

INTRODUKSJON

Lymfomer er en heterogen malign sykdomsgruppe med utspring fra B og T-celler i immunsystemet. Cellene har reseptorer for en rekke cytokiner, som under normale forhold regulerer deres vekst og differensiering. En kan anta at utvikling, vekst, sykdomsforløp og respons på behandling av lymfomer vil kunne være påvirket av en rekke cytokiner. Det samme gjelder samspillet mellom de neoplastiske cellene og den normale delen av immunsystemet. Genene som regulerer aktivering, vekst og differensiering innen immunsystemet, er som resten av menneskets gener, polymorfe. Den vanligste formen for polymorfi utgjøres av enkle nukleotid substitusjoner (SNP), som forekommer overalt i genomet i en hyppighet på ca. 1/100 base. Det finnes en egen database for SNP i cytokiner: "Cytokine polymorphisms in human disease", som også har en oversikt over funksjonelle SNP med direkte effekt på funksjon og/eller ekspressjonsnivå (<http://www.bris.ac.uk/pathandmicro/services/GAI/cytokine4.htm>). Her finnes dokumentasjon med referanser til en lang rekke SNP som særlig er assosiert med autoimmune sykdommer og kreft. Flere studier har vist assosiasjon mellom SNP-polymorfier (singel nukleotide polymorfier) og en rekke parametre som brukes i klinisk medisin. Eksempler er risiko for utvikling, progresjon og behandlings respons ved en rekke forskjellige sykdomer. I de senere årene har man begynt å fokusere på empiriske studier av hele genomet. Kartlegging av SNP-er, deres hyppighet og den raske teknologiske utviklingen innen dette feltet, vil gjøre slike undersøkelser mulige i nær fremtid.

Innen samleggruppen lymfomer kan en tenke seg at SNP-er i molekyler som er involvert i "kommunikasjon" mellom de forskjellige cellene i immunsystemet kan påvirke deres funksjon eller ekspresjon. Således kan forskjellige varianter bidra til økt eller nedsatt risiko for utvikling av lymfom og påvirke sykdommen i positiv eller negativ retning. En ønsker ved DNR, seksjon for immunterapi å foreta en bred karakterisering av SNP-er hos pasienter med non-Hodgkin lymfom (NHL), og å sammenlikne resultatene med SNP frekvensene i et referansemateriale bestående av DNA fra 4000 norske blodgivere. Man håper på den måten å kunne identifisere funksjonelle SNP-er som etterhvert kan brukes i klinisk sammenheng. En håper også at disse undersøkelsene vil bidra til større kunnskap om tumor biologi ved NHL.

PROBLEMSTILLING

Gir SNP og andre polymorfismer i utvalgte gener økt risiko for utvikling av non-Hodgkin lymfom? Undersøkelse av SNP-er i IL-4, CTLA-4, IL-10 og TNF B med AKDKE i 96 kapilær "array".

OM OPPGAVEN

Oppgaven gir først en kort oversikt over SNP-er. Hva det er, og hvordan de kan brukes i klinisk forskning. Fremstillingen tar for seg assosiasjons analyser. Det gis i tillegg noen eksempler på funksjonelle SNP-er i et illustrativt øyemed. Etter beskrivelsen av SNP-er følger en kort oversikt over malignitet i Lymfoide celler, først og fremst B-celle non-Hodgkin lymfom. Det legges vekt på immunologiske og genetiske forhold.

Oppgaven tar deretter for seg de enkelte molekyler som er undersøkt i den praktiske delen av oppgaven. Det gis en kort beskrivelse av kjent immunologisk funksjon og i tillegg eksempler på bruk av de aktuelle molekyler i klinisk forskning. Fremstillingen er ikke ment som en fullstendig beskrivelse av molekyler, men heller som et ”springbrett” å jobbe ut fra, ved eventuelle funn i det praktiske forsøket. Det er ikke lagt vekt på SNP-er i beskrivelsen av molekyler av en enkel grunn: SNP-er og bruk er adekvat beskrevet i kapitlet som omhandler konseptet. Videre har jeg beskrevet enkelte SNP-studier der det har vært relevant for funn i den praktiske delen. Jeg har valgt å gjøre bakgrunnsdelen av oppgaven relativt bred for å få et noe større innblikk i problemstillingene og derved få mer ut av prosjektet personlig. Analysemetoden og det praktiske forsøket beskrives deretter.

Det praktiske forsøket søker å besvare om det foreligger en økt risiko for utvikling av lymfom hvis en innehar en gitt SNP-genotype i de aktuelle molekyler.

INNHold

- S3-5** SNP-ER og ASSOSIASJONS ANALYSER, EN INTRODUKSJON
- S6-8** OM MALIGNITET I LYMFOIDE CELLER
- S9-15** KORT OM DE AKTUELLE MOLEKYLENE
- S16-18** SMELTE GEL TEKNIKKER
- S19-23** PRAKTISK FORSØK OG DISKUSJON OMKRING FUNN
- S24-26** VEDLEGG; Regulatoriske T-celler/Treg celler, kreft og IL-10

SNP-ER og ASSOSIASJONS ANALYSER, EN INTRODUKSJON

Singel nukleotide polymorfier (SNP) er de vanligst forekomende genetiske varianter i det humane genom. De blir sett på som verdifulle i studier av blant annet polygen arv, farmakogenetikk og immunmodulering(1,2,3,4). Polymorfier kan påvirke ekspresjon eller føre til funksjonelle endringer i et gitt molekyl. De kan således påvirke sykdomsforløp, risiko for utvikling av en tilstand eller respons på et medikament. Med majoriteten av SNP-er følger det ingen gitt fenotype endring. De er således ikke funksjonelle.

I løpet av de senere årene har det blitt opprettet flere raskt ekspanderende databaser med tusenvis av SNP-er. CancerSNP500(<http://snp500cancer.nci.nih.gov>) er et eksempel hvor en forsøker å samle funksjonelle SNP-varianter relatert til forskjellige typer kreft. Informasjonen håper man i fremtiden å kunne bruke til en mer individuelt tilpasset behandling.

Skjulte fenotyper, miljø, kobling og avgrensede sammenhenger

Singel nukleotide mutasjoner kan ha en rekke effekter med forskjellig alvorlighets grad. Fra såkalte "silent mutations/varianter"(ikke funksjonelle SNP-er) til de klassiske eksemplene på alvorlig sykdom som sigdcelle anemi. Sigdcelle anemi har en langt høyere prevalens i områder hvor malaria er endemisk fordi heterozygote bærere er beskyttet mot sykdommen. Hos noen mennesker er ikke fenotypen som følger en SNP umiddelbart åpenbar. Et klassisk eksempel på det er en variant av glukose-6 Fosfat Dehydrogenase mangel. En C > T substitusjon på nukleotide 563, ekson 6, fører til substitusjon av fenylalanin > serine for aminosyre 188 i genet. Dette fører til nedsatt katalytisk aktivitet til enzymet. Personene er fenotypisk normale og uten sykdom. I gitte situasjoner som ved inntak av medikamentet Primaquine (malaria profylakse) eller bestemte matvarer vil disse personene utvikle alvorlig hemolytisk anemi. Eksemplene illustrer behovet for å studere og vurdere SNP-er i avgrensede sammenhenger. Det finnes eksempler på at en og samme genotype ved en gitt infeksjon har en preventiv virkning mens den ved en annen type infeksjon vil påvirke sykdomsforløpet i en negativ retning. Mange funksjonelle varianter trenger ikke å komme til syne før en blir utsatt for en bestemt påkjenning, miljøpåvirkning eller sykdom. Kobling mellom gener er også viktig å ta med i vurderingen av et funn. En genotype som er overrepresentert i en sykdom trenger ikke å være direkte ansvarlig for den økte risikoen en tilsynelatende finner. Allelet kan være koblet til et annet allel med en biologisk funksjon som fører til den økte risikoen.

Assosiasjonsanalyser

En viktig fremgangsmåte for å studere SNP-er er via assosiasjons analyser. Man velger seg da ut kandidat SNP-er og sammenligner grupper med en gitt tilstand med egnede kontrollgrupper. Kandidatgenene velger man ut på bakgrunn av kjent virkning på en sykdomsprosessen eller a priori kunnskap om genet/genproduktet.

Etter hvert har en rekke studier vist at en mengde SNP-er er funksjonelt relevante in vivo. Manose bindende lectin(MBL2) er et protein med kapasitet til opsonisering og komplement aktivering. Eksemplene benyttes i illustrerende hensikt.

Risiko for utvikling av en sykdom:

Varianter av MBL2 har blitt undersøkt med hensyn på risiko/tilbøyelighet til utvikling av en rekke autoimmune sykdomer og infeksjoner. Bestemte MBL2 varianter synes å gi øket risiko for vanlige pediatriske luftveisinfeksjoner (5,6)

Påvirkning av et sykdomsforløp:

En del studier har vist at MBL2 varianter kan virke modifierende på et sykdoms forløp. Cystisk Fibrose (CF) pasienter med gitte MBL2 varianter utvikler nedsatt lungefunksjon raskere og dør tidligere enn CF pasienter uten de aktuelle genotypene(7,8). Prinsipielt kan slike funn bidra til videre undersøkelser og utvikling av nye terapeutiske strategier. I tilfelle med CF kunne tilførsel av rekombinant MBL2 bidra til å senke morbiditet og øke overlevelsen hos den andelen av pasientene dette gjelder.

