

# Slatka strana kronične bolesti presatka protiv primatelja: istraživanje glikozilacije imunoglobulina G

Ema Prenc, dipl. ing.

## Mentori:

- Doc. dr. Dražen Pulanić, viši znanstveni suradnik
- Prof. dr. Steven Živko Pavletić

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
KBC Zagreb  
National Institutes of Health, SAD

UNITYTHROUGH  
KNOWLEDGEFUND

# Presadba alogeničnih krvotvornih matičnih stanica (aloPKMS)

- Krvotvorne matične stanice - nezrele krvne stanice koje imaju potencijal diferencijacije u sve vrste krvnih stanica
- Potencijalno izlječenje za veći broj malignih i nemalignih hematoloških bolesti (AML, ALL, CML, HL, NHL, mijelom, AA, imunodeficijencije, solidni tumori..)

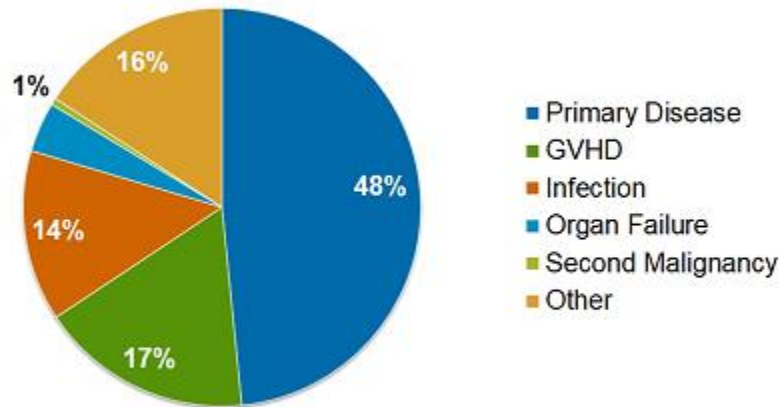
- Izvori: koštana srž, periferna krv (uz stimulaciju faktorom rasta granulocita, G-CSF), krv iz pupkovine
- Darivatelj: srodan/nesrodan, većinom HLA podudaran
- Kondicioniranje: mijeloablativno/smanjenog intenziteta (RIC)
- **Cilj: zamjena bolesnog krvotvornog sustava primatelja (domaćina) sa onim zdravim darivatelja, postizanje *graft-versus-tumor (leukemia)* efekta**

## Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. chronic Graft-versus-Host Disease, cGvHD)

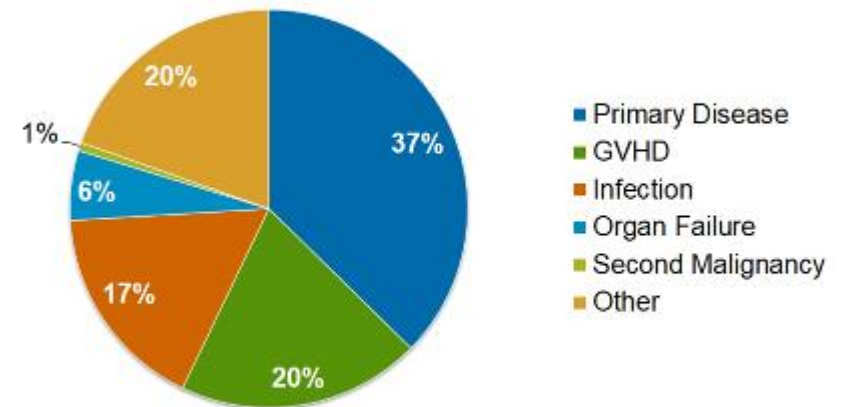
- multiorganski aloimuni i autoimuni poremećaj koji nastaje u oko 30-50% bolesnika nakon srodne aloPKMS i u oko 50-70% nakon nesrodne aloPKMS
- Jedan od vodećih uzroka kasnog ne-relapsnog morbiditeta i smrtnosti nakon aloPKMS
- Najčešće 3-24 mjeseca nakon aloPKMS
- Liječenje: steroidi (50% uspješnosti)

