



## Autoanticorpi anti-TRIB2 (Tribbles omologo 2)

### Indicazioni

- ▶ Narcolessia e cataplessia
- ▶ Uveite autoimmune

### vedi

- ▶ Autoanticorpi nelle neuropatie centrali (narcolessia)
- ▶ Informazioni laboratorio: Narkolepsie - Autoantikörper gegen Tribbles Homolog 2 (anti-TRIB2)

Autoanticorpi diretti contro Tribbles omologo 2 (anti-TRIB2) sono stati riscontrati la prima volta in pazienti affetti con uveite autoimmune attraverso la tecnica di phage display usando il cDNA ottenuto da due occhi umani (Zhang et al. 2005). Studi successivi rivelavano che anticorpi anti-TRIB2 compaiono anche in pazienti affetti da narcolessia e cataplessia (tabella 1).

### Antigene

Tribbles omologo 2 (MM 38,8 kDa; cromosoma 2p4.3) costituisce uno dei tre membri della famiglia tribbles nella superfamiglia delle proteina chinasi. La proteina tribbles omologo 2 modula numerosi processi fisiologici e patologici di traduzione del segnale. Ella fa parte dell'apoptosi e considerata un oncogeno potente, TRIB2 viene espressa di più in qualche sottogruppo di leucemie mieloidi acute umane (Hannon et al. 2012), acquisisce proprietà oncogeniche attraverso l'inattivazione del fattore di trascrizione C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ) e induce leucemie mielogeni in topi (Lohan und Keeshan 2013). In condizioni fisiologiche TRIB2 è espressa, tra l'altro, sui neuroni secernenti l'ipocretina/l'oressina (HCRT neuroni) nei nuclei dorsomediali, perifornicali e laterali dell'ipotalamo (Cvetkovic-Lopes et al. 2010). È il difetto della produzione dell'ormone di ipocretina, che dà origine a qualche sintomo clinico della narcolessia.

**Tabella 1** Prevalenza degli autoanticorpi anti-Tribbles omologo 2 in pazienti affetti da narcolessia e uveite autoimmune.

Malattie e controlli	n	anti-TRIB2 [%]	Autori
Narcolessia e cataplessia <sup>*1</sup>	119	14,3 <sup>*2</sup>	Cvetkovic-Lopes et al. 2010
Narcolessia senza cataplessia	24	12,5 <sup>*2</sup>	
Ipersonnia idiopatica	23	0,0	
Sclerosi multipla	16	0,0	
Altre neuropatie infiammatorie	9	11,1	
Soggetti controllo	42	4,8	
Narcolessia e cataplessia <sup>*1</sup>	90	21,1 <sup>*3</sup>	Kawashima et al. 2010
Narcolessia senza cataplessia	57	3,5	
Soggetti controllo	156	4,5	
Narcolessia e cataplessia <sup>*1</sup>	88	26,1 <sup>*3</sup>	Toyoda et al. 2010
Narcolessia senza cataplessia	18	5,6	
Ipersonnia idiopatica	11	0,0	
Soggetti controllo	87	0,0	
Uveite autoimmune	10	30,0	Zhang et al. 2005

**n** numeri di campioni  
<sup>\*1</sup> Pazienti HLA-DQB1\*0602 positivi  
<sup>\*2</sup> La quota percentuale dei pazienti anti-TRIB2 positivi si riferisce ai valori delle estinzioni dell'elisa  $\geq$  media + 2DS dei soggetti controllo. Riferiti a un valore limite di  $\geq$  1DS dei soggetti controllo il 39 % dei pazienti con narcolessia (56 di 143 complessivamente) risulterebbe positivo.  
<sup>\*3</sup> Valore limite  $\geq$  media + 2SD dei soggetti controllo



## Autoanticorpi anti-TRIB2 (Tribbles omologo 2)

### Prevalenza

Autoanticorpi anti-TRIB2 sono stati riscontrati la prima volta in pazienti affetti da uveite autoimmune (Zhang et al. 2005). In seguito essi sono stati individuati da tre gruppi di studiosi (Europa, Stati Uniti, Giappone) nel siero e nel liquido cerebrospinale di pazienti con narcolessia e cataplessia (tabella 1). In pazienti con narcolessia, anti-TRIB2 sono risultati aumentati specie nelle fasi iniziali, nelle quali i livelli anticorpali erano più alti delle fasi più tarde. La probabilità della presenza di anti-TRIB2 in soggetti in fasi iniziali (< 2,3 anni) della malattia è 7,4 volte più alta di quella in soggetti in fasi più tarde (Cvetkovic-Lopes et al. 2010; Kawashima et al. 2010). Prendendo per base quel punto temporale di riferimento il 41 % dei pazienti con narcolessia nella fase iniziale e portanti l'allele DQB1\*0602 era anti-TRIB2 positivo rispetto al 4 - 8 % degli altri gruppi (Kawashima et al. 2010). Il livello degli anticorpi misurati nel siero è risultato diminuire marcatamente durante i primi 2 - 3 anni dalla comparsa, ma addirittura venti anni dopo dall'inizio della malattia in qualche paziente esistevano anti-TRIB2 con valori più alti di 1SD dei soggetti controllo (Cvetkovic-Lopes et al. 2010). I dati sulla prevalenza degli anticorpi in pazienti affetti da cataplessia, oppure senza, sono in disaccordo (tabella 1). Correlazioni sono state osservate fra il livello degli anticorpi e la frequenza degli attacchi cataplettici e fra la gravità della narcolessia (Cvetkovic-Lopes et al. 2010). Altre correlazioni osservate erano fra la presenza degli anticorpi e la manifestazione della cataplessia. Non esistevano correlazioni tra livelli bassi dell'ipocretina nel liquido spinocerebellare e la prevalenza di anti-TRIB2 (Kawashima et al. 2010).

### Immunopatologia

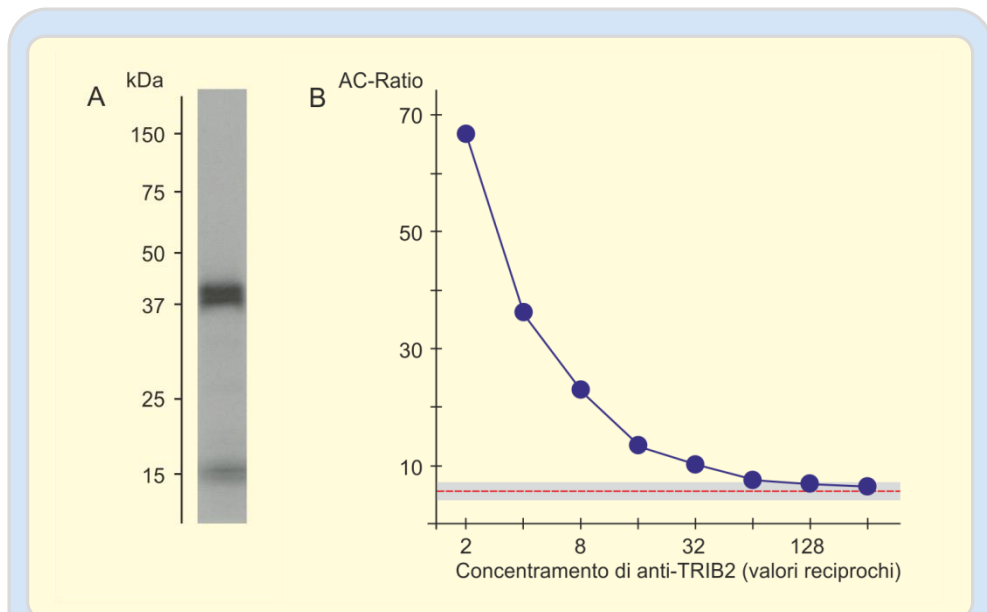
La narcolessia è un disordine del sonno caratterizzato da eccessiva sonnolenza diurna e nella forma più caratteristica associata alla cataplessia cioè ad una perdita del tono muscolare provocata di forti emozioni e i pazienti subito dopo l'addormentamento entrano in fase REM. La prevalenza della malattia raggiunge  $5 \times 10^{-4}$  (Longstreth et al. 2007). Nel suo corso si manifesta una perdita quasi completa (> 90 %) dei neuroni secernenti l'ipocretina (neuroni HCRT) nell'ipotalamo (Peyron et al. 2000; Thannickal et al. 2000), la causa della quale si suppone sia in una patologia autoimmune (riassunto: Overeem et al. 2009). La stretta associazione della narcolessia all'allele HLA-DQB1\*0602 nel 95 % dei pazienti (Mignot et al. 2001), l'associazione a polimorfismi del recettore  $\alpha$  dei linfociti T (Hallmayer et al. 2009) e la dimostrazione degli autoanticorpi contro Tribbles omologo 2, quale ultimo viene espresso nei neuroni HCRT, hanno dato nuovi impulsi a tali considerazioni su meccanismi autoimmuni. Le cause dello sviluppo degli anticorpi anti-TRIB2 non sono attualmente chiare. Se essi, prodotti a causa di un processo autoimmune finora sconosciuto, danneggino direttamente i neuroni HCRT, oppure se essi si sviluppino quasi come coprodotto in seguito di un altro danno infiammatorio neurologico e quindi sorreggono un processo infiammatorio cronico oppure se essi costituiscano soltanto un epifenomeno accidentale, finora non è risaputo. Bensì ci sono indizi, che gli anticorpi possano esercitare effetti patologici. Dopo l'iniezione intraventricolare di sieri di pazienti anti-TRIB2 positivi in topi, gli animali sviluppavano non solo lesioni morfologiche ipotalamiche (perdita di NeuN, di sinaptofisina e di neuroni HCRT) ma anche manifestazioni cliniche rassomiglianti alla narcolessia (Katzav et al. 2013). Tali studi sperimentali insieme al miglioramento dei sintomi dopo terapia IVIG in alcuni pazienti (Cvetkovic et al. 2010) fanno supporre, che meccanismi patologici autoimmuni c'entrino con la genesi della narcolessia.

### Metodi della ricerca

Il dosaggio degli anticorpi è stato effettuato da una parte mediante Elisa usando quale antigene una proteina di fusione GST con gli ultimi 28 amino acidi C-terminali della sequenza di TRIB2 (Cvetkovic et al. 2010), dall'altra parte attraverso immunoprecipitazione della TRIB2 di lunghezza completa, marcata con  $^{35}\text{S}$ -metonina, ottenuta mediante trascrizione e traduzione in vitro (Kawashima et al. 2010; Toyoda et al. 2010). Campioni da analizzare: siero, liquido cerebrospinale.



## Autoanticorpi anti-TRIB2 (Tribbles omologo 2)



**Immagine 1** Dimostrazione degli autoanticorpi anti-TRIB2 mediante radioimmunoprecipitazione (in collaborazione con Dipl.-Leb. Chem. O. Bauer).

**A** Autoradiogramma della proteina TRIB2 integrale (343 aminoacidi, M, 38,8 kDa), trascritta e tradotta *in vitro* e marcata da  $^{35}\text{S}$ -metionina, dopo cromatografia su Sephadex G 25 allo scopo di rimozione della  $^{35}\text{S}$ -metionina non incorporata. Il cDNA codificante la proteina da esprimere è stata ottenuta mediante PCR da una libreria di cDNA di cerebello umano (100 % d'accordo con la sequenza consensus NP\_067675.1; Q92519) e stata clonata nel vettore pCITE-4a modificato (Novagen). L'antigene radioattivo è ampiamente privo di contaminazioni e dimostra il peso molecolare aspettato.

**B** Curva di calibrazione della radioimmunoprecipitazione di  $^{35}\text{S}$ -metionina-TRIB2 con anticorpi polivalenti anti-TRIB2 del coniglio (TRIB-2 (H-53); Santa Cruz Biotechnology). La linea tratteggiata corrisponde al valore medio di 5 controlli negativi umani, la area grigia dimostra  $\pm 1\text{SD}$ . L'elaborazione dei valori di misurazione è stata eseguita consona a Frey et al. 1998.

### Bibliografia

Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, Maret S, Pradervand S, Dauvilliers Y, Lecendreux M, Lammers GJ, Donjacour CE, Du Pasquier RA, Pfister C, Petit B, Hor H, Mühlethaler M, Tafti M: Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *J Clin Invest* (2010); 120(3): 713 - 719 (PMID: [20160349](#)).

Grandinetti KB, Stevens TA, Ha S, Salamone RJ, Walker JR, Zhang J, Agarwalla S, Tenen DG, Peters EC, Reddy VA: Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP $\alpha$ . *Oncogene* (2011); 30(30): 3.328 - 3.335 (PMID: [21399661](#)).

Hallmayer J, Faraco J, Lin L, Hesselson S, Winkelmann J, Kawashima M, Mayer G, Plazzi G, Nevsimalova S, Bourgin P, Hong SC, Honda Y, Honda M, Högl B, Longstreth WT Jr, Montplaisir J, Kemlink D, Einen M, Chen J, Musone SL, Akana M, Miyagawa T, Duan J, Desautels A, Erhardt C, Hesla PE, Poli F, Frauscher B, Jeong JH, Lee SP, Ton TG, Kvale M, Kolesar L, Dobrovólná M, Nepom GT, Salomon D, Wichmann HE, Rouleau GA, Gieger C, Levinson DF, Gejman PV, Meitinger T, Young T, Peppard P, Tokunaga K, Kwok PY, Risch N, Mignot E: Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet* (2009); 41(6): 708 - 711 (PMID: [194121769](#)).



## Autoanticorpi anti-TRIB2 (Tribbles omologo 2)

Hannon MM, Lohan F, Erbilgin Y, Sayitoglu M, O'Hagan K, Mills K, Ozbek U, Keeshan K: Elevated TRIB2 with NOTCH1 activation in paediatric/adult T-ALL. *Br J Haematol* (2012); 158(5): 626 - 634 (PMID: [22775572](#)).

Katzav A, Arango MT, Kivity S, Tanaka S, Givaty G, Agmon-Levin N, Honda M, Anaya JM, Chapman J, Shoenfeld Y: Passive transfer of narcolepsy: anti-TRIB2 autoantibody positive patient IgG causes hypothalamic orexin neuron loss and sleep attacks in mice. *J Autoimmun* (2013); 45: 24 - 30 (PMID: [23834844](#)).

Kawashima M, Lin L, Tanaka S, Jennum P, Knudsen S, Nevsimalova S, Plazzi G, Mignot E: Anti-Tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep* (2010); 33(7): 869 - 874 (PMID: [20614846](#)).

Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G: The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* (2007); 30(1): 13 - 26 (PMID: [17310860](#)).

Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu S, Leffell M, Grumet F, Fernandez-Vina M, Honda M, Risch N: Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* (2001); 68(3): 686 - 699 (PMID: [11179016](#)).

Overeem S, Black JL 3rd, Lammers GJ: Narcolepsy: immunological aspects. *Sleep Med Rev* (2008); 12(2): 95 - 107 (PMID: [18291691](#)).

Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E: A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* (2000); 6(9): 991 - 997 (PMID: [10973318](#)).

Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* (2000); 27(3): 469 - 474 (PMID: [11055430](#)).

Toyoda H, Tanaka S, Miyagawa T, Honda Y, Tokunaga K, Honda M: Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep* (2010); 33(7): 875 - 878 (PMID: [20614847](#)).

Zhang Y, Davis JL, Li W: Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. *Mol Immunol* (2005); 42(11): 1.275 - 1.281 (PMID: [15950723](#)).