Farmakologisk respons, betydningen av styrken på en assosiasjon og betydningen av prevalens:

Et individs genetiske profil er med på å bestemme individets respons på et medikament. 6-Merkaptopurine er et medikament som brukes i behandling av Akutt Lymfoblastisk Leukemi. En liten andel av individene som behandles med medikamentet utvikler en potensielt fatal benmargstoksisitet. Denne intoleransen springer ut fra en bestemt variant av enzymet Thiopurine-S-metyltransferase(2). En kan i dag enkelt screene pasienter for denne genotypen. Man kan således unngå komplikasjoner hos den andelen av pasientene dette gjelder. Dette illustrer godt poenget med individualitet, og er utgangspunkt for et nytt forskningsområde, farmakogenetikk, med store implikasjoner for medikamentell behandling.. Prevalensen av den aktuelle SNP-en ble i en studie estimert til å være rett under 1%. Prevalens er viktig å ta med seg i betraktninger omkring SNP-studier. Både mhp en studie størrelse og hvor stor andel av en gruppe som vil ha nytte av undersøkelsen. Eksempelvis er det funnet assosiasjon mellom en SNP, ALOX5-genotype og virkningen av et astma medikament. ALOX5 hadde en 100% prediktiv verdi for ikke respons ovenfor det aktuelle medikamentet. Prevalensen av den aktuelle genotypen er rett under 10% og en test vil således kun identifisere en andel av non-respondere(2). Det er lett å skjønne at antallet i en gruppe man må undersøke øker med fallende prevalens og svakere assosiasjon.

Studier av maligne B-celle lymfomer

Det foreligger få studier av SNP-ers betydning i relasjon til B-celle neoplasier.

Noen eksempler:

Monoklonale antistoffer mot B-celle overflate og pan-lymfocytt antigener(CD20 og CD52). brukes og har vist seg effektive i behandling av enkelte former for NHL

AntiCD20 monoklonalt IgG, Rituximab har vist seg effektivt i behandling av en rekke NHL.

En del studier har vist at mellom 30-50 % av pasientene med lavgradig B-celle NHL ikke viser noen respons ved Rituximab behandling. Grunnen til dette er ikke klarlagt.

In vitro studier peker mot at en av virkemåtene for Rituximab er lyse av lymfom celler via antistoff-avhengig cellemediert cytotoxiskitet. Dette krever Fc reseptor på cellene som induserer lyse av lymfom cellene. I en studie av en SNP i FcyIIIa subklasse, fant man en assosiasjon mellom genotype og klinisk respons ved Rituximab behandling.

I en studie av thalidomide behandling ved myelomatose fant man en assosiasjon mellom en gitt SNP-genotype i TNFalfa genet og effekt av Thalidomide terapi. En av effektene til Thalidomide er hemming av produksjon av TNFa (in vitro studier). En annen studie viste assosiasjon mellom en gitt TNFa mikrosatellitt polymorfi og resistens til kjemoterapi Hodgkin lymfom (HL). I tillegg viste studien assosiasjon mellom genotypen og tilbakefall av sykdom etter kjemoterapi (2-5 år etter behandling)(9-12).

Det bør være klart ut i fra eksemplene at SNP-baserte assosiasjonsstudier kan gi ny viten om biologisk funksjon til bestemte gener. Ved studier av multifaktoriell sykdom kan SNP-studier gi ny innsikt i utvikling av og patogenesen av den aktuelle tilstanden. Dette kan igjen legge grunnlang for utvikling av nye terapeutiske strategier og behandlingsmetoder som er mer individuelt tilpassede. Det gjenstår å se hvor stor nytte og bruk denne forskningen vil få for praktisk medisin. For en rekke flere eksempler henvises det til (1), (2), (3) og (4). De ovenfornevnte eksemplene er kun ment i et illustrativt øyemed. Jeg vil derfor ikke beskrive flere studier, bortsett fra der jeg finner det relevant i forhold til den praktiske undersøkelsen.

1 Roses AD

Pharmacogenetics and the practise of medicine
Nature, 2000, 405, 857-865

2 MaCarthy et al

The use of SNP maps in pharmacogenomics
Nature Biotechnology, 2000, 18, 505-508

3 Stephen Chanock and J G Taylor

Using genetic variation to study immunomodulation
Current Opinion in Pharmacology 2002, 2, 463-469

4 Taylor JG et al

Using genetic variation to study human disease
Trends Mol Medicine 2001, 7, 507-512

5 Koch A et al

Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood
J Am Med Assoc, 2001, 285, 1316-1321

6 Snowden et al

Mannose binding protein genotypes and recurrent infection
Lancet 1995, 346, 1629-1631

7 Garred P et al

Assosiation of mannose binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in Cystic Fibrosis
J Clin Invest 1999, 104, 431-437

8 Gabolde M et al

Assosiation of variant alleles of MBL with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis
A cohort study

BMJ 1999, 319, 1166-1167

9 Campbell P et al

Monoklonal antibody therapy for lymphoma
Blood Rev 2003, 17, 143-152

10 Guillaume C et al

Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcyRIIIa gene

Blood, Feb 2002, Vol 99, Nr 3, 753-758

11 Neben K et al

OM MALIGNITET I LYMFOIDE CELLER

Malignitet i lymfoide celler omfatter neoplasmer i B og T celler i immunsystemet. Neoplasmene oppstår i ulike stadier av cellenes differensiering fra stamcelle til moden effektor celle.

Dagens klassifikasjon av kreft med opprinnelse i lymfoide celler skjer etter WHO-klassifikasjonen. Den enkelte sykdom defineres ut fra

- 1 Morfologi
- 2 Immunfenotype
- 3 Genetiske forandringer
- 4 Klinikk

En forsøker på denne måten å dele sykdommene opp i enheter med klinisk/terapeutisk relevans. I den groveste inndelingen deler man sykdommene inn i forskjellige B og T celle Non Hodgkins Lymfomer (NHL) og Hodgkins Lymfom (HL). T-NHL og HL omtales ikke nærmere da disse sykdommene ikke berører den praktiske oppgaven. Insidensen av NHL har økt klart over tid i etterkrigs årene i Norge (tall fra kreftregisteret). Det samme gjelder USA. Man har ingen god forklaring på dette.

Etiologi

En regner med at etiologien er multifaktoriell.

Etiologiske faktorer for de fleste sykdomsgruppene er ukjente og i beste fall usikre. Feil i differensierings prosessene til B- celler regnes som sentrale for utvikling av malign sykdom. Infeksjoner har vist seg å kunne bidra til NHL utvikling og er det område hvor holdepunkter for sammenhengen mellom en påvirkning og utvikling av NHL har ekspandert mest.

Det klassiske eksempelet er assosiasjonen mellom Epstein Barr virus (EBV) og Burkitts lymfom i deler av Afrika. Hepatitt C virus gir økt risiko for utvikling av flere former for NHL. Pasienter med HIV har også en langt høyere risiko for utvikling av NHL. Her spiller nedsatt immunfunksjon en vesentlig rolle. Av bakterier er det vist assosiasjon mellom Helikobakter Pylori og risiko for utvikling av MALT-lymfom i ventrikkel (mucosa associated lymfoid tissue)

En rekke miljøfaktorer/eksponeringer foruten infeksjoner har vært implisert. Bla kjemiske midler brukt i jordbruk og tidligere kjemo- og stråle terapi. Dette har dog ikke bidratt til økt forståelse av patogenesen ved NHL.

I noen familier er det en klar arvelig opphopning av maligne lymfomer. Til tross for dette har det ikke vært mulig å identifisere noen arvelige, genetiske faktorer. I de fleste andre tilfeller er det ingen åpenbar arvelig komponent hos lymfompasientene. En kan anta at polygenetisk arv bidrar i større eller mindre grad til å utvikle sykdommen i disse tilfellene. Arvede kombinasjoner av SNP-er kan således spille en rolle.

