νεότερη ηλικία από το γονότυπο C
- Γονότυποι A και B
 - Υψηλότερα ποσοστά απόκρισης σε αντικα και αρνητικοποίηση του ΗΒεΑg μετά από peg IFN-α από γονότυπο D και C, αντιστοίχως



cccDNA

- Ευαίσθητος δείκτης λοίμωξης
- Έμπόδιο στην εκρίζωση της λοίμωξης
- Στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων 30-50 copies/cell
- Μέτρηση με real-time PCR

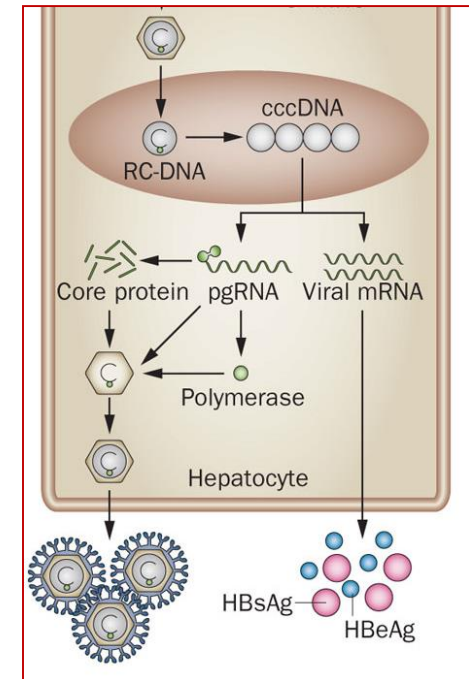


Μέτρηση cccDNA στο Ήπαρ

- Επίπεδα HBV cccDNA σημαντικά υψηλότερα σε HBeAg- θετικούς ασθενείς σε σχέση με HBeAg-αρνητικούς ασθενείς (0.01 copies/cell, $P < .001$), ανενεργούς φορείς (0.02 copies/cell, $P < .001$)
- Στη θεραπεία της HBeAg-θετικής CHB τα επίπεδα του cccDNA στο ήπαρ αποτελούν προγνωστικό παράγοντα μακροχρόνιας απόκρισης
- Στη θεραπεία της HBeAg-αρνητικής CHB τα επίπεδα και το ποσοστό του ccc DNA στο ήπαρ αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες μακροχρόνιας απόκρισης και αρνητικοποίησης του HBsAg στον ορό

HBV cccDNA στον Ορό

- Real Time PCR
- Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το HBV cccDNA είναι ανιχνεύσιμο σε ορό ασθενών με χρόνια HBV λοίμωξη και ότι τα επίπεδά του συσχετίζονται με το ενδοηπατικό cccDNA
- $R = 0.481, P = 0.002$



WONG ET AL. HEPATOLOGY, 2004

Taranta et al. Journal of Clinical Virology, 2014, 354 - 360

Shi M et al. PLoS ONE, 2015

Η Ανακάλυψη του Ιού της Ηπατίτιδας C με την Εφαρμογή Τεχνικών Μοριακής Βιολογίας



Chimpanzee plasma with high infectious titer

↓ nucleic acid extraction

RNA, DNA

↓ denature

ssRNA, ssDNA

↓ reverse transcriptase, primers

dsDNA, RNA-DNA hybrid

↓ RNase, DNAP1

dsDNA

↓ 4 methylase, Eco RI, linkers

dsDNA with EcoRI site on ends

↓ clone into λphage

λ gt 11 phage with variety of dsDNA sequences

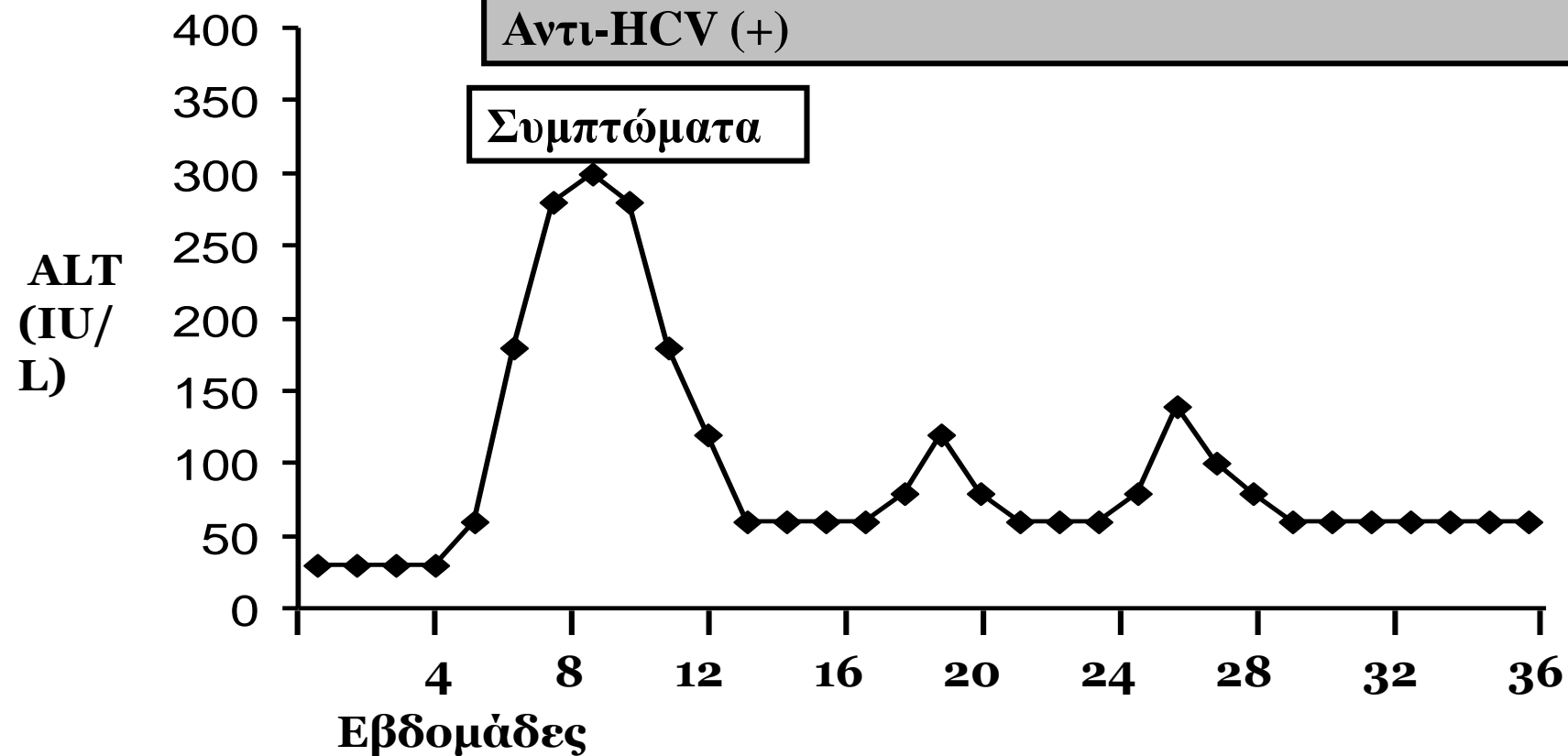
Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ,
Overby LR, Bradley DW,
Houghton Science 1989; 244:
359-362

Ηπατίτιδα C

HCV-RNA (+)

