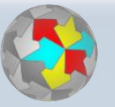


Análisis de la variabilidad genética de *KIR3DL2* en linfomas cutáneos de célula T



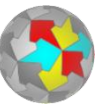
Natalia Gómez Lozano y Carlos Vilches (IPs), Servicio de Inmunología HUPHM.

Paloma Martín Acosta (co-investigadora), Servicio de Anatomía Patológica HUPHM.

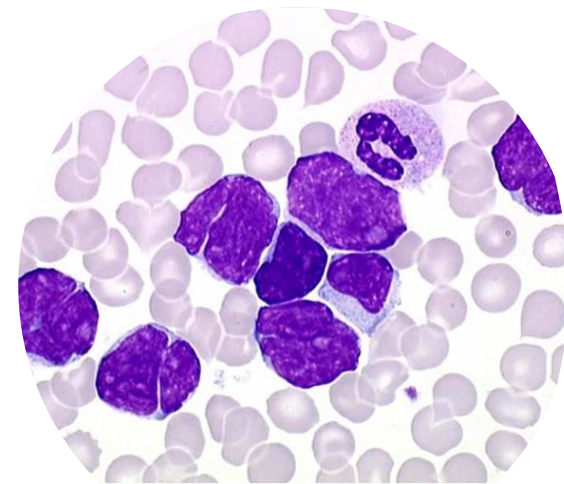
Belén Navarro Matilla (colaboradora clínica), Servicio de Hematología HUPHM.

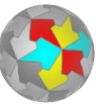
Irma Zapata Paz (colaboradora clínica), Servicio de Oncología Radioterápica HUPHM.

Adrián Santos López (investigador predoctoral) , IDIPHISA.



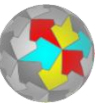
- Los LCCT son un grupo de linfomas poco frecuente caracterizado por células T neoplásicas que infiltran la piel.
- Comprende un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo diagnóstico puede ser complicado en los estadios iniciales.
- La Micosis Fungoide (MF) y el Síndrome de Sézary (SS) son dos de los subtipos más comunes de los LCCT: 50% y 5% respectivamente.
- SS y MF están estrechamente relacionados: la clínica de los estadios avanzados de MF (micosis fungoide transformada, MF-t) es muy similar a la del SS y aunque se consideran entidades clínicas distintas comparten características patológicas y moleculares:
 - Presencia de una población clonal de células T CD4+ en piel y sangre periférica.
 - Linfadenopatía generalizada.
 - Eritrodermia (afectación cutánea de al menos el 80-90 % de la superficie corporal).
 - Pérdida de marcador pan-T CD7.
 - Mutaciones en la vía de señalización del TCR.
 - Alteraciones cromosómicas complejas y alta tasa de inestabilidad genómica.





- Curso clínico agresivo con una mediana de supervivencia menor a 5 años en estadios avanzados con alta carga tumoral en sangre.
- La terapia actual raramente consigue respuestas mantenidas siendo el trasplante alogénico la única opción potencialmente curativa.
- Las mutaciones *driver* no se conocen: la baja tasa de incidencia y cohortes con pocos pacientes hacen complicado el estudio y la identificación de factores genéticos asociados a la enfermedad.





En 2001 se describió por primera vez que las células tumorales de pacientes con MF-t y SS expresan de manera aberrante el receptor p140/**KIR3DL2**. Este receptor se identificó en células tumorales de piel y sangre de pacientes con LCCT.

NEOPLASIA

CD4⁺ cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140–killer cell immunoglobulin-like receptor

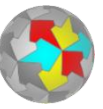
Martine Bagot, Alessandro Moretta, Simona Sivori, Roberto Biassoni, Claudia Cantoni, Cristina Bottino, Laurence Bousmell, and Armand Bensussan

Tumor cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) have the cell surface phenotype of mature T-helper lymphocytes, and it may be impossible to differentiate them from nonmalignant lymphocytes in skin and blood. Until now, no specific cell membrane marker of CTCL has been reported. In the current study, it is reported for the first time that CTCL cells express the

major histocompatibility complex class I binding p140–killer cell immunoglobulin-like receptor, which has been described on a minor subset of natural killer lymphocytes and on a marginal circulating CD8⁺ T lymphocyte subset. Interestingly, the molecular characterization of this KIR expressed by CTCL allowed us to isolate a novel allelic form of p140–KIR3DL, resulting in 4 amino