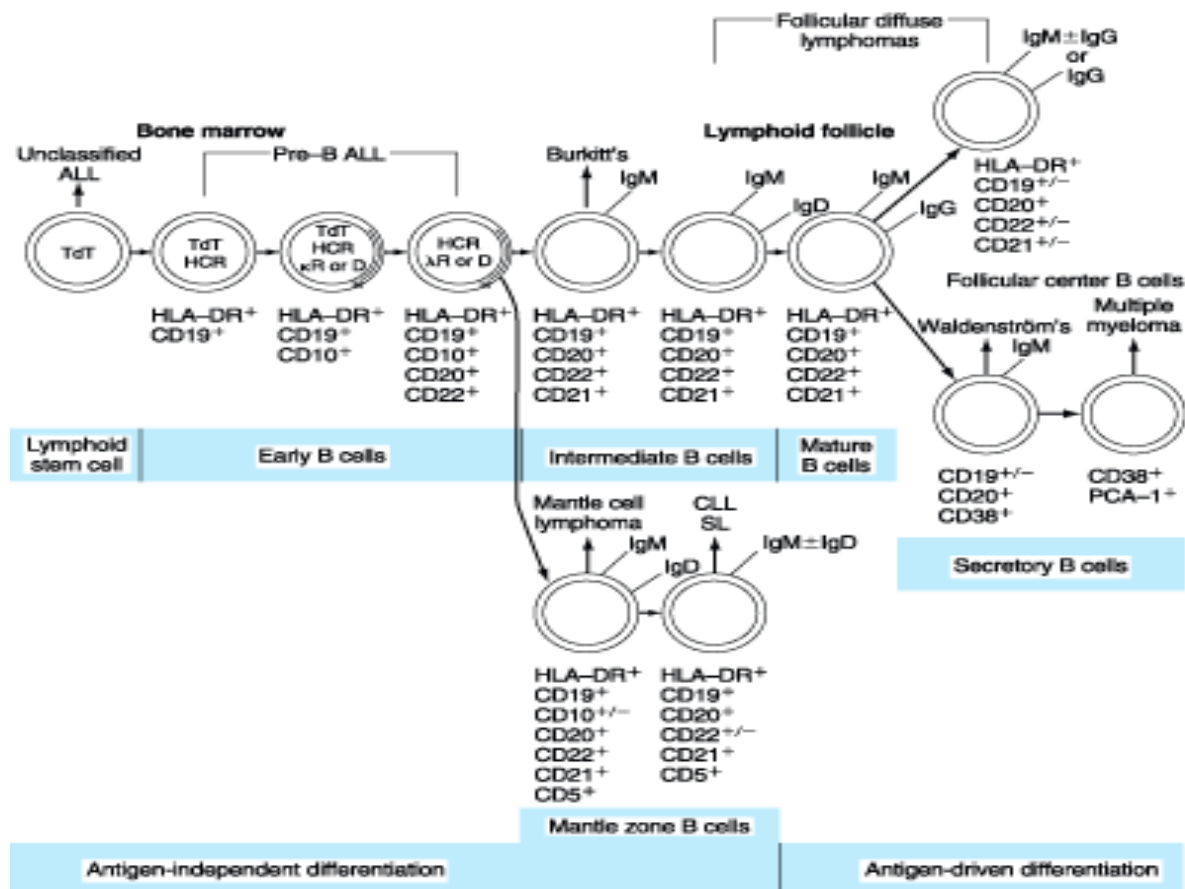
De meste kjente og viktigste risikofaktorer for utvikling av malignt lymfom er forandringer i immunsystemet, enten i form av primær og sekundær immunsuppresjon eller autoimmun sykdom.

Noen eksempler er organtransplantasjon og behandling for dette (immunsuppressiva), HIV-infeksjon, samt Reumatoid Artritt (RA) og Systemisk Lupus Erytromatosus (SLE)

Immunologi og Genetikk

Alle lymfoide celler er derivert fra en felles hematopoetisk forløper/stamcelle i benmargen. Denne gir opphav til lymfoide, myeloide, erytroide, monocytt og megakaryocytt cellelinjene.

Gjennom sekvensiell og tidmessig/temporal aktivering av transkripsjons faktorer blir cellene programmert til de forskjellige cellelinjene. B-celle rekken differensierer i benmarg hvor den blir ”**committed**” når den starter å rearrangere Immunoglobulin (Ig) gener. Med de forskjellige stadiene i utviklingen følger det en ”overflate fenotype”. Det vil si at cellene uttrykker overflate proteiner som er karakteristiske for utviklingsstadiet (Cluster of Differentiation molekyler, CD). Immunfenotyping er et viktig ledd i differensialdiagnostikk av lymfomene etter WHO-klassifikasjonen.



FIGUR FRA HARRISON

Tilsynelatende stadium i differensieringen kan ikke brukes prognostisk. Det predikerer ikke forløpet av sykdommen. For eksempel har Burkitts Lymfom/Leukemi fenotypen til en follikkelsenter IgM bærende celle. Pre-B celle lymfom/leukemi har en immunfenotype karakteristisk for en mer umoden celle. Likevel er den sistnevnte sykdommen mindre aggressiv og mer tilbøyelig for kurasjon en den tilsynelatende mer modne Burkitts L (Grading har prognostisk betydning for flere kreft former, eksempelvis ovarial cancer).

Stadium i differensiering reflekterer heller ikke stadium hvor den genetiske lesjonen en antar har stor betydning/avgjørende for utvikling av malignitet oppstod. Karakteristisk for Follikulære B-celle Lymfomer er t(14:18) translokasjonen. Denne translokasjonen fører til at BCL2 gen overflyttes i nærheten av Ig tungkjede-genene og fører til overekspressjon av det anti-apoptotiske proteinet BCL2. Denne lesjonen mener en måtte ha oppstått tidligere i differensieringen av B-cellen i samband med Ig-genrearrangering. Hva som gjør at denne lesjonen fører til at de maligne cellene får en immunfenotype som en follikkelsenter celle, er uklart.

Forskjellige NHL er assosiert med en rekke genetiske abnormaliteter som regnes som viktige i utvikling av malignitet. Translokasjoner, amplifikasjoner, delesjoener og mutasjoner i enkeltgener er mekanismer som er mest beskrevet. Mange av disse er karakteristiske for de enkelte lymfom gruppene. Stokastiske prosesser i forbindelse med B-celle utvikling, aktivering og modning regnes som viktige i utviklingen av lesjoner som fører til sykdom.

Mantelcellelymfomer karrakteriseres av t(11:14) translokasjonen. Ig promotor gener overføres til kromosom 11 og gir overekspressjon av cyklinD1 som er et proliferasjonsprotein. Dette er igjen sannsynligvis viktig for malign transformasjon.

Storcellede diffuse B-celle lymfomer og Burkitts lymfomer karrakteriseres av muterte Ig-V gener. I tillegg uttrykker de ofte BCL-6. Burkitts lymfom har i tillegg alltid enten t(8.14), t(2:8) eller t(8:22) translokasjon som fører til øket ekspresjon av Myc. Myc er assosiert med proliferasjon.

Ved Marginalcelle lymfomer ser man ofte t(11:18) translokasjon. Denne fører til øket uttrykk av et antiapoptose protein API2.

En del av de nevnte genetiske forandringer har prognostisk betydning for de enkelte lymfomgruppene.

Det foreligger foreløpig lite undersøkelser på SNP-ers betydning i relasjon til B-celle neoplasier (risiko, prognose, behandlings respons osv). Slik sett kan SNP-studier muligens kaste nytt lys over multigenetiske forhold knyttet til disse kreftformene. Det er ukjent hvor stor rolle hereditære faktorer bidrar til utviklingen av sykdommen, slik som beskrevet under etiologi. Muligens bidrar immunsystemets "stokastiske natur" i vesentlig grad til sykdommen. Behovet for diversitet, de ovenfornevnte prosessene i samband med modning og aktivering, gjør at cellene er utsatt for en rekke stokastiske prosesser. Prosesser og enzymer involvert i re-arrangering av v-region gener i B og T celler er interessante kandidater i denne sammenhengen. De beskrevne karrakteristiske lesjonene støtter til en viss grad dette. Studier av autoimmunitet hos eneggede tvillinger viser lite konkordans. Det vil si at det ikke er en stor andel av tvillingene som får den samme autoimmunesykdommen. En del forskere regner derfor ikke med at hereditære faktorer kan bidra til noe særlig mer enn 30% av risikoen for å utvikle autoimmunesykdom. Tvillingstudier tyder på at den arvelige komponenten ved B-celle neoplasier er enda lavere.

Kilder:

- 1 Harrison Online ; Part 6: Oncology and Haematology; Section 2: Disorders of Haematopoiesis; Chapter 112
- 2 Norsk handlingsprogram for diagnostikk og behandling av maligne lymfomer
Norsk Lymfomgruppe 2003
- 3 Bogen Kompendium , Immunologi aug 1998
- 4 Noel R et al
Mechanism of autoimmunity
Seminars in liver disease, Vol 22, nr 4, 2002

KORT OM DE AKTUELLE MOLEKYLENE

Alle molekylerne beskrevet nedenfor er på en eller flere måter involvert i kommunikasjon mellom celler i immunforvaret. Molekylerne er involvert i sentrale prosesser som proliferasjon, differensiering og apoptose hos en rekke celletyper, først og fremst celler i immunforvaret. Alle molekylerne spiller også en rolle ved forskjellige typer av innflammasjon. Det er således mulig at funksjonelle SNP-er i molekylerne kan spille en rolle for utvikling av B-celle neoplasier og at de kan påvirke immunsystemets antitumor responser i positiv eller negativ retning. Her presenteres kort molekylernes mest sentrale og kjente funksjoner. Det gis i tillegg noen eksempler på bruk og kliniske forsøk hvor en prøver å gjøre nytte av disse mediatorernes egenskaper.

CTLA-4

I de fleste tilfeller trenger T-celler kostimulering i tillegg til antigen stimulering via T-celle reseptor (TCR) for å kunne aktiveres. Den antatt viktigste kostimulatoriske signalveien formidles av CD28(T-celler)-CD80/86(Antigenpresenterendeceller,APC) interaksjon. CTLA-4 er et overflate molekyl som uttrykkes på overflaten til aktiverte CD4 + og CD8 + T-celler. Molekylet binder de samme ligandene som CD28. Molekylet regnes for å ha en nedregulerende/dempende rolle i T-celle aktiveringsprosessen først og fremst via hemming av den ovenfornevnte kostimulatoriske signal veien. CTLA-4 er således et molekyl som står sentralt i reguleringen av T-celle responser.

Hva slags biologisk rolle i regulering av immunresponser denne dempende effekten har er gjenstand for debatt. Hvordan T-celler integrerer TCR stimulering med kostimulatoriske og inhibitoriske signaler er heller ikke klarlagt.

Flere musemodeller for studie av autoimmunitet tyder på at CTLA-4 er viktig for toleranse utvikling. Forståelse av toleranse som fenomen er viktig både for forståelse av autoimmunitet og kreft. Mus som mangler ekspressjon av CTLA-4 utvikler generell autoimmunitet og lymfoproliferativ sykdom karrakterisert av polyklonal T-celle ekspansjon, infiltrasjon av aktiverte T-celler i forskjellige organer og for tidlig død.

Andre forskere har pekt på CTLA-4 rolle i induksjon av anergi hos T celler. Anergi hos T-celler er karrakterisert av at de er uten evne til å utøve effektor funksjoner i respons til antigen stimulering. Forståelse av anergi og faktorer som spiller inn er igjen viktig eksempelvis i immunterapi rettet mot kreft.

En tredje mulig funksjon er en rolle i regulering av polyklonale T-celle ekspansjoner/responser under en gitt antigen stimulus. En tenker seg da at klonene som reagerer sterkest mot et gitt antigen blir kraftigst inhibert. På den måten får man en bredere antigen-spesifik populasjon i det de sterkest reagerende T-celle klonene ikke blir for dominerende i immunresponsen. En slik regulering gir anledning for andre T-celle kloner til å reagere. Man vil da få en større kryss reaktivitet mot et og samme epitop og epitoper som ligner på hverandre (mutasjoner, homologe antigener). I tillegg kan man tenke seg at en slik polyklonal ekspansjon er viktig for en respons mot flere antigen-epitoper fra samme patogen eller kreftcelle populasjon. (hindre "escape").

Bla på bakgrunn av det ovenfor nevnte immunmodulerende funksjonene drives det forskning på bruk av CTLA-4 basert immunterapi ved behandling av kreft.

Noen få eksempler i kreftbehandlings strategier:

CTLA-4 blokkade ved bruk av antistoffer har vist antitumor effekter i flere musemodeller med langtids virkende immunitet mot de aktuelle tumorene.

Det er også gjort små studier på mennesker med anti-CTLA-4 terapi på pasienter med prostata kreft og malignt melanom. Studiene viste klinisk respons blant annet målt ved nedgang i PSA i prostata gruppen og tumornekrose med inflammatoriske infiltrater i melanom gruppen. Dog var responsen vekslende fra pasient til pasient både med hensyn på varighet og hvor godt man responderte. CTLA-4 anses i dag som en potensielt viktig brikke for å øke T-celle responser ved forskjellige immunterapi strategier for behandling av kreft.

KILDER

1 Jackson G et al

CTLA-4: New insights into its biological function and use in tumor immunotherapy

Nature Immunology; Vol 3; No 7; July 2002; 611-618

2 Mark E Dudley + SA Rosenberg

Adoptive-Cell-Transfer therapy for the treatment of patients with cancer

Nature Reviews Cancer; vol 3, Sep 2003, 666-675

Tumor Nekrose Faktor, TNF

TNF B er et proinflammatorisk cytokin som produseres av T og B lymfocytter samt NK celler. TNF ble opprinnelig identifisert som et cytokin med anti-tumor aktivitet i 1984. Siden den gang har det blitt avdekket en rekke flere ligander og reseptorer tilhørende tumor nekrose super familien (TNFSF). I tillegg har det blitt identifisert en rekke molekyler som virker som ”transdusere” i de intracellulære signalveiene som påvirkes av TNFSF. TNFS ligander er med på å regulere sentrale celleprosesser som apoptose, proliferasjon, differensiering og overlevelse.

Table 1
Regulation of apoptosis and proliferation of cells by members of the TNF superfamily

Ligand	Receptor	Apoptosis	Proliferation	NF-κB	JNK	p42MAPK	p38MAPK
TNF-α	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
LTα	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
FasL	Fas	+	-	+	+	-	-
VEGI	DR3	+	-	+	-	-	-
TRAIL	DR4, DR5	+	-	+	+	-	-
LTβ	LT-βR	+	+	+	-	-	-
CD27L	CD27	+	+	+	+	+	-
CD30L	CD30	+	+	+	+	-	-
4-1BBL	4-1BB	+	-	+	+	-	-
TWEAK	Fn 14	+	+	+	+	-	-
LIGHT	LT-βR, HVEM	+	+	+	-	-	-
CD40L	CD40	-	+	+	+	-	-
OX40L	OX-40	-	+	+	-	-	-
RANKL	RANK	-	+	+	+	+	+
APRIL	TACI	-	+	+	+	-	-
BAFF	TACI, BCMA	-	+	+	+	-	-
GITRL	GITR	-	+	+	-	-	-
EDA-A1	EDAR	+	-	+	+	-	-
EDA-A2	XEDAR	-	-	+	-	-	-
?	TROY	-	+	+	-	-	-
?	DR6	-	-	+	+	-	-
?	RELT	?	+	+	?	?	?

Noen problemstillinger:

De fleste celletyper har ekspressjon av TNFR1 reseptor som binder både TNF B og TNF A. Likevel responderer kun noen få selekterte celle-typer i en gitt situasjon med vekstmodulering ved binding av TNF. De fleste celletyper responderer med NF-κB aktivering ved stimulering med TNF. NF-κB er en transkripsjons faktor som synes å virke antiapoptotisk. Molekylet har blant annet blitt implisert i tumorgenese. Mekanismene bak hvorfor cytokinene i noen situasjoner virker apoptotisk og i andre situasjoner virker antiapoptotisk er ikke fullstendig klarlagt.

Table 2
Cellular expression of ligands and receptors of the members of the TNF superfamily

Cytokine	Cells	Receptor	Cells
LT α	NK, T, and B cells	TNFR1 TNFR2	All cells Endothelial cells, immune cells
TNF- α	NK, T, and B cells	TNFR1, TNFR2	See above
LT β	T cells, B cells, NK cells, DC, macrophages	LT- β R	NK, CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells
FasL	Activated T cells and non-T cells	Fas DeR3	Nucleated cells Lung and colon cells
TRAIL	Lymphocytes, DC cells	DR4, DR5, DeR1, DeR2	Most cells
TWEAK	Monocytes	Fn 14	Endothelial cells, fibroblasts
4-1BBL	B cells, dendritic cells, macrophages	4-1BB	Activated T cells, monocytes and NK cells
OX40L	T and B cells	OX-40	T cells
CD40L	T and B cells	CD40	Reed-Stemberg cells
CD27L	NK, B, and T cells	CD27	CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells
CD30L	T cells, monocytes	CD30	Reed-Stemberg cells
APRIL	Secondary lymphoid organs	BCMA, TACI	B and T cells
Blys	T cells, DC cells	TACI, BCMA	See above
	Monocytes, macrophages	BAFF-R	B cells
LIGHT ^a	T cells, granulocytes, monocytes, DC cells	HVEM LT- β R	T lymphoid cells Nonlymphoid hematopoietic cells, and stromal cells
VEG1 ^a	Endothelial cells	DR3	Activated T cells
GITRL		GITR	CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells
RANKL	Activated T cells, osteoblasts	RANK OPG	Osteoclast precursors Osteoclast precursors, endothelial cells, others
EDA-1	Skin	EDAR	Ectodermal derivative
EDA-2	Skin	XEDAR	Ectodermal derivative
?		DR6	Resting T cells
?		RELT	Lymphoid tissues
?		TROY	Embryo skin, epithelium, hair follicles and brain

^a Binds to DeR3/TR6; both TNF- α and LT α binds to TNFR1 and TNFR2; THANK (also called TALL-1, BAFF, Blys, α TNF4); VEG1 is also called TL1 and TL-1a is a longer variant of TL-1; TROY is also called TAJ.

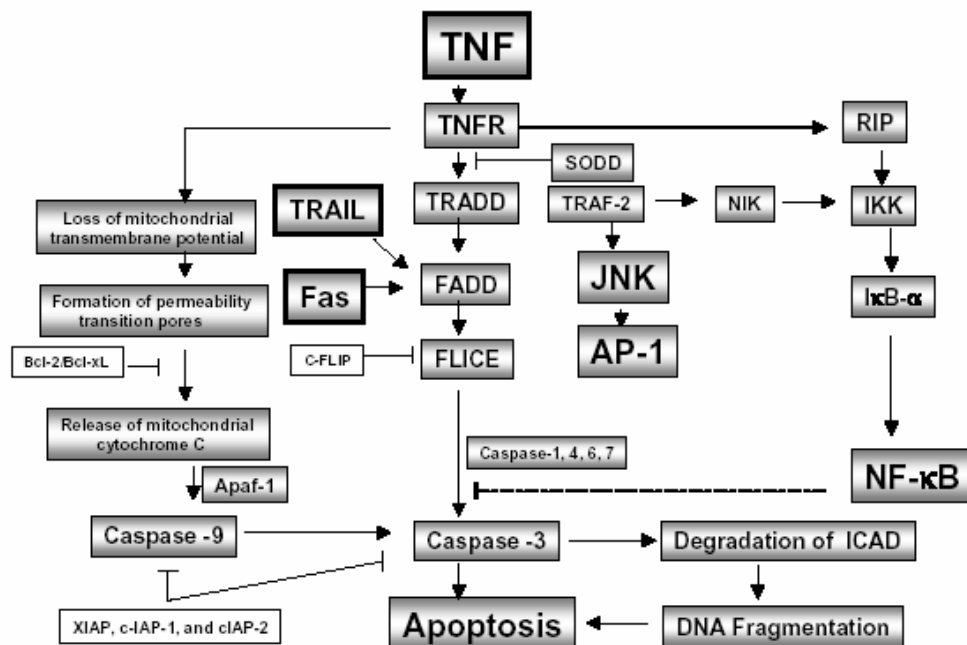


Fig. 1. TNF cell signaling pathway leading to apoptosis, survival and proliferation. XIAP, c-IAP-1, and cIAP-2 have been shown to inhibit caspase-3, -7 and -9. Survivin binds an IAP-inhibiting protein, Smac/DIABLO, thus releasing IAP to suppresses caspases.

Det foregår mye forskning i modulering av de ekstra og intracellulære signalveiene hvor TNFSF ligander involvert. Bla apoptose baserte terapier mot kreft (1). Her omtales kort kun terapier og forsøk som omfatter TNF A og B.

TNFs inflammatoriske egenskaper bidrog i sin tid til utvikling av TNF-antagonister. TNF A antagonister er i dag i klinisk bruk i blant annet behandling av Reumatoid Artritt og Innflamatorisk Tarm Sykdom. TNF inhibitorer er også effektive i bruk for å redusere sykdomsaktivitet i Psoriasis og Psoriasis artritt(2).

Flere kliniske forsøk er undervei for å se på TNF A antagonisters rolle i kreft behandling. Man håper på at disse medikamentene i enkelte tilfeller skal kunne inhibere tumorgenese. Enkelte studier tyder på at TNF A i gitte tilfeller kan bidra til dette. I andre sammenhenger håper man at TNF A antagonister skal dempe bivirkninger av konvensjonell kjemoterapi eller virke palliativt. Mange pasienter med langtkommen kreftsykdom har økte nivåer av TNF og en regner med at deler av symptomalogen hos disse pasientene skyldes dette cytokinet. Dette gjelder bl.a. utviklingen av kacheksi.

TNF A regnes også som bidragsyter til forskjellige former for cytostatikainduisert toksisitet. Eksempelvis cisplatin-indusert nefrotoksisitet(3).

I andre forsøk har man prøvd å gjøre nytte av TNFs apoptotiske egenskaper. En del av forsøkene har strandet pga dette cytokinets toksiske egenskaper og lav antitumor effekt under de aktuelle studiene. En håper etterhvert å kunne utvikle metoder for å unngå TNF induert toksisitet (4,5). Kombinasjonsbehandling med TNF og forskjellige cytostatika induserer effektive antitumor responser med kurasjon og langtids virkende immunitet i brystkreft og lymfom musemodeller. Dette i doser hvor "singelagent" terapi med de samme stoffene ikke gir antitumor respons(6). Denne undersøkelsen viser at kombinasjonsbehandling kan være en mulig terapeutisk strategi og at man på den måten vil kunne unngå TNF-indusert toksisitet.

De ovenfornevnte eksemplene illustrer også TNFs dobbeltrolle og uklarhet omkring i hvilke situasjoner cytokinet påvirker tumorgenese i positiv og negativ retning.

Hovedkilde : U Gaur et al

Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily
Biochemical Pharmacology 66, 2003, 1403-1408

1 John C Reed

Apoptosis Targeted therapies for cancer
Cancer Cell, Jan 03, vol 3, 17-22

2 Kruger et al

Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis
Arch Dermat, 2004 Feb, 140(2), 218-25

3 Szlosarek PW et al

Tumor necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours
Lancet Oncol, 2003, Sep, 4(9): 565-73

4 De Vries EG et al

Modulation of death receptor pathways in oncology
Drugs Today, 2003, 39, Suppl C, 95-109

5 Marek Los et al

Anticancer drugs of tomorrow: Apoptotic pathways as targets for drug design
Drug Discovery Today, 2003, vol 8, nr 2, 67-77

6 Mihich E et al

Anticancer drugs plus cytokines: immunomodulation based therapies of mouse tumours
Int J Immunopharmacol 2000, Dec,22(12), 1077-81

IL-10

IL-10 ses på som et viktig immunmodulerende pleotropisk cytokin som virker inhibitorisk på en rekke celletyper. Det produseres av blant annet makrofager, T og B celler. En rekke effekter og mekanismer bak cytokinets virkning er beskrevet. Som beskrevet under CTLA-4 trenger T-celler ofte kostimulering for effektiv aktivering. En av de viktigste mekanismene er CD28(T-celler)-CD80/86(antigen presenterende celler) interaksjon. Studier har implisert IL-10 i hemning av denne interaksjonen.

T celle anergi induert av IL-10 har blitt beskrevet i forsøk på både mus og mennesker. Både under naturlig antigen eksponering og ved spesifikk immunterapi (SIT) ved allergiske tilstander.(ref 1)

Eksempelvis er SIT med bie-gift peptider karrakterisert av blokkert CD28-B7 interaksjon, øket IL-10 ekspressjon i aktiverte CD4 positive T celler i den antigen spesifikke T-cellepopulasjonen(ref 1). Antigen/peptid induert Th 1 og Th 2 cytokin produksjon og proliferasjon synker samtidig med IL-10 økningen. Ved in vitro forsøk blir de anergiske cellenes proliferative egenskaper og cytokin responser rekonstituert ved nøytralisering av det endogent produserte IL-10. Lignende resultatater har blitt vist med SIT mot gresspollen induert astma, rinitt og konjunktivitt. Ved SIT med biegift peptider ble det også observert en nedgang i antigen-spesifik IgE/IgG ratio. In vitro forsøk har vist at IL-10 fører til nedgang i Ig-E produksjon hos B-celler. Nedgangen er ledsaget av økt produksjon av Ig-G. Den aktuelle undersøkelsen samt flere andre har implisert IL-10 som en sentral aktør i anti-allergiske responser(1,2).

I tillegg til at IL-10 synes å induere anergi i T-celler og inneha antiinflammatoriske egenskaper har andre studier vist at IL-10 kan virke som vekstfaktor for maligne og normale B-celler(se under ”praktisk forsøk”).

Bivoktere utsatt for biestikk viser økte tall av IL-10 produserende CD4+CD25+ T-celler. De ovenfornevnte CD4+CD25+ cellene har i de senere årene gitt grobunn for en hypotese om en ny hovedklasse T-celler, regulatoriske T-celler(Treg-celler). Cellene karakteriseres av sekresjon av IL-10 og TGFB (transforming growth factor B)(1,3). De to cytokinene regnes for å være sentrale i mediering av Treg-cellenes effektorfunksjoner. Treg-cellenes viktigste oppgave regnes for å være opprettholdelse av perifer T-celle toleranse.

Pga IL-10s T-celle inhiberende og anti-inflammatoriske egenskaper er det gjort flere forsøk, og flere er på vei for å undersøke muligheten til å bruke dette cytokinet ved en rekke sykdommer og tilstander. Av sykdommer og tilstander kan nevnes er Reumatoid artritt, Inflammatorisk tarm sykdom, psoriasis og Kronisk Hepatitt C og post organtransplantasjon. De fleste undersøkelsene har til nå gitt skuffende resultatater(4).

IL-10 blitt implisert i rekke maligne tilstander. Som eksempel kan nevnes at pasienter med flere forskjellige B-celle neoplasier har økte nivåer av IL-10 i serum og i tumor materiale. En kan derfor tenke seg en rolle for IL-10 i immunterapi mot kreft(5,6).

- 1 Cezmi A et al
Mechanisms of IL-10 mediated immune suppression
Immunology 2001, 103, 131-136
- 2 Till SJ et al
Mechanisms of immunotherapy
J Allergy Clin Immunology, 2004, Jun 113(6), 1025-34
- 3 Dennis OG et al
TH1-TH2: A procrustean paradigm
Nature Immunology, Vol 4, Nr 6, Jun 2003, 503-505
- 4 Asadullah K et al
IL-10 therapy, review of a new approach
Pharmacol Rev, 2003, Jun, 55(2), 241-69
- 5 Adorini L
Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases
Clin Exp Immunol, 2003 May, 132(2), 185-92
- 6 Spaner DE
Amplifying cancer vaccine responses by modifying pathogenic gene programs in tumor cells
J Leukoc Biol, 2004 Aug, 76(2), 338-51

SMELTE GEL TEKNIKKER

Smeltegels teknikker gir blant annet mulighet til screening av både kjente og ukjente mutasjoner, kjente og ukjente SNP-er og populasjons screening av SNP-er(1,2,3).

KORT OM TEORETISK BAKGRUNN:

De forskjellige teknikkene baserer seg på forsøk og teorier beskrevet av Fischer og Lerman (4) og teorier + formler utviklet av Poland (5). Det finnes pc-baserte programmer på nettet som simulerer smelteprofiler for DNA fragmenter på bakgrunn av fragmentets nukleotide sekvens (eks MacMelt). At man kjenner nukleotide sekvens er altså en forutsetning for simulering.

-Alle teknikkene baserer seg på elektroforese av PCR amplifiserte gen produkter. Prinsippet for de forskjellige smeltegels teknikkene baserer seg på at lengde og nukleotide sekvens til et gitt DNA fragment bestemmer smelte/denatureringstemperaturen. Ved en bestemt temperatur vil et gitt fragment foreligge i 50/50 likevekt mellom helix-singelstrand. To DNA fragmenter med samme lengde vil ha forskjellig smelte/likevekts temperatur på bakgrunn av forskjellig nukleotide sekvens. Dette er den viktigste forutsetningen for analyse metoden.

Ved elektroforese vil de forskjellige fragmentene partielt denaturere ved bevegelse gjennom kapilær rør eller en gel. DNA fragmentet med lavest smeltepunkt vil ha lavest elektroforetisk mobilitet og bevege seg saktere enn fragmenter med høyere smeltepunkt. Dette fordi en større andel av fragmentet med lavest smeltepunkt vil foreligge som "singel strand" og ikke som dobbel helix. Fragmentene skilles således på bakgrunn av forskjeller i smeltepunkt og elektroforetisk mobilitet. Fragmenter med forskjell i kun et basepar skilles med denne metoden.

Homo duplekser og heteroduplekser:

Kontinuerlig denaturering og sammenføring av singel strand DNA molekyler under PCR gir opphav til formasjon av homoduplex og heteroduplex molekyler. Heteroduplekser er DNA-molekyler som i en enkelt baseposisjon har en "mismatch"/ikke komplementært basepar.

Eksempel:

En heterozygot prøve GA, vil gi homoduplexene GC og AT. I tillegg heteroduplex molekyler GT og AC for den gitte posisjonen.

Teknikkene er oppkalt etter hva slags kjemisk denaturant eller "matrix" analysen blir utført på. Metodene har forskjellig sensitivitet og spesifisitet, samt applikasjon (1,6)

Kvalitativ sensitivitet : Evne til å oppdage en mutant sekvens i en gitt målsekvens

Kvantitativ sensitivitet : Evne til å oppdage en mutantsekvens i en "bakgrunn" av vildtypesekvenser

Spesifisitet : Evne til å oppdage at en vildtype sekvens ikke er en mutant og å skille de aktuelle de enkelte nukleotide sekvensene fra hverandre.

Jeg vil nå gi en kort beskrive Automatisert Konstant Denaturant Kapilær Elektroforese(AKDKE). De andre teknikkene beskrives ikke nærmere da de ikke er brukt i den praktiske delen. For en mer fullstendig beskrivelse av smelte gels teknikker og bruk henvises det til referanse(1).

AKDKE

Ved denne metoden inneholder primerne som brukes til PCR oppforming fluofoerer. Etter oppforming lastes fragmentene i elektroforese apparaturen. De vil på bakgrunn av forskjellig smelteprofil ha forskjellig mobilitet gjennom kapilær røret som beskrevet ovenfor. En laser som er fokusert på kapilærrøret vil eksitere de fluoformerkede PCR produktene. Fluoforene vil ved laser eksitasjon emitere lys som detekteres av analyse apparaturen. Signalet blir digitalisert og overført til en pc hvor resultat blir presentert som elektroferogramer. Elektroferogramene representerer således emittert lys fra fluoforen. Man benytter seg i tillegg av en standard prøve for å skille de ulike genotypene fra hverandre(se figur).

Optimale elektroforese forhold for separasjon av fragmentene bestemmes ved hjelp av simulering av smelteprofil (for eksempel med MacMelt) og ved å kjøre PCR produktene ved litt forskjellige temperaturer.

På DNR, immunologisk seksjon bruker man en modifisert MegaBace1000 genetisk analyse maskin for AKDKE hvor kapilærene er omsluttet av et varmeelement for presis temperatur kontroll (2). Analyse metoden er veletablert (1,7).

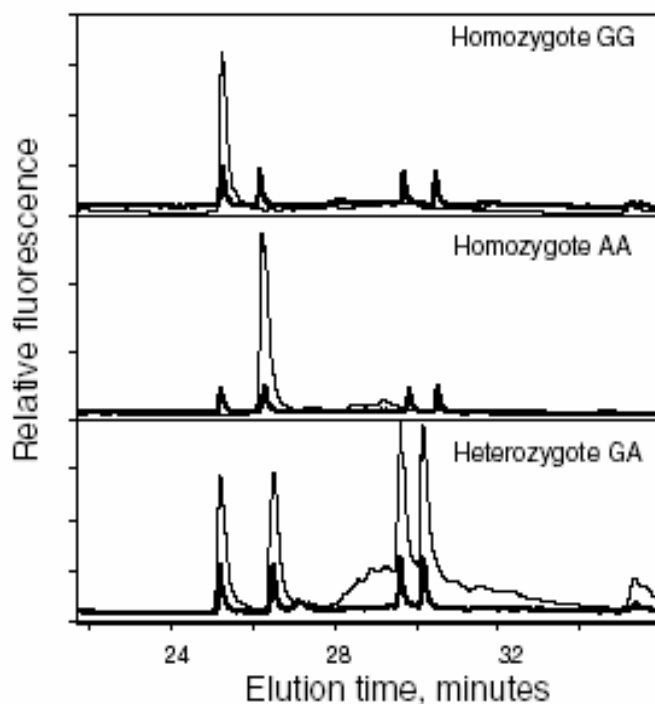


FIG. 3. Electropherograms of 3 samples with different genotypes are presented. The samples were analyzed by denaturant capillary electrophoresis (DCE) with internal Tamra-labeled standard (bold line). Upper part shows the homozygous GG genotype, the middle part shows the genotype AA, and lower part shows the heterozygous GA genotype.

- 1 Jens Bjørheim, Gustav Gaudernack, Per Olaf Ekstrøm
Melting gel techniques in SNP and mutation detection: From theory to automation
J. Sep. Sci. 2002, 25, 637-647 (hovedkilde)
- 2 Jens Bjørheim, M Minarik, G Gaudernack and P O Ekstrøm
Mutation detection in KRAS Exon 1 by Constant Denaturant Capillary Electrophoresis in 96 parallel capillaries
Analytical Biochemistry 304, 200-205, 2002
- 3 Per Olaf Ekstrøm, J Bjørheim, G Gaudernack and K E Giercksky
Population screening of SNP exemplified by analysis of 8000 alleles
Journal Of Biomolecular Screening Vol 7 , Nr 6, 2002, 501-506
- 4 S G Fischer, LS Lerman
DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturant gradient gels;
correspondence with melting theory
Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80; 1579-1583
- 5 D Poland
Recursion relation generation of probability profiles for specific-sequence macro-molecules with long-range
correlations
Biopolymers 13 ; 1859-1871; 1974
- 6 Jens Bjørheim et al
Mutation analysis of KRAS exon 1 comparing three different techniques: TTGE, CDCE and AS-PCR
Mutation Research 403, 1998 , 103-112
- 7 Jens Bjørheim, P O Ekstrøm, A L Børresen-Dale and G Gaudernack
ACDCE applied for detection of KRAS exon 1 mutations

PRAKTISK FORSØK

Undersøkelse av SNP-er i IL-4, TNF-B, IL-10 og CTLA-4

MATERIALE OG METODE

Blod fra 82 pasienter med Non-Hodgkins lymfom ble brukt som DNA kilde.

I forsøket utgjorde tidligere utført analyse av de aktuelle SNP-ene utgangspunkt for sammenligning med NHL gruppen. Kilden var 4000 blodgivere, bortsett fra for IL-10. Der utgjorde 219 blodgivere kontroll gruppen. Det er foreløpig ikke gjort en bred SNP-populasjons analyse på IL-10 ved DNR, slik tilfelle er for de andre molekylene. (Ekstrøm et al, Journal Of Biomolecular Screening Vol 7 , Nr 6, 2002, 501-506).

DNA ISOLASJON

DNA isolasjon ble gjort med GenoM TM-48 (GenoVision) og det isolerte DNA ble overført til en 96-brønns mikrotiter plate. Maskinen er en automatisert DNA-ekstraksjons maskin og ble brukt i henhold til fabrikantens instruksjer.

PCR REAKSJON

All PCR ble gjort på PTC-200 TC PCR maskin(MJ Research, Waltham, MA).

Reaksjons blanding ble laget ved å blande sammen :

1508mlH₂O, 200 ml buffer, 200 ml MgCl₂ oppløsning, 80ml dNTP, 5 ml av hver av primerne og 2.5 ml av 50 u/ml Taq enzym. Deretter ble 20 ml av reaksjonsblanding fordelt i hver brønn i en 96 brønns PCR plate. 0.7 ml DNA fra hver pasient ble så fordelt i brønnene. ml=mikroliter

Samme syklus parametre ble brukt på alle fragmentene som ble analysert. 35 sykler med denaturering i 1 minutt ved 94C, sammenføyning ved 53 C i 1 minutt og elongering ved 72C i 1 minutt. Alle PCR produkter ble så denaturert i 5 minutter ved 94C og deretter inkubert ved 65 C i 1 time for heteroduplex dannelse.

PRIMERE OG SNP-referanser

- 1) IL-4: RS 2070874
- 2) IL-10: RS 1800896
- 3) CTLA-4: RS 231775
- 4) TNF: RS 909253

(RS nummer er et internasjonalt referansesystem man bruker for primere. Hvert primersett som brukes til oppformering av SNP-fragmenter har sitt RS nummer. De kan brukes til å forsikre seg om at man har sett på samme fragment ved sammenligning av studier. De kan også brukes til å identifisere bestemte polymorfier i SNP-databaser)

STANDARD

To tilfeldige prøver i hvert undersøkelses sett ble PCR oppformert ved bruk av primere inneholdende en annen fluofoer. Det ble deretter gjort elektroforese på de i agarose gel. Agarose gel elektroforese ble gjort for å undersøke om det forelå reaksjonsprodukt som kunne brukes som standard. En av prøvene ble deretter valgt ut som standard for å kunne "skåre" /skille allelene fra hverandre.

AKDKE

En MegaBace 1000 genetisk analyse maskin ble brukt til AKDKE analyse. De aktuelle SNP-ene har blitt undersøkt tidligere slik at tekniske omstendigheter som optimal temperatur, injeksjon av prøvene var allerede gitt og man trengte derfor kun mindre justeringer for å få best mulig oppløsning.

Kjøreforhold var standard kjøreforhold ved DNA sekvensering slik som anbefalt av produsenten. PCR-produktene forelå i en 96-brønns plate uttynnet 1 : 50 i destilert vann forut for injeksjon i maskinen.

STATISTIKK ANALYSE

Det ble brukt differanse test/risiko differanse test for to uavhengige binomiske forsøksrekker ($Y = p_1 - p_2$ / roten av $\{(1/n_1 + 1/n_2)p^*(1-p^*)\}$ $p^* = x_1 + x_2 / (n_1 + n_2)$; p_1 og $p_2 =$ de estimerte frekvenser). I tillegg ble kji-kvadrat test brukt.

FUNN

Det ble ikke funnet interessante/signifikante forskjeller mellom kontrollgruppen og NHL pasientene for IL-4, TNF og CTLA-4.

For IL-10 ble det funnet signifikante forskjeller i genotype og allele frekvens mellom NHL pasientene og kontroll gruppen.

Den estimerte frekvensen for GG genotypen hos lymfom gruppen var 0.378 (n=82 95% CI 0.366-0.390). I kontrollgruppen var GG frekvensen 0.174 (n=219 95% CI 0.171-0.177).

Allele frekvens G i lymfom gruppen var 0.579 (n=164 95% CI 0.573-0.585). G allele frekvens i kontroll gruppen 0.470 (n=438 95% CI 0.468-0.470).

Kji-test på GG-genotypen og G allelet gav henholdsvis $p = 5,64 \times 10^{-5}$ og $p = 0,0173$

Diff test for to uavhengige binomiske forsøksrekker:

GG genotype frekvens; 0.378 versus 0.174

P ingen forskjell $p < 0.04\%$ (99% CI 0.052-0.321)

G allele frekvens; 0.579 versus 0.470

P ingen forskjell $p = 1.82\%$ (99% CI -0.0101-0.229)

Undersøkelsen tyder således på at G-allelet er forbundet med økt risiko for utvikling av B-NHL.

DISKUSJON

Tre SNP-er i IL-10 promotoren har tidligere vært rapportert å kunne influere IL-10 produksjon. Observasjonene baserer seg på in vitro studier(1). -1082G allelet er assosiert med høyere produksjon. Serum IL-10 er forhøyet i opp mot 50 % av pasientene med B-NHL. Økte nivåer av IL-10 har i studier vært assosiert med et negativt sykdomsforløp ved forskjellige B-celle neoplasier(2,3). In vitro studier har vist at IL-10 kan fungere som en vekstfaktor for normale og maligne B-celler. Tilsetning av eksogent IL-10 til B-NHL-tumorkultur viste i en studie å øke disse cellenesproliferasjon(4,5). Økt IL-10 produksjon på grunn av et høyproduksjons allele kan således tenke seg å bidra til tumorvekst og et negativt sykdomsforløp i den andelen av pasientene dette gjelder. IL-10 har også vist seg å kunne inducere anergi i TH1 og TH2 hjelpeceller og nedregulere HLA I og II ekspresjon på overflaten av antigenpresenterende celler(6-9). Således tyder disse studiene på at IL-10 kan bidra til å dempe T-celle medierte antitumor responser. Et høyproduksjons allele kan bidra til dette i større grad.

I en studie gjort av Lech-Maranda et al fant man en høyere forekomst av IL-10 -1082G allelet hos pasienter med Diffust Storcellet B-celle Lymfom(DLBCL n=199) sammenlignet med friske kontroller(n=112)(0.47 versus 0.39 p=0.043)(10). Undersøkelsen støtter til en viss grad funnet mitt. Dog var den aktuelle undersøkelsen gjort på en mer enhetlig sykdomsgruppe.

Et overraskende funn i (10) var at det antatte ”høyproduksjons allelet” korrelerte med bedre prognose hos DLBCL pasientene. Median oppfølgingstid for pasientene var 42 måneder(9-196). En mulig forklaring er at den aktuelle polymorfien ikke bidrar til økt IL-10 produksjon in vivo hos B-NHL pasienter. En annen mulig forklaring er at IL-10 kan virke tumorinhiberende. Forfatterne av (10) legger vekt på dette som en mulig forklaring. In vitro studier og enkelte dyremodeller har vist at IL-10 kan ha antitumor effekter gjennom stimulering av NK-celle mediert tumorlyse og gjennom å hemme tumorangiogenese(11,12,13). Andre studier har vist at IL-10 under visse forhold kan stimulere cytotoksiske T-celler(CTL) til tumordrap. Det er uenighet om IL-10 virker inhiberende eller stimulerende på CTL antitumor responser. Forskjellige forskergrupper har kommet til motstridende resultater(14,15). Det er derfor vanskelig å bruke CTL medierte antitumor responser som forklaringsmodell. At IL-10 nedregulerer HLA I og II ekspresjon og synes å inducere anergi i TH1 og TH2 celler, taler også mot CTL mediert tumordrap som forklaringsmodell. De ovenfornevnte effektene på B-celler taler også mot dette.

Treg celler karrakteriseres av produksjon av IL-10 og TGFB. Cellenes viktigste funksjon anses å være inhibisjon av T-celle medierte immunresponser og opprettholdelse av perifer toleranse. Det synes derfor merkelig at IL-10 som anses for å være et av de viktigste effektorcytokinene til disse cellene skal virke stimulerende på CTL in vivo. I løpet av de to siste årene har en rekke studier vist økte nivåer av disse cellene både i tumormateriale og i serum hos kreftpasienter. Økte nivåer synes å være et generellt fenomen hos kreftpasienter og har vært forbundet med dårlig prognose(**se vedlegg**). Dette støtter heller ikke forklaringsmodellen i (10) etter mitt syn.

I en studie gjort av Cunningham et al(16) fant man det motsatte resultat hva gjelder -1082 allelet og risiko for utvikling av B-NHL . Man undersøkte 46 pasienter med DLBCL samt 17 pasienter med andre aggressive histologier. Man fant at IL-10-1082A allelet var signifikant overrepresentert i lymfomgruppen(n=63, p=0.0344).

Studien av Cunningham illustrerer:

- 1 Behovet for å undersøke et større antall pasienter
- 2 At det er viktig å legge vekt på reproduktibilitet i SNP-baserte assosiasjons analyser.
- 3 De to studiene illustrerer også nødvendigheten av å ikke komme til altfor raske konklusjoner.

KONKLUSJON

Den aktuelle GG genotypen og G allelet synes å øke risikoen for å utvikle B-NHL. Assosiasjonen er sterkest for GG-genotypen. Man kan derfor tenke seg at homozygote bærere har en høyere risiko en heterozygote for å utvikle sykdommen. Det foreligger også en mulighet for at den aktuelle SNP-en er koblet til et annet gen og derfor ikke er direkte involvert i patogenesen ved B-celle-NHL.

Undersøkelse av flere pasienter er nødvendig for å sannsynliggjøre en reel forskjell og få et mer presist estimat. En bør også undersøke om skjevheten er mer uttalt for enkelte undergrupper av B-NHL eller om dette er et generelt fenomen ved B-celle neoplasier. Hvis resultatene lar seg reproducere gir de grunnlag for å undersøke hvordan de aktuelle allelene påvirker IL-10 produksjonen in vivo hos lymfompasienter og hva slags prognostisk betydning dette har.