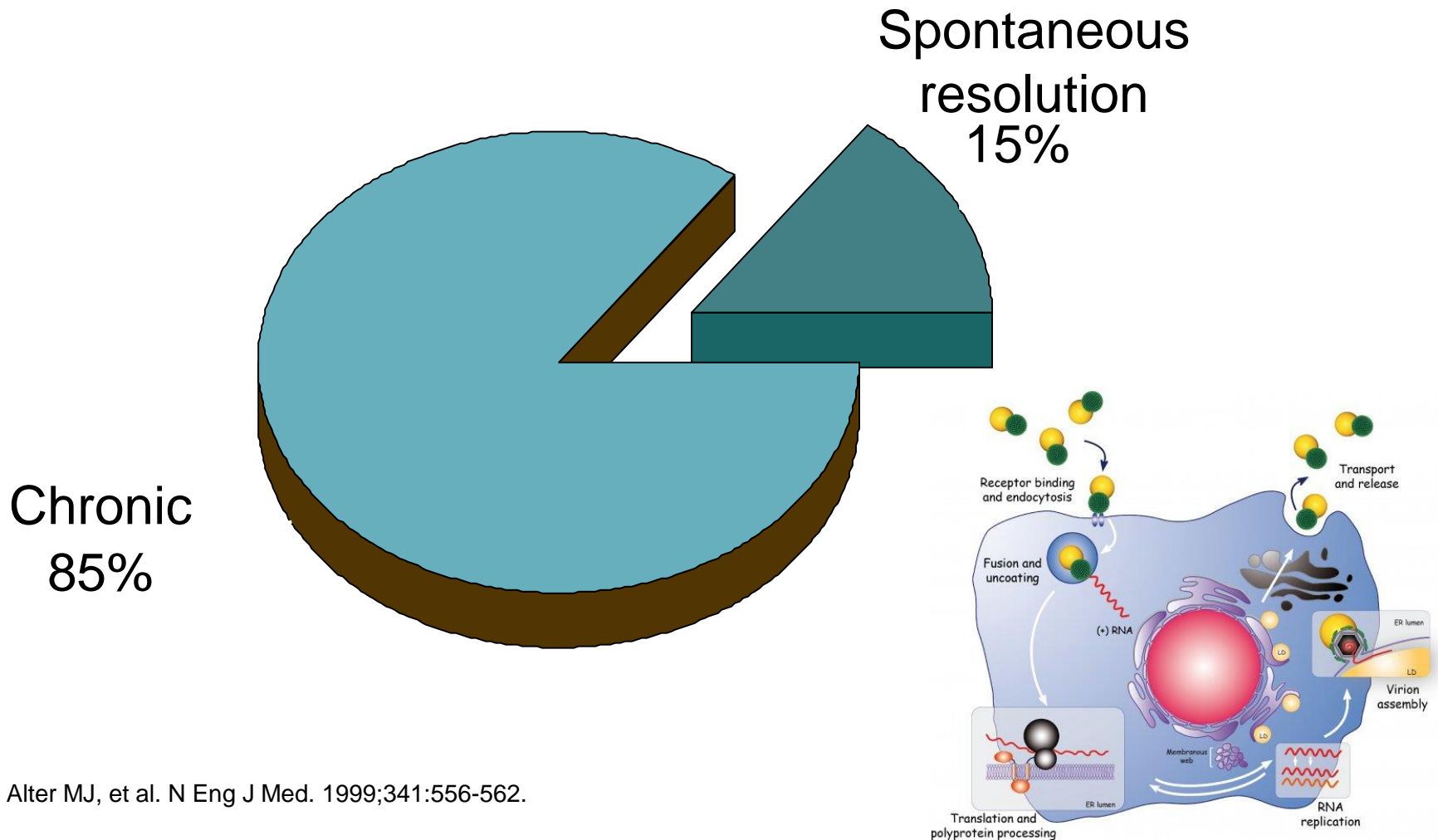
Αντι-HCV (+)

Συμπτώματα

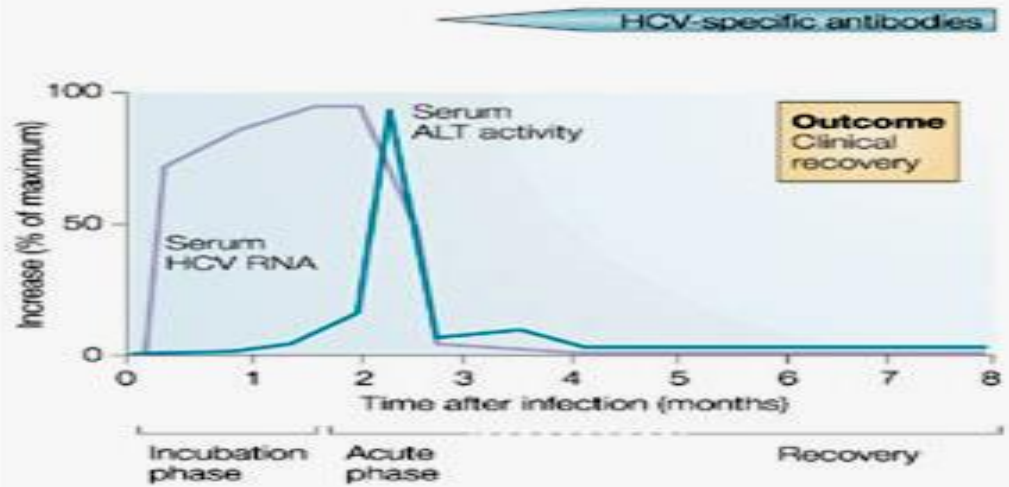


Hepatitis C Virus

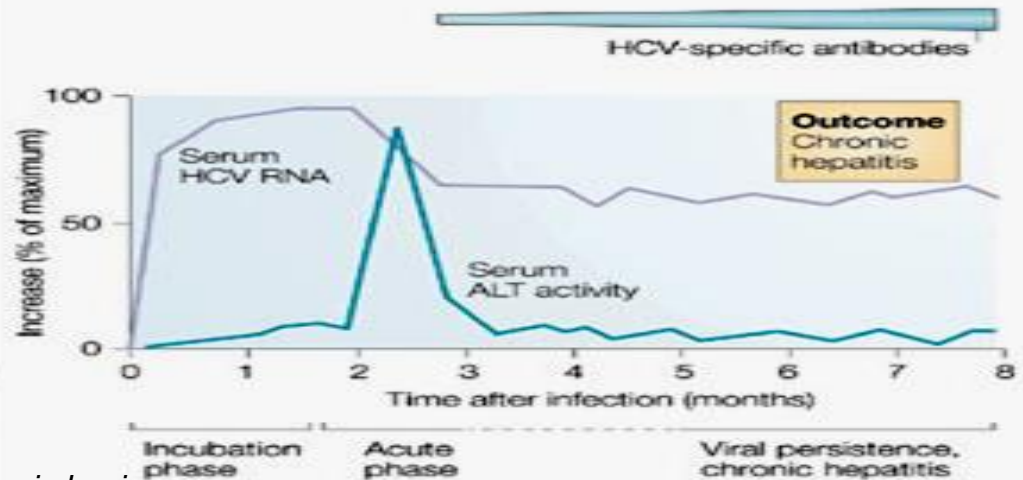
Fate of Acute Infection



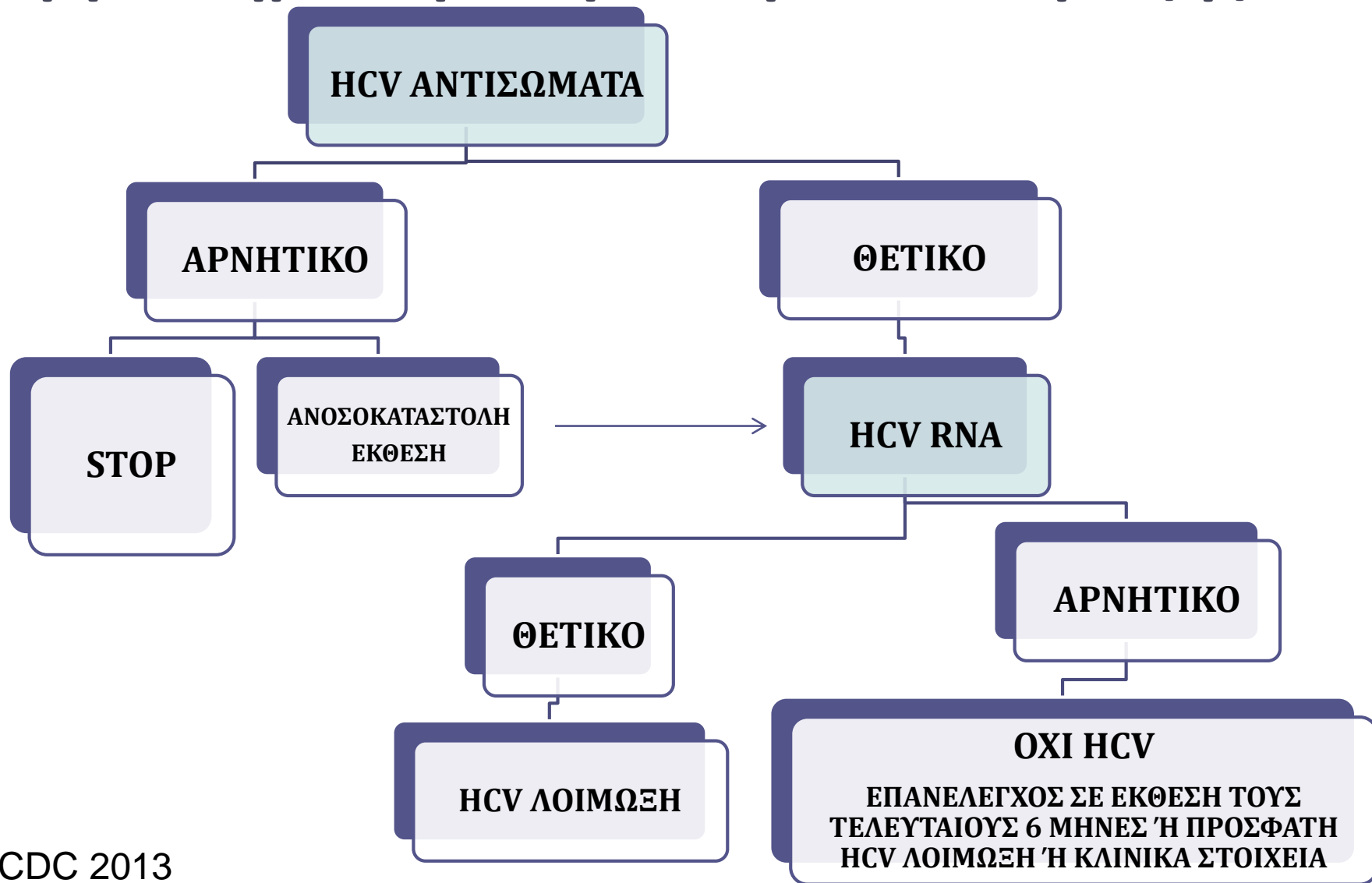
c Hepatitis C (acute)



d Hepatitis C (chronically evolving)

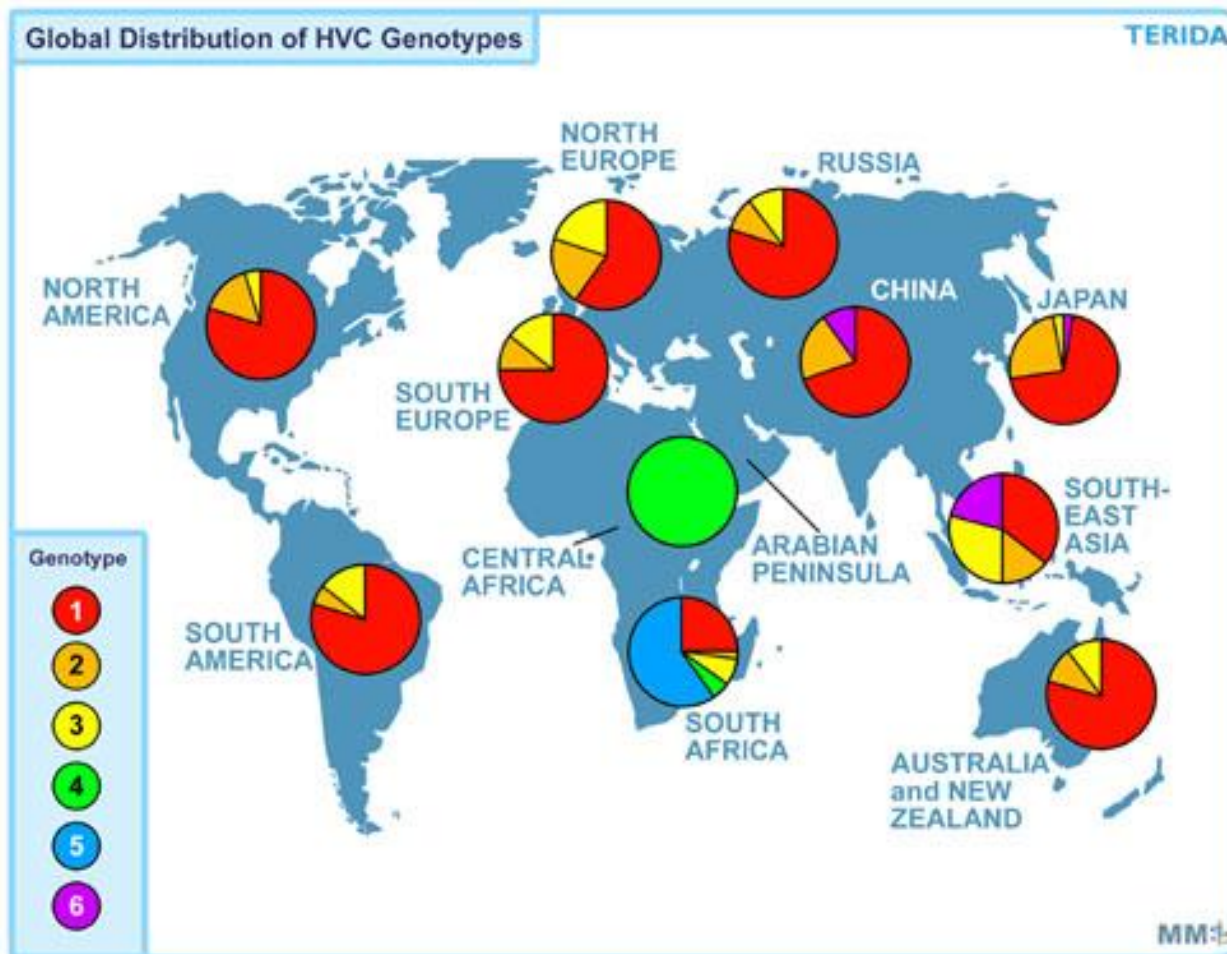


Εργαστηριακή Διάγνωση HCV Λοίμωξης

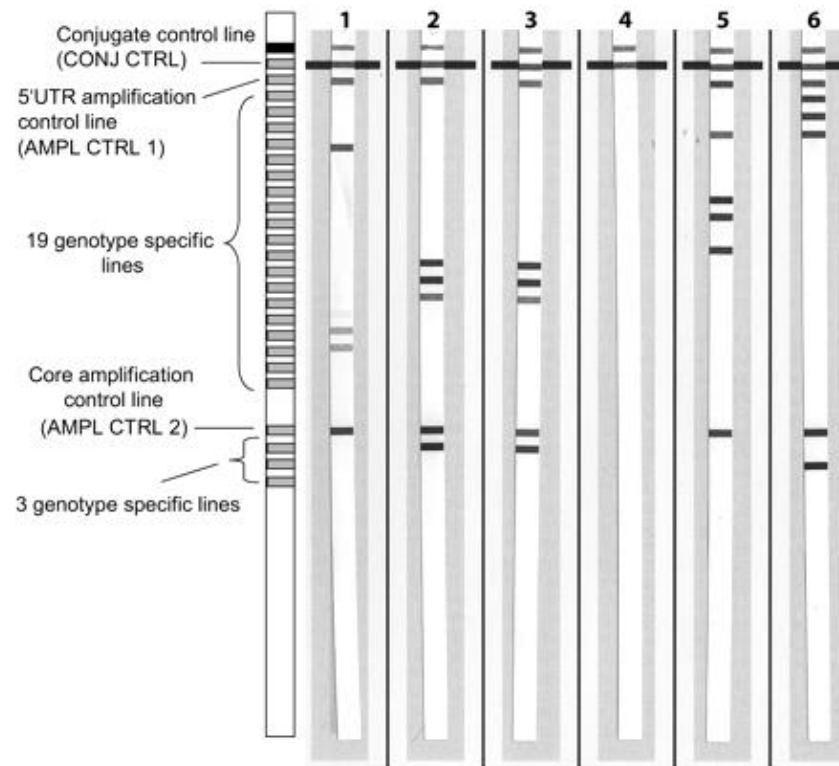


Γονότυποι

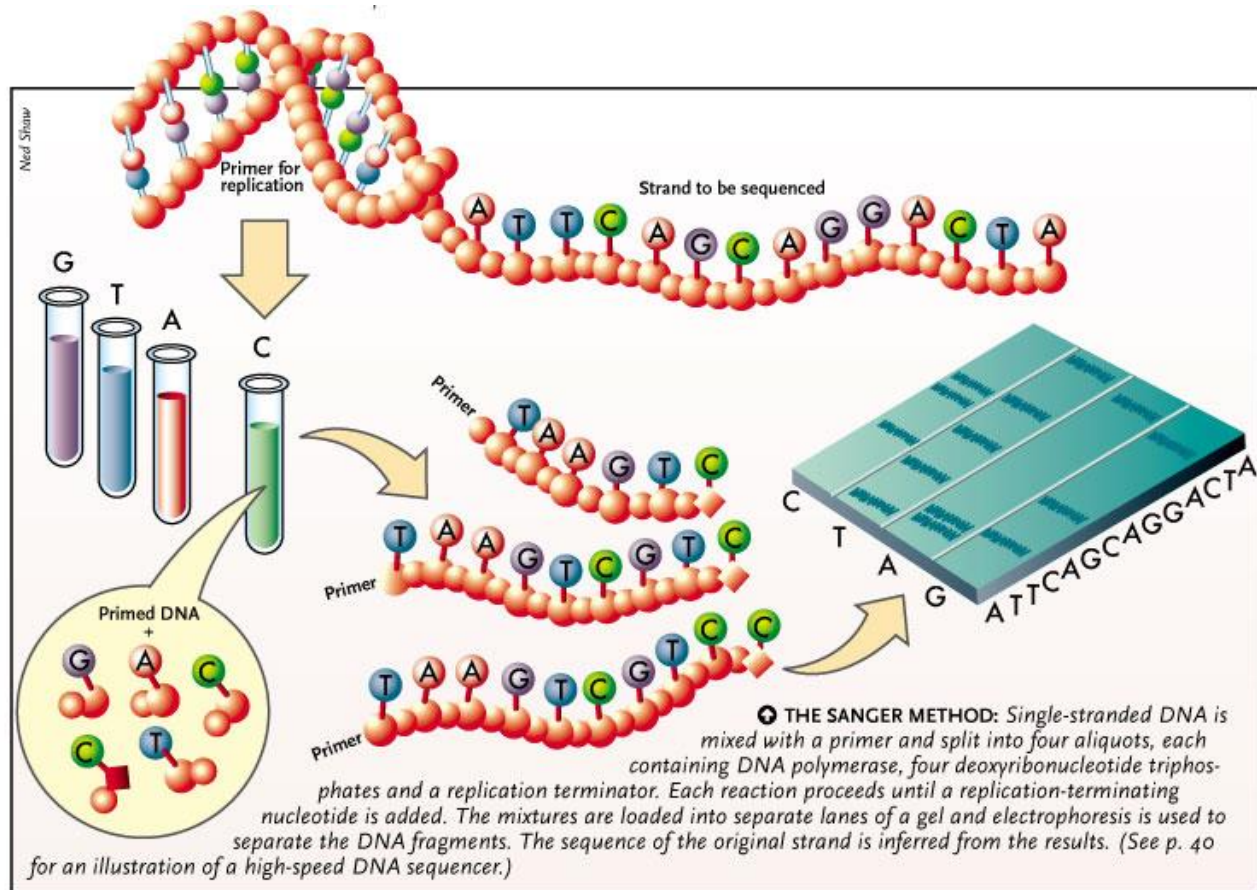
9/12/2011

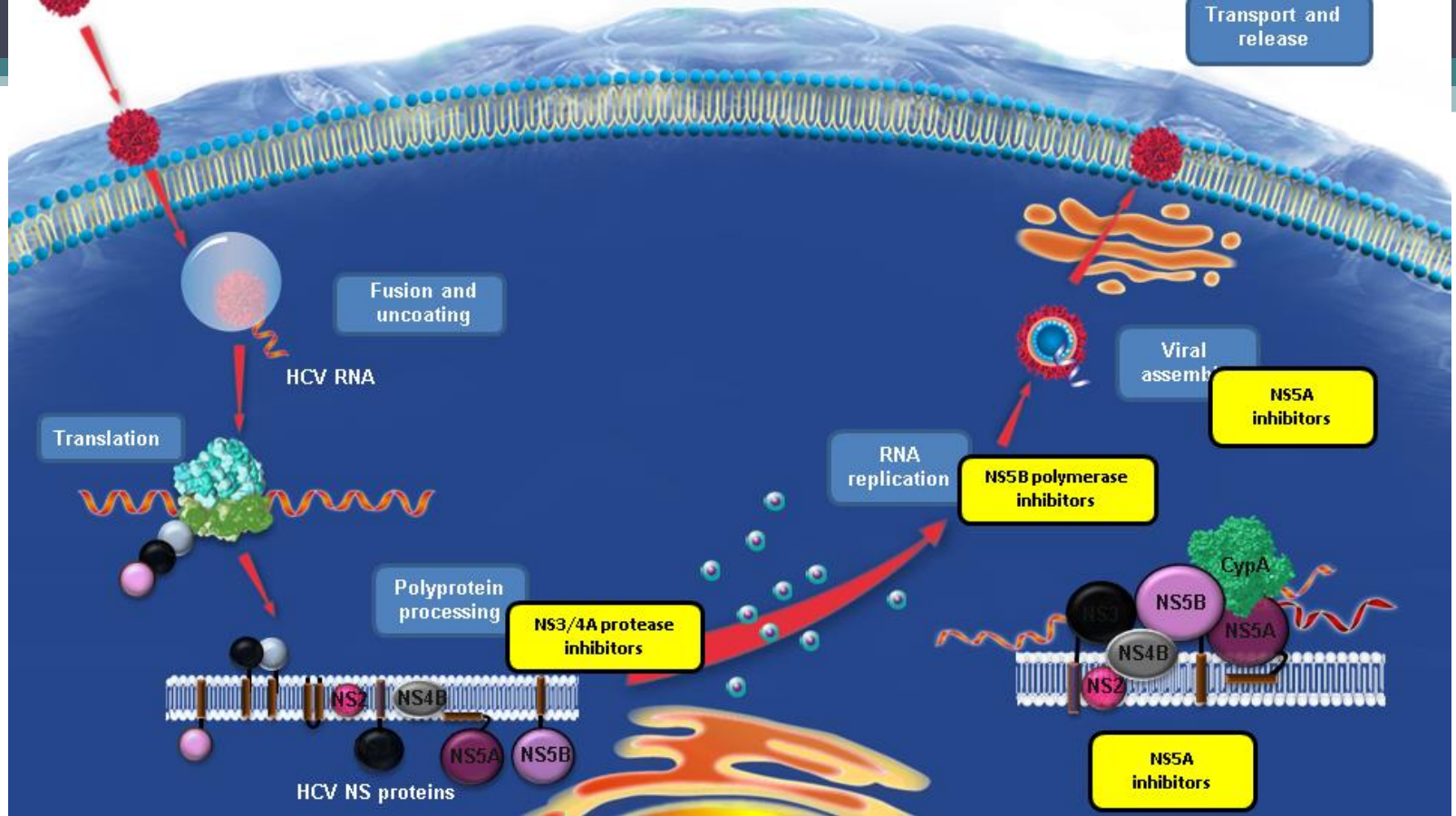


Γονότυποι - LIPA



Αλληλούχηση





Viral targets

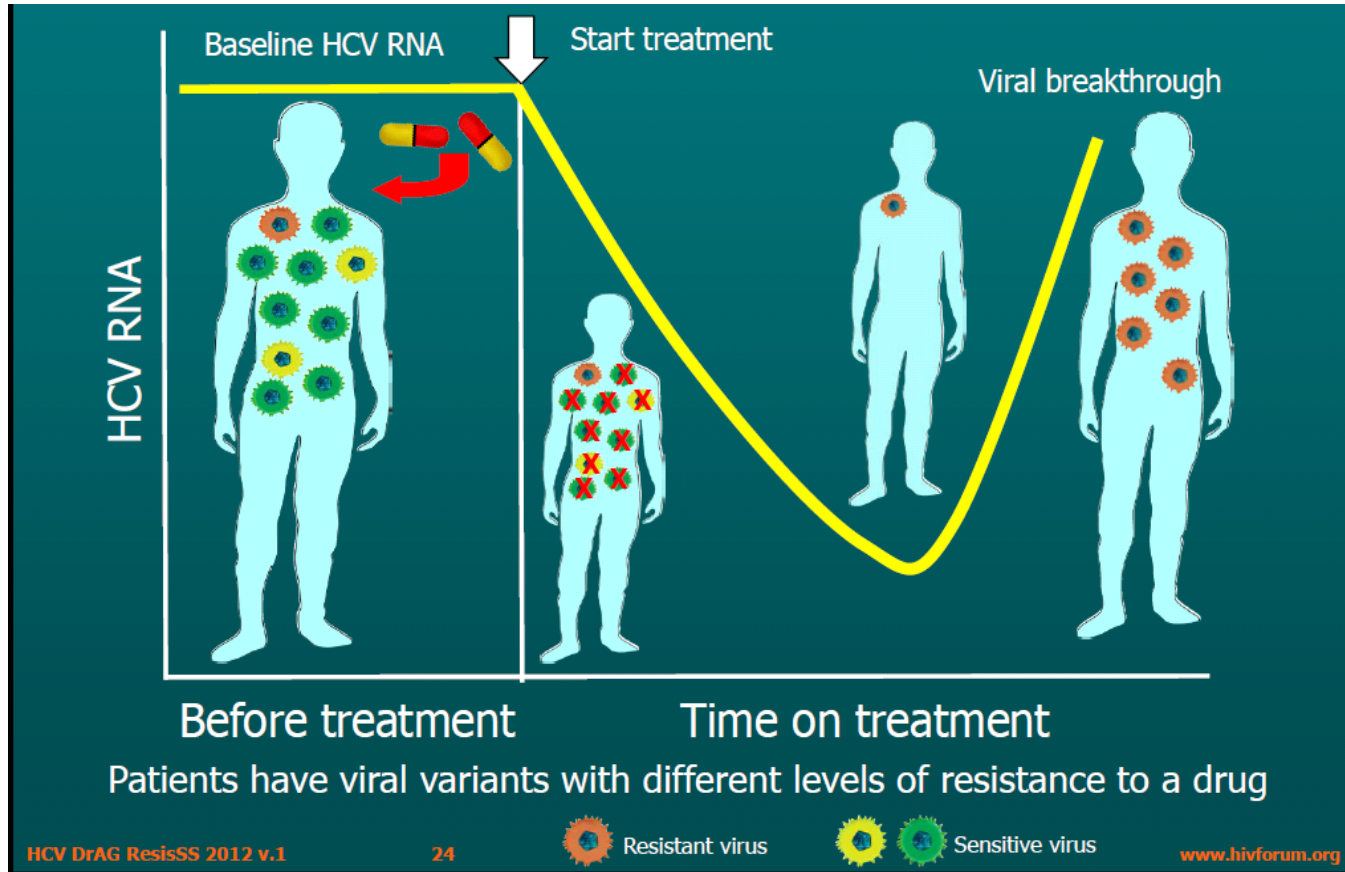


NS3	NS5A	NS5B	Host targets
The NS3/4A serine protease	Multifunctional phosphoprotein, component of the HCV-RNA replication complex	RNA-dependent RNA polymerase	Host protein interacting with NS5A and the NS5B
Boceprevir Telaprevir ABT-450/r, ACH-1625 Asunaprevir, TMC-435 (Simeprevir), BI-201335 Danoprevir/r, GS-9451 MK-5172	Daclatasvir GS-5885 ABT-267 PPI-668 MK	<u>Nucleos(t)ide analogue</u> GS-7977 (Sofosbuvir), Mericitabine, IDX-184 <u>Non-nucleoside analogue</u> BI-207127, ABT-333 ABT-072, BMS-791325 Tegobuvir, Setrobuvir VX-222, Fillbuvir	Alisporivir SCY-635

Host targets

Cyclophilin A

Αντοχή σε DAAs



HCV γενετική ετερογένεια συγγενών στελεχών (quacispesies) περιλαμβάνονται resistance-associated variants (RAVs)

Ανίχνευση Αντοχής. Πρέπει να εξετάζεται?