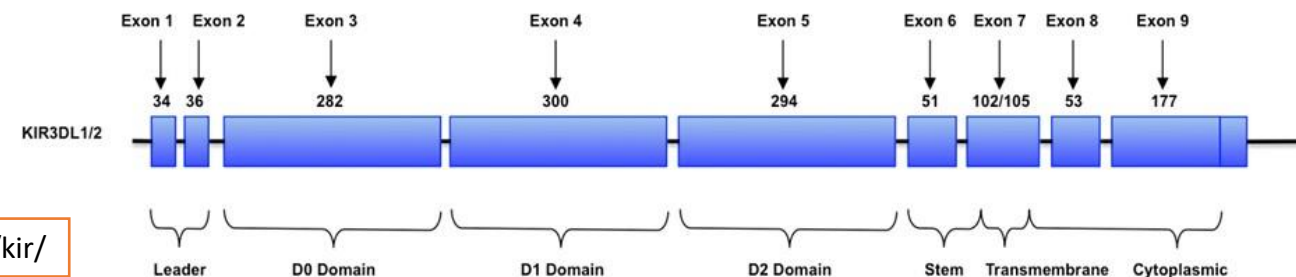
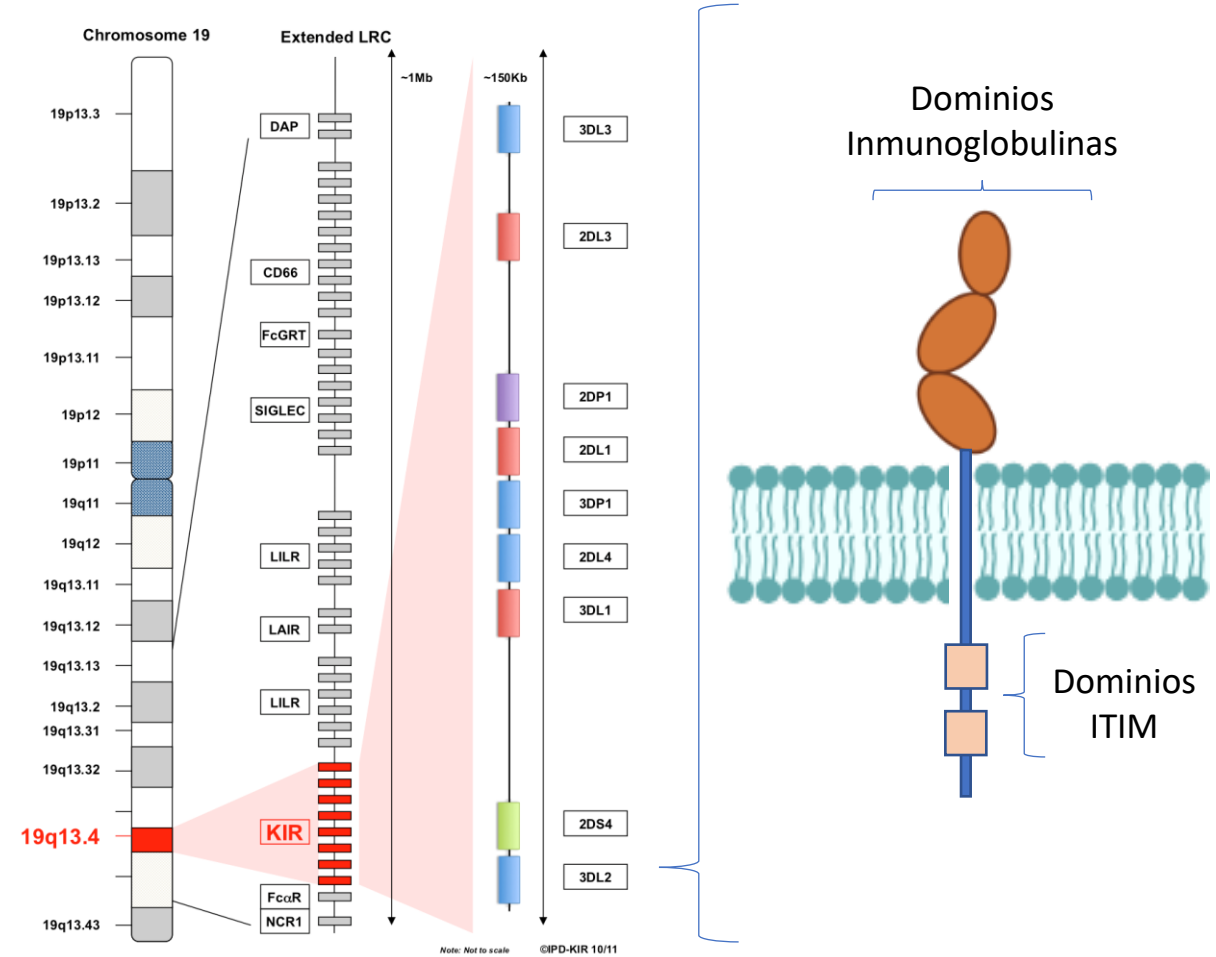
acid substitutions, 3 in the extracellular immunoglobulin-like domain of the protein and one in the cytoplasmic region. This finding is likely to be important both for the pathophysiology and for the clinical treatment of patients with CTCL. (Blood. 2001;97:1388-1391)

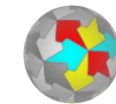
© 2001 by The American Society of Hematology



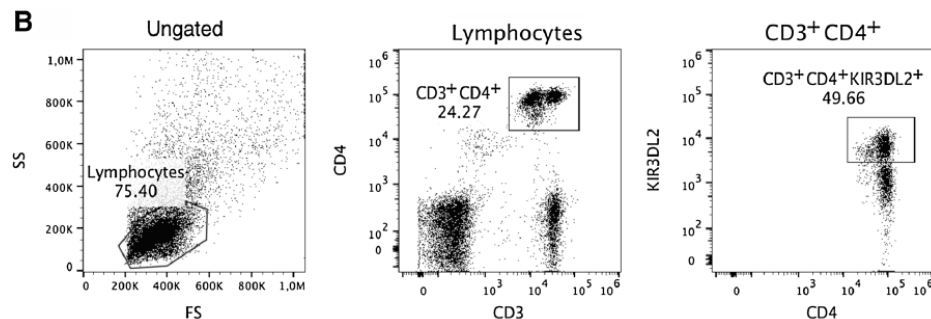
- Receptor transmembrana de la familia de los receptores KIR (receptores de muerte celular de tipo inmunoglobulina).
- Localizado en el brazo largo del cromosoma 19.
- Se expresa en la membrana como un homodímero. Tiene tres dominios de tipo inmunoglobulina y una cola citoplasmática larga con 2 dominios ITIM.
- Típicamente expresado células asesinas naturales (Natural Killer cells, células NK) y en una población minoritaria de células T CD8+.
- Gen ubicuo, muy polimórfico y presenta secuencias reguladoras únicas.
- Es el receptor KIR más largo.
- Sus ligandos conocidos son las moléculas de HLA de clase I, HLA-A3 y HLA-A11 y la cadena pesada libre de HLA-B27.
- Es capaz de unir motivos CpG del ADN en los endosomas para la activación vía Toll-like receptor 9 (TLR9).

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>



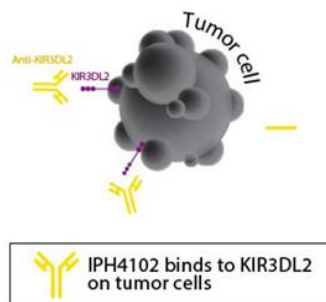


- Se ha propuesto como un marcador más sensible que los criterios biológicos utilizados en la práctica clínica, tanto para diagnóstico, el pronóstico y la evaluación de la eficacia del tratamiento en el SS, mediante citometría de flujo.



Hurabielle C et al. Clin Cancer Res. 2017 Jul 15;23(14):3619-3627. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3185. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28119365.