1 Turner et al

An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter
Eur J Immunogenetics 1997,24, 1-8

2 Blay et al

Serum IL-10 in NHL, a prognostic factor
Blood, 1993 Oct 1, 82(7), 2169-74

3 Vassilakopoulos et al

Serum IL-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkins lymphoma
Haematologica 2001, Mar, 86(3), 274-81

4 Rousset et al

IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes
Proc Natl Acad Sci, vol 89, Mar 1995, 1890-1893

5 Voorzanger et al

IL-10 and IL-6 are produced in vivo by NHL cells and act as cooperative growth factors
Cancer Res, 1996 Dec 1, 56(23), 5499-505

6 Groux et al

IL-10 induces a long term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells
J Exp Med, 1996 Jul 1, 184(1), 1-8

7 Matsuda et al

IL-10 pretreatment protects target cells from tumor and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression

8 Yue et al

IL-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA I, II and ICAM-1 molecules

Int J Cancer, 1997 May 16, 71(4), 630-637

9 Koppelman et al

IL-10 downregulates MHC II peptid complexes at the plasma membrane of monocytes
Immunity 1997, 7, 861

10 Lech-Maranda et al
IL-10 gene promoter polymorphism influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma
Blood, May 2004, Vol 103, number 9

11 Asadullah K et al
IL-10 therapy, review of a new approach
Pharmacol Rev, 2003, Jun, 55(2), 241-69

12 Kundu et al
IL-10 inhibits tumor metastasis , downregulates MHC class I, and enhances NK-lysis
Cell Immunol 1997 Aug 25, 180(1), 55-61

13 Cervenak et al
Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by IL-10
Blood, 2000 Oct, 96(7), 2568-73

14 Hagenbaugh et al
Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice
J Exp Med. 1997 Jun 16;185(12):2101-10

15 Groux et al
A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen presenting cells

16 Cunningham et al
Polymorphism in the IL-10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive NHL
Leuk Lymphoma 2003 Feb, 44(2), 251-5

VEDLEGG

Regulatoriske T-celler/Treg celler, kreft og IL-10

CD4CD25+ T celler /Treg celler regnes som sentrale for opprettholdelse av selvtoleranse. Eksperimentelle dyremodeller har vist at de er potente hemmere av antitumor immunresponser(1). Karakteristisk for Treg celler er produksjon av IL-10. I løpet av 2003 og 2004 har det kommet en rekke studier på Treg cellers betydning ved malignitet hos mennesker. Blant annet har man gjort undersøkelser av pasienter med kreft i ventrikkel, colon/rektum, øsofagus, bryst, lunge og pankreas. Felles for studiene var at kreftpasientene hadde økte nivåer av Treg celler i blodet sammenlignet med friske kontroller (eksempelvis 1,2,3,4).

Ved in vitro studier av forskjellige epiteliale svulster fant Wolf et al(1) at Treg cellene var anergiske for stimulering via TCR reseptor, at Treg cellene hemmet proliferasjon av CD4+CD25- celler i ko-kultur og at de hemmet NK-celle mediert cytotoxicitet. (kolon/rektum, lunge, bryst, ventrikkel kreft)

I (2) fant Ichiara et al at antallet Treg celler var høyere hos pasienter med langtkommen sykdom sammenlignet med pasienter i tidlig sykdomsfase. Treg cellene produserte store mengder av IL-10, mens de CD4+CD25- produserte lite av cytokinet. Proliferasjon av CD4+CD25- celler ble hemmet i nærvær av Treg cellene og grad av inhibisjon var proporsjonal med mengden Treg celler(undersøkelsen var gjort på pasienter med kreft i ventrikkel og øsofagus).

I (3) fant Sasada et al at pasienter med høye nivåer av Treg celler hadde dårligere prognose sammenlignet med pasienter med lavere nivå. De isolerte cellene produserte IL-10 og IL-4 men ikke IFN-gamma eller IL-2 ved stimulering. I tillegg inhiberte Treg cellene cytokin produksjonen til de CD4+CD25- cellene(Pasienter med GI cancer)

I (4) fant Liyanage et al at andelen Treg celler var høyere blant TIL(tumor infiltrerende lymfocytter) sammenlignet med andelen i perifert blod hos bryst og pankreas kreft pasienter. Cellene hadde konstitutiv ekspresjon av CTLA-4. I tillegg hadde de sekresjon av IL-10 og TGF-B. Det var ingen sekresjon av IFN-gamma. I ko-kultur ble proliferasjon og sekresjon av IFN-gamma hos CD8+ og CD4+CD25- celler potent hemmet. Andelen Treg var høyere i perifert blod hos pasientene sammenlignet med kontroller.

Lignende studier har blitt gjort for B-celle neoplasier. Shi et al(5) fant andelen Treg celler var signifikant høyere hos pasienter med B-celle-NHL sammenlignet med friske kontroller. Dette gjaldt både ubehandlede pasienter og pasienter som hadde oppnådd partiell eller komplett remisjon etter kjemoterapi.

Marshall et al(6) undersøkte 24 pasienter med Hodgkins sykdom. TIL ble stimulert med forskjellige mitogener og antigener uten at man fikk cellene til å proliferere. Dette til forskjell fra PBMC(mononukleære celler i perifert blod). TIL hadde store populasjoner av CD4CD25+ Treg celler. Ved å blande PBMC med TIL fant man at PBMC responser ble hemmet. Denne inhibitoriske virkningen på PBMC responser ble dempet ved å forhindre cellekontakt, ved å blokkere CTLA-4 og ved å nøytralisere IL-10.

En av de sentrale problemene man tror man må overkomme for effektiv T-celle mediert immunterapi mot kreft, er anergi hos de aktuelle effektor cellene (Dudley et al,7).

Eksempelvis indikerer studier at "lymfodeplesjon" med cytostatika forut for ACT-terapi (Adaptiv Celle Transfer-terapi) gir bedre effekt enn å overføre celler uten forutgående "lymfodeplesjon". En mulig forklaring på dette er at man ved "lymfodeplesjon" fjerner en stor andel Treg celler og på den måten får en bedre immunrespons rettet mot de maligne cellene. I en studie av Shimizu et al (8) viste man at eliminering av Treg celler i mus øker effekten av ACT terapi betraktelig. Det kan være mange mekanismer som ligger til grunn for anergi hos effektor cellene ved ACT og vaksine strategier. Både "boende" og tumor induerte mekanismer spiller sannsynligvis en rolle.

I en interessant studie av Hussain et al sammenlignet man vaksine respons ved bruk av to forskjellige vaksine strategier i mus. Immunisering med den ene typen vaksine induerte effektiv anti-tumor respons i musene mens immunisering med den andre typen gav ingen/dårlig antitumor respons. Treg celle andelen i milt og TIL var signifikant høyere i muse-gruppen med dårlig anti-tumor respons etter immunisering sammenlignet med gruppen med god antitumor respons(9). Ut i fra in vitro studier mente forfatterne at IL-10 og TGF-B sekresjon fra Treg cellene var sentrale for den immunsuppressive virkningen.

Chakraborty et al (10) immuniserte (tumor lysat/APC basert vaksine) pasienter med malignt melanom. Man fikk en signifikant økning av CTL i sirkulasjonen som oppnådde maksimalt nivå i løpet av dag 7 hvoretter nivået av CTL begynte å synke og falt til prevaksine nivå etter 28 dager. Det fallende nivået av CTL var assosiert med samtidig ekspansjon av CD4CD25+ Treg celler. In vitro stimulering av postvaksine PBL (Lymfocytter i perifert blod) med IL-2 førte til økt sekresjon av IL-10 hos cellene. Videre undersøkelser viste at andelen CD4CD25IL-10+ T-celler hadde økt signifikant i postvaksine PBL.

1 Wolf et al

Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients

Clin Cancer Res 2003 Feb, 9(2), 606-12

2 Ichihara et al

Increased pop. of regulatory T cells in peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers

Clin C Res 2003 Oct 1, 9(12), 4404-8

3 Sasada et al

CD4CD25+ regulatory T cells in patients with GI malignancies: Possible involvement of reg. T cells in disease progression

Cancer 2003, Sep 1, 98(5), 1089-99

4 Liynage et al

Prevalence of reg. T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas and breast adenocarcinoma

J Immunol 2002 Sep 1, 169(5), 2756-61

5 Shin et al

CD4CD25+ T reg cells in peripheral blood of B-NHL patients with or without chemotherapy

Ai Zheng 2004 May, 23(5), 597-601

6 Marshall et al

Immunosuppressive reg T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkins lymphoma

Blood 2004 Mar 1, 103(5), 1755-62

7 Dudley et al

Adoptive Cell Transfer therapy for the treatment of patients with cancer

Nature Reviews 2003 Sep, 666-674

8 Shimizu et al

Induction of tumor immunity by removing CD α CD β + T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity

9 Hussain et al

CD4CD25+ regulatory T cells that secrete TGFbeta and IL-10 are preferentially induced by a vaccine vector

J Immunotherapy 2004 Sep-Oct, 27(5), 339-46

10 Chakraborty et al

Reg T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma

