

**University of Crete
Faculty of Medicine**

**Graduate Program
In Clinical Investigation**

**«CELLULAR AND GENETIC ETIOLOGY,
DIAGNOSIS AND TREATMENT
OF HUMAN DISEASES»**

Master thesis

**Mannose-Binding Lectin Polymorphisms and Outcome of
Patients with Chronic Hepatitis C**

Eirini Koutsounaki, MD

Supervisors

Emmanouil Galanakis, MD, PhD

Georgios Goulielmos, PhD

Heraklion 2006

ABSTRACT	3
INTRODUCTION	4
Objective	4
MATERIALS AND METHODS	5
Study population	5
<i>Hepatitis Activity</i>	6
<i>Liver fibrosis</i>	6
<i>Response</i>	7
Analysis of the mbl2 gene	7
<i>Confirmation of polymorphism by direct sequencing</i>	9
<i>Statistical analysis</i>	9
RESULTS	
Patients' clinical characteristics	10
Genotypes of MBL	10
Relationships between patients' characteristics and MBL alleles.	10
DISCUSSION	11
CONCLUSION	13
REFERENCES	14
TABLES	
Table 1. Primers' sequence	20
Table 2. Restriction endonucleases used in enzymatic digestions of exon 1	21
Table 3. Restriction endonucleases used in enzymatic digestions of promoter	22
Table 4. Frequency of promoter haplotypes in the total of 80 HCV study patients	23
Table 5 .Frequency of exon 1 genotypes and haplotypes in the total of 80 HCV study patients	24
Table 6. ABCD Genotypes and progression to fibrosis	25
Table 7. ABCD Genotypes and liver inflammation	26
Table 8. HL Genotypes and progression to fibrosis	27
Table 9. HL Genotypes and inflammation	28
Table 10. XY Genotypes and progression to fibrosis	29
Table 11. XY genotypes and inflammation	30
Table 12 Exon 1 genotypes AA, AO and OO correlation to the patients' age, duration of infection, laboratory results, and clinical classification according to hepatitis activity (CAH/CIH), liver fibrosis (advanced fibrosis/no fibrosis) and response to treatment (responders/non responders)	31
SUPPLEMENTS	
Supplement 1.	32
Supplemental Table 1. Patients' variables as related to chronic active or inactive hepatitis	32
Supplemental Table 2. Patients' variables as related to response or non response to treatment	33
Supplemental Table 3. Patients' variables as related to progression to cirrhosis or not	34
Supplement 2: Study Protocol	35
Supplement 3: Informed consent format	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Supplement 4: Structural and functional characteristics of MBL	42

ABSTRACT

Chronic infection with hepatitis C virus (HCV) often leads to chronic active inflammation and fibrosis of the liver. Host factors may contribute to the variable natural history and outcome. Deficiency of mannose-binding lectin (MBL) protein, a pattern recognition molecule involved in innate immunity, is determined by variant alleles in *mb12* gene promoter and exon-1 regions. To determine whether *mb12* gene polymorphisms affect the course of HCV infection we investigated the association between *mb12* gene polymorphisms and HCV infection in 80 Caucasian HCV-infected patients. Mannose-binding lectin (*mb12*) gene mutations were determined by using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) analysis. Non-A haplotype was found more frequently within chronic active hepatitis (CAH) patient genotypes rather than chronic inactive hepatitis (CIH) patient genotypes ($p=0.0374$, $OR=0.3255$, $95\%CI=0.1172$ to $0,9039$). Five patients were found homozygous for codon #54 mutations and four of them had advanced grade of fibrosis (ISHAK index ≥ 4) ($p=0.1774$, $OR=5.077$, $95\%CI=0.5344$ to 48.233). In conclusion *mb12* gene polymorphisms may have a role in determining the progression of chronic HCV infection.

INTRODUCTION

Mannose-binding lectin (MBL) is an important component of innate immunity. Circulating MBL levels are strongly related to genetic polymorphisms of *mb12* gene. It has been reported that deficiency or mutation in MBL may affect host defense to bacterial as well as viral infection. Variant alleles have been correlated with non-response to IFN therapy in a short scale study (Matsushita et al Hepatology 1998) and with progressive disease (Sasaki et al Scand 2000) in Japanese patients with hepatitis C viral (HCV) infection.

MBL polymorphisms have been associated with persistent hepatitis B virus (HBV) infection in Caucasian patients (Thomas et al 1996). Recently, genetic deficiency of MBL was correlated with progression of chronic hepatitis B to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Chong 2005). Moreover HBV clearance was shown to be affected by MBL polymorphisms (Thio 2005). Positive relation of *mb12* polymorphisms was found in Vietnamese and Japanese patients (Song 2003, Hacozaiki 2002), whereas no correlation was found in African, German, Korean patients (Bellamy 1998, Hohler 1998, Cheong 2005) with chronic HBV infection.

Objective

In the present study we investigated the frequency of mutant haplotypes detected in 80 Caucasians with HCV and the likelihood of correlation with the outcome of the disease. For this purpose, the relationship between MBL genotypes, and HCV RNA levels and the state of hepatic injury were analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Eighty Caucasian patients (71 Greeks) HCV-RNA-positive and/or HCV-Ab-positive (36 men and 44 women) followed up at Heraklion University Hospital were included. All HCV-RNA-positive and/or HCV-Ab-positive patients who visited the Hepatology outpatient department from January 2006 to July 2006 were asked to enter the study. Median age was 56 (range 22 to 83) median age at diagnosis was 43 (range 8 to 69). Mean follow up period was 7 years and mean serum levels of alanine aminotransferase (SGPT/ALT) were 68 IU/l. All patients were instructed to refrain from alcohol consumption during follow up. The study was performed in the laboratory of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, after obtaining the approval of the institutional committee and the informed consent of the patients.

Forty-eight underwent liver biopsy and liver histopathology was estimated following the Ishak hepatic activity index. Inflammation staging includes assessment of inflammatory cell infiltration, various forms of liver damage with scores from 0 to 4 and necrosis score from 0 to 6. Total score can be from 0 to 18. Fibrosis scoring ranges from 0 to 6 and refers to mild architectural changes (1-2), fibrosis (3-4) and cirrhosis (5-6) (Ishak et al 1995).

Hepatitis Activity

Sixteen patients were classified as cases of chronic inactive hepatitis and 30 as cases of chronic active hepatitis.

Chronic inactive hepatitis (CIH). This group consisted of asymptomatic patients with no history of acute hepatitis C, including those identified as a result of routine laboratory screening tests for blood donation. Patients in this category had normal aminotransferase levels, no complications of chronic diseases, and normal hepatic synthetic functions. In due to receive antiviral therapy liver biopsy was obtained from patients infected by HCV type 1, 1b and 4 and those infected by 3a and 2a/2c who consented to (Ishak index score of inflammation 1, 2, 3 and 4 in liver tissue biopsy).

Chronic active hepatitis (CAH). This group consisted of patients with a history of increased aminotransferase levels, without liver cirrhosis, determined by histopathological (score of inflammation 5, 6 and 7) and biochemical indices.

Liver fibrosis

Patients were distinguished into cases with advanced liver fibrosis (31 patients) and mild/no liver fibrosis (29 patients).

Advanced liver fibrosis Chronic HCV patients with histopathological evidence of fibrosis (stage 4 and 5). Patients with liver cirrhosis who presented histopathological criteria (Ishak index stage of fibrosis 5 and 6), platelet count <150,000 cells/ml; clinical criteria of atrophy of the liver, splenomegaly, and findings suggestive of portal hypertension on imaging control were also categorized in this group.

Mild/no liver fibrosis This group consisted of chronic HCV patients with lower stage (1, 2 and 3) of histopathological findings of fibrosis.

Response

Distinct classification was made to responders (31 patients) and non-responders (33 patients) to viral therapy with pegylated interferon and ribavirin.

As *responders* were defined the chronic HCV patients who retained undetectable viral load six months post therapy with ribavirin and pegylated interferon.

As *non responders* were defined the chronic HCV patients who retained viral load by the end of treatment with ribavirin and pegylated interferon.

Analysis of the mbl2 gene

Upon obtaining informed consent, we proceeded in collecting whole blood in EDTA-containing tubes. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leucocytes by using the commercial kit PUREGENE (Gentra SYSTEMS, Minnesota, USA). The extracted DNA was stored at -20⁰C until analyzed. Genotypes were scored blindly and analysis of all ambiguous samples was repeated.

Regions of interest, including the polymorphisms under study, within the promoter and exon 1 of the *mb12* gene, were amplified by polymerase chain reaction (PCR). We focused on two single nuclear polymorphisms (SNPs) at the promoter positions -550nt and -220nt and three mutations of exon 1. According to Madsen et al (Immunogenetics 1994), four alleles can be detected on *mb12* gene. Allele A indicates the wild-type gene, allele B the codon 54 (GGG to GAC) variant (glycine to aspartic acid), allele C the codon 57 (GGA to GAA) variant (glycine to glutamic acid), and allele D the codon 52 (CGT to TGT) variant (arginine to cystein). We subsequently grouped non-A variants (B, C, and D) as O allele.

The common polymorphisms within the promoter are termed H/L (-550nt site) and X/Y (-220nt site). The mutations were analyzed by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) analysis (Tin et al 2005). There are two sites (the -550nt site of the promoter gene region and codon 52 in exon 1) for which restriction endonucleases are not commercially available. The *Drd I* and *MwoI* restriction enzyme sites were introduced into amplification products of the -550 SNP and D allele respectively by site-directed mutagenesis with the use of specifically designed mismatched primers (Tin et al 2005). Two primers, named, MBL-E1-FOR (mismatched) and MBL-E1-REV. were used to amplify the polymorphic sites at exon 1. Another pair of primers, MBL-PRO-FOR (mismatched) and MBL-PRO-REV, were used to amplify the region carrying the polymorphic sites in the promoter region of the gene. PCR reactions were carried out by using a PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). The PCR conditions applied were the following: 1 cycle of 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 10sec, annealing at 62°C for 30sec and extension at 72°C for 30sec. The final extension step was done at 72°C for 10 min. A total volume (60 µl) of PCR reaction contained 100ng of genomic DNA, 0.4 µM each of forward and reverse primers, 0.2 mM of dNTPs, 1x reaction buffer (Minotech) and 0.2 units of DNA Taq Polymerase (Minotech). The primers used are depicted in Table 1.

12 µl each of MBL exon 1 PCR products were incubated with excess of *Mbo II* (Promega), or *Ban I* (New England Biolabs) at 37 °C, or *Mwo I* (New England Biolabs) at 60 °C for 2 hr in three single digestions (Table 2).

12 µl each of MBL promoter gene region PCR products were incubated with excess of *Drd I* (New England Biolabs) and *Btg I* (New England Biolabs) at 37 ° C overnight double digestion (Table 3).

Two or three percent agarose gels in 0.5x TBE buffer were used to visualize the cleaved fragments for exon 1 and promoter, respectively.

Confirmation of polymorphism by direct sequencing

Selected PCR amplified segments, corresponding to AA, AB, AC, AD and HY, HX, LY, LX genotypes, were completely sequenced both strands in a LiCor 4200L sequencer of the laboratory of Microchemistry (IMBB-FORTH, Crete, Greece) in order to confirm that the amplified products represent genuine *mb12* exon1 and promoter regions.

Statistical analysis

In comparison studies of the various patient subgroups, only unrelated cases were used. The statistical difference in genotype distribution and allele frequencies and case subjects was assessed by using Fisher exact test. Mann-Whitney test was used and odds ratios (OR) and their confidence intervals (CI) were calculated, *P* values <0.05 were defined as significant.

RESULTS

Clinical characteristics and biochemical measurements

The demographics, biochemical results and various variables investigated in HCV infected patients, in combination with the exon 1 polymorphisms, are shown in Table 12.

Genotypes of MBL

Promoter polymorphisms H/ L (site -550) and Y/ X (site -220) were also detected. The most common haplotype identified was HY, whereas others, such as LY, HX and LX, were also present in the patient group examined. Double digestion of the PCR product corresponding to the promoter allowed the determination of the promoter haplotypes presented (Table 4)

In the population under study, alleles B (codon #54 mutation), C (codon #57 mutation) and D (codon #52 mutation) were detected. The observed frequencies of genotypes AA, AB, BB, AC, AD, and DD are present in the Table 5.

Relationships between patients' characteristics and MBL alleles.

Non-A haplotype was found more frequently within chronic CAH patient genotypes rather than CIH patient genotypes ($p=0.0374$, $OR=0.3255$, $95\%CI=0.1172$ to 0.9039).

We assume that O haplotype (probably mutant MBL) could be related to chronic active hepatitis.

Five patients were found homozygous for codon #54 mutations and four of them had advanced grade of fibrosis (ISHAK index ≥ 4) ($p=0.1774$, $OR=5.077$, $95\%CI=0.5344$ to 48.233) (Tables 6). BB homozygosity may be associated with advanced fibrosis stages. However, none of the AA, AB, AC, AD, DD genotypes exhibited any significant difference regarding the aforementioned stages of the disease.

DISCUSSION

HCV infection is characterized by chronicity and outcome may vary from spontaneous recovery to asymptomatic healthy carriage or acute hepatitis C and to progression to liver fibrosis. Most of the infected patients develop chronic disease with detectable viral load and fluctuations in hepatic biochemistry, often in the absence of clinical symptoms. Viral clearance can be achieved to a degree (40%-60%) by established antiviral agents such as combined treatment with ribavirin and pegylated interferon. Progression of the chronic carriage in the liver may develop as chronic active hepatitis C, liver fibrosis, cirrhosis C and hepatocellular carcinoma. According to Lauer et al NEJM 2001, the major complications from chronic HCV infection occur as a result of progressive fibrosis with the ultimate development of cirrhosis. Extrahepatic manifestations such as cryoglobulinaemia and lymphoblastic lymphoma are also strongly correlated with chronic HCV infection. Clinical outcome is the result of a complex interplay between viral virulence factors and host's response to infection. It is well known that certain HCV genotypes are associated with worse prognosis. Not much is known on the human genetic susceptibility to HCV infection and progression to chronic disease.

Several studies have shown an association between low serum MBL level or the presence of *mbi2* variant alleles and an increased risk of infection and autoimmune diseases such as sepsis in neutropenic patients, meningococcal disease, pneumonia, systemic lupus erythematosus, early-onset rheumatoid arthritis and celiac disease.

Low serum concentration of the protein is associated with immunodeficiency caused either by a defect in complement activation or in complement-independent opsonophagocytosis.

It has been shown that in white patients, codon 52 mutation of the MBL gene is associated with persistent HBV infection (Thomas et al 1996), poor HBV clearance (Thio 2005) and progression of chronic hepatitis B to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Chong 2005).

Regarding HCV infection, MBL deficiency was shown to affect poor response to antiviral treatment and disease progression (Matsushita et al Hepatology 1998) (Sasaki et al Scand 2000). However, this potent relationship has not been adequately investigated up to date.

Our findings suggest that *mbi2* gene polymorphisms may have a role in determining the prognosis for patients with chronic HCV infection. These findings were similar to Sasaki et al previous study in Japanese patients relating #54 codon mutation with progression to chronic active hepatitis C. In the present study, no relationship between the sustained viral response rate and SNPs of *mbi2* was detected; a finding which is in accordance with previous reports (Naito et al 2005). Our findings differ partially to those of Kilpatrick et al (2003), mentioning that in a cohort of patients from Europe no correlation was apparent between MBL levels and response to therapy or hepatitis C disease progression. Of note,

direct comparison between these two studies cannot be done since the results in Kilpatrick et al refer to MBL serum levels only, without using any genotypes. Moreover, our findings are not consisted to those presented by Matsushita et al (1998) who studied a group of HCV Japanese patients and managed to correlate homozygosity for B allele with poor response to interferon treatment.

Of great interest in the present study was that almost all HCV infected patients with BB allele homozygosity had advanced liver fibrosis. This may suggest that an adequate serum concentration of MBL may be important in the defense against HCV infection. Individuals with a lower concentration of serum MBL may be more prone to HCV - induced hepatitis and subsequent liver cirrhosis. If this speculation has merit, then typing of the MBL gene may aid in the selection of HCV-infected patients at higher risks of progression to CAH and LC. It may also provide an insight into the pathogenesis of HCV infection, leading to CAH and LC.

CONCLUSION

Our findings suggest that hepatitis C patients with a mutant allele (B, C or D) are more likely to develop CAH than patients with A allele, which tend to retain CIH. Additionally, homozygosity for codon #54 mutations seems to be strongly related to progression to cirrhosis. Given the relatively small sample of the present study investigation of larger samples is required in order firm conclusions to be drawn.

REFERENCES

1. K. Sasaki: Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:960–965
2. Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med*. 1989 Oct 1; 170(4):1175-89.
3. Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J*. 1989 Sep 15;262(3):763-71.
4. Storgaard P, Nielsen EH, Andersen O, Skriver E, Mortensen H, Hojrup P, Leslie G, Holmskov U, Svehag SE. Isolation and characterization of porcine mannan-binding proteins of different size and ultrastructure. *Scand J Immunol*. 1996 Mar;43(3):289-96.
5. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*. 1996 Nov;17(11):532-40.
6. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*. 1996 Nov 23;348(9039):1417-9.
7. Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1733-45.

8. Ohta M, Okada M, Yamashina I, Kawasaki T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem.* 1990 Feb 5;265(4):1980-4
9. Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1497-502.
10. Malhotra R, Laursen SB, Willis AC, Sim RB. Localization of the receptor-binding site in the collectin family of proteins. *Biochem J.* 1993 Jul 1; 293 (Pt 1):15-9.
11. Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet.* 1991 Jun 29;337 (8757):1569-70.
12. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet.* 1995 Apr 8;345(8954):886-9
13. Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet.* 1995 Oct 7;346(8980):941-3.
14. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ.* 1997 Apr 26;314(7089):1229-32
15. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet.* 1996 Nov 23;348(9039):1417-9.

16. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981 Sep-Oct;1(5):431-5.
17. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995 Jun;22(6):696-9
18. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994 Jun;19(6):1513-20.
19. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*. 1994;40(1):37-44.
20. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet*. 1992 Dec;1(9):709-15. Erratum in: *Hum Mol Genet* 1993 Mar;2(3):342.
21. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol*. 1995 Sep 15;155(6):3013-20
22. Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet*. 1995 Oct 7;346(8980):941-3

23. Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, Spurdle AB, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(1):13-9.
24. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet.* 1989 Nov 25;2(8674):1236-9.
25. Homann C, Garred P, Hasselqvist P, Graudal N, Thiel S, Thomsen AC. Mannan-binding protein and complement dependent opsonization in alcoholic cirrhosis. *Liver.* 1995 Feb;15(1):39-44.
26. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345;41-52
27. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006 ISSN 0001-2815
28. Tin SK, Lee LY, Thumboo J, Koh DR, Fong KY. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL-2) gene. *J Immun Meth* 2005;303;148-151
29. Ishak K. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 1995; 22: 696-699
30. Summerfield, J. A.; Sumiya, M.; Levin, M.; Turner, M. W. : Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *Brit. Med. J.* 314: 1229-1231, 1997.

31. Soborg, C.; Madsen, H. O.; Andersen, A. B.; Lillebaek, T.; Kok-Jensen, A.; Garred, P. : Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 188: 777-782, 2003
32. Hibberd, M. L.; Sumiya, M.; Summerfield, J. A.; Booy, R.; Levin, M.; Meningococcal Research Group : Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* 353: 1049-1053, 1999
33. Garred, P: Susceptibility to HIV infection and progression of AIDs in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 349: 236-240, 1997.
34. Thio CL: Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2005 Jul;79(14):9192-6.
35. R. Alan Ezekowitz: Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *JID* 2003:187 (Suppl 2)
36. C.D.Kilpatrick: Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. *Clin Exp Immunol* 2003;132:92–95
37. M. Matsushita: Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch Virol* 143: 645–651 1998
38. Toralf Bernig, Willemijn Breunis, Nannette Brouwer, Amy Hutchinson, Robert Welch, Dirk Roos, Taco Kuijpers, Stephen Chanock. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. *Hum Genet* (2005) DOI 10.1007/s00439-005-0053-5

39. Oleksyk: Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance. *Genes and Immunity* 6,347–357, 2005.
40. Minton EJ : Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. *J Infect Dis* 178:39, 1998.
41. Minton EJ : Clearance of Hepatitis C Virus Is Not Associated With Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 Genes. *Human Immunology* 66, 127–132, 2005.

Table 1. Primers' sequence used for exon 1 region (MBL-E1-FOR, MBL-EI-REV) and promoter region (MBL-PRO-FOR, MBL-PRO-REV) replication

<i>Primers' sequence</i>	
MBL-E1-FOR	5'-CAT CAA CGG CTT CCC AGG GCA AGA TGG G
MBL-EI-REV	5'-GTC TCC TCA TAT CCC CAG GC
MBL-PRO-FOR	5'-GAA AAT GCT TAC CCA GAC AAG CCT GT
MBL-PRO-REV	5'-TCA TCT GTG CCT AGA CAC CTG GC

Table 2. Restriction endonucleases used in enzymatic digestions of exon 1 PCR products for the C, B, and D allele detection. Mbo II recognizes the mutant C allele, whereas Ban I (B) and Mwo I (D) cut the wild type alleles. The expected size of the PCR fragments are also presented

<i>Restriction Enzyme</i>	<i>Recognition sequence</i>	<i>codon</i>	<i>Units per 12 μl reaction</i>	<i>Expected size of PCR fragments</i> <i>Uncut: 134bp</i>
<i>Mbo II</i>	GAAGA(N) ₈	57 (C allele) mutant	3 U	78 bp
<i>Ban I</i>	GGYRCC	54 (B allele) wild type	0.5 U	95 bp
<i>Mwo I</i>	GC(N) ₇ GC	52 (D allele) wild type	0.5 U	109 bp

Table 3. Restriction endonucleases used in enzymatic digestions of promoter PCR products for the L and Y allele detection. Drd I recognizes the L polymorphism versus H polymorphism, whereas Btg I cut the Y vs X allele. The expected size of the PCR fragments are also presented

Restriction Enzyme	Recognition sequence	SNP	Units per 12 μl reaction
<i>Drd I</i>	GAC(N) ₆ GTC	-550 (L allele) polymorphism	0.5U
<i>Btg I</i>	CCRYGG	-220 (Y allele) common	1.5U
Promoter haplotypes	Expected size of PCR fragments		
HY/HY	354 bp		
HX/HY	410+354 bp		
LX/LY	389+333 bp		
HY/LY	354+333 bp		
LY/LY	333 bp		
HY/LX	389+354 bp		

Table 4. Frequency of promoter haplotypes in the total of 80 HCV study patients

<i>Promoter haplotypes</i>	
HY/HY	34 (42,5%)
HX/HY	16 (20%)
LX/LY	10 (12,25%)
HY/LY	12 (15%)
LY/LY	6 (7,5%)
HY/LX	2 (2,5%)

Table 5 .Frequency of exon 1 genotypes and haplotypes in the total of 80 HCV study patients

<i>Exon</i>	<i>1</i>
<i>Genotypes &</i>	
<i>haplotypes</i>	
AA	44 (55%)
AB	20 (25%)
BB	5 (6,25%)
AC	4 (5%)
AD	5 (6,25%)
DD	2 (2,5%)
A	117 (73,1%)
O	43 (26,9%)

Table 6. ABCD Genotypes and progression to fibrosis in 60 HCV patients with histological (ISHAK staging from 0 to 5) and clinical criteria

<i>Fibrosis</i>	1	2	3	4	5	<i>Total</i>
BB	0	0	1	2	2	5
AA	1	2	12	4	12	31
AB	0	0	8	3	3	14
AC	0	0	0	1	2	3
AD	0	2	2	0	1	5
DD	0	0	1	0	1	2
<i>Total</i>	1	4	24	10	21	60

Table 7. ABCD Genotypes and liver inflammation
in 48 HCV patients with histological criteria (ISHAK total scoring from 0 to 8)

<i>Inflammation</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	<i>Total</i>
AA	0	2	3	7	4	7	1	0	24
A haplotype	0	4	7	20	13	20	3	1	68
O haplotype	0	0	1	5	12	8	1	1	28
AB	0	0	1	3	3	4	0	1	12
BB	0	0	0	0	3	2	0	0	5
AC	0	0	0	0	0	1	1	0	2
AD	0	0	0	2	1	1	0	0	4
DD	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Total</i>	0	2	4	12	12	14	2	1	48

Table 8. HL Genotypes and progression to fibrosis in 60 HCV patients with histological (ISHAK staging from 0 to 5) and clinical criteria

<i>Fibrosis</i>	1	2	3	4	5	<i>Total</i>
HH	1	3	16	8	13	41
HL	0	0	3	1	5	9
LL	0	1	5	1	3	10
<i>Total</i>	1	4	24	10	21	60

Table 9. HL Genotypes and inflammation in 48 HCV patients with histological criteria (ISHAK total scoring from 0 to 8)

<i>Inflammation</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	<i>Total</i>
HH	0	1	4	8	9	10	1	1	34
HL	0	1	0	2	1	3	0	0	7
LL	0	0	0	2	2	2	1	0	7
<i>Total</i>	0	2	4	12	12	15	2	1	48

Table 10. XY Genotypes and progression to fibrosis in 60 HCV patients with histological (ISHAK staging from 0 to 5) and clinical criteria

<i>Fibrosis</i>	1	2	3	4	5	<i>Total</i>
YY	1	2	16	5	15	39
XY	0	2	8	5	6	21
<i>Total</i>	1	4	24	10	21	60

Table 11. XY genotypes and inflammation in 48 HCV patients with histological criteria (ISHAK total scoring from 0 to 8)

<i>Inflammation</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	<i>Total</i>
YY	0	0	3	9	11	6	0	1	30
XY	0	2	1	3	1	9	2	0	18
<i>Total</i>	0	2	4	12	12	15	2	1	48

Table 12

Exon 1 genotypes AA, AO and OO correlation to the patients' age, duration of infection, laboratory results, and clinical classification according to hepatitis activity (CAH/CIH), liver fibrosis (advanced fibrosis/no fibrosis) and response to treatment (responders/non responders)

variable	Total of patients N=80	MBL Exon1 Wild type AA genotype N=44	MBL Exon1 Heterozygosity AO genotype N=29	MBL Exon1 Homozygous mutation OO genotype N=7	P value	Odds ratio	95% CI
Gender (ratio male/female)	36/44	19/25	12/17	5/2	0.2339	0.952	0.0537 to 1.624
Age at evaluation (years)	56 (22 to 83)	56 (22 to 76)	51 (26 to 83)	60 (24 to 71)	0.5654		
Age at diagnosis (years)	43 (8 to 69)	42 (8 to 63)	43 (26 to 69)	52 (22 to 69)	0.3241		
Duration of infection	5 (0 to 29)	6 (0 to 29)	2 (0 to 16)	3,5 (0 to 17)	0.0893		
C3	112 (53 to 175)	111 (53 to 162)	110 (84 to 145)	175	NS		
C4	22,9 (4 to 52)	23 (4 to 52)	21 (9,5 to 36)	17	NS		
Reumatoid factor	<10 (<10 to 201)	<10 (<10 to 201)	<10 (<10 to 52,7)	10	NS		
Hepatitis activity (CAH/CIH)	30/16	13/10	11/6	6/0	0.3534	0.4588	0.1323 to 1.591
Liver fibrosis (advanced fibrosis/no fibrosis)	31/29	16/16	10/11	5/2	0.4259	0.3852	0.06853 to 2.165
Response to treatment (responders/nonresponders)	31/33	15/10	14/10	2/3	0.6404	2.175	0.3325 to 14.228
HCV titer (prior to treatment)	681000 (0 to 16,8*10 ⁶)	596500 (3430 to 7100000)	1,455*10 ⁶ (0 to 16,8*10 ⁶)	2,6*10 ⁶ (455000 to 3*10 ⁶)	0.4138		
HCV titer (post treatment)	0 (0 to 23,9*10 ⁶)	70950 (0 to 23,9*10 ⁶)	0 (0 to 4,11*10 ⁶)	0 (0 to 2,1*10 ⁶)	0.1153		
SGPT/ALT IU/l (prior to treatment)	70 (17 to 579)	67 (24 to 261)	76 (17 to 579)	140 (53 to 193)	0.1478		
SGPT/ALT IU/l (post)	58,5 (8 to 218)	50,5 (8 to 119)	80 (15 to 218)	136(13 to 140)	0.7754		

Supplement

Supplemental Table 1. Patients' variables as related to chronic active or inactive hepatitis

Total 46 patients	CAH N=30	CIH N=16
Gender	18 males	7 males
Age \pm SD (years)	58 \pm 14,425	41 \pm 14,78
Diagnosis age \pm SD	46 \pm 13,76	39 \pm 12,1
Fibrosis stage (ISHAK)		
1	0	1
2	0	3
3	14	9
4	8	2
5	7	0
Inflammation score		
1	0	0
2	0	2
3	0	3
4	1	9
5	12	0
6	15	0
7	1	0
SGPT (post treatment)	52,5 \pm 42,4	<30
HCV titer (prior to treatment)	691000 (range 19000 to 168x10 ⁵)	352000 (range 3430 to 50,2x10 ⁵)
HCV genotype		
1	3	1
1 β	10	7
3 ^a	8	2
2a/2c	2	0
4	3	3
C4 levels	25 (range 5,16 to 52)	21 (range 20,2 to 27,9)
HYA/HYA, HYA/LYA	7	6
HYA/HXA, LYA/HXA, HYA/HYO, LYA/HYO, LXA/HYA	10	7
YO/LXA, LXA/LYA, LYA/LYO, O/O	13	3

Supplemental Table 2. Patients' variables as related to response or non response to treatment

Total 64	Responders 31	Non Responders 33
Gender	16 males	16 males
Age ± SD (years)	42±15	59±13,4
Diagnosis age ± SD	40±13,2	53±12,4
Fibrosis stage (ISHAK)		
1	1	
2	4	
3	15	7
4	2	8
5	1	12
Inflammation score		
1		
2		2
3	1	1
4	7	2
5	6	4
6	6	6
7	1	1
	1	0
SGPT (post treatment)	19,5 (range 8 to 60)	68 (range 42 to 218)
HCV titer (prior to treatment)	541000 (range 19000 to168x10 ⁵)	488000 (range 1,27x10 ⁵ to 48,9x10 ⁵)
HCV genotype		
1	4	1
1β	8	9
3 ^a	11	6
2a/2c	2	0
4	2	6
C4 levels	25,4(range 9,8 to 52)	19,9 (range 4 to 35,5)
HYA/HYA, HYA/LYA	9	13
HYA/HXA, LYA/HXA, HYA/HYO, LYA/HYO, LXA/HYA	10	9
YO/LXA, LXA/LYA, LYA/LYO, O/O	12	11

Supplemental Table 3. Patients' variables as related to progression to cirrhosis or not

	Fibrosis 31	Non cirrhosis 29
Gender	10 males	17 males
Age ± SD (years)	65±13,4	42 ±13,7
Diagnosis age ± SD	56±13,5	40 ±12,25
Fibrosis stage (ISHAK)		
1	0	1
2	0	4
3	0	24
4	10	0
5	21	0
Inflammation score		
1	0	0
2	1	1
3	1	3
4	3	9
5	4	8
6	9	6
7	1	1
	0	1
SGPT (post treatment)	60 (13 to 218)	21 (13 to 119)
HCV titer (prior to treatment)	533000 (143000 to 71x10 ⁵)	422000 (19000 to 168x10 ⁵)
HCV genotype		
1	3	2
1β	9	10
3 ^a	3	10
2a/2c	1	1
4	4	3
C4 levels	19,9(4 to 36)	23,95 (5,16 to 52)
HYA/HYA, HYA/LYA	10	10
HYA/HXA, LYA/HXA, HYA/HYO, LYA/HYO, LXA/HYA	10	11
YO/LXA, LXA/LYA, LYA/LYO, O/O	11	8

Study Protocol

Μελέτη πολυμορφισμών της Mannose-binding lectin σε ασθενείς με ηπατίτιδα C

Κύριος ερευνητής: Ειρήνη Κουτσουνάκη, Ιατρός, Μεταπτυχιακή Ερευνήτρια

Περίληψη

Η ηπατίτιδα C είναι μία από τις συχνότερες χρόνιες λοιμώξεις του δυτικού κόσμου. Η κάθαρση του ιού με την καθιερωμένη θεραπεία με peg-ιντερφερόνη και ριβαμπρίνη είναι αποτελεσματική μόνο στο 55% των ασθενών. Φαίνεται ότι παράγοντες του ξενιστού ενέχονται επιπλέον στην ανοσολογική απάντηση. Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας έχει η μαννόζη-συνδεόμενη λεκτίνη (MBL), μεταλλαγές στο γονίδιο της οποίας προκαλούν μειωμένα επίπεδα MBL στον ορρό και έχειδειχθεί ότι σχετίζονται με ευπάθεια σε παιδιατρικές λοιμώξεις, μηνιγγιτιδοκοκκικές, μυκοβακτηριδιακές και λοιμώξεις από ιούς, όπως ο HIV . Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μεταλλαγμένες μορφές της MBL είναι συχνότερες σε χρονίους HBV ασθενείς που αναπτύσσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και κίρρωση, όπως επίσης ότι επηρεάζουν την κάθαρση του ιού της ηπατίτιδας B. Λιγότερα είναι γνώστα στην ηπατίτιδα C. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να εξεταστούν πολυμορφισμοί της MBL σε σχέση με την μείωση του ιϊκού φορτίου σε ασθενείς που παρακολουθούνται στο ΠΑΓΝΗ με χρόνια ηπατίτιδα C που διατηρούν υψηλά επίπεδα HCV RNA παρά τη θεραπεία με peg-ιντερφερόνη και ριμπαβρίνη (non responders) και φορείς που έχουν αρνητικοποιήσει τους τίτλους του ιού μετά τη θεραπεία (responders). Η σχετιζόμενη με την πορεία νόσου τιτλοποίηση του HCV (με PCR) θα συσχετιστεί με τυχόν πολυμορφισμούς του γονιδίου της MBL (PCR/RFLPs) και τα επίπεδα της MBL στον ορρό (ELISA). Τα αποτελέσματα θα αναλυθούν με τις κατάλληλες στατιστικές μεθόδους για τη διερεύνηση του κυρίου ερωτήματος: εάν επηρεάζεται η κάθαρση από τον ιό της ηπατίτιδας C σε θεραπευόμενους ασθενείς με απλοτύπους της MBL που επιφέρουν χαμηλά επίπεδα στον ορρό.

Εισαγωγή

Η επιμόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας μπορεί να επιφέρει εύρος κλινικών εκδηλώσεων από ασυμπτωματική φορεία και οξεία ηπατίτιδα ως χρόνια ηπατίτιδα και σχετιζόμενη ηπατική κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η τελική εικόνα φαίνεται να καθορίζεται από ιολογικούς παράγοντες και από παράγοντες του ξενιστού. Ο ιός της ηπατίτιδας C αποτελείται από ένα μικρό, μονό, θετικά ελικομένο RNA και ανήκει στην οικογένεια των φλαβοϊών. Συχνότεροι γονότυποι του HCV ιού που ενέχονται στη λοίμωξη είναι οι 1a, 1b, 2, 3 και 4. Στη δομή του ιού της ηπατίτιδας C είναι σημαντική η E₂ πρωτεΐνη του φακέλου που λόγω της πολυμορφικότητάς της φαίνεται να διαφεύγει των αντισωμάτων του ξενιστή.

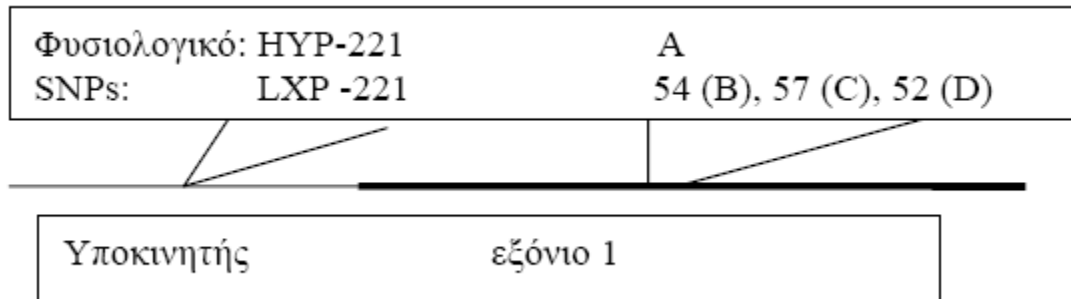
Επιδημιολογικά στοιχεία από τον Παγκοσμιο Οργανισμό Υγείας δείχνουν ότι 1.8% του πληθυσμού φέρει ορολογική ένδειξη για τον ιό της ηπατίτιδας C και 1.3% έχει διάγνωση χρόνιας λοίμωξης. Ένα μικρό ποσοστό των μολυνθέντων ατόμων (~27%) αρνητικοποιεί τα επίπεδα του ιού HCV, ενώ έχει αντισώματα έναντι του HCV, και διαφεύγει τον κίνδυνο εκδήλωσης ηπατοκυτταρικής νόσου από τον ιό. Το 82% του πρωτοπαθούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σχετίζεται με HBV/HCV λοίμωξη.

Παράγοντες του ξενιστού που έχουν σχετιστεί με θετική εκβαση της λοίμωξης είναι HLA πολυμορφικοί δείκτες. Οι γονότυποι HLA DRB1*1101, HLA DRB1*0301 συνδέονται με κάθαρση από τον ιό της ηπατίτιδας C (Minton et al, 1998). Πρόσφατες μελέτες (Minton et al 2005) που εξετάζουν πολυμορφισμούς στα γονίδια των ιντερλευκινών IL-1, IL-6 και IL-10 δείχνουν απουσία συσχέτισης συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την κάθαρση από τον ιό ενώ ορισμένοι πολυμορφισμοί στις IL-10 και IL-19 φαίνεται να έχουν θετική συσχέτιση με την κάθαρση στον Αφροαμερικανικό πληθυσμό (Oleksyk et al 2005).

Η σχέση μεταξύ γενετικού υποστρώματος του ξενιστού και απάντησης στον ιό της ηπατίτιδας είναι ακόμα ασαφής. Σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή ανοσία έχει το *Mbl*, υπεύθυνο γονίδιο για τη σύνθεση της MBL πρωτεΐνης. Η mannose binding lectin MBL (Ezekowitz 1988, Taylor 1989) είναι μία ασβεστιοεξαρτώμενη λεκτίνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ και εκκρίνεται στον ορρό ως πρωτεΐνη οξείας φάσης. Η MBL έχει σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή ανοσία καθώς ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος και τη φαγοκυττάρωση. Είναι ένα σύμπλοκο μόριο αποτελούμενο από τριμερή που εκπροσωπούνται έξι φορές στο σύμπλοκο. Μέσω ειδικής περιοχής αναγνωρίζει και δεσμεύει γλυκοπρωτεΐνες μαννόζης του τοιχώματος Gram (-) βακτηρίων καθώς και γλυκοπρωτεΐνες του εξωτερικού φακέλλου ιών (gp120 HIV). Πρωτεΐνη επιφανείας του HBV φακέλου περιέχει ένα πλούσιο σε μαννόζη ολιγοσαχαρίτη όπου πιθανώς προσδένεται η MBL και οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Chong et al 2005).

Το γονίδιο *Mbl2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και αποτελείται από τέσσερα εξόνια. Έχουν μελετηθεί τρεις πολυμορφισμοί (SNPs) στο εξόνιο 1 και ένας σημαντικός στον υποκινητή που δίνουν χαμηλά επίπεδα λειτουργικής MBL στον ορρό. Τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ονομάζονται A στο εξόνιο 1 και HYP στη θέση -221 του υποκινητή.

Μεταξύ των σημειακών μεταλλαγών που μελετώνται περιλαμβάνονται αυτές στο εξόνιο 1: στην τριπλέτα 54 G>A (B πολυμορφισμός), στην τριπλέτα 57 G>A (C πολυμορφισμός), στην τριπλέτα 52 C>T (D πολυμορφισμός) που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος B: G54D, C: G57E, D: R52C, και ο LXP πολυμορφισμός στη θέση -221 του υποκινητή.



Ο πολυμορφισμός D είναι συχνός στους Καυκασίους (σύμφωνα με τους Thomas et al) . Έχει εκτιμηθεί ότι το 10% της λευκής φυλής έχει συνδιασμούς πολυμορφισμών που επιφέρουν πολύ χαμηλά επίπεδα MBL < 50 ng/ml στον ορρό (P.Garred Mol.Immunol.2004).

Στον πίνακα διακρίνονται οι συγκεντρώσεις της MBL στον ορρό σε σχέση με το γονότυπο:

Ομάδα 1 Υψηλά Επίπεδα MBL >2.5 µg/ml	Ομάδα 2 Χαμηλά Επίπεδα MBL <1.15 µg/ml	Ομάδα 3 Πολύ Χαμηλά MBL <0.05 µg/ml
YA/YA	XA/XA	Y(nonA)/Y(nonA)
YA/XA	YA/Y(nonA)	XA/Y(nonA)

*HYP (αναφέρεται ως Y) LXP (αναφέρεται ως X) στον πίνακα οι SNPs B, C, D που επιφέρουν χαμηλά επίπεδα MBL αναφέρονται ως non A.

Γενετικές μεταλλαγές και χαμηλά επίπεδα MBL στον ορρό σχετίζονται με γενετική ευπάθεια σε λοιμώξεις όπως στις HIV (Garred 1997), στις λοιμώξεις από μηνιγγιτιδόκοκκο (Hibberd 1999),στη φυματίωση (Soborg 2003) και υποτροπιάζουσες παιδιατρικές λοιμώξεις (Summerfield 1995,1997).

Πρόσφατα μελετήθηκαν πολυμορφισμοί της MBL από τους Chong et al (Hepatology 2005) που συνδέουν το γενετικό έλλειμμα στη μαννόζη-συνδεόμενη λεκτίνη mannose binding lectin (MBL) με την τελική εκδήλωση ηπατοκυτταρικής κίρρωσας και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε χρονίους HBV ασθενείς. Επίσης πρόσφατη δημοσίευση C.L.Thio et al(J.Virol. 2005) δείχνει ότι η κάθαρση από τον HBV επηρεάζεται από MBL πολυμορφισμούς . Μεταλλάξεις SNPs που συνδέονται με τη χρόνια ηπατίτιδα B έχουν εντοπιστεί από τους H.C.Thomas et al (Lancet 1996). Θετική συσχέτιση SNP πολυμορφισμών με χρόνια ηπατίτιδα B βρέθηκε επιπλέον σε Βιετναμέζους και Ιάπωνες (L. H. Song 2003, Hakozaki Y 2002). Αρνητική συσχέτιση

δίνουν σε Αφρικανούς, Γερμανούς, Κορεάτες (R.C.Bellamy 1998, T.Hohler 1998, J.Y. Cheong 2005).

Λιγότερες έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη διερεύνηση των πολυμορφισμών της MBL στους ασθενείς με ιογενή ηπατίτιδα C και την ενδεχόμενη συσχέτιση της πορείας της νόσου με γενετικό έλλειμμα στην MBL. Οι M. Matsushita et al συσχετίζουν τις μεταλλαγμένες μορφές MBL με φτωχότερη πρόγνωση στη θεραπεία με ιντερφερόνη-α (Arc.Virol 1998). Οι Sasaki et al υποστηρίζουν ότι γονιδιακές μεταλλάξεις και χαμηλά επίπεδα της MBL στον ορρό μπορεί να είναι επιβαρυντικοί παράγοντες στην πρόοδο της χρόνιας ηπατίτιδας από τον ιό C (Scand.J.Gastroent.2000). Οι Kilpatrick et al (Clin Exp Immunol 2003), σε αντίθεση, θεωρούν τα επίπεδα της MBL στον ορρό μη καθοριστικά στην εξέλιξη της HCV λοίμωξης και την χορήγηση MBL (θεραπεία υποκατάστασης) μη ενδεδειγμένη. Στην τελευταία μελέτη δεν εξέτασαν την MBL σε γονιδιακό επίπεδο.

Ενδιαφέρον για μας έχει η μελέτη πολυμορφισμών της MBL σε σχέση με την μείωση του ιϊκού φορτίου, καθώς είναι γνωστό ότι η HCV ιαμμία εμμένει μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη μόλυνση από τον ιό HCV.

Για τη συσχέτιση των σημειακών πολυμορφισμών της MBL με την κάθαρση από τον HCV ιό η μελέτη θα περιλάβει άτομα που κατάγονται από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης και παρακολουθούνται από τη Γαστρεντερολογική Κλινική του ΠΑΓΝΗ με θετικά αντισώματα έναντι του HCV. Πρόκειται να εξετασθούν ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C που διατηρούν υψηλά επίπεδα HCV RNA παρά τη θεραπεία με peg-ιντερφερόνη και ριμπαβιρίνη (non responders) και φορείς που έχουν αρνητικοποιήσει τους τίτλους του ιού μετά τη θεραπεία (responders).

Κύριο ερώτημα

Σχετίζεται η μειωμένη κάθαρση από τον ιό στους non responders με αποτύπους της MBL που επιφέρουν χαμηλά επίπεδα στον ορρό

Επιμέρους ερωτήματα

1. Ποιά είναι η συχνότητα των πολυμορφισμών SNPs στο δείγμα του πληθυσμού που μελετάμε α) συνολικά β) στους responders και γ) στους non responders
2. Ποιά είναι τα επίπεδα της MBL στον ορρό σε σχέση με το γονότυπο του κάθε ασθενούς
3. Ποιά είναι η συχνότητα χαμηλών επιπέδων MBL ορρού α) στους responders και β) στους non responders
4. Ποιά είναι η μείωση του ιϊκού φορτίου α) στους responders και β) ποιά στους non responders

5. Ποιός γονότυπος του ιού HCV καθαίρεται συχνότερα και ποιός λιγότερο συχνά στο συγκεκριμένο δείγμα πληθυσμού
6. Υπάρχει σχέση ανθεκτικού τύπου του ιού (μη καθαιρόμενου) α) με μεταλλαγμένους απλοτύπους της MBL β) με χαμηλά επίπεδα MBL στον ορρό

Μέθοδος :

Δείγμα μελέτης

40 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C που διατηρούν υψηλά επίπεδα HCV RNA παρά τη θεραπεία με peg-ιντερφερόνη και ριμπαβιρίνη (non responders) και 40 υγιείς φορείς που έχουν αρνητικοποιήσει τους τίτλους του ιού μετά τη θεραπεία (responders).

1. Προσδιορισμός γονοτύπου του ιού και μέτρηση του ιϊκού φορτίου προ και τρεις μήνες μετά τη θεραπεία.
2. Καθορισμός των επιπέδων της MBL στον ορρό με ELISA.
3. Απομόνωση γενωμικού DNA (QIAGEN, flexigene DNA kit) από περιφερικό αίμα ασθενών/φορέων.
4. Πραγματοποίηση PCR για την ανίχνευση πολυμορφισμών με ηλεκτροφόρηση αгарόζης στον υποκινητή και την κωδικοποιούσα περιοχή της MBL.
5. Γονοτύπηση των μελετηθέντων ατόμων όλων των κατηγοριών.
6. Στατιστική ανάλυση με μηδενική υπόθεση H_0 :απουσία συσχέτισης MBL (SNPs) με την κάθαρση από τον ιό και H_1 :θετική συσχέτιση . Εφαρμογή του χ^2 τεστ και εφαρμογή του Mann-Whitney U Test για τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με το ιϊκό φορτίο.

Πίνακας Ασθενούς HCV

Όνομα Ασθενούς		Αυξ.Αριθμός
Ηλικία	Διεύθυνση	Τηλέφωνο
Ημερομηνία διάγνωσης	Βιοψία Ήπατος	Αντι-HCV Ποιοτική PCR Γονότυπος HCV
Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ιστολ.διάγνωση ηπατίτιδας <input type="checkbox"/> Mild <input type="checkbox"/> Moderate <input type="checkbox"/> Severe	Ποσοτική PCR (πριν τη θεραπεία) Ημ.
Θεραπευτικό σχήμα Ριμπαβιρίνη Από εώς	SGOT: Προ Μετά SGPT: Προ Μετά Plt:	Ποσοτική PCR (3 μήνες μετά τη θεραπεία)
peg-ιντερφερόνη Από εώς	Προ Μετά Alb: Προ Μετά	Ημ.
Response	Non Response	Relapse
Ρευματοειδής παράγοντας	Ημ.	Αποτελ.
C3	Ημ.	Αποτελ.
C4	Ημ.	Αποτελ.
Γεν.ούρων (διάγνωση νεφρίτιδας)	Ημ.	Αποτελ.
Διάγνωση άλλης ιογενούς λοίμωξης (HBV,CMV,HSV...)		
Υποτροπιάζουσες Λοιμώξεις (ωτίτιδα,ουρολοιμώξεις...)		

Έντυπο ενημερωμένης συγκατάθεσης

Μελέτη αιτιολογίας, γενετικής ευπάθειας και απόκρισης στη θεραπεία

σε λοίμωξη από τον ιό της Ηπατίτιδας C

Κάθε άτομο που έχει προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C παρουσιάζει διαφορετική απάντηση σε σχέση με την ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή και την απομάκρυνση του ιού από τον οργανισμό. Σημαντικό ρόλο στην έκβαση της θεραπείας φαίνεται να έχει η ποιότητα παραγόντων που καθορίζουν την ονομαζόμενη "πρώτη γραμμή άμυνας". Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να εξετάσει τέτοιους παράγοντες στο εργαστήριο (μοριακά και γενετικά) και να οδηγήσει σε συμπεράσματα σε σχέση με την άμυνα του οργανισμού και την καλλίτερη απάντηση στη θεραπεία.

Συγκατάθεση Ασθενούς

Αφού μου εξηγήθηκαν οι σκοποί και η μεθοδολογία της μελέτης αυτής, συμφωνώ, να χρησιμοποιηθεί μικρή ποσότητα (~5ml) από την εξέταση αίματος της συνηθισμένης παρακολούθησής μου, με την προϋπόθεση ότι

- Δε θα γίνει καμία επιπλέον αιμοληψία εκτός από τις απαραίτητες για την παρακολούθηση και θεραπεία μου
- Διατηρώ το δικαίωμα να αλλάξω γνώμη και να διακόψω τη συμμετοχή στη μελέτη αυτή, όποτε το επιθυμήσω και χωρίς να χρειαστεί να εξηγήσω τους λόγους της απόφασής μου
- Διατηρώ το δικαίωμα να ζητήσω ενημέρωση για τα αποτελέσματα που αφορούν στην υγεία μου και που θα προκύψουν από τη μελέτη αυτή

Ηράκλειο /... .. /20

Ο ασθενής

Ο γιατρός

.....

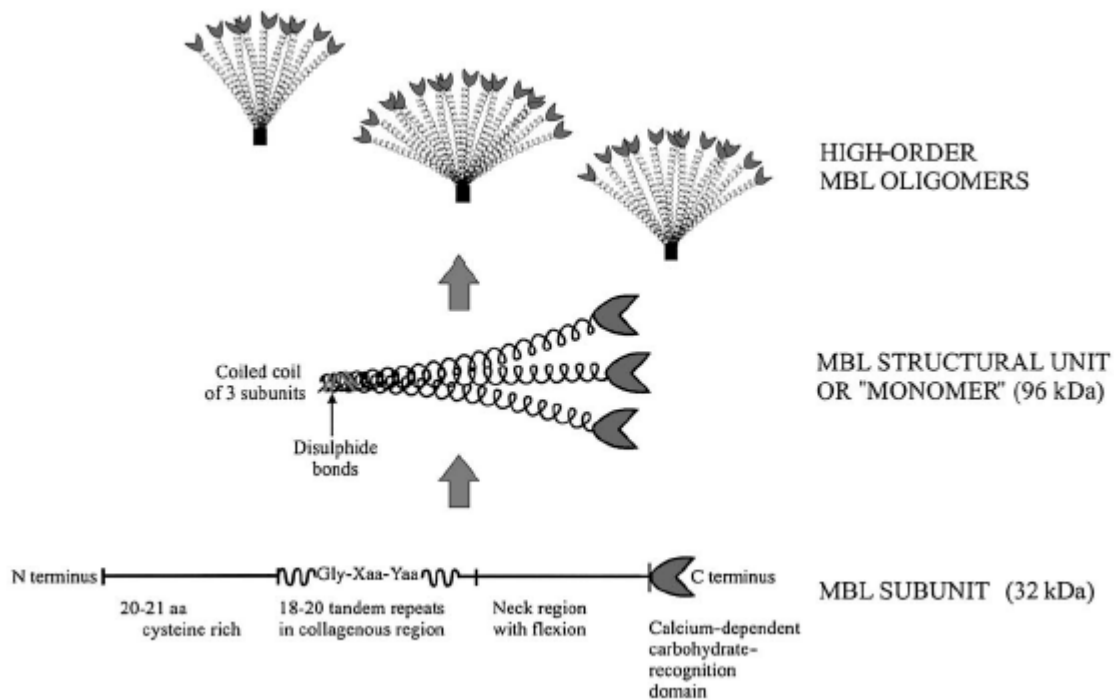
.....

τηλέφωνο

.....

MBL- Η δεσμευόμενη στη μαννόζη λεκτίνη

Η δεσμευόμενη στη μαννόζη λεκτίνη (MBL), ανήκει στους παράγοντες της χυμικής ανοσίας που αναγνωρίζουν επαναλαμβανόμενες δομές όπως λιποπολυσαχαρίτες, μαννάνες, γλυκάνες εκφραζόμενες κατά κύριο λόγο σε επιφάνειες παθογόνων και όχι από τον 'εαυτό'. Η βασική μονάδα της MBL αποτελείται από ένα ομοτριμερές σχηματιζόμενο από την ελίκωση περιοχής που μοιάζει με την έλικα κολλαγόνου. Το καρβοξυτελικό άκρο της μονάδας αυτής προβάλλει με μορφή 'τουλίπας', έχει ασβεστιοεξαρτώμενη δράση και αναγνωρίζει δομές ολιγοσαχαριτών όπου δεσμεύεται.



[CID 2003:37 (1 December) • Eisen and Minchinton]

Η MBL φαίνεται ότι έχει κεντρικό ρόλο στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση έναντι βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασίτων. Είναι μία λεκτίνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ, κυκλοφορεί στον ορό και έχει δράση πρωτεΐνης οξείας φάσης. Δεσμευόμενη

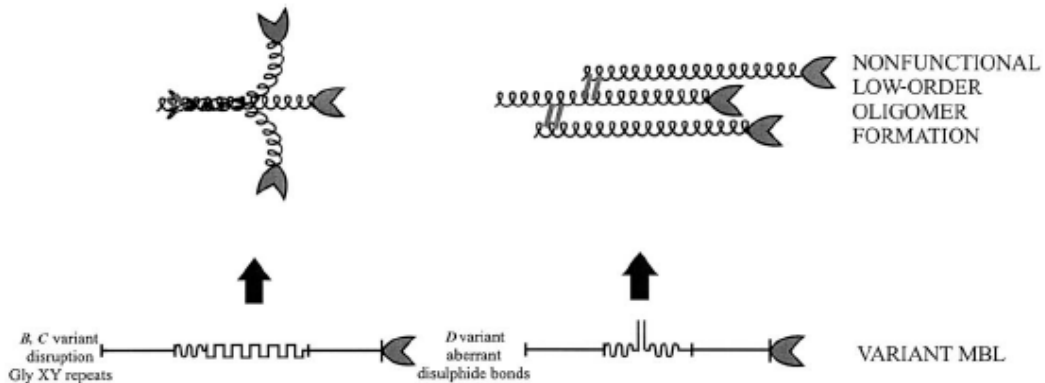
στην επιφάνεια του ξενιστού μπορεί να συμμετέχει άμεσα στην οψωνοποίησή του και τη φαγοκυττάρωση, είτε να ενεργοποιεί τη χαρακτηριζόμενη τρίτη οδό του συμπληρώματος, την οδό των λεκτινών.

Η λειτουργική MBL κυκλοφορεί με τη μορφή ανώτερων πολυμερών (τετραμερών, πενταμερών και εξαμερών) της βασικής ομοτριμερούς μονάδας. Η ανώτερη στερεοδιαμόρφωση επιτρέπει μεγαλύτερης συγγενείας αλληλεπιδράσεις με τις επιφάνειες των μικροβίων, επερχόμενη στερεοταξική αλλαγή στο σύμπλοκο και ενεργοποίηση ειδικών πρωτεασών των MASPs. Δομικά και λειτουργικά η MBL μοιάζει με τον παράγοντα C1q της κλασσικής οδού του συμπληρώματος, όμως μπορεί να δεσμεύεται στα παθογόνα ανεξάρτητα από την παρουσία αντισωμάτων.

Τα τετραμερή, πενταμερή, εξαμερή της MBL κυκλοφορούν σε σύμπλοκα με τις MBL-σερίνη πρωτεάσες MASP-1, MASP-2 και MASP-3. Η MASP-2 μοιάζει με το C1s της κλασσικής οδού. Κόβει το C4 για την παραγωγή C4b και τελικά το σχηματισμό C4b2a, της C3 κομβερτάσης. Ακολούθως παράγεται το θραύσμα C3b, που επίσης δρα ως οψωνίνη, συμμετέχοντας με το C4b2a στη δράση της C5 κομβερτάσης. Με την ενζυμική πέψη του C5 παράγεται η C5a αναφυλατοξίνη και το C5b θραύσμα ξεκινά το σχηματισμό του membrane-attack complex που δημιουργεί οπές στις μεμβράνες και προκαλεί άμεση λύση στο παθογόνο.

Το γονίδιο *mbl-2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και αποτελείται από τέσσερα εξόνια. Τρεις δομικές μεταλλάξεις του εξονίου 1 οι B (54aa), C (57aa) και D (52aa) επηρεάζουν την ελίκωση της περιοχής που μοιάζει με κολλαγόνο και φαίνεται να διαταράζουν το

σχηματισμό της βασικής ομοτριμερούς μονάδας και των ανώτερων πολυμερών.



• CID 2003:37 (1 December) • Eisen and Minchinton

Πολλοί σημειακοί πολυμορφισμοί της περιοχής του υποκινητή έχουν μελετηθεί, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζουν δύο στη θέση -550 H/L και -220 X/Y οι οποίοι σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και συνεπώς χαμηλά επίπεδα MBL στο πλάσμα. Τα άτομα με MBL ‘αγρίου τύπου’ παρουσιάζουν 1,5 έως τρεις φορές αύξηση της πρωτεΐνης, ενώ φορείς με μεταλλαγμένο γονότυπο της MBL δεν επιτυγχάνουν επίπεδα της πρωτεΐνης στο φυσιολογικό εύρος σε συνθήκες οξείας φάσης. Το γενετικό έλλειμμα της MBL, έχει θεωρηθεί ως μία από τις συχνότερες ανοσοανεπάρκειες.