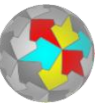
- KIR3DL2 se ha utilizado como **diana terapéutica** en LCCT en un ensayo clínico de fase I mediante el uso del anticuerpo monoclonal IPH4102. IPH4102 parece ser seguro y tener una actividad clínica beneficiosa (actualmente ensayo clínico de fase II).



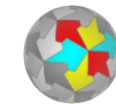
¿Implicación de KIR3DL2 en etiopatogenia?

¿Mecanismos implicados en la expresión aberrante tumoral?

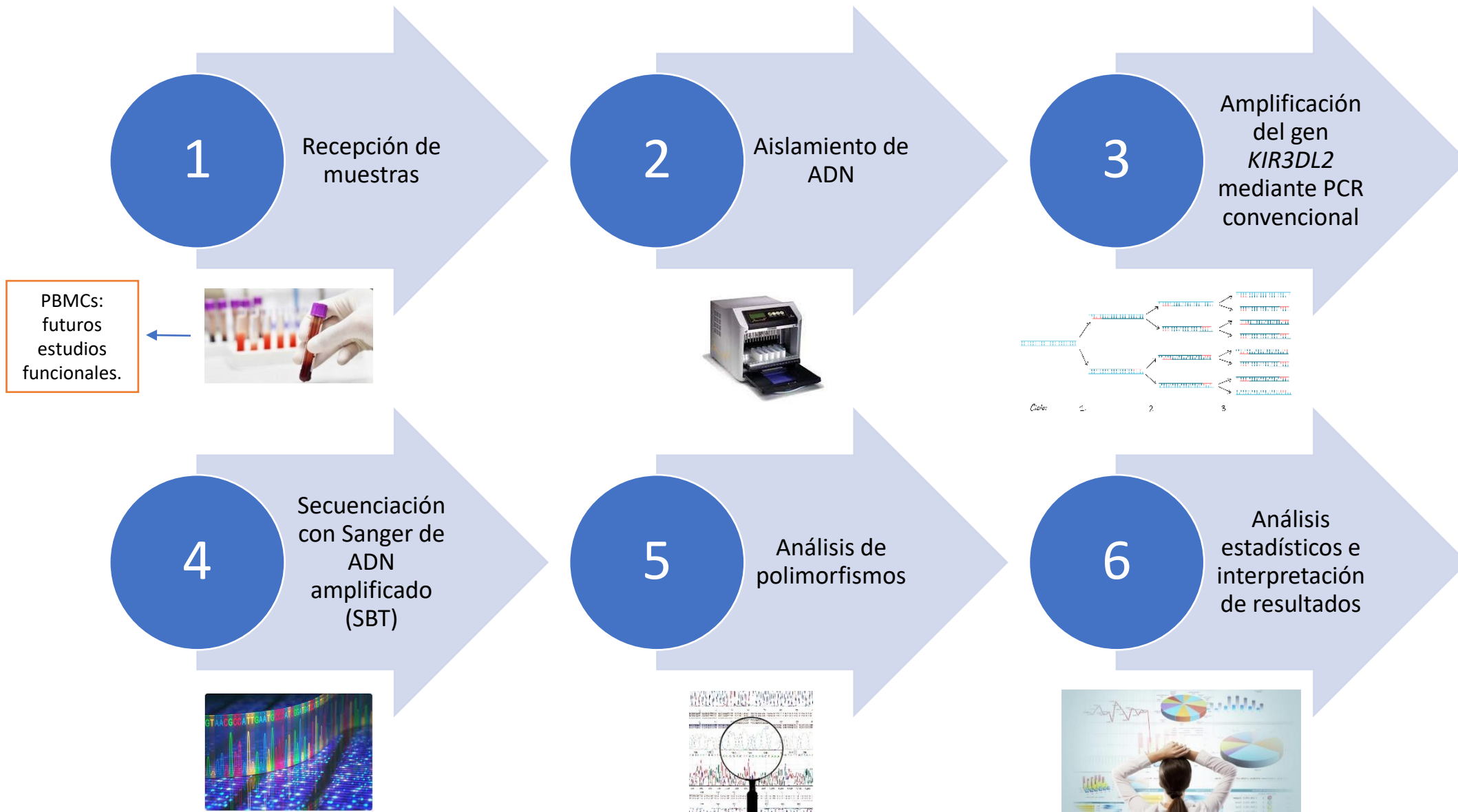


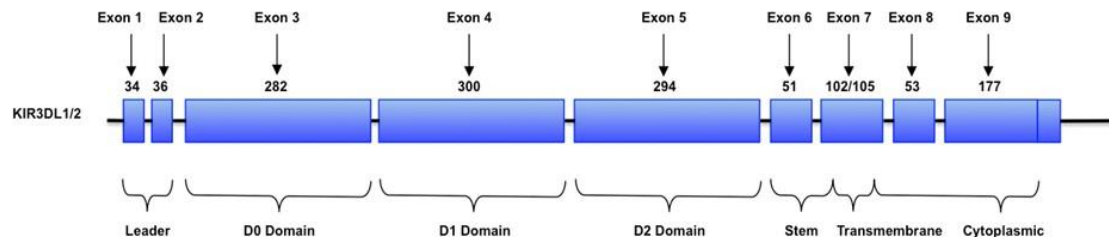
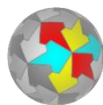


“Estudiar la variabilidad genética de *KIR3DL2* y su posible implicación en el SS y MF-t”.



Material y Métodos: Flujo de trabajo

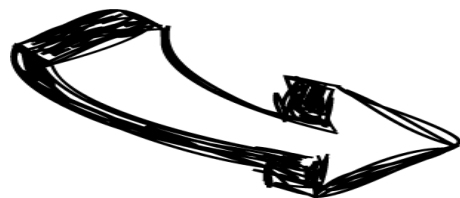




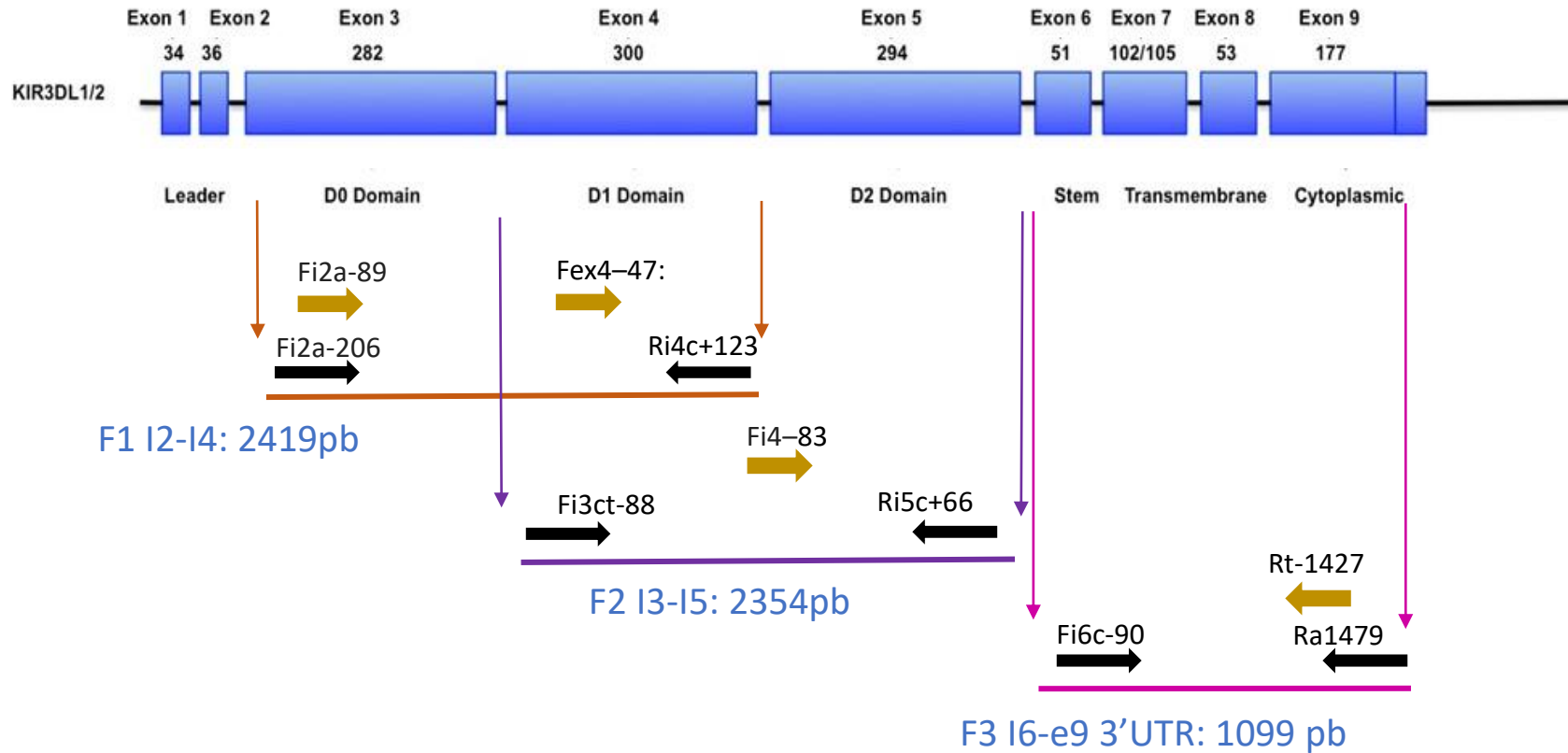
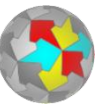
Para estudiar la variabilidad genética de *KIR3DL2* elaboramos un sistema de tipado basado en una serie de polimorfismos del gen *KIR3DL2*.

Los polimorfismos están presentes en los Exones 3, 4, 5 y 9 (E3, E4, E5 y E9).

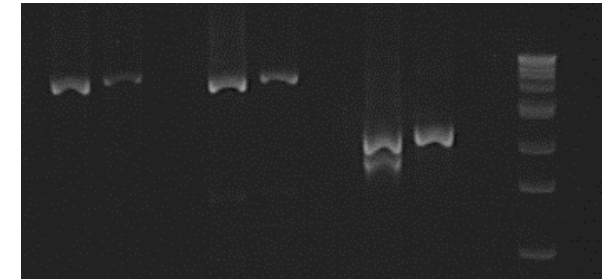
Una vez que hemos determinado que polimorfismos presenta cada una de las muestras podemos determinar que alelo/s de *KIR3DL2* tiene cada paciente.



3DL2 allele	Freq Eur (%)	E3	E4	E5	E9				
*0010101	51-37.4		456C>T						
*0010102									
*00102									
*0010301									
*0010302									
*00104	321 G>A								
*0020101	41.3-33		474 G>T						
*0020102									
*0020103									
*0020104									
*0020105									
*0020106									
*00202									
*00203									
*00204						474 G>T 477 G>T			
*00301						18.2-10.4	337 C>G		
*00302									
*00303									
*00304	337 C>G	546 C>T							
*004	0	117 G>C 118 C>G 337 C>G	497 G>A	682 G>C 684 C>G 755 T>C					
*00501	20.9-14.8	337 C>G	497 G>A						
*006	1.3-0	322 G>A							
*0070101	46.2-32	322 G>A			1190 C>T				
*0070102									
*0070103									
*00703						396 C>G			
*007 (otros alelos)	cambios en distintos exones								
*008	7-5.5	122 G>A	394 C>A		1265 T>C				
*00901	15-11		456C>T	893 G>A					
*00902									
*00903									
*01001	11-5				1190 C>T				
*01002									
*01003									
*011	12-4.4	337 C>G			1190 C>T				
*012	1.3-0	122 G>A	497 G>A						

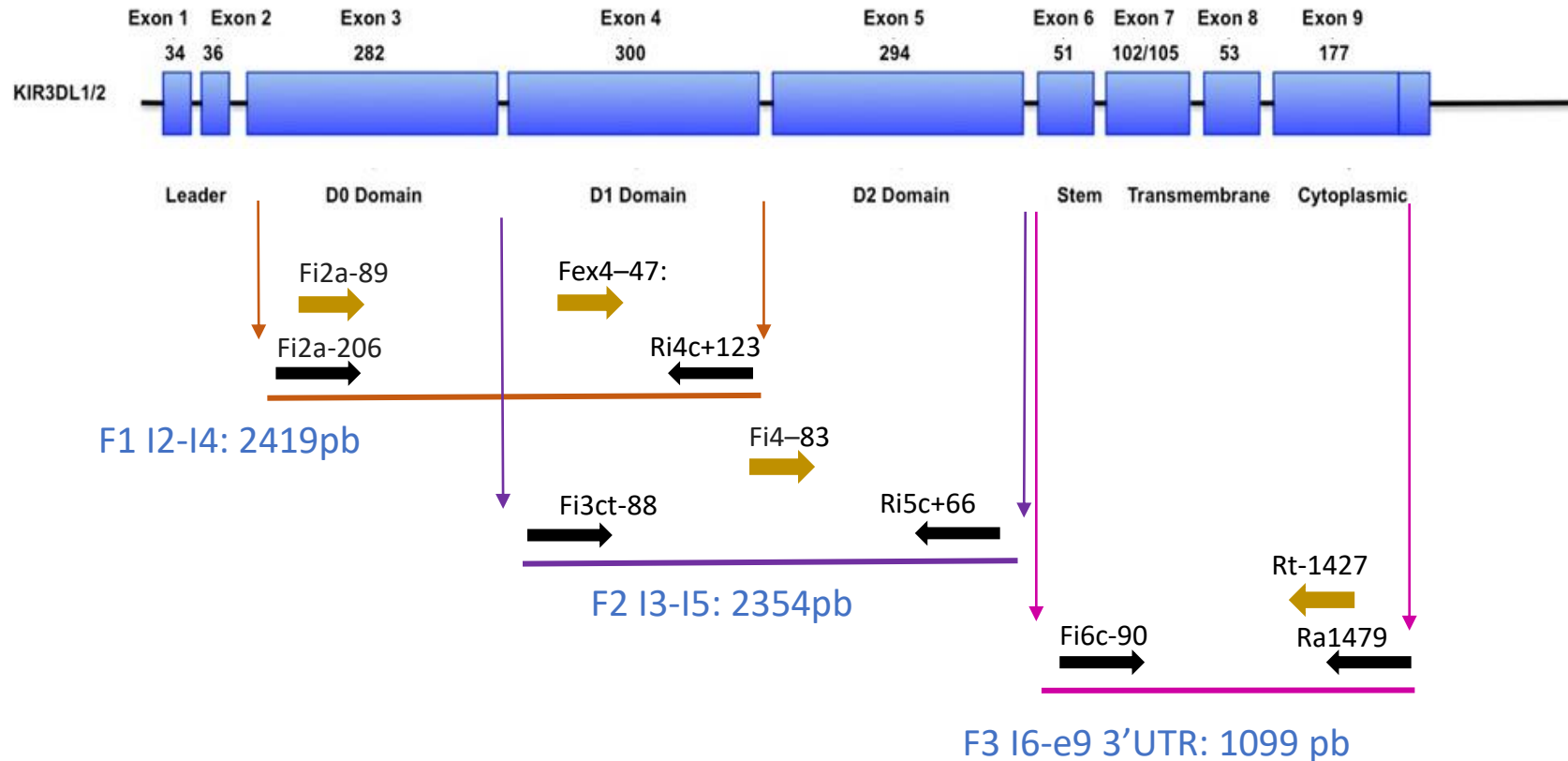
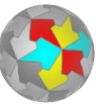


F1: 2419pb F2: 2354pb F3: 1099pb
 M1 M2 H₂O M1 M2 H₂O M1 M2 H₂O



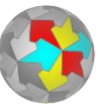
- La identificación de los polimorfismos de *KIR3DL2* se llevó a cabo mediante la amplificación de tres fragmentos del gen (F1, F2 y F3) a través de 3 reacciones de PCR convencionales.
- Se diseñaron *primers* específicos del gen *KIR3DL2* (alto nivel de homología con el resto de genes de la familia KIR).

* El primer Fi6c-90 de F3 también amplifica *KIR3DL1**05901, no detectado en Europa y minimamente Africa y China. *KIR3DL2**05901 es un híbrido de *KIR3DL2* y *KIR3DL1*.



- Posteriormente se realiza el análisis de SNPs de la región codificante por SBT con el uso de *primers* internos.
- La especificidad de los primers de secuenciación es la siguiente:
 - **Fi2-89:** *2DL4*, *-5A*, *-5B*, *3DL1/L3/S1*, *-3 3DL2*, *3DP1*.
 - **Fex4-47:** *2DL1*, *2DS1/S3-S5*, *3DL1/S1*, *3DL2*.
 - **Fi4-83:** *3DS1*, *3DL2*, *3DL1*, *2DS3*, *2DS2*, *2DS1*, *2DP1*, *2DL5B*, *2DL5A*, *2DL3*, *2DL2*.
 - **Rt1427:** *3DL1 (05901)*, *3DL2*.

Resultados: tipaje de *KIR3DL2*

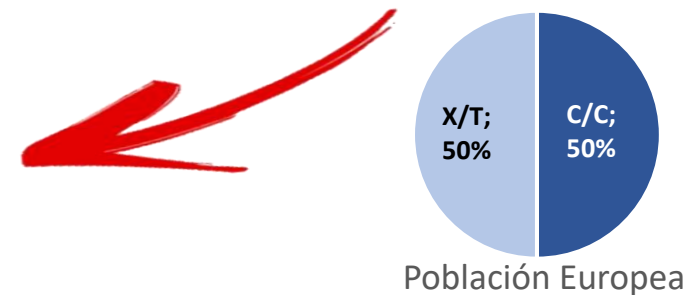


En la siguiente tabla se representa si los polimorfismos seleccionados de los exones 3, 4, 5 y 9 están presentes en cada una de las muestras. Se especifica si el polimorfismo está en homocigosis o en heterocigosis. Se realiza la tipificación de cada una de las muestras. En ocasiones, no se puede diferenciar si una muestra presenta la combinación de los alelos *007, *001 o *006, *010. Como secuencia de referencia se utiliza el alelo *KIR3DL2**0010101.

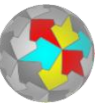
MUESTRA	POLIMORFISMO																			Alelos			
	EXON 3 (Fi2a-89)					EXON 4 (Fex4-47)					EXO 5 (Fi4-83)				EXON 9 (Rt-1427)								
Código	117 G>C	118 C>G	122 G>A	303 C>T	321 G>A	322 G>A	337 C>G	394 C>A	396 C>G	456C>T	474 G>T	477 G>T	497 G>A	546 C>T	682 G>C	684 C>G	755 T>C	893 G>A	1190 C>T	1265 T>C			
Muestra1						G/A	C/G						G/A							C/T		*007,*00501	
Muestra2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	C/T		X
Muestra3			X			G/A					G/T				X	X	X	X		C/T		*007,*002	
Muestra4								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		C/T		*010 y ¿?	
Muestra5						G/A														C/T		*007,*001/*006,*010	
Muestra6																						*001,*001	
Muestra7						G/A				C/T								G/A		C/T		*007,*009	
Muestra8						G/A														C/T		*007,*001/*006,*010	
Muestra9											TT											*002	
Muestra10						AA														TT		*007	
Muestra11											G/T											*001,*002	
Muestra12						G/A					G/T									C/T		*007,*002	
Muestra13						G/A					G/T									C/T		*007,*002	

Tabla 1. Determinación alélica de *KIR3DL2* en pacientes de SS y MF-t.

Detectamos que el polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) presente en el exón 9 aparece con una frecuencia elevada en comparación con los datos publicados en población de ascendencia europea.

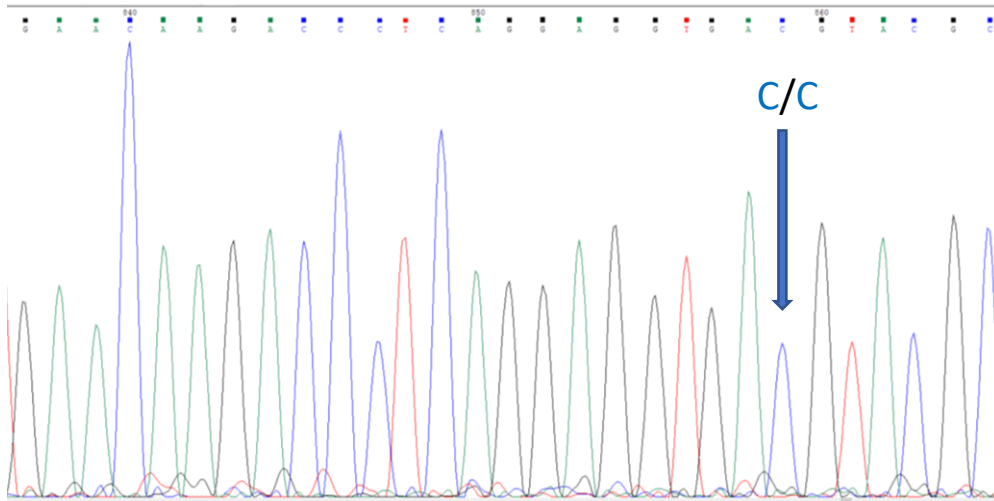


Resultados: tipaje de *KIR3DL2*

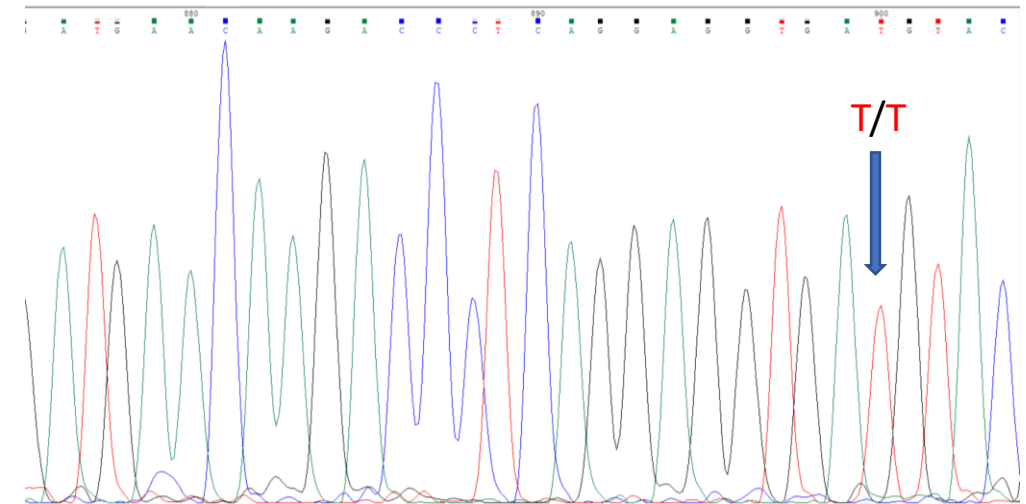


Ejemplos de análisis del polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) en muestras de LCCT (SS y MF-t):

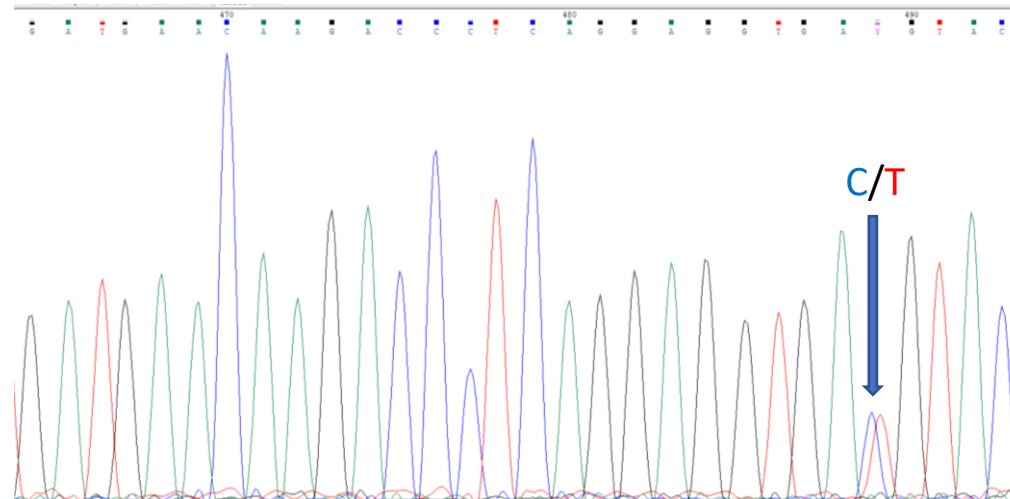
Muestra6

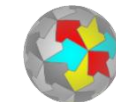


Muestra10



Muestra8





1) Elaboramos una tabla de frecuencias genotípicas del polimorfismo rs3745902 en nuestra serie de pacientes, en la serie control y en población de ascendencia europea (www.ensembl.org).

N	C/C % (n)	C/T % (n)	T/T % (n)
LCCT (13)	23,1 (3)	69,2 (9)	7,7 (1)
Serie Control (42)	54,8 (23)	42,9 (18)	2,4 (1)
Población Europea (545)	50,3 (253)	39,4 (198)	10,3 (52)

Tabla 2. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs3745902 SNP en pacientes de LCCT, en la serie control y en población de ascendencia europea.

2) Realizamos un análisis estadístico (prueba χ^2 de Pearson) comparando la frecuencia de portar una T en la posición 1190 de *KIR3DL2* en las 3 poblaciones estudiadas.

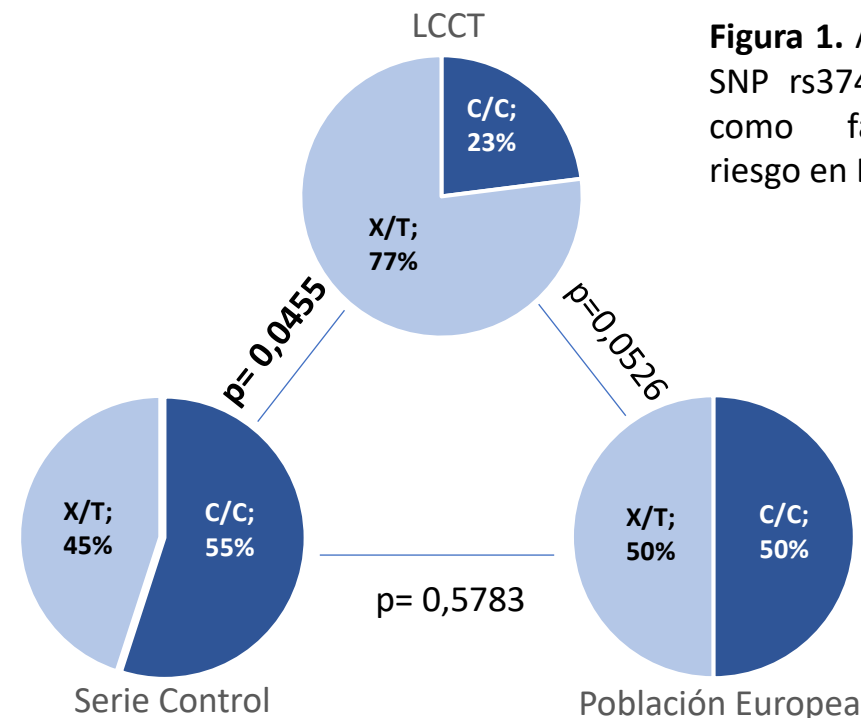
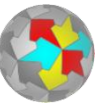


Figura 1. Análisis del SNP rs3745902 SNP como factor de riesgo en LCCT.

- Las frecuencias genotípicas del polimorfismo 1190 C>T de *KIR3DL2* de la serie control son las descritas en poblaciones de ascendencia europea (Proyecto 1000 Genomes).
- Los pacientes con LCCT muestran un aumento de frecuencia de genotipos con al menos una copia del polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) de *KIR3DL2* (es decir, 1190T homocigotos y heterocigotos) en comparación con la serie control (77% vs 45%, $p=0,0455$).



Pese a que el polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) es exclusivo de *KIR3DL2*, para asegurarnos de que realmente estamos amplificando *KIR3DL2* y no otro gen de la misma familia, realizamos un alineamiento de todos los genes KIR y sus alelos principales. Seleccionamos 3 SNPs que son específicos de *KIR3DL2* y de unos alelos minoritarios de *KIR3DL1*. Comprobamos que efectivamente todas nuestras muestras presentan dichos polimorfismos (datos nos mostrados).

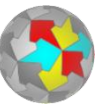
1190 C>T (rs3745902 SNP)

1) G en posición 1191, exclusiva de *KIR3DL2* y de *KIR3DL1**0040, *00402, *05901, *05902, *060, *061, *064, *065 y *098.

2) T en posición 1220, exclusiva de *KIR3DL2* y de *KIR3DL1**05901, *05902, *060, *061, *064, *065 y *098.

3) G en posición 1235, exclusiva de *KIR3DL2* y de *KIR3DL1**05901, *05902, *061, *064, *065 y *098.

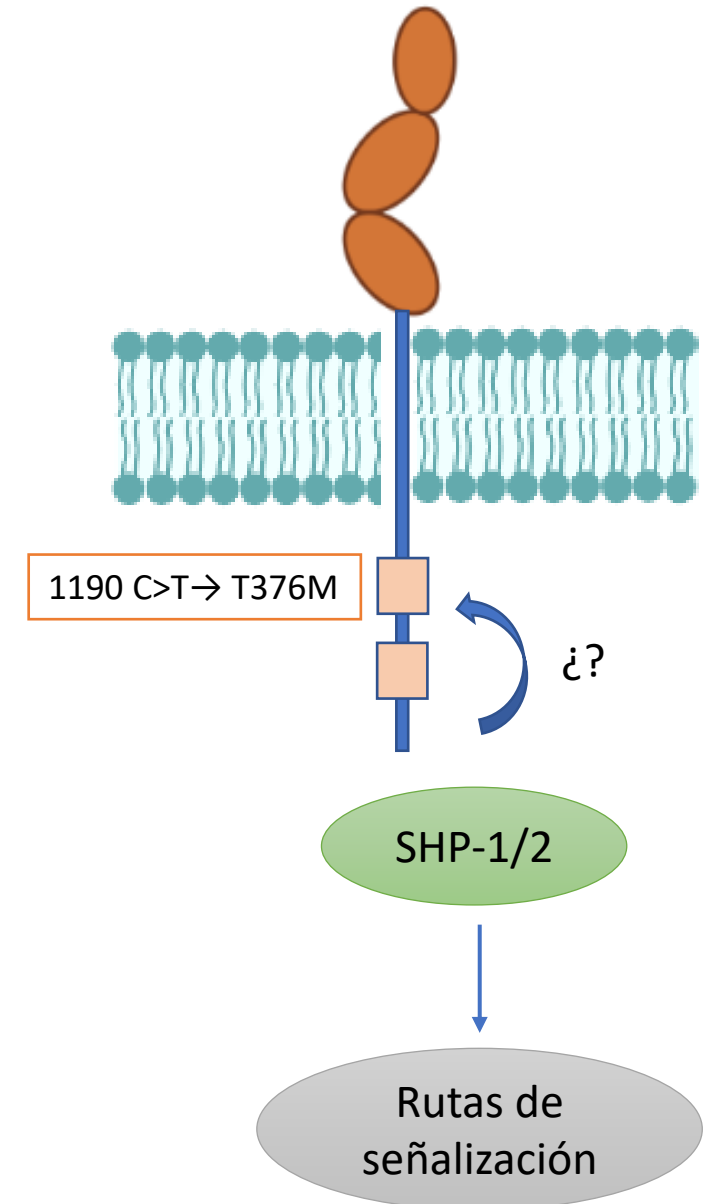
IPD:KIR00989	KIR3DL1*118	1335	bp	CA	G	G
IPD:KIR01060	KIR3DL1*1190101	1335	bp	CA	G	G
IPD:KIR01086	KIR3DL1*1190102	1335	bp	CA	G	G
IPD:KIR00065	KIR3DL2*0010101	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00459	KIR3DL2*0010102	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00280	KIR3DL2*00102	1298	bp	CG	G	G
IPD:KIR00317	KIR3DL2*0010301	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00462	KIR3DL2*0010302	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00541	KIR3DL2*00104	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00796	KIR3DL2*00105	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00789	KIR3DL2*00106	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00832	KIR3DL2*00107	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00937	KIR3DL2*00109	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00066	KIR3DL2*0020101	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00461	KIR3DL2*0020102	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00463	KIR3DL2*0020103	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00464	KIR3DL2*0020104	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00465	KIR3DL2*0020105	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00640	KIR3DL2*0020106	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00460	KIR3DL2*00202	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00770	KIR3DL2*00203	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00847	KIR3DL2*00204	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00067	KIR3DL2*00301	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00287	KIR3DL2*00302	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00774	KIR3DL2*00303	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00783	KIR3DL2*00304	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00068	KIR3DL2*004	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00069	KIR3DL2*00501	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00600	KIR3DL2*00502	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00070	KIR3DL2*00601	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00930	KIR3DL2*00602	1368	bp	CG	G	G
IPD:KIR00071	KIR3DL2*0070101	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00295	KIR3DL2*0070102	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00458	KIR3DL2*0070103	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00543	KIR3DL2*00702	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00778	KIR3DL2*00703	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00808	KIR3DL2*00704	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00823	KIR3DL2*00705	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00841	KIR3DL2*00706	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00844	KIR3DL2*00707	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00915	KIR3DL2*00708	1368	bp	TG	G	G
IPD:KIR00927	KIR3DL2*00709	1368	bp	TG	G	G

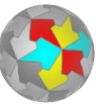


- El cambio de una Citosina por una Timina en la posición 1190 tiene como consecuencia el cambio de una Treonina (T) por una Metionina (M) en la larga cola citoplásmica del receptor (T376M).
- En teoría, este cambio no predice cambios importantes en la estructura del receptor, aunque las propiedades físico-químicas de estos 2 aminoácidos (aa) difieren (T es polar y M es hidrófoba).
- T376 se encuentra en la posición -1 con respecto al residuo tirosina (Y) del ITIM de KIR3DL2 y por tanto puede que sea crítico dentro del mismo.

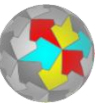
Motivo ITIM: VTYAQL

- Se ha descrito que la sustitución del aa -2 respecto a la tirosina del ITIM tiene un papel en el control de la capacidad de interactuar con SHP-1/2.
- T376M no se ha implicado directamente en la función ITIM, pero podría alterar la función inhibidora del receptor.





“En nuestro estudio el polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) del dominio ITIM de KIR3DL2 es un factor genético de riesgo asociado al desarrollo de SS / MF-t”.

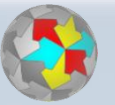


“Aumentar el tamaño muestral de la serie de pacientes LCCT y de controles sanos, para el estudio de la variabilidad genética de *KIR3DL2*”.

“Realizar análisis estadísticos de frecuencias alélicas y genotípicas de *KIR3DL2*”.

“Realizar estudios funcionales para comprobar la posible implicación del polimorfismo 1190 C>T (rs3745902 SNP) del dominio ITIM de *KIR3DL2* en estas patologías”.





Grupo Investigador

Natalia Gómez Lozano y Carlos Vilches (IPs), Servicio de Inmunología HUPHM.

Paloma Martín Acosta (co-investigadora), Servicio de Anatomía Patológica HUPHM.

Belén Navarro Matilla (colaboradora clínica), Servicio de Hematología HUPHM.

Irma Zapata Paz (colaboradora clínica), Servicio de Oncología Radioterápica HUPHM.

Unidad de Secuenciación de ADN y Biología Molecular (IDIPHISA).

Elvira Ramil

Belén Pérez

A soccer ball with a colorful pattern of red, yellow, and cyan panels. The ball is centered in the image and has a soft glow around it. The text "¡MUCHAS GRACIAS!" is overlaid on the ball in a bold, blue, sans-serif font.

¡MUCHAS GRACIAS!