

Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK z rodziny NKG2 i ich ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych

Streszczenie

Allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych (ang. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT) to procedura stosowana głównie w leczeniu chorób i dysfunkcji układu krwiotwórczego, w tym chorób rozrostowych. HSCT wykonywane jest z wykorzystaniem materiału pochodzącego od odpowiednio dobranej dawcy w głównym układzie zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex, MHC, u człowieka - Human Leukocyte Antigen, HLA). Pomimo wysokiego współczynnika sukcesu, wdrażania nowych strategii kondycjonowania biorców i profilaktyki, procedura ta obarczona jest ryzykiem wystąpienia groźnych komplikacji poprzyszczepowych. Wśród nich wyróżnia się m.in. infekcje bakteryjne, grzybicze i wirusowe, odrzucenie przeszczepienia czy wznowę choroby pierwotnej. Jednymi z najczęściej występujących komplikacji po allogenicznym HSCT są infekcja wirusem cytomegalii (CMV) a także, występująca w dwóch formach; ostrej i przewlekłej, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. Graft-versus-Host Disease, acute/chronic GvHD). Ryzyko wystąpienia choroby GvH związane jest z wieloma czynnikami zarówno ze strony biorcy jak i dawcy, ale najbardziej istotnym jest stopień doboru w HLA pomiędzy parą dawca/biorca. Dla powodzenia allogenicznego przeszczepienia decydujący jest czas procesu pełnej odnowy układu immunologicznego w zakresie wszystkich populacji limfocytarnych.

Komórki NK (ang. Natural Killers) są populacją limfocytów, które jako jedne z pierwszych ulegają rekonstytucji w organizmie biorcy po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. Wykazują one właściwości typowe zarówno dla wrodzonej jak i nabytej odporności, co czyni je niezwykle ciekawym przedmiotem badań. Prawidłowe funkcjonowanie komórek NK regulowane jest przez szereg aktywujących i hamujących receptorów zlokalizowanych na ich powierzchni. Wśród nich wyróżnia się receptory lektynopodobne należące do rodziny NKG2, w tym receptor hamujący NKG2A oraz receptory aktywujące NKG2C i NKG2D. Mają one zdolność do oddziaływania z komórkami docelowymi, na powierzchni których dochodzi do ekspresji HLA-E, MICA i MICB należących do nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I.

Geny kodujące zarówno klasyczne, jak i nieklasyczne cząsteczki MHC zlokalizowane są w regionie położonym na krótszym ramieniu chromosomu 6. Podobnie do klasycznych *loci*, geny kodujące nieklasyczne cząsteczki MHC klasy I cechują się znaczną zmiennością polimorficznością. Wyjątek stanowi *HLA-E*, którego allele *01:01 oraz *01:03 występują z częstością ok. 99% w ogólnej populacji, a ich rozkład jest niemal identyczny.

HLA-E jest ligandem dla dwóch receptorów; hamującego NKG2A oraz aktywującego NKG2C (kodowanych, odpowiednio, przez geny *KLRC1* oraz *KLRC2*). Pomimo strukturalnego podobieństwa obydwu receptorów, zdolność NKG2A do wiązania HLA-E jest ponad 6-krotnie większa, niż NKG2C, co spowodowane jest przez różnice reszt aminokwasowych w pozycjach 165-168 (dla NKG2C) oraz 167-170 (dla NKG2A). Spośród nieklasycznych *loci* MHC klasy I, największą zmiennością polimorficzną cechuje się *MICA*, dla którego odkrytych zostało ponad 100 alleli. *MICA* oraz *MICB* są ligandami dla receptora aktywującego NKG2D, którego obecność powiązana jest z cytolitycznymi i cytotoksycznymi właściwościami komórkami NK. Cząsteczki *MICA/MICB* oraz *HLA-E* mogą występować zarówno w postaci białek transbłonowych, jak i w macierzy zewnątrzkomórkowej w postaci rozpuszczalnej (ang. soluble, s; sMICA, sMICB, sHLA-E).

Wyniki uzyskane podczas przygotowania niniejszej rozprawy doktorskiej opisane zostały w trzech publikacjach oryginalnych. Omówione zostały w nich zagadnienia związane ze zmiennością polimorficzną genów kodujących receptory NKG2A (*KLRC1*), NKG2C (*KLRC2*) i NKG2D (*KLRK1*) oraz ich ligandy, cząsteczki HLA-E, MICA i MICB, jak również ekspresją powierzchniową omawianych receptorów na komórkach NK, a także poziomem rozpuszczalnych form ich ligandów w surowicy pacjentów.

Pierwsza z prac (Siemaszko i wsp. *Frontiers In Immunology*, 2023) skupia się na receptorach NKG2A oraz NKG2C oraz cząsteczce HLA-E, która jest ich wspólnym ligandem. Badania nad zmiennością genetyczną *NKG2A/KLRC1*, *NKG2C/KLRC2* i *HLA-E* wykazały, że u biorców chorych na ostrą białaczkę szpikową (ang. Acute Myeloid Leukaemia, AML) allel *NKG2A* rs7301582 C występuje rzadziej w porównaniu do grupy dawców. Pacjenci, u których doszło do rozwinięcia ostrej postaci GvHD o bardziej nasilonym przebiegu II-IV stopnia częściej charakteryzowali się obecnością delekcji zlokalizowanej w genie kodującym aktywujący receptor NKG2C, niż osoby u których nie wystąpiły objawy aGVHD lub rozwinęła się ona jedynie w łagodnym stopniu I.

W przypadku polimorfizmu rs1264457 w genie kodującym cząsteczkę HLA-E zaobserwowano, że występowanie niezgodności między dawcą i biorcą przeszczepu w allelach *HLA-E* u par w pełni zgodnych w zakresie klasycznych *loci* HLA(10/10) skutkuje podwyższonym ryzykiem rozwinięcia cGVHD, a także wystąpieniem infekcji CMV po przeszczepieniu. Nie zauważono natomiast związku pomiędzy brakiem zgodności w allelach *HLA-E*, a rozwinięciem aGVHD.

Kolejnym aspektem pracy było zbadanie czy stężenie rozpuszczalnej formy HLA-E w surowicy biorców, pobranej po HSCT, jest powiązane z wystąpieniem poprzyszczepowych powikłań. Wykazano, że zarówno biorcy, którzy rozwinęli przewlekłą, jak i ostrą chorobę GvH charakteryzują się zmniejszonym poziomem sHLA-E, w porównaniu do biorców, u których te komplikacje nie zostały zdiagnozowane. Dodatkowo, zauważono też znaczący wzrost poziomu sHLA-E w surowicy pobranej 90 dni po przeszczepieniu, w porównaniu do stężenia tego białka 30 dni po transplantacji.

Badania nad ekspresją receptora NKG2C na powierzchni komórek NK przeprowadzone zostały za pomocą cytometrii przepływowej. Wykazały one, że biorcy, u których rozwinęła się infekcja CMV charakteryzują się podwyższonym odsetkiem komórek NK NKG2C+ w dniu 60 oraz 90 po przeszczepieniu, w porównaniu do biorców, u których nie doszło do rozwinięcia infekcji. Podobne zależności zaobserwowano także w przypadku populacji komórek NK NKG2A-/NKG2C+. Dodatkowo, zaobserwowano pewne relacje pomiędzy wystąpieniem wariantów polimorficznych, a ekspresją powierzchniową receptora NKG2C. U pacjentów z obecnością co najmniej jednego allelu *NKG2A* rs7301582 T oraz z delekcją *NKG2C* zaobserwowano zmniejszony odsetek komórek NK NKG2C+ w porównaniu do pozostałych chorych po transplantacji.

Kolejna publikacja (Siemaszko i wsp. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2024) dotyczy genetycznej charakterystyki cząsteczki MICB, która jest jednym z ligandów aktywującego komórki NK receptora NKG2D. Badania nad zmiennością polimorficzną *MICB* wykazały, że w przypadku obydwu badanych polimorfizmów (rs1065075 oraz rs3828903), allele G występują ze zmniejszoną częstością u dawców, których biorcy rozwinęli przewlekłą postać choroby GvH. Natomiast obecność allelu *MICB* rs1065075 G u dawcy lub biorcy przeszczepu związana była z obniżonym ryzykiem rozwoju infekcji CMV. Zależność pomiędzy występowaniem allelu G w polimorfizmie *MICB* rs1065075, a rzadszym rozwojem infekcji CMV została dodatkowo potwierdzona z wykorzystaniem analizy wieloczynnikowej, która uwzględniała zmienne takie jak wiek biorcy, czy obecność przeciwciał anty-CMV w klasie IgG u dawcy i biorcy przed transplantacją. Badania nad znaczeniem rozpuszczalnej formy MICB przeprowadzone zostało z wykorzystaniem surowicy biorców pobranej 30 dni od przeprowadzenia procedury transplantacji komórek krwiotwórczych. Stwierdzono, że pacjenci, u których doszło do infekcji CMV lub u których zdiagnozowano przewlekłą postać GvHD charakteryzowali się podwyższonym poziomem rozpuszczalnej formy MICB w porównaniu do pacjentów, u których nie doszło do rozwoju tych komplikacji. Ponadto zaobserwowano, iż stężenie sMICB może być związane z obecnością specyficznych wariantów genetycznych *MICB*. Wyższe poziomy rozpuszczalnej formy MICB w surowicy występowały u pacjentów z homozygotycznym genotypem AA zarówno w przypadku polimorfizmu rs1065075, jak i rs3828903.

W ostatnim, nieopublikowanym manuskrypcie, wchodzącym w skład rozprawy, zostały omówione zagadnienia związane z cząsteczką MICA oraz receptorem aktywującym NKG2D. Badania nad rozpuszczalną formą MICA w surowicy pacjentów pobranej 30 i 90 dni po przeszczepieniu ujawniły, że stężenie sMICA wzrasta wraz z upływem czasu po HSCT. Podwyższony poziom rozpuszczalnej formy MICA został stwierdzony w surowicy biorców pobranej 30 dni po przeszczepieniu, u których zdiagnozowano zarówno ostrą, jak i przewlekłą postać GvHD. Zaobserwowano również, iż stężenie rozpuszczalnej formy MICA może być związane z genotypem MICA. Pacjenci, u których wykryto co najmniej jeden allel rs1065075 G (genotypy AG oraz GG), a także pacjenci, których dawcy posiadali allel rs1065075 G, charakteryzowali się podwyższonym stężeniem rozpuszczalnej formy MICA w surowicy w porównaniu do osób, u których wykryto homozygotyczny genotyp AA.

U pacjentów ze zdiagnozowaną przewlekłą chorobą GvH ekspresja powierzchniowa receptora NKG2D na komórkach NK była podwyższona w dniu +60 i +90 od przeszczepienia w porównaniu do osób, u których nie wykryto tej choroby. Dodatkowo, odsetek komórek NKG2D+ NK różnił się u biorców w zależności od poziomu rozpuszczalnej formy MICA. Wyższe częstości komórek NKG2D+ NK w +30 dniu po przeszczepieniu występowały u pacjentów, u których poziom rozpuszczalnej formy MICA w surowicy był niższy (sMICA < mediana).

Ponadto, stwierdzono potencjalne znaczenie prognostyczne polimorfizmu *NKG2D* rs1049174 w przypadku ryzyka rozwoju ostrej postaci choroby GvH. Rozkład genotypów polimorfizmu rs1049174 w grupie biorców bez lub z łagodnym stopniem I aGvHD był zbliżony do rozkładu genotypów w grupie kontrolnej, którą stanowiły zdrowe niespokrewnione osoby, dawcy krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu. Istotne różnice zaobserwowano porównując biorców z bardziej nasiloną chorobą aGvH II-IV stopnia i osoby zdrowe z grupy kontrolnej lub biorców bez ostrej choroby aGvH II-IV stopnia.

Zwieńczeniem cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest praca przeglądowa dotycząca opisu biologicznych i klinicznych właściwości receptora aktywującego NKG2C, a także jego oddziaływaniu z cząsteczką HLA-E, będącej wspólnym ligandem dla receptorów NKG2C i NKG2A (Siemaszko i wsp. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2023).

Wyniki opisane w cyklu prac wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują na istotną rolę zmienności genetycznej i ekspresji powierzchniowej receptorów komórek NK z rodziny NKG2 w przebiegu procesu odnowy układu immunologicznego u pacjentów poddanych allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Występowanie określonych wariantów genetycznych, predysponujących do rozwinięcia omawianych poprzyszczepowych powikłań może mieć znaczenie prognostyczne. Z kolei rozpuszczalne formy ligandów receptorów komórek NK, należące do nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I, mają potencjalne znaczenie jako biomarkery rozwoju poprzyszczepowych komplikacji, takich jak ostra i przewlekła choroba GvH oraz infekcja CMV