# Uzroci smrti nakon aloPKMS (2012-2013, SAD)

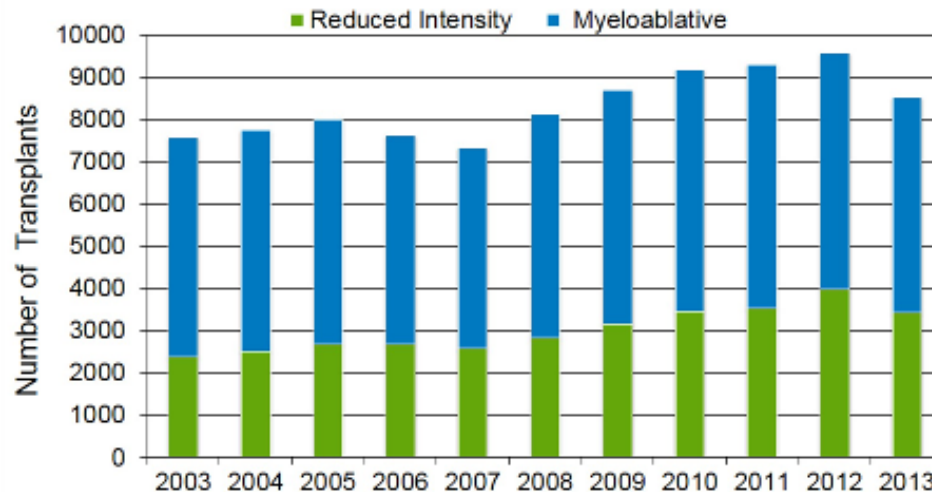
## HLA podudarni srodni darivatelji



## HLA podudarni nesrodni davatelji



- Incidencija cGVHD-a u porastu:
  - veći broj aloPKMS/god,
  - veći broj aloPKMS sa smanjenim kondicioniranjem,
  - veći broj aloPKMS s nepodudarnim darivateljima,
  - starija životna dob pacijenata



# Multisistemska autoimuna i aloimuna bolest

- Oči (suhoća, nalik Sjögrenovom sindromu)
- Koža (skleroza, lihenoidne promjene, poikiloderma)
- Usta (lihenoidne promjene, suhoća)
- Gastrointestinalni sustav
- Jetra
- Pluća
- Urogenitalni sustav
- Mišići i zglobovi

....



Poremećena  
homeostaza  
humoralnog odgovora

**Aloprotutijela**  
**Autoprotutijela**

Povišen odnos  
BAFF/B stanice

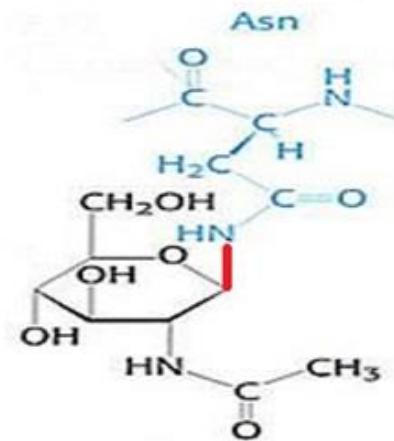
# Dijagnoza, stupnjevanje i prognoza

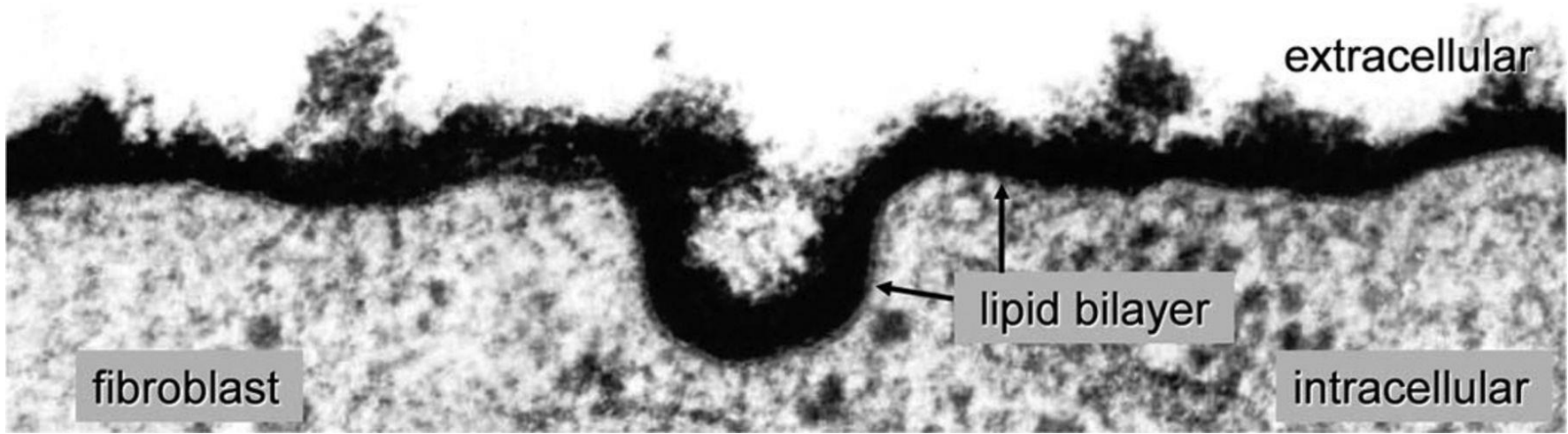
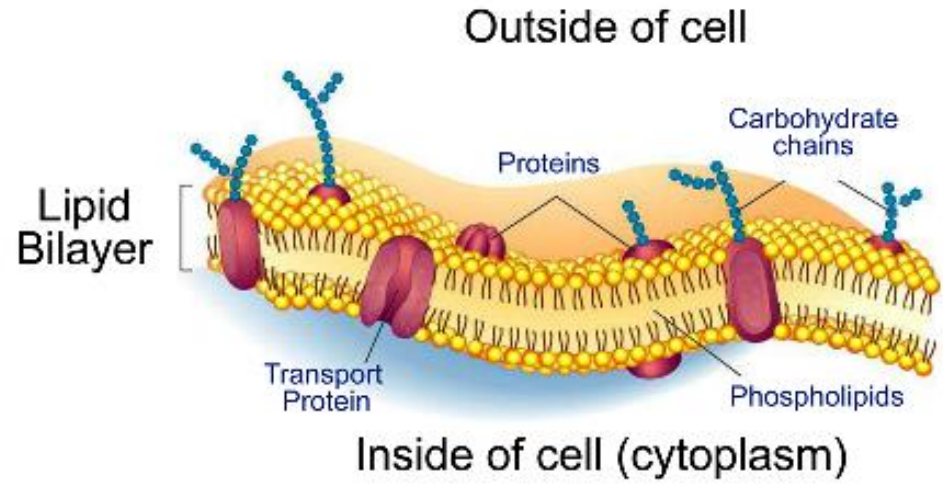
- Temelj: prepoznavanje kliničkih manifestacija, histološka potvrda
  - Evaluacija težine i aktivnosti bolesti: smjernice National Institutes of Health (NIH)
- pronalazak pouzdanih biomarkera?  
(predviđanje nastanka i težine bolesti, zahvaćenih organskih sustava, odgovora na terapiju..)



# Glikozilacija

- Jedna od najčešćih i najvarijabilnijih posttranslacijskih promjena
- Kovalentno vezanje glikana (šećera) na organsku molekulu (protein)
- Kompleksan metabolički put (stotine glikoziltransferaza, glikozidaza, transportnih proteina, transkripcijskih faktora) na koji utječu genetski i okolišni čimbenici
- Glikani su integralni dio skoro svih membranskih i izlučenih proteina u organizmu





# Uloga glikana

- Strukturne i modulatorne funkcije (utječu na konformaciju proteina, struktura membrana)
- Specifično prepoznavanje (stanična signalizacija, komunikacija među stanicama, adhezija)

## Imunološki sustav:

- Glikoproteini (TLR i NOD-like receptori, MHC I i MHC II proteini, receptori kemokina i citokina, T i B stanični koreceptori, TCR i BCR..)
- Citokini, kemokini
- Protutijela

...

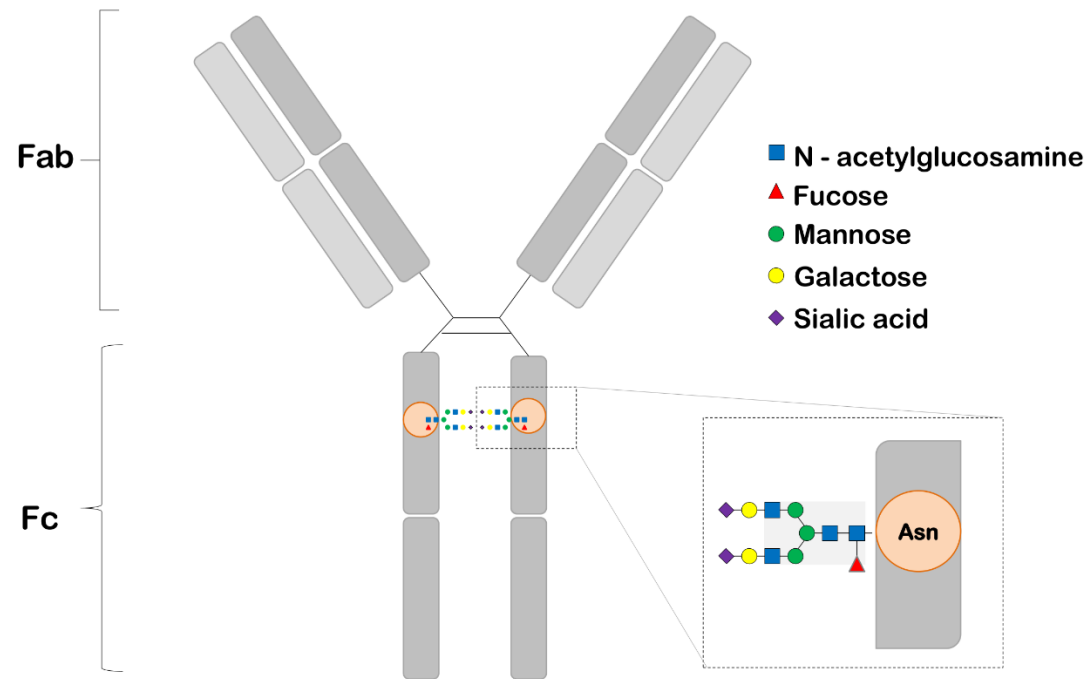
# Istraživački alat

- Varijabilnost na razini populacije
- Longitudinalna stabilnost glikoma pojedinca → značajna količina genetske kontrole
- Promjene u sastavu glikana odraz su okolišnih čimbenika i patofizioloških procesa

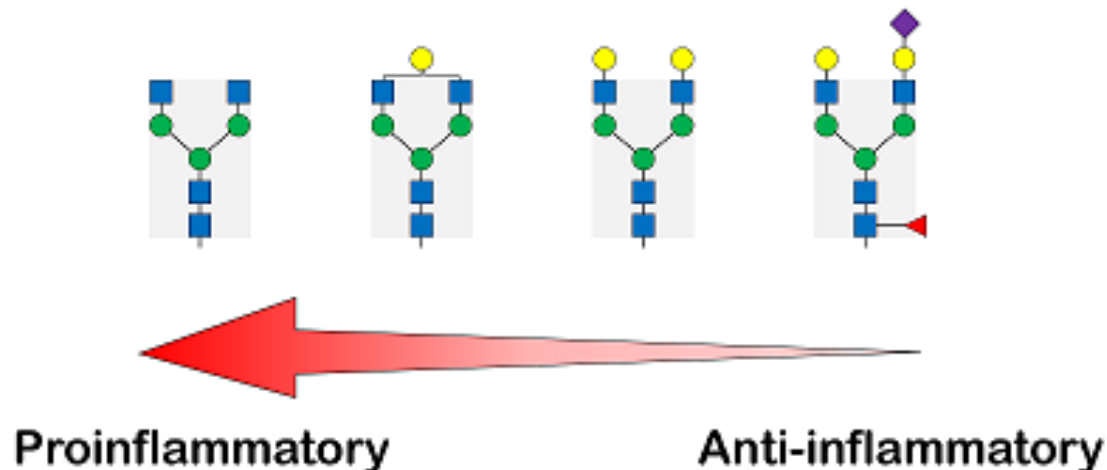
- Strukturne varijacije u fenotipu glikoma pojedinca ovise o/povezane su s brojnim faktorima:
  - Dob
  - Spol
  - Hormonski status (trudnoća, tranzicija iz pred- u postmenopauzno razdoblje...)
  - BMI
  - Pušenje
  - Značajan broj upalnih stanja, autoimunih bolesti i patoloških stanja (npr. SLE, reumatoidni artritis, Sjögrenov sindrom i hematološki tumori)

# Imunoglobulin G (IgG)

- Glikoprotein u ljudskoj plazmi
- Glavna efektorska molekula humoralnog imunološkog sustava
- Poznate građe:
  - Dva teška i dva laka polipeptidna lanca povezana disulfidnim vezama
  - Fc regija (CH<sub>2</sub>) domena nosi biantenarni N-glikan kompleksnog tipa kovalentno vezan na asparagin 297 (Asn297)
  - Jezgru N-glikana Fc fragmenta protutijela čini heptasaharid kojeg nadopunjuju različiti, uglavnom terminalno smješteni šećeri



- Promjene u sastavu glikana mijenjaju konformaciju proteina → utjecaj na interakcije s Fc receptorima i efektorske funkcije IgG-a
  - **Primjeri:**
    - Manjak fukoze – povećan afinitet prema FcγR - pospješena stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (eng. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)
    - Dodatak sijalinske kiseline – IgG poprima protuupalna svojstva (pr. IVIG)



# Ciljevi

- **OPĆI CILJ**

- Analizirati N-glikozilaciju IgG u bolesnika s cGVHD-om nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica (aloPKMS) i u osoba koje nakon aloPKMS nisu razvili cGvHD, te ispitati povezanost N-glikozilacije IgG s manifestacijama cGVHD

- **SPECIFIČNI CILJEVI:**

- Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s aktivnošću i težinom cGvHD te zahvaćenim organskim sustavima
- Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s demografskim karakteristikama i kliničkim manifestacijama bolesnika s cGVHD
- Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s laboratorijskim markerima upale u bolesnika s cGVHD (CRP, SE, C3, C4)
- Utvrditi potencijal N-glikozilacije IgG-a kao prognostičkog i dijagnostičkog biomarkera bolesti



# Plan istraživanja I

- **Uzorci:**
  - 251 uzorka krvne plazme pacijenata s cGvHD (NIH\* presječna studija)
  - 30 uzoraka krvne plazme pacijenata s cGvHD + 30 kontrola (transplantirani, bez cGvHD; podudarni u spolu i dobi) (KBC Zagreb\*\* presječna studija)
- **Pacijenti:**
  - 1-75 god starosti
  - Ekstenzivna laboratorijska obrada
  - Pregledi subspecijalista
  - Klasifikacija aktivnosti i težine bolesti te zahvaćenosti organskih sustava prema smjernicama NIH-a (2005., 2015.)

\* National Cancer Institute (NCI) klinička presječna studija „Natural History Study of Clinical and Biological Factors Determining Outcomes in Chronic Graft-Versus-Host Disease” 2004-2014

\*\* UKF projekt Medicinskog fakulteta u Zagrebu “Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic graft- versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”