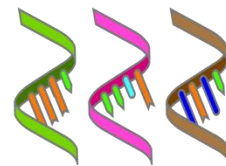
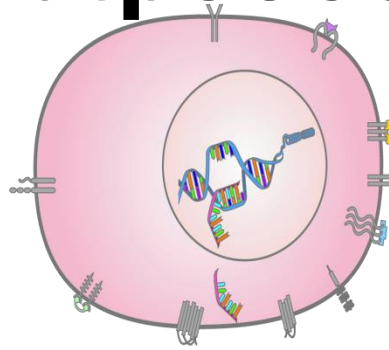
- Με τη νέα τεχνολογία μπορεί να ανιχνευθούν <0,5%
- Πριν την έναρξη αγωγής - Baseline test?
 - + σε μεγάλο ποσοστό ασθενών οι οποίοι όμως αποκρίνονται στα νέα φάρμακα
 - Εξαίρεση **Q80K (simeprevir)** 9-48% ασθενών με HCV g 1a (↓SVR)
- Σε αποτυχία αγωγής
 - Ο πληθυσμός ανθεκτικών στελεχών εμπλουτίζεται
 - Τα ανθεκτικά στελέχη εξαφανίζονται σταδιακά σε περίπου ένα χρόνο μετά τη θεραπεία

HEV - HDV

- Η ανίχνευση του **HDV RNA** με **PCR** είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης ειδικά σε αρχική φάση της λοίμωξης
- Παρακολούθηση θεραπείας
- **HEV RNA** (RT-PCR) η πιο αξιόπιστη μέθοδος διάγνωση
- Η ευαισθησία και ειδικότητα διαθέσιμων ELISA ποικίλει
- IgM 2/6 έχουν ευαισθησία και ειδικότητα > 95%

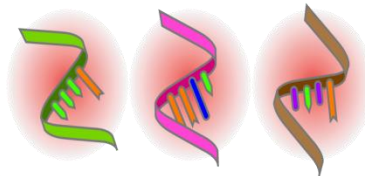
Γονιδιακές Μικροστοιχίες - ΗΚΚ

Κύτταρο



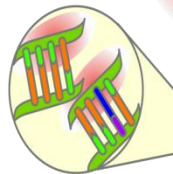
Απομόνωση mRNAs

Παραγωγή φθορίζοντων
cDNAs

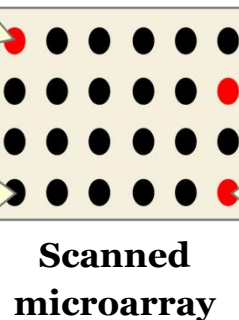
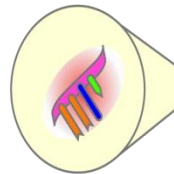


DNA στην εξέταση

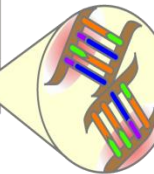
Red matches



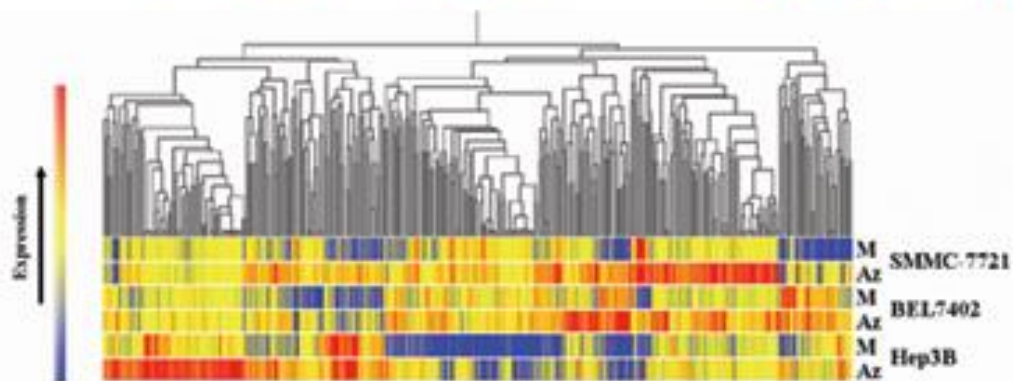
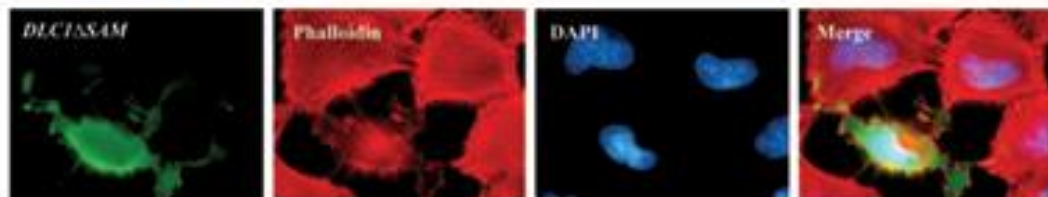
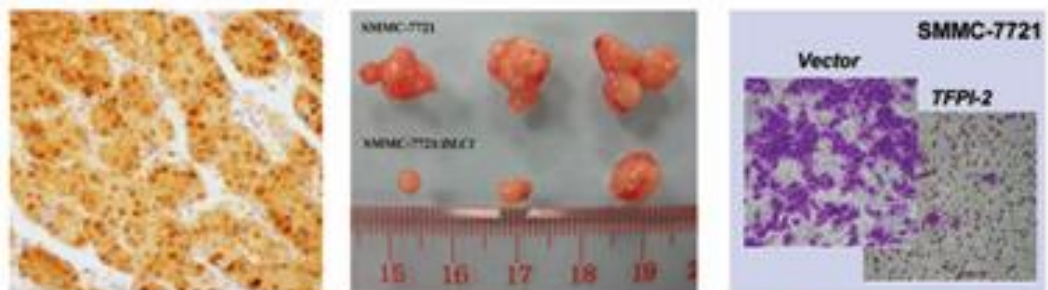
No matches



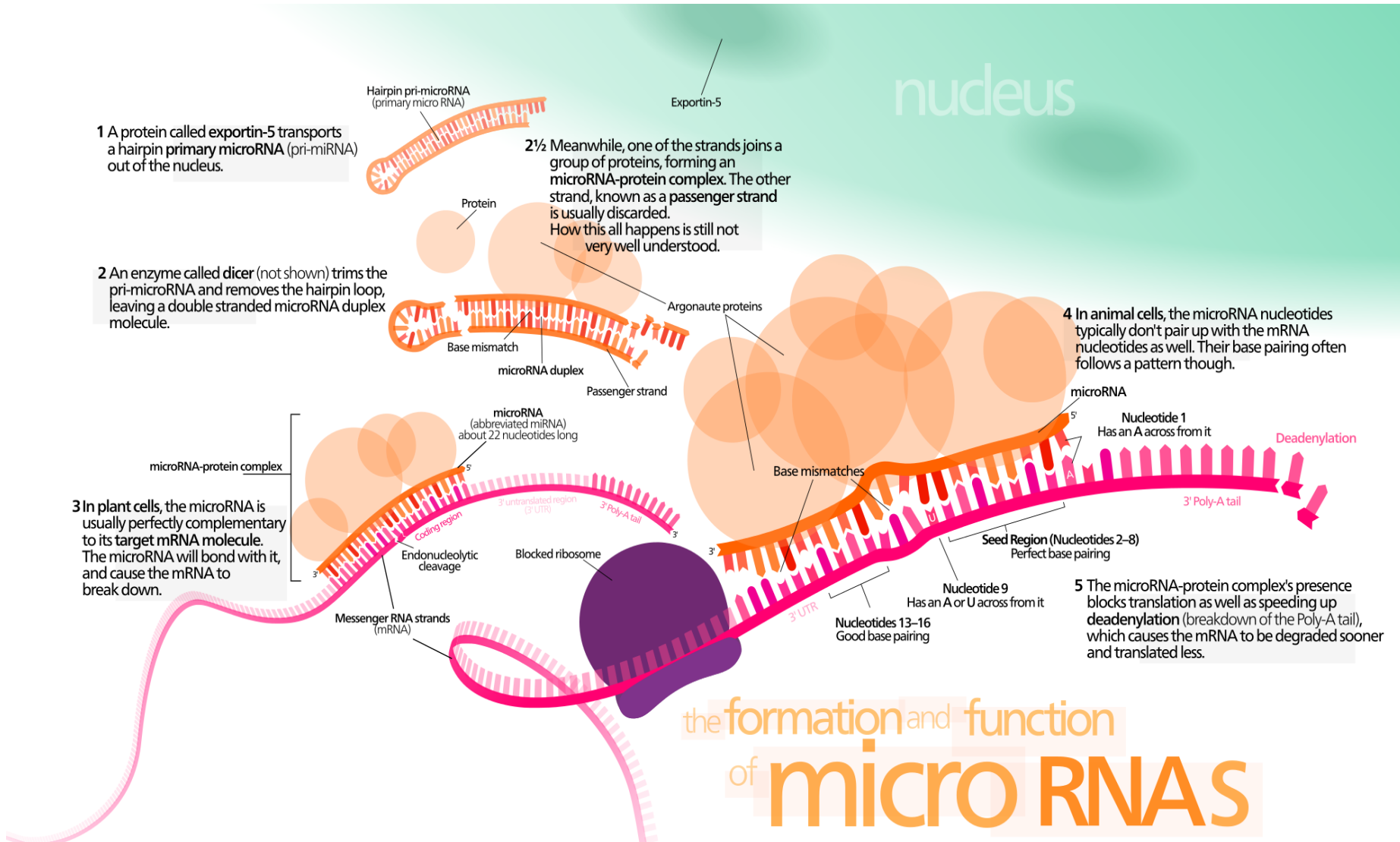
Red matches



ΗΚΚ Επιγενετικές Μελέτες



MicroRNA: Μικρό μη μεταγραφόμενο RNA που δρα στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης



1 A protein called exportin-5 transports a hairpin primary microRNA (pri-miRNA) out of the nucleus.

2½ Meanwhile, one of the strands joins a group of proteins, forming an microRNA-protein complex. The other strand, known as a passenger strand is usually discarded. How this all happens is still not very well understood.

2 An enzyme called dicer (not shown) trims the pri-microRNA and removes the hairpin loop, leaving a double stranded microRNA duplex molecule.

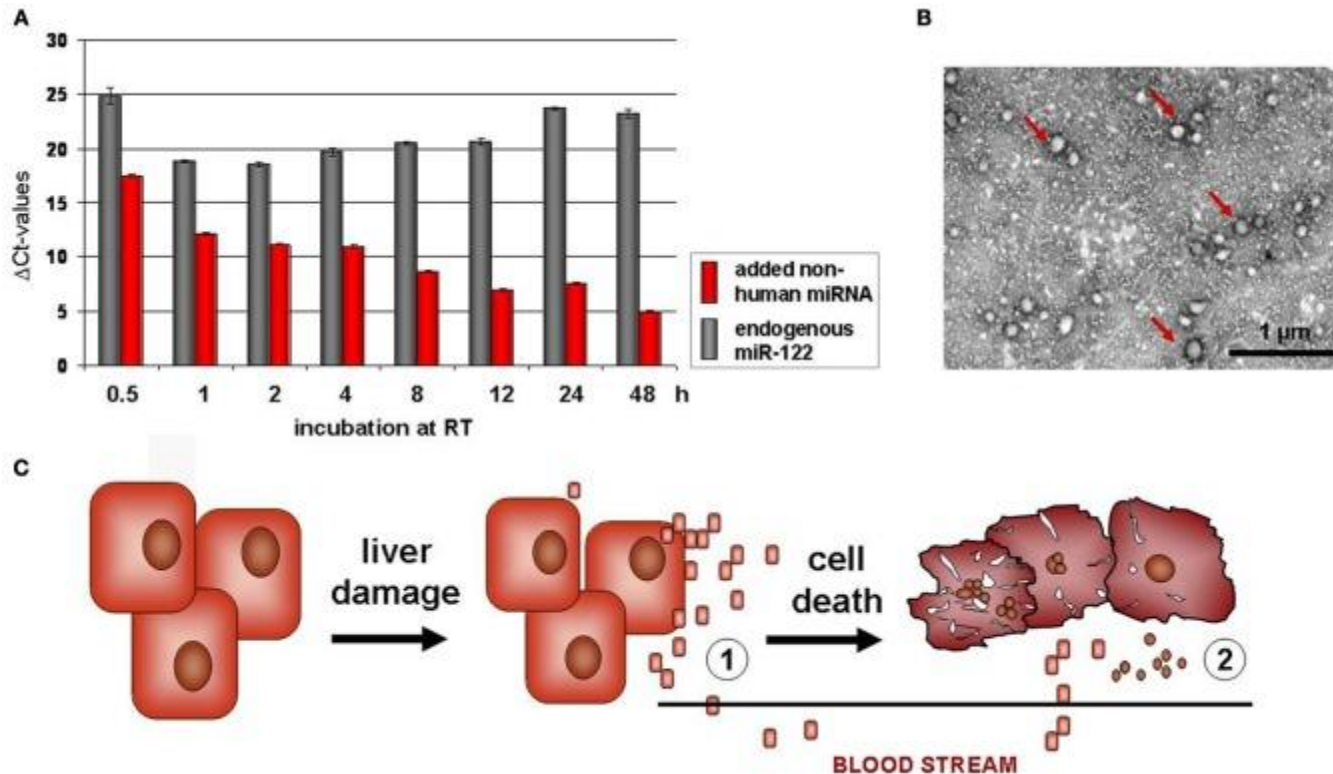
4 In animal cells, the microRNA nucleotides typically don't pair up with the mRNA nucleotides as well. Their base pairing often follows a pattern though.

3 In plant cells, the microRNA is usually perfectly complementary to its target mRNA molecule. The microRNA will bond with it, and cause the mRNA to break down.

5 The microRNA-protein complex's presence blocks translation as well as speeding up deadenylation (breakdown of the Poly-A tail), which causes the mRNA to be degraded sooner and translated less.

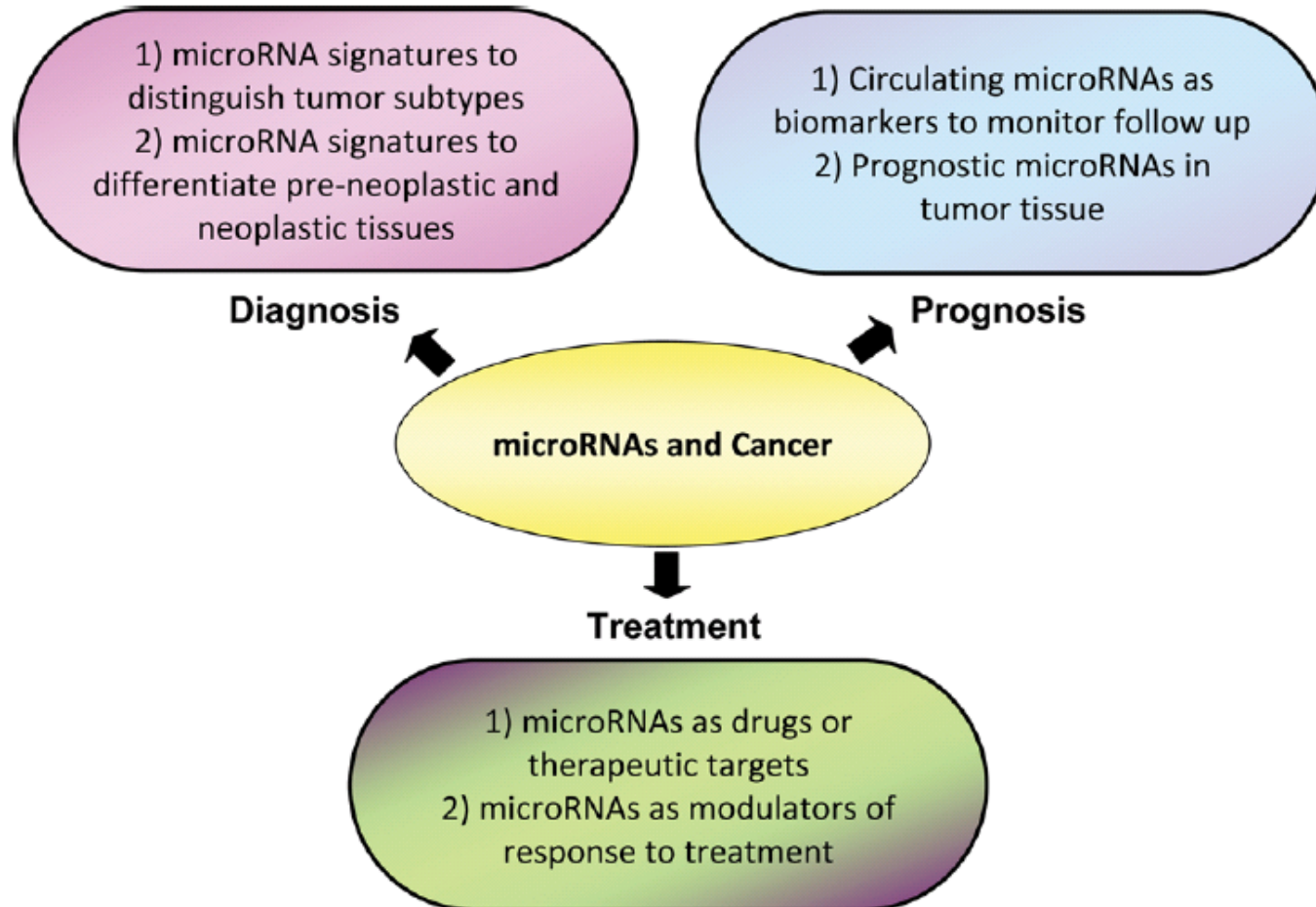
the formation and function
of **micro RNAs**

Highly stable miRNA is released from hepatocytes after acute liver damage

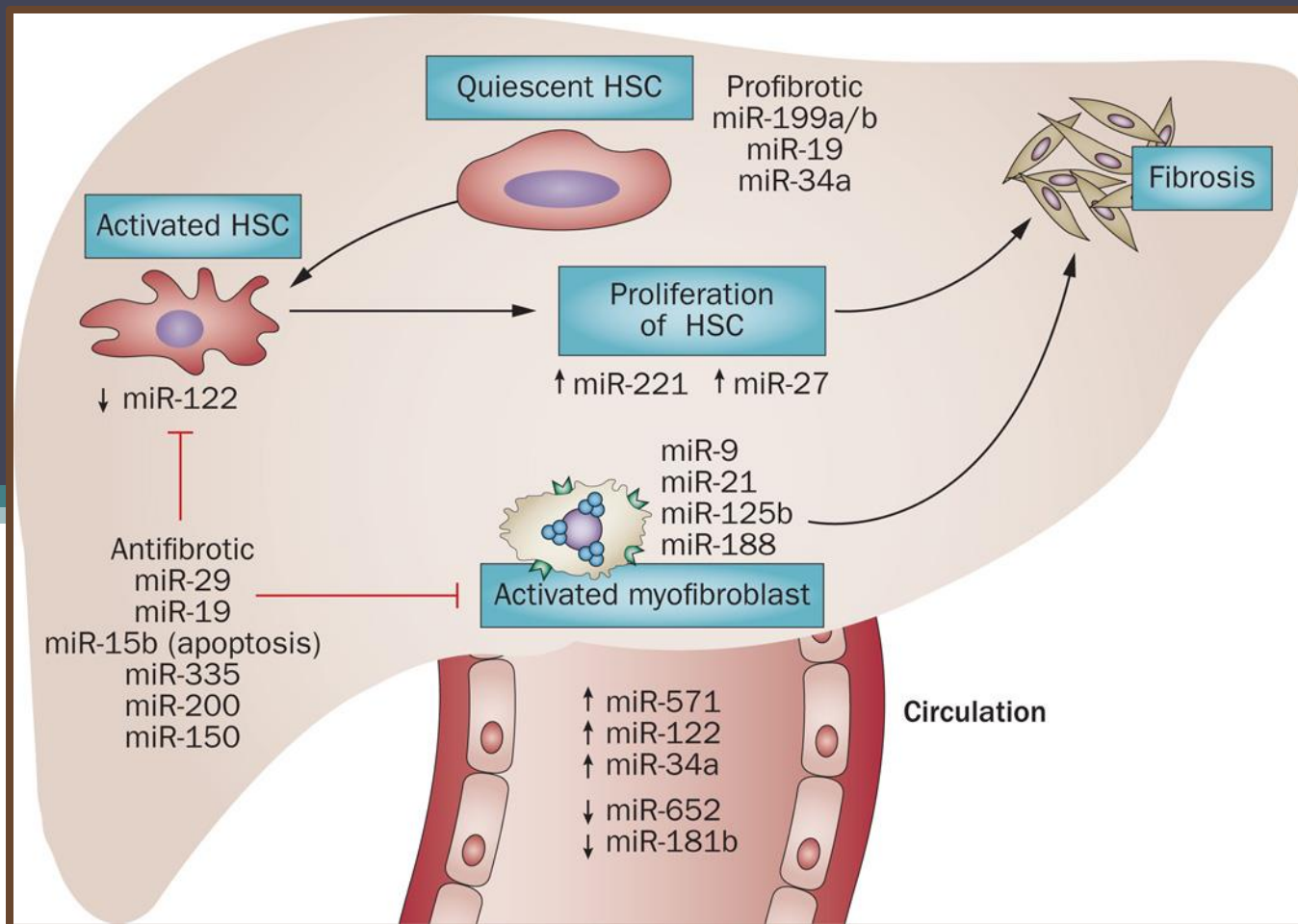


MicroRNA: Μικρό μη μεταγραφόμενο RNA που δρα στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης

MicroRNAs: HKK



microRNAs στην ηπατική ίνωση



ΚΑΛΟ ΑΠΟΓΕΥΜΑ

