



## Genetica en alloimmunisatie bij Sikkelcelziekte

Sanne M. Meinderts, Jorn Gerritsma, Joep W.R. Sins, Martin de Boer, Karin van Leeuwen, Bart J. Biemond, Anita W. Rijnveld, Jean-Louis H. Kerkhoffs, Anoosha Habibi, Robin van Bruggen, Taco W. Kuijpers, Ellen van der Schoot, France Pirenne, Karin Fijnvandraat, Michael W. Tanck and Timo K. van den Berg

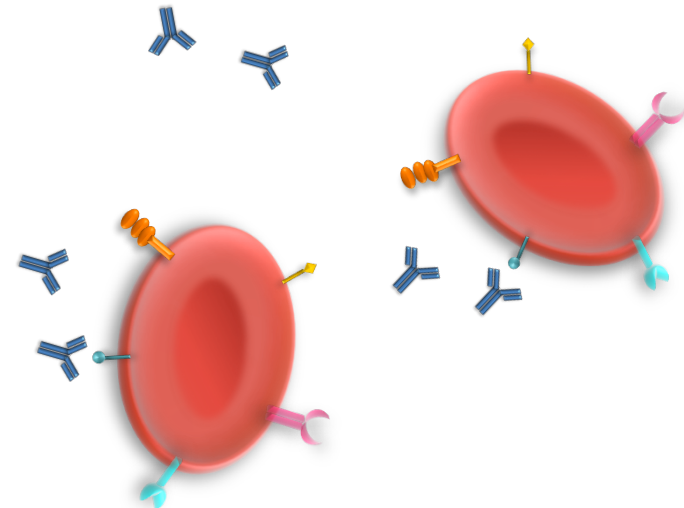
## Alloïmmunisatie en sikkelcelanemie (SCA)

- Symtomen: anemie, episoden van pijnlijke botcrisen en hoge kans op infarcten en infecties
- Belangrijke behandelmethode: bloedtransfusie
- Risico van behandeling: mismatch van minor bloedgroepen → alloïmmunisatie
- SCA patienten hebben een verhoogd risico op alloïmmunisatie



## Profylactisch matchen

- Overwegingen:
  - De meeste SCA patienten vormen geen allo-antistoffen
  - Het aanbieden van antigeen-negatieve units is kostbaar en niet altijd mogelijk
- Er is een noodzaak voor een screeningstest die patienten weet te identificeren met een risico op alloimmunisatie.

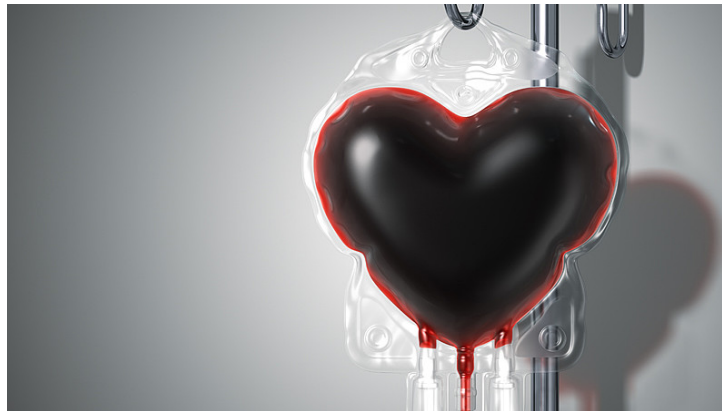


## Genetische markers for alloimmunisatie

- Beschermende factor in: FCGR2C
- Risicofactoren gevonden in: HLA types, TRIM21, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , CD81
- Studiefocus: Toll-like receptoren (TLR) en genen betrokken bij de TLR-pathway.
  - Er zijn associaties gevonden tussen TLR genvarianties en verscheidene autoimmuunziekten
  - In muizen: stimulatie van bepaalde TLRs leidt tot alloimmunisatie

## Doel van deze studie

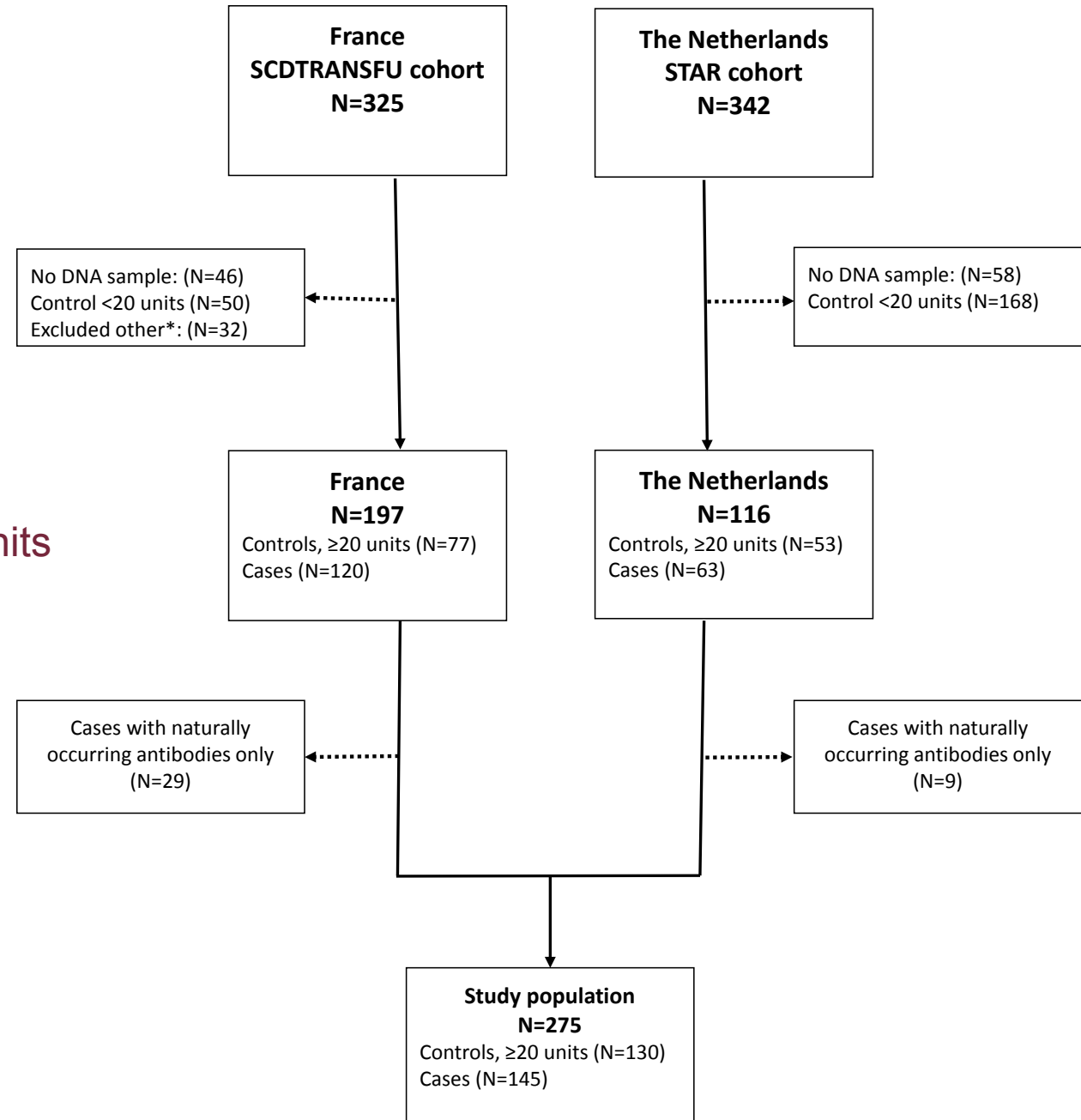
- Onderzoeken of er associaties tussen RBC alloimmunisatie en genvarianties in de TLR pathway bestaan in een cohort van SCA patiënten
- Daarnaast is er onderzoek gedaan naar genen die in met andere antilichaam-gemedieerde aandoeningen geassocieerd zijn



# Cohort

## Case-control studie

- Cases: allo-antilichaam aanwezig
- Controls: geen alloimmunisatie,  $\geq 20$  RBC units

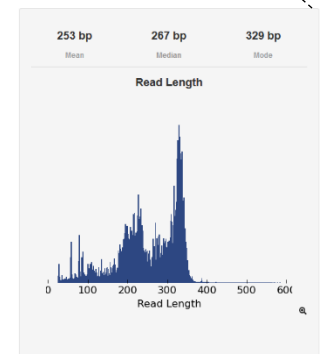
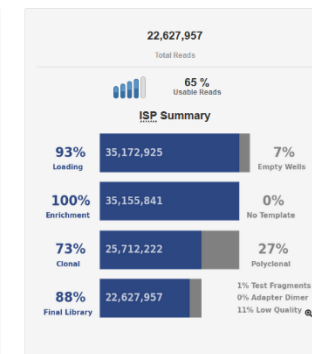
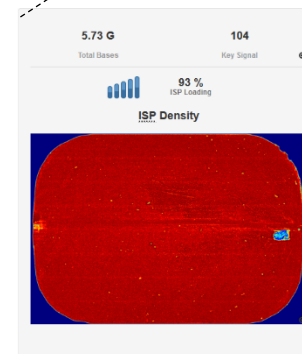


## Methode – Statistische analyse

- Primaire analyse
  - Cases vs. controls
- Logistische regressieanalyse
- Multiple testing
  - Bonferroni correctie
  - Linkage disequilibrium → Formule Li & Ji (2005)
- Secondaire analyse
  - Identificatie van onafhankelijke associaties per chromosoom  
→ multiële regressieanalyse met backward selection

## Genotypering

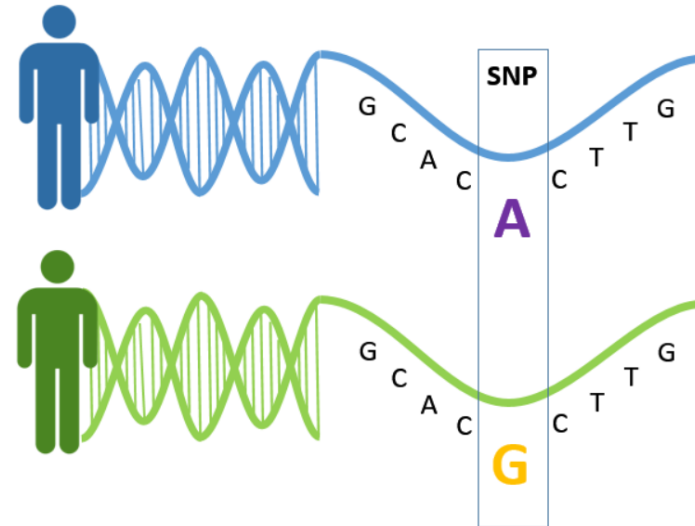
- Next generation sequencing: IonTorrent
- 850 SNPs geselecteerd voor array
- Primers design 200 bps up- and downstream van target





## Methode

- Kwaliteitscheck – patient
  - Call rate >95%
  - Identity by state
  - Heterozygosity
  - Alle 275 patienten voldoen aan criteria
- Kwaliteitscheck – SNP
  - Call rate >95%
  - Minor allele frequency >1%
  - 690 van 850 SNPs voldoen aan criteria

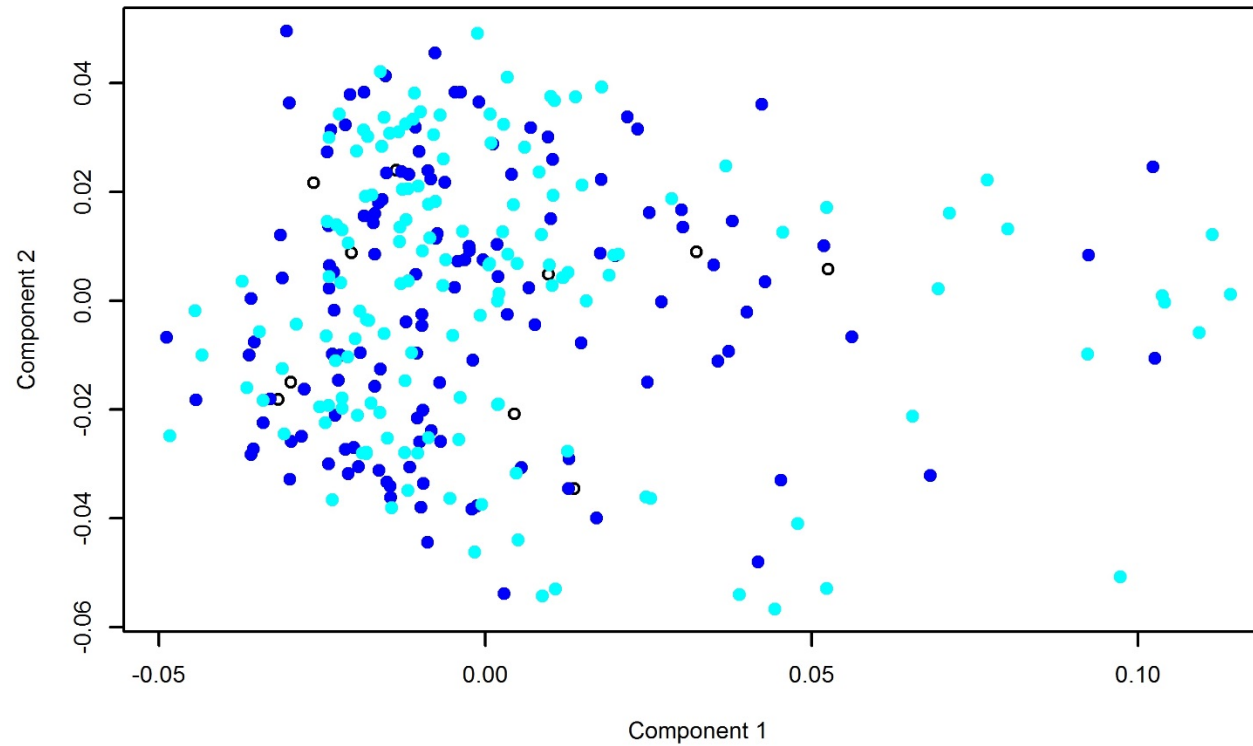


## Baseline characteristics

<b>N (%) or Median (IQR)</b>	<b>Alloantibody + (n=145)</b>	<b>Alloantibody - (n=130)</b>
<b>Age at last follow-up in years</b>	33 (27-44)	31 (25-39)
<b>Female sex</b>	91 (63)	64 (49)
<b>Hemoglobin genotype</b>		
<b>HbSS/HbS<math>\beta</math><sup>0</sup></b>	132 (91)	125 (96)
<b>HbSC/HbS<math>\beta</math><sup>+</sup></b>	13 (9)	5 (4)
<b>Ethnicity*</b>		
<b>Africa</b>	88 (62)	83 (64)
<b>Latin America</b>	48 (34)	42 (33)
<b>Asia</b>	2 (1)	1 (1)
<b>Other</b>	4 (3)	2 (2)
<b>Cumulative transfusion exposure units (total or until 1st antibody formation)</b>	10 (5-29)	127 (47-248)

\*Ethnicity was unknown in 5 patients

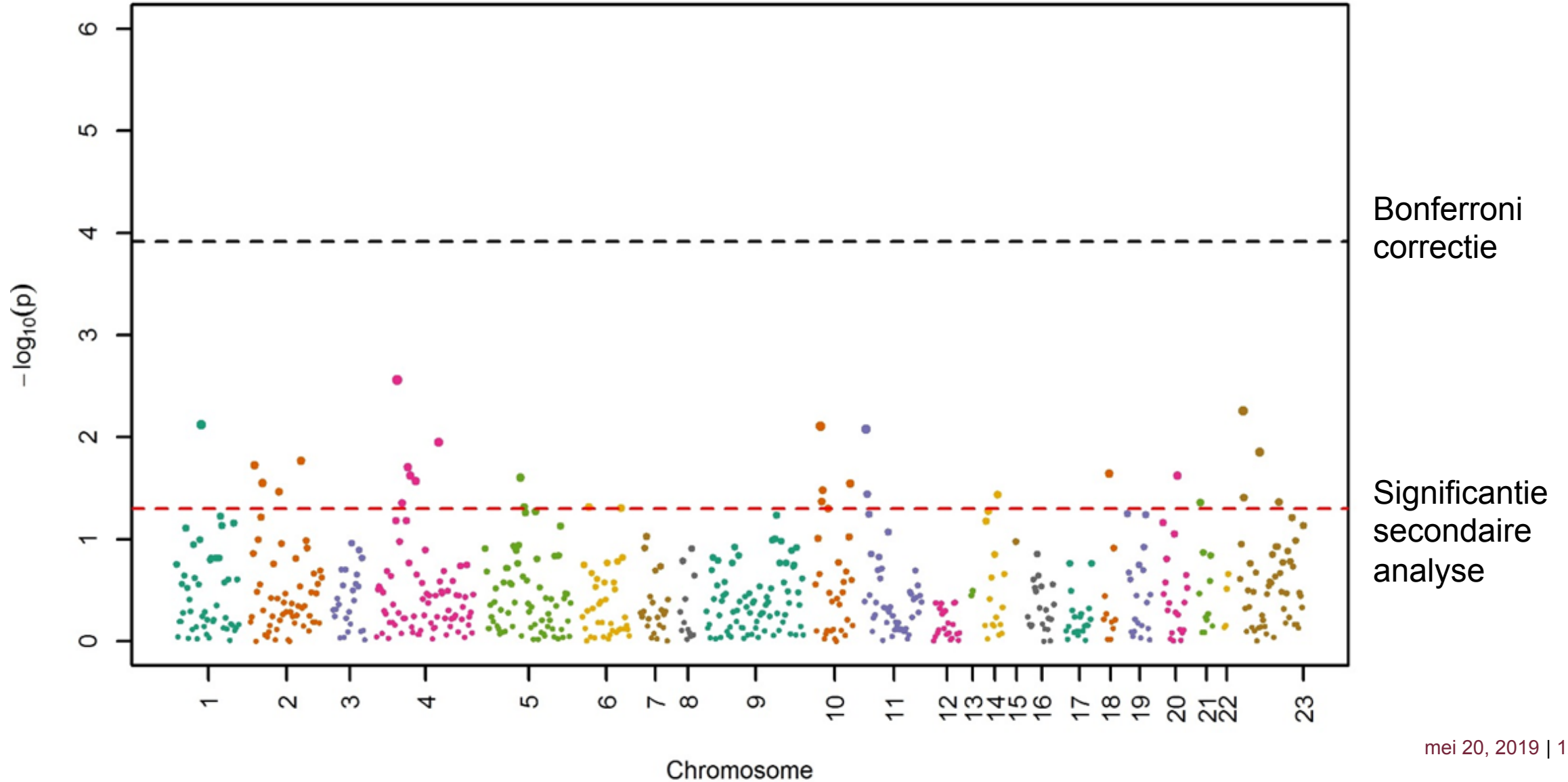
## Genetic heterogeneity tests



- Test ook uitgevoerd voor gender en zeer immunogenen antistoffen



# Sanquin Primaire analysis

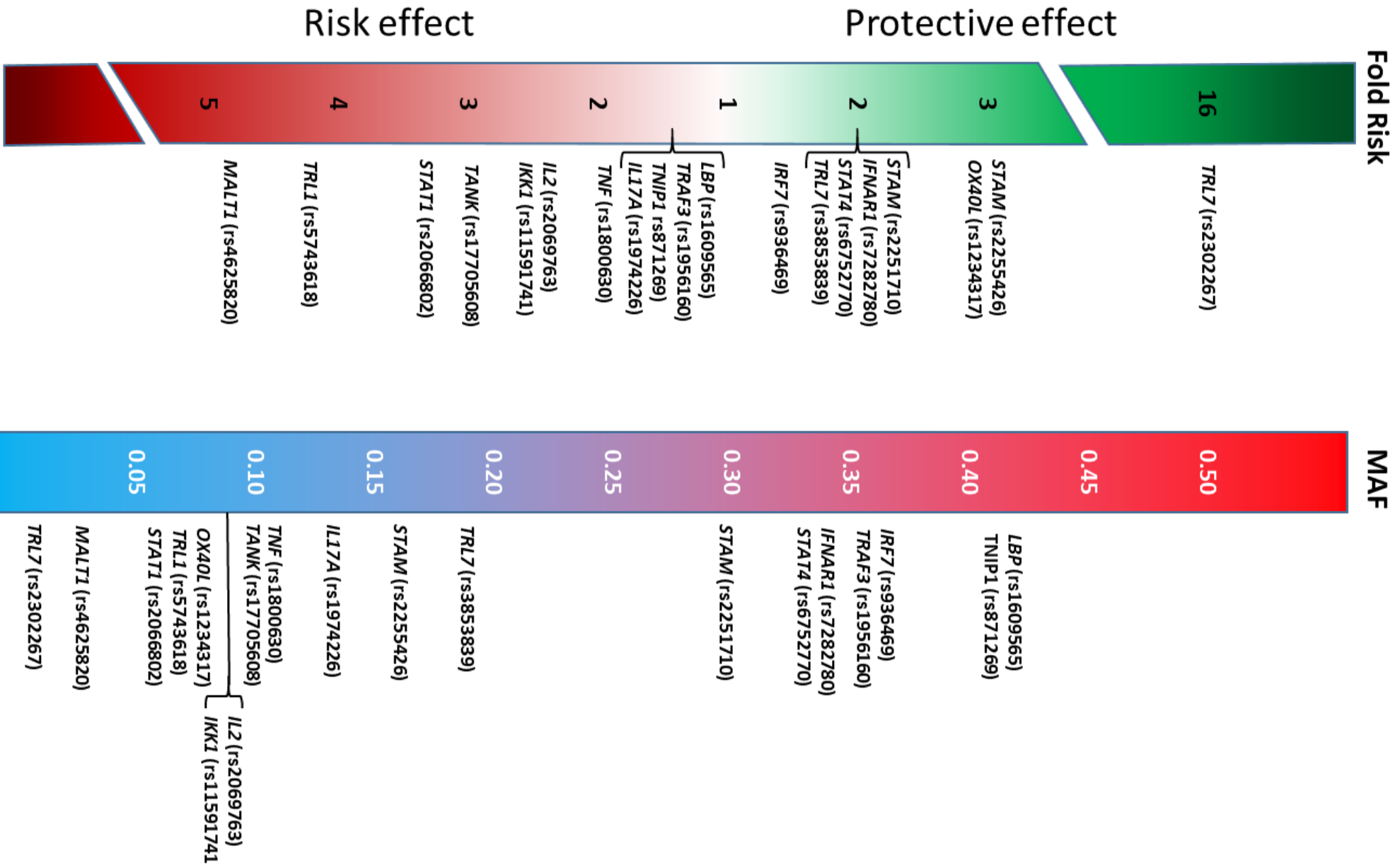


## Resultaten

- 29 SNPs p-value  $<0,05$ , verspreid over 12 chromosomen
- Multiple regression analysis met backward selection resulteert in 19 onafhankelijke SNPs

# Independent moderate associations

SNP ID	Chromosome	Gene	OR	LL95	UL95	P-value	MAF
<b>rs1234317</b>	<b>1</b>	<b>TNFSF4</b>	<b>0,35</b>	<b>0,14</b>	<b>0,88</b>	<b>0,0247</b>	<b>0,081</b>
<b>rs6752770</b>	<b>2</b>	<b>STAT4</b>	<b>0,51</b>	<b>0,31</b>	<b>0,83</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,342</b>
<b>rs1770560</b>							
<b>8</b>	<b>2</b>	<b>TANK</b>	<b>2,94</b>	<b>1,28</b>	<b>6,72</b>	<b>0,0107</b>	<b>0,102</b>
<b>rs2066802</b>	<b>2</b>	<b>STAT1</b>	<b>3,30</b>	<b>1,22</b>	<b>8,92</b>	<b>0,0189</b>	<b>0,061</b>
<b>rs2069763</b>	<b>4</b>	<b>IL2</b>	<b>2,61</b>	<b>1,09</b>	<b>6,20</b>	<b>0,0305</b>	<b>0,091</b>
<b>rs5743618</b>	<b>4</b>	<b>TLR1</b>	<b>4,24</b>	<b>1,31</b>	<b>13,75</b>	<b>0,0161</b>	<b>0,071</b>
<i>rs871269</i>	<i>5</i>	<i>TNIP1</i>	<i>1,51</i>	<i>0,94</i>	<i>2,42</i>	<i>0,0868</i>	<i>0,418</i>
<i>rs1974226</i>	<i>6</i>	<i>IL17A</i>	<i>1,55</i>	<i>0,81</i>	<i>2,97</i>	<i>0,1896</i>	<i>0,130</i>
<i>rs1800630</i>	<i>6</i>	<i>TNF</i>	<i>1,80</i>	<i>0,83</i>	<i>3,91</i>	<i>0,1395</i>	<i>0,111</i>
<b>rs2255426</b>	<b>10</b>	<b>STAM</b>	<b>0,33</b>	<b>0,16</b>	<b>0,68</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,165</b>
<b>rs2251710</b>	<b>10</b>	<b>STAM</b>	<b>0,45</b>	<b>0,27</b>	<b>0,76</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,291</b>
<b>rs1159174</b>							
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>IKK1</b>	<b>2,73</b>	<b>1,03</b>	<b>7,20</b>	<b>0,0428</b>	<b>0,089</b>
<i>rs936469</i>	<i>11</i>	<i>IRF7</i>	<i>0,68</i>	<i>0,43</i>	<i>1,09</i>	<i>0,1099</i>	<i>0,361</i>
<i>rs1956160</i>	<i>14</i>	<i>TRAF3</i>	<i>1,49</i>	<i>0,91</i>	<i>2,43</i>	<i>0,1128</i>	<i>0,357</i>
<b>rs4625820</b>	<b>18</b>	<b>MALT1</b>	<b>4,87</b>	<b>1,08</b>	<b>21,88</b>	<b>0,0390</b>	<b>0,029</b>
<i>rs1609565</i>	<i>20</i>	<i>LBP</i>	<i>1,47</i>	<i>0,92</i>	<i>2,33</i>	<i>0,1064</i>	<i>0,428</i>
<b>rs7282780</b>	<b>21</b>	<b>IFNAR1</b>	<b>0,46</b>	<b>0,28</b>	<b>0,77</b>	<b>0,0030</b>	<b>0,344</b>
<b>rs2302267</b>	<b>23</b>	<b>TLR7</b>	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>	<b>0,71</b>	<b>0,0264</b>	<b>0,014</b>
<b>rs3853839</b>	<b>23</b>	<b>TLR7</b>	<b>0,56</b>	<b>0,34</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0245</b>	<b>0,184</b>



## Discussie

- TLR 1 (rs5743618) → aminozuur verandering (Ser → Ile)
  - 4x verhoogd risico
  - TLR 1 functie: Herkenning van peptidoglycanen en lipoproteïnen<sup>1</sup>
  - SNP is voorheen geassocieerd met astma en allergie<sup>2,3</sup>
- STAM (rs2255426 en rs2251710) → varianten in intronen
  - 2-3 maal verlaagd risico
  - STAM functie: downstream functie van IL2 en GM-CSF receptor en  $\gamma$ c-Jak3 signaling<sup>4</sup>
  - SNP is niet eerder geassocieerd met antilichaam-gemedieerde aandoeningen
- Geen associatie gevonden voor TLR 2/3/4/9
  - Stimulatie van TLR 3/4/9 in muizen zorgt voor een verandering in de immuunrespons tegen RBCs<sup>5,6</sup>
  - Lage expressie van TLR2/3 is geassocieerd met non-responder status<sup>7</sup>

1. Means T et al, Cytokine & growth factor reviews, 2000  
2. Qi H et al, Tuberculosis, 2015  
3. Koponen et al. The Pediatric infectious disease journal, 2014  
4. Takeshite T et al. Immunity, 1997

5. Hendrickson J et al. Transfusion, 2006  
6. Hendrickson J et al. Transfusion, 2008  
7. Vingert B et al. Eur J of immunology, 2015

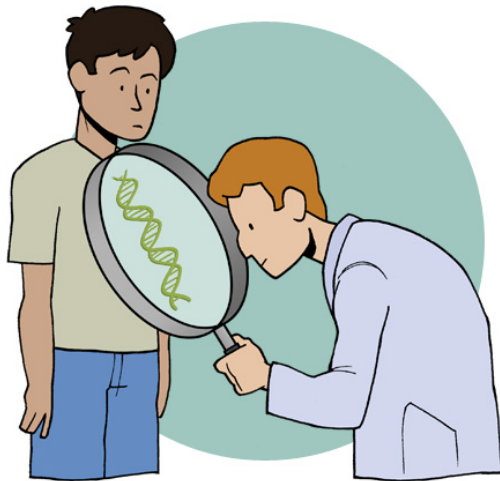


## Conclusie

- Geen sterke genetische associaties gevonden voor alloimmunisatie in dit SCA cohort
- 19 onafhankelijke milde associaties gevonden
- Validatie van SNPs in andere cohorten vereist
- Grotere cohorten zijn nodig

## Take home message

- Meer samenwerking tussen kennisinstellingen, ziekenhuizen en transfusie centra wereldwijd is nodig voor genetisch onderzoek in SCA



## Acknowledgements

### **Sanquin**

- Martin de Boer
- Karin van Leeuwen
- Ellen van der Schoot
- Taco Kuijpers
- Robin van Bruggen
- Timo van den Berg

### **Etablissement Français**

#### **Du Sang Céteil (EFS)**

- France Pirenne
- Sadaf Pakdaman

### **AMC**

- Jorn Gerritsma
- Michael Tanck
- Karin Fijnvandraat
- Joep Sins
- Bart Biemond

### **Erasmus MC**

- Anita Rijneveld
- Marjon Cnossen

### **Haga ziekenhuis**

- Jean-Louis Kerkhoffs
- Alfred van Meurs