# Plan istraživanja II

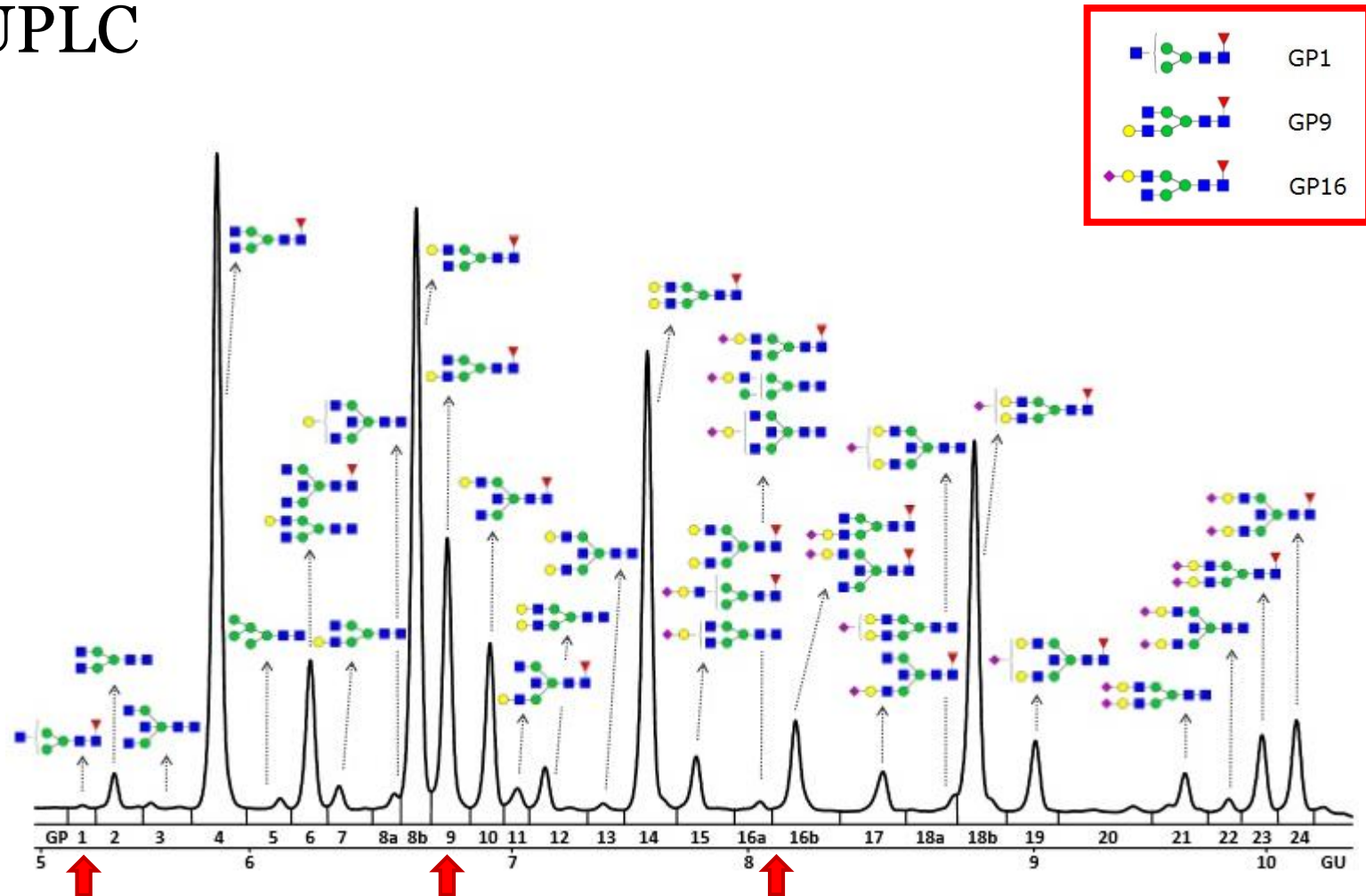
- Analiza glikana
  - Izolacija IgG iz plazme metodom afinitetne kromatografije (UPLC)
  - Analiza postupkom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute spektrometrijom mase (LC-MS)
- Statističke metode
  - Deskriptivna statistika i prikladna grafička obilježja
  - Provjera potencijala glikana kao prognostičkog biomarkera – statistički modeli
  - Testiranje hipoteze – prikladne neparametarske metode

# (Vrlo) preliminarni rezultati 😊

<b>TABLE 1.</b>	<b>NIH</b>		<b>CHC ZAGREB</b>	
<b>PATIENTS</b>	251		30	
<b>GENDER</b>				
male	145	57,77%	15	50%
female	106	42,23%	15	50%
<b>AGE</b>				
range	5-71		9-60	
median	46		43	
<b>CGVHD ONSET</b>				
de novo	80	32%	9	29%
progressive	95	38%	11	35%
quiscent	75	30%	10	32%
<b>CGVHD CLASSIFICATION</b>				
classic	215	86%	25	81%
overlap	33	13%	5	16%
late acute	3	1%	0	0%
<b>GLOBAL NIH SCORE</b>				
mild	4	2%	3	10%
moderate	58	23%	13	42%
severe	189	75%	14	45%
<b>DISEASE ACTIVITY</b>				
active	126	86%	15	48%
inactive	21	14%	15	48%
<b>MOST INVOLVED ORGANS</b>				
skin	197	78%	17	55%
lung	196	78%	15	48%
eyes	193	77%	15	48%

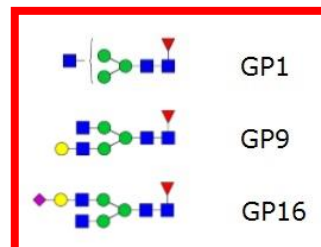
# (Vrlo) preliminarni rezultati 😊

- UPLC



# Hrvatski pacijenti: kontrole

- Smanjenje:
  - GP9 (% FA2[3]G1 / IgG glikan ukupno)
  - GP16 (% FA2G1S1 / IgG glikan ukupno)
- Povećanje:
  - GP1 (% FA1/ IgG glikan ukupno)



# Američka populacija

- GP9, GP16, GP1 : ocjena zahvaćenosti kože
- GP16: ukupna ocjena težine bolesti

# Daljnji planovi

- Dopršetak analize
- Longitudinalno istraživanje

# Hvala na pažnji!

