



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU
POLSKA AKADEMIA NAUK

mgr Milena Iwaszko

**Rola polimorfizmu receptorów z rodziny CD94/NKG2
oraz cząsteczki HLA-E w patogenezie reumatoidalnego
zapalenia stawów**

Streszczenie

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik

Promotor pomocniczy: dr inż. Agnieszka Chrobak

Wrocław, 2018

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, układową chorobą tkanki łącznej o podłożu immunologicznym. W patogenezie tej choroby istotną rolę odgrywają limfocyty T oraz komórki NK, których funkcja jest modulowana przez szereg receptorów. Receptory te pośredniczą w przekazywaniu współzawodniczących ze sobą sygnałów aktywujących oraz hamujących, a co za tym idzie regulują aktywność cytotoksyczną oraz produkcję cytokin przez limfocyty. Receptory CD94/NKG2, obecne na komórkach NK i T, oraz ich ligandy mogą więc odgrywać kluczową rolę w warunkowaniu odpowiedzi immunologicznej w RZS poprzez indukowanie cytotoksyczności oraz produkcji prozapalnych cytokin, które stanowią czynniki przyczyniające się do rozwoju RZS.

Cele pracy obejmowały: (1) określenie związku wybranych polimorfizmów genów receptorów z rodziny *CD94/NKG2* i cząsteczki *HLA-E* z ryzykiem zachorowania na RZS, skutecznością leczenia inhibitorami TNF- α oraz laboratoryjnymi i klinicznymi parametrami aktywności choroby; (2) określenie związku ekspresji powierzchniowej receptorów z rodziny *CD94/NKG2* i cząsteczki *HLA-E* na wybranych populacjach komórek z zachorowaniem na RZS.

Badaną grupę stanowiło 303 chorych na RZS poddanych terapii inhibitorami TNF- α z Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych AM we Wrocławiu oraz Kliniki Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. dr. J. Bizuela w Bydgoszczy. Grupa kontrolna osób zdrowych składała się z 238 honorowych dawców krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu.

Oznaczenie polimorfizmów wybranych genów wykonane zostało przy użyciu metody real-time PCR z zastosowaniem sond TaqMan oraz zestawów LightSNiP. Liczba komórek wykazujących ekspresję powierzchniową białek *HLA-E*, *CD94*, *NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2D* oszacowana została za pomocą cytofluorymetrii przepływowej u 34 chorych na RZS i 24 osób stanowiących grupę kontrolną.

Ekspresja powierzchniowa *NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2D* analizowana była na limfocytach T (*CD3+CD56-*) obejmujących subpopulacje *CD8+*, *CD4+*, *CD28+*, $\gamma\delta 1+$, $\gamma\delta 2+$ oraz na komórkach NK (*CD3-CD56+*) i NKT (*CD3+CD56+*). Badanie ekspresji powierzchniowej *HLA-E* przeprowadzone zostało na limfocytach T (*CD3+CD4+*), B (*CD19+*) oraz monocytach (*CD14+*).

Zaobserwowano zależność między polimorfizmem *HLA-E* rs1264457 a podatnością na zachorowanie na RZS w grupie kobiet. Częstość występowania genotypu *HLA-E**01:01/01:01 była istotnie niższa wśród pacjentek w porównaniu do zdrowych kobiet ($p = 0,031$). Obecność genotypu *HLA-E**01:01/01:01 związana była również z dobrą odpowiedzią na leczenie inhibitorami TNF- α po upływie 12 tygodni od rozpoczęcia terapii, podczas gdy nosicielki pozostałych genotypów nie uzyskały zadowalającej odpowiedzi na leczenie ($p = 0,014$). Z kolei pacjentki posiadające homozygotyczny genotypu *HLA-E**01:03/01:03 charakteryzowały się gorszą odpowiedzią na leczenie w porównaniu do chorych posiadających genotyp *HLA-E**01:01/01:01 ($p = 0,021$). Zaobserwowano również związek między polimorfizmem *HLA-E* rs1059510 a skutecznością zastosowanej terapii po 12 tygodniach leczenia w obrębie całej badanej grupy chorych. Zadowalający efekt terapeutyczny występował istotnie częściej wśród pacjentów będących homozygotami *HLA-E**01:03/01:03/01:03:01 w porównaniu do nosicieli pozostałych genotypów ($p = 0,009$).

Wykazano również związek między polimorfizmem *CD94* rs2302489 a predyspozycją do zachorowania na RZS. Wśród chorych zaobserwowano rzadsze występowanie genotypu *CD94* rs2302489 AA niż u osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną ($p = 0,016$). Obecność homozygotycznego genotypu *CD94* rs2302489 AA korelowała również z brakiem przeciwciał anti-CCP u pacjentów ($p = 0,001$). Ponadto pacjenci, u których nie wykryto przeciwciał anti-CCP częściej byli nosicielami allelu *CD94* rs2302489 A ($p = 0,0005$). Ponadto zaobserwowano częstsze występowanie genotypu *CD94* rs2302489 TT wśród pacjentów, u których leczenie nie przyniosło zadowalającego efektu terapeutycznego ($p = 0,017$).

Spośród trzech badanych polimorfizmów w genie *NKG2A* zaobserwowano zależność między wariantem polimorficznym rs7301582 a skutecznością terapii anti-TNF- α . Wśród chorych, u których nie uzyskano wystarczającej odpowiedzi na leczenie zaobserwowano częstsze występowanie genotypu *NKG2A* rs7301582 CC w porównaniu do pozostałych genotypów ($p = 0,035$). Z kolei dobrą odpowiedzią na terapię częściej charakteryzowali się chorzy posiadający allel *NKG2A* rs7301582 T ($p = 0,019$). Nie wykazano natomiast związku między polimorfizmem *NKG2A* rs2734414 i rs2734440 a podatnością na zachorowanie na RZS oraz skutecznością terapii anti-TNF- α .

W obrębie genu *NKG2D* przebadano trzy miejsca polimorficzne: *NKG2D* rs2255336, rs1049174 oraz rs1154831. Zaobserwowano różnice w rozkładzie genotypów oraz alleli *NKG2D* rs2255336 wśród chorych na RZS w odniesieniu do skuteczności terapii blokerami

TNF- α po 12 tygodniach. Pacjenci posiadający homozygotyczny genotyp *NKG2D* rs2255336 GG charakteryzowali się niedostateczną odpowiedzią na leczenie w porównaniu do nosicieli pozostałych genotypów ($p = 0,003$). Ponadto allel *NKG2D* rs2255336 G występował istotnie częściej wśród chorych, u których zastosowane leczenie nie przyniosło zadowalającego efektu terapeutycznego ($p = 0,002$). Z kolei obecność heterozygotycznego genotypu *NKG2D* rs2255336 AG u chorych związana była z dobrą odpowiedzią kliniczną w odniesieniu do pozostałych genotypów ($p = 0,010$).

Wykazano również związek między skutecznością leczenia inhibitorami TNF- α a polimorfizmem *NKG2D* rs1049174. Brak adekwatnej odpowiedzi po 12 tygodniach terapii był częściej obserwowany wśród nosicieli allelu *NKG2D* rs1049174 C ($p = 0,031$). Z kolei analiza rozkładu genotypów wykazała, że obecność genotypu *NKG2D* rs1049174 CC u pacjentów zwiększała ryzyko niepowodzenia leczenia, podczas gdy genotyp GG lub CG związany był z uzyskaniem zadowalającego efektu terapeutycznego ($p = 0,004$). Z kolei występowanie heterozygotycznego genotypu *NKG2D* rs1049174CG w odniesieniu do układu homozygotycznego CC oraz GG korelowało z dobrą odpowiedzią kliniczną na leczenie ($p = 0,002$). Ponadto zaobserwowano istotnie częstsze występowanie genotