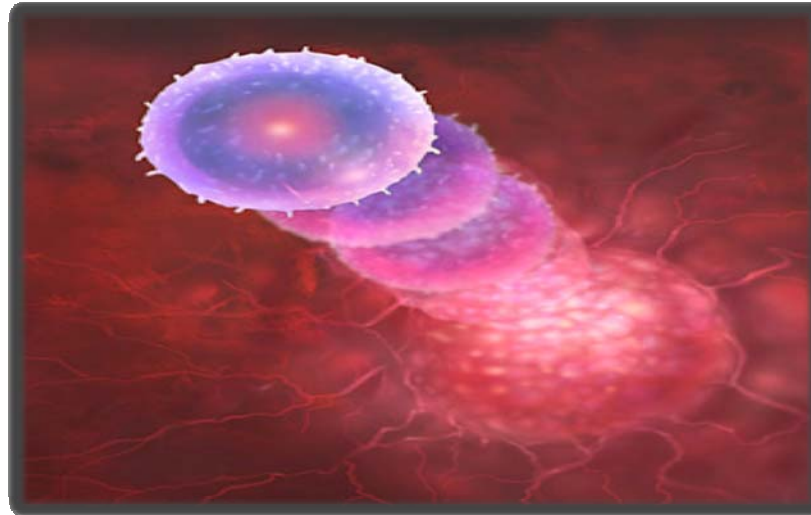


ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΜΦΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ



Μαμάρα Α. (1), Καλαλά Φ. (1), Λιαδάκη Κ. (1), Παπαδούλης Ν. (2), Μανδαλά Ε. (3), Παπαδάκης Ε. (4), Γιαννακούλας Ν. (5), Παλασοπούλου Μ. (5), Λαφιωνιάτης Σ. (6), Κιουμή Α. (4), Κοραντζής Ι. (4), Καρτάσης Ζ. (7), Ιωάννου Μ. (8), Μτσουκά Π. (5), Σπελέτας Μ. (1)

(1) Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, (2) Αιματολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, (3) Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη, (4) Αιματολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη, (5) Αιματολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, (6) Αιματολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Βόλου, (7) Αιματολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Χαλκίδας, (8) Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.



Πολυμορφισμοί ανοσογονιδίων
CD40, IL-10, TNFRSF5
προδιαθετικοί παράγοντες στην εμφάνιση
λεμφοπαραγωγών συνδρόμων και καρκίνου

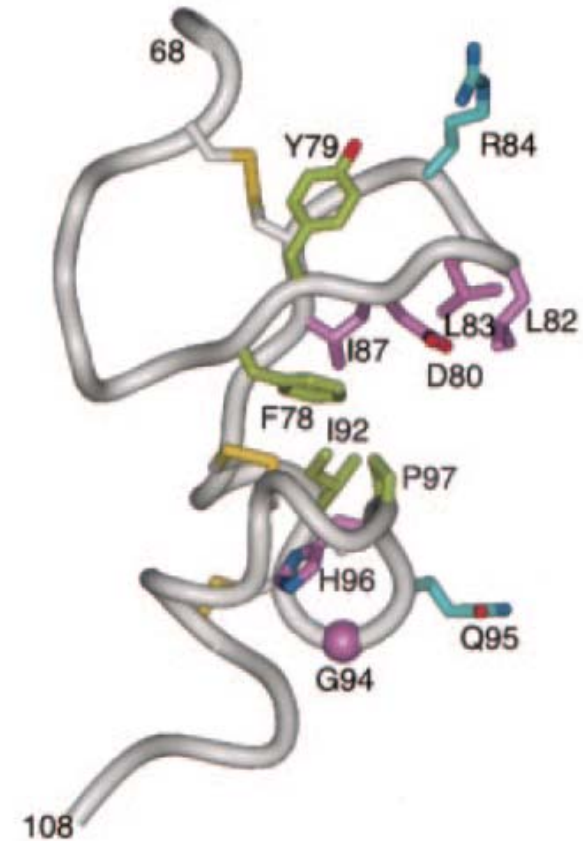
Skibola et al, Blood 2008

Bogumia et al, Tissue Antigens 2008



TNFRSF13B

- Εκφράζεται στα Β και στα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα
- Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI



Hymowitz et al, JBC 2005



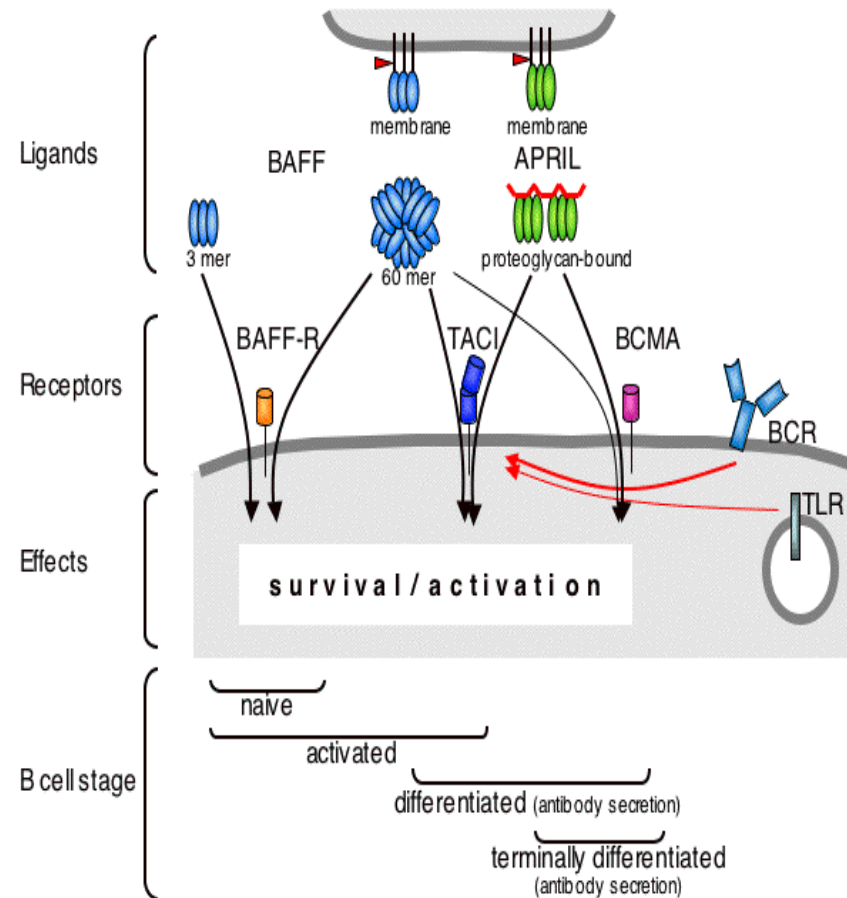
TACI: Υποδοχέας των κυτταροκινών BAFF και APRIL

BCMA:

- Υποδοχέας των BAFF και APRIL.
- Εκφράζεται στα πλασματοκύτταρα.

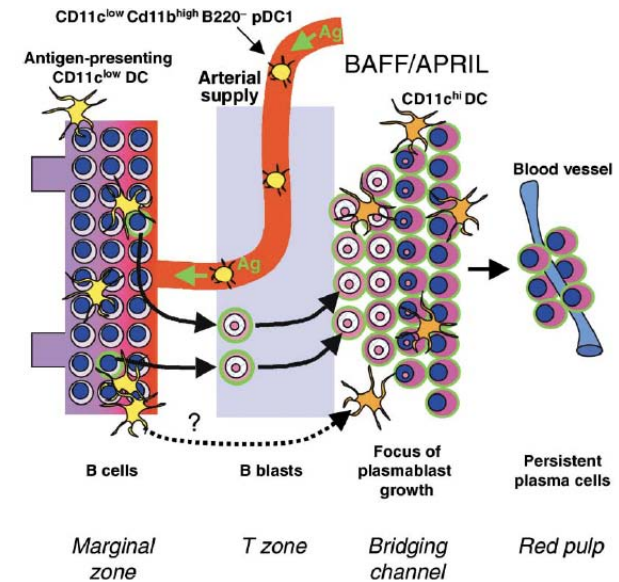
BAFF-R:

- Υποδοχέας του BAFF.
- Εκφράζεται σε ανώριμα και ώριμα B κύτταρα.



Οι **BAFF-TACI / APRIL-TACI** αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν

1. Στην επιβίωση και διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων
2. Στις θυμοανεξάρτητες ανοσιακές απαντήσεις
3. Στην ιστοτυπική μετατροπή και την παραγωγή αντισωμάτων
4. Στην ομοιόσταση των B κυττάρων



Ng et al, Mol Immunol 2005

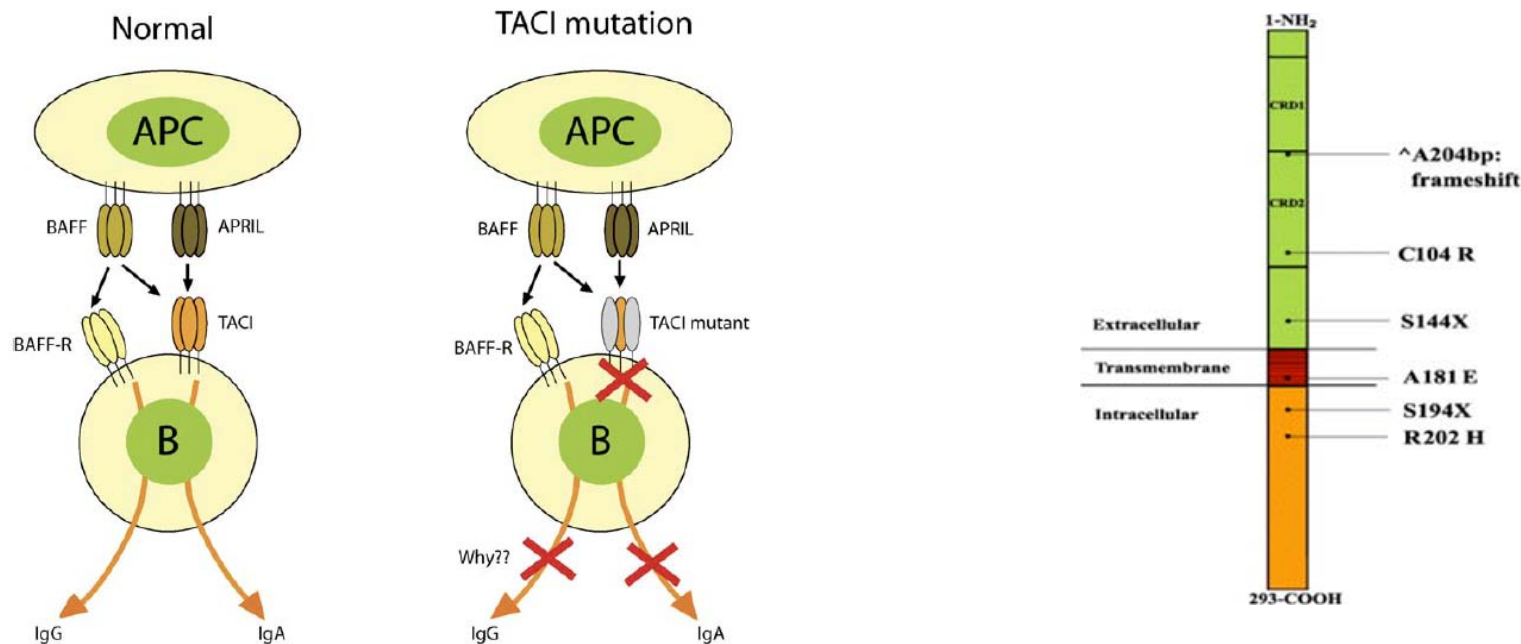
Viau et al, Clin Immunol 2005

Mackay et al, Cytokine Growth Factor Rev 2008



Μεταλλάξεις του *TNFRSF13B*

- ✓ Σε ασθενείς με Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (CVID) συσχετίστηκαν με την εμφάνιση της νόσου.



Castigli et al, Nat Genet 2005
Salzer et al, Nat Genet 2005



Table 1 Frequency of selected TACI coding variants in individuals with CVID and IgAD^a

	C104R		A181E		R202H
CVID (all) ^b	16/846	14/844 ^d	22/844	16/844 ^d	1/852
Controls (all) ^c	17/4,208	17/4,208	20/3,924 ^e	20/3,924 ^e	6/4,624
<i>P</i> value	8.2×10^{-5}	3.8×10^{-4}	3.9×10^{-8}	2.4×10^{-5}	0.69
OR	4.16	3.69	5.60	4.08	0.57
	(1.98–8.74)	(1.73–7.89)	(2.99–10.51)	(2.07–8.04)	(0.06–5.40)
IgAD (Swedish)	1/478		7/464		2/480
Controls (Swedish)	8/2,038		12/1,730		0/2,082
<i>P</i> value	0.55		0.09		3.0×10^{-3}
OR	0.53		2.19		–
	(0.07–4.12)		(0.88–5.47)		–

^a(Number of variant alleles)/(number of tested alleles).

^bThe 'CVID (all)' group includes 115 Swedish, 154 German and 155 US individuals with CVID.

^cThe 'Controls (all)' group includes 1,080 healthy Swedish blood donors and consecutive samples from the Swedish national neonatal screening program for phenylketonuria (PKU)⁶, 342 healthy German blood donors and 787 healthy US donors from the New York cancer project collection⁷.

^dHomozygous sequence variants were excluded from the calculation.

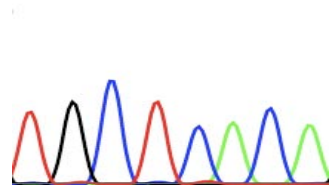
^eOne 'control' heterozygous for the A181E allele was found to be hypogammaglobulinemic (serum level of IgG = 3.7 g/l).

The institutional review boards at the Karolinska Institute approved this study, and informed consent was obtained from all patients.

Pan-Hammarström et al, Nat Genet 2007

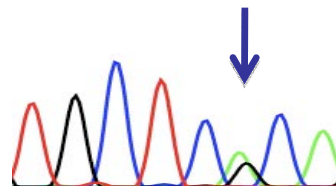


T G C T C A C A



WT

T G C T C A C A



Her

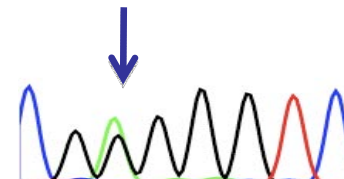
V220A

C G G G G G T C



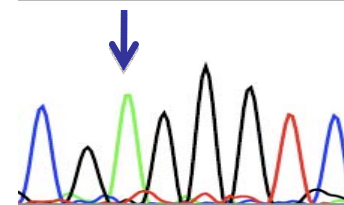
WT

C G A G G G T C



Heter

C G A G G G T C



Homoz

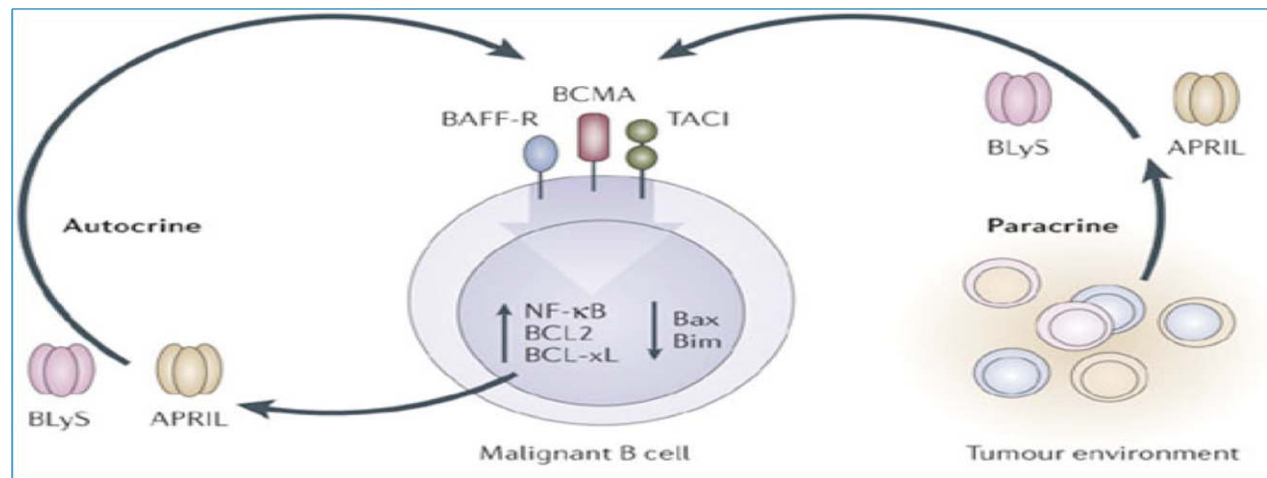
P251L

Speletas et al, Tissue Antigens 2008

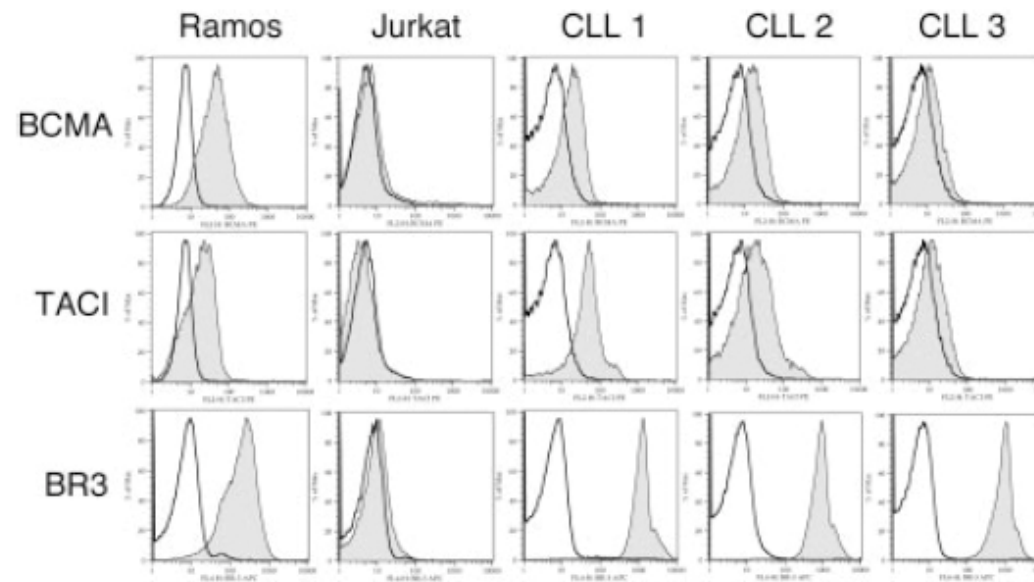


BAFF και APRIL

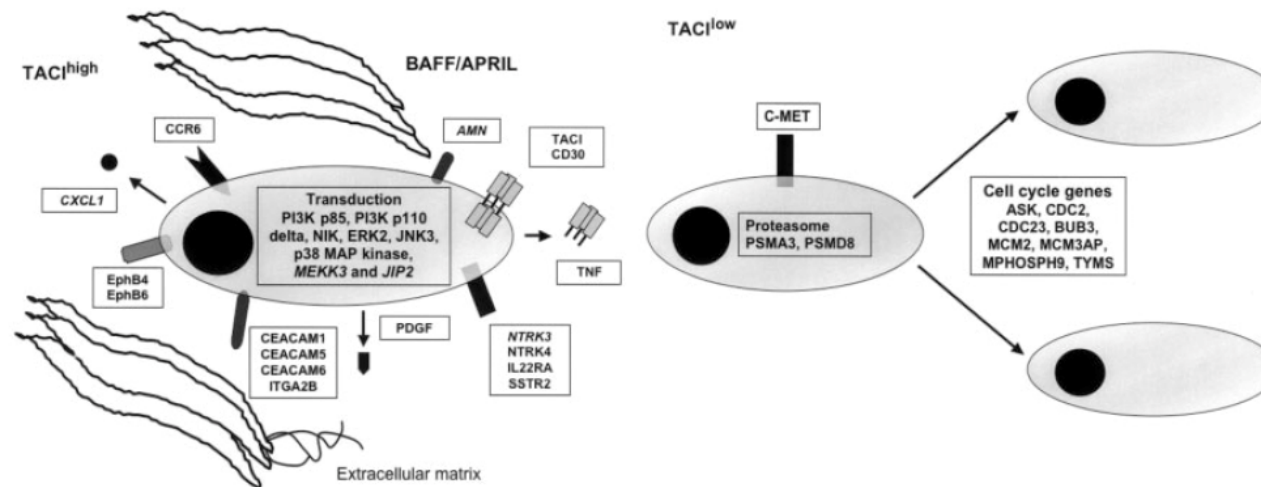
- Τα νεοπλασματικά Β κύτταρα εκφράζοντας BAFF, APRIL και τους υποδοχείς τους διαφεύγουν της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ



Εισαγωγή



Endo et al, Blood 2007



Moreaux et al, Blood 2005



Να μελετηθεί εάν στα νεοπλασματικά Β κύτταρα, η έκφραση της πρωτεΐνης *TACI*, καθώς και η παρουσία πολυμορφισμών του *TNFRSF13B* σχετίζονται με τον φαινότυπο της ασθένειας και την πρόγνωσή της.



- 134 ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα
 - 96 με B-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία/B-SLL
 - 22 με low-grade NHL (οζώδες, σπληνικό, MALT, μακροσφαιριναιμία Walldenstrom)
 - 5 με high-grade NHL
 - 4 με λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα
 - 4 με T-NHL
 - 2 με αγγειοανοσοβλαστικό NHL
 - 1 με νόσο Hodgkin (μικτής κυτταροβρίθειας)

μέση ηλικία: 68.2 έτη, άνδρες/γυναίκες: 76/58

- 59 φυσιολογικοί μάρτυρες

μέση ηλικία: 54.2 έτη, άνδρες/γυναίκες: 24/35



- 1) Αιματολογική και ανοσοφαινοτυπική μελέτη (για ασθενείς με B-CLL, μελέτη και των προγνωστικών δεικτών CD38 και ZAP-70)
- 2) Προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών στον ορό (και υποτάξεων)
- 3) Προσδιορισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης TACI με κυτταρομετρία ροής (κλώνος 1α1, Abcam, USA) σε 70 ασθενείς με LPDs και σε 59 φυσιολογικούς μάρτυρες
- 4) Ανίχνευση των πολυμορφισμών του *TNFRSF13B*-P251L και *TNFRSF13B*-V220A με PCR-RFLP
- 5) Στατιστική ανάλυση – Mann-Whitney test, Pearson correlation (στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0 for Macintosh)

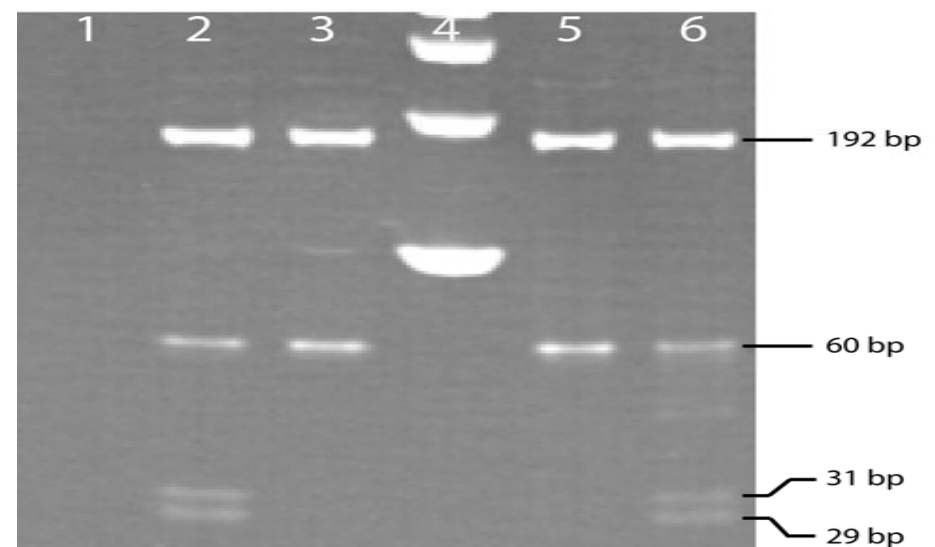
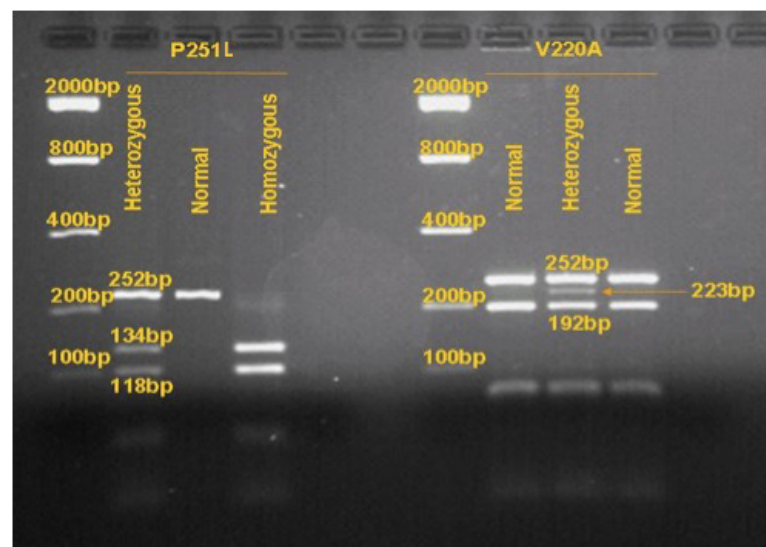


PCR-RFLP για την ανίχνευση των πολυμορφισμών V220A και P251L

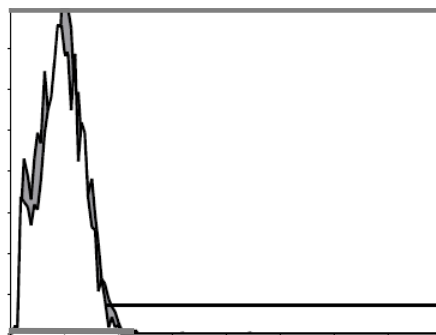
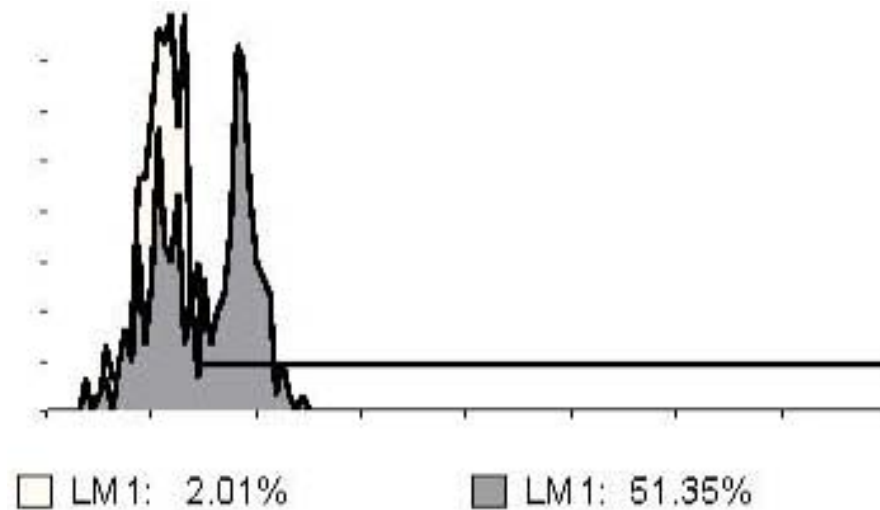
Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)
TACI- 33544	ACg CgA Tgg AAg CCg gCA g <u>A</u> C CTg	24bp
TACI- 33772	CTC CCC CCg ggT CCA CgT ATT TAC	24bp

Πολυμορφισμός P251L : Ένζυμο περιορισμού MnlI (New England Biolabs)

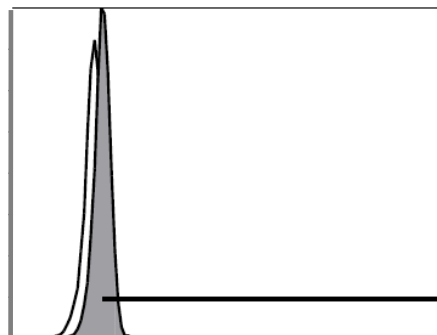
Πολυμορφισμός V220A : Ένζυμο περιορισμού BfuAI (Fermentas)



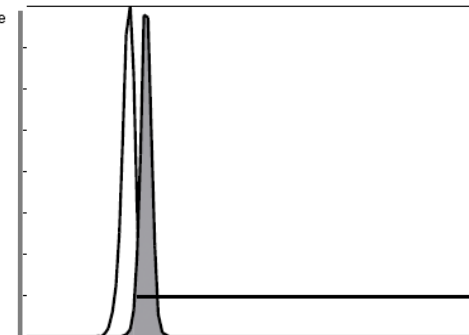
Έκφραση της πρωτεΐνης TACI στα
φυσιολογικά B κύτταρα



TACI PE 1.1%



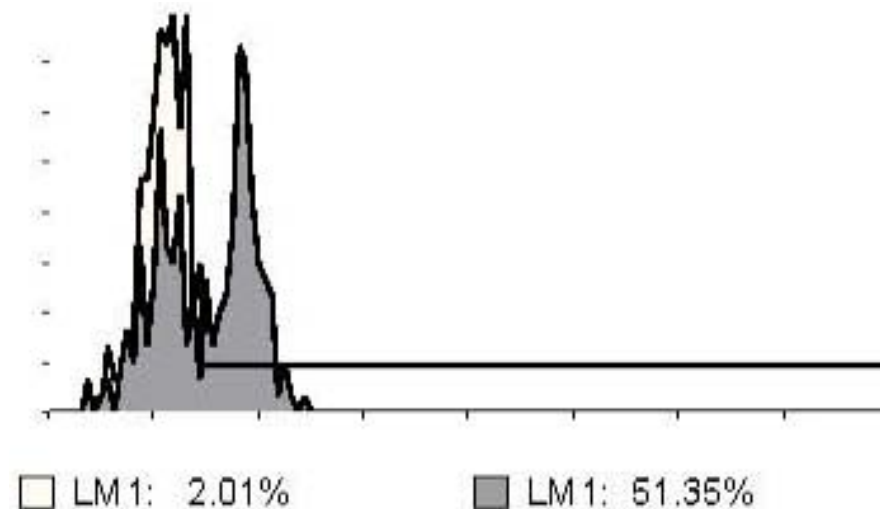
TACI PE 22%



TACI PE 84.4%



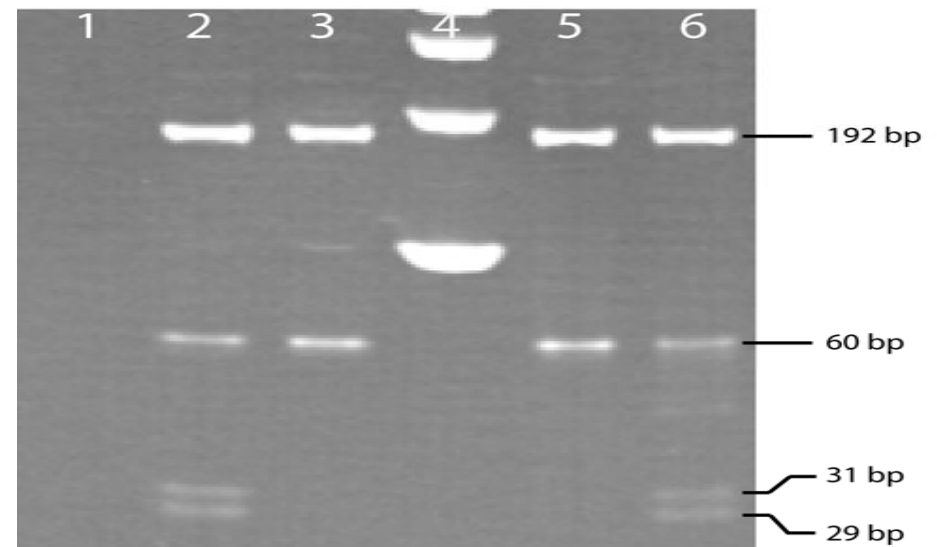
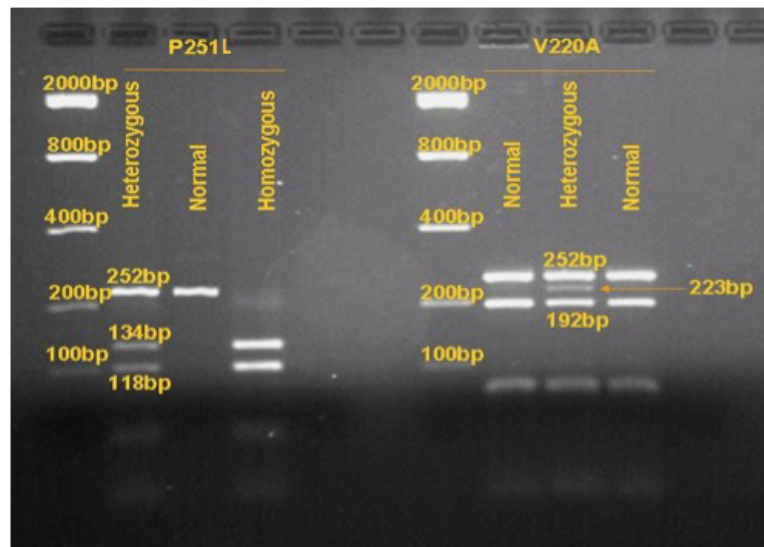
Έκφραση της πρωτεΐνης TACI στα
φυσιολογικά B κύτταρα



Τα νεοπλασματικά B κύτταρα παρουσιάζουν μικρότερη έκφραση
της πρωτεΐνης **TACI** συγκριτικά με τα φυσιολογικά B κύτταρα
($22.2 \pm 24.1\%$ vs 42.6 ± 33.2 , σύνολο ασθενών
 $17.5 \pm 21.8\%$ vs 42.6 ± 33.28 , ασθενείς με B-CLL/B-SLL
 $p = 0,001$).



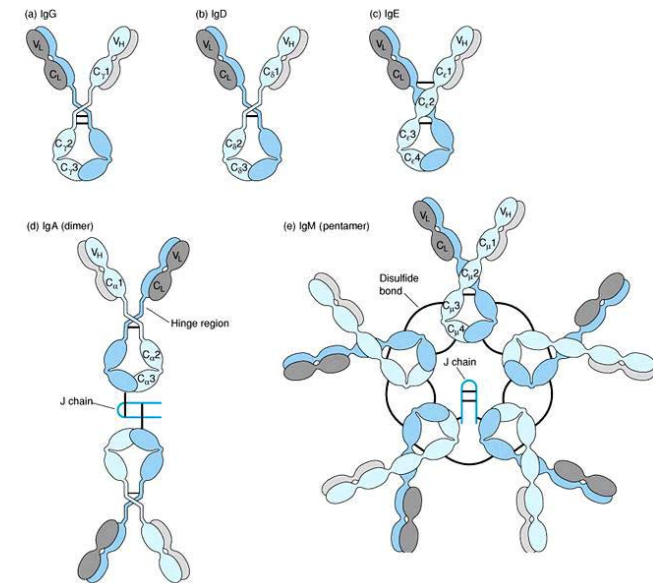
Αποτελέσματα



- Συχνότητα αλληλίου **V220A**:
Ασθενείς: **2.6 %** / Φυσιολογικά άτομα: **3.3 %** ($p=0,677$)
- Συχνότητα αλληλίου **P251L**:
Ασθενείς: **16.4 %** / Φυσιολογικά άτομα: **10.3 %** ($p=0,056$)



Η έκφραση της πρωτεΐνης **TACI** συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία του πολυμορφισμού ***TNFRSF13B-P251L*** ($p=0.009$), και αρνητικά με τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης **IgA** ($p=0.003$)

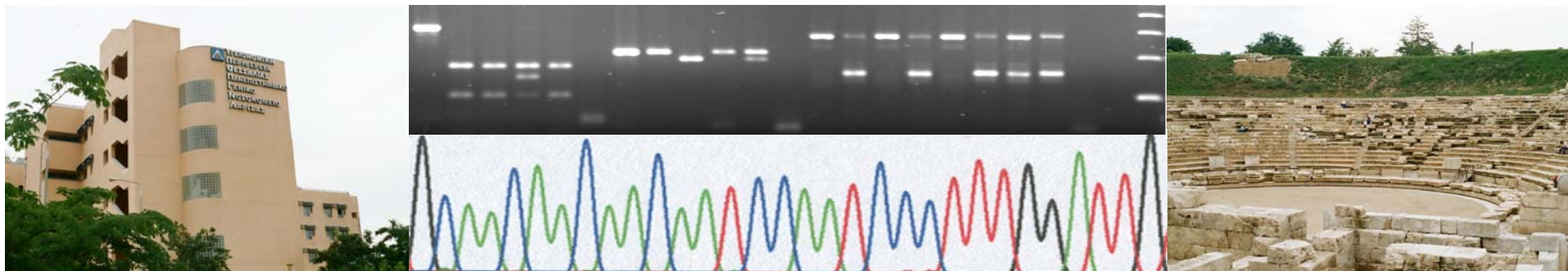


Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις της έκφρασης ή της παρουσίας των πολυμορφισμών του *TNFRSF13B* με άλλους προγνωστικούς δείκτες (CD38, ZAP-70) σε ασθενείς με B-CLL/B-SLL



- Διαπιστώθηκε χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης TACI σε ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα («αποφυγή» απόπτωσης?)
- Διαπιστώθηκε αυξημένη επίπτωση του πολυμορφισμού *TNFRSF13B*-P251L σε ασθενείς με LPDs
- Η ανάλυση σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο περισσότερων δειγμάτων θα οδηγήσει σε πιο ασφαλή συμπεράσματα





Anastasios E. Germenis
Associate Professor and Head



Vaios Karanikas
*EU Marie Curie Fellow
Cancer Immunology Unit Co-ordinator*



Matthaios Speletas
Assistant Professor



Helen Kletsou
Administration officer



Natasha Vardakastani
Chief technician



Niki Argentou
BSc student



George Hatsidis
PhD student



George Iordanakis
PhD student



Aggeliki Barda
PhD student



Gedeon Loules
PhD student



Vasilka Meredith
PhD student



Shaana Khalil
PhD student



Fani Kalala
Postdoctoral scientist



Evagelia Siska
BSc student



Asterios Saitis
MSc student



Sofia Sarafi
MSc student



Constantine Mpoukas
PhD student



Kiki Liadaki
PhD student



Stefanos Tsohas
PhD student



Maria Zamanakou
PhD student



Faye Soukou
PhD student



Eva Gramoustianou
Postdoctoral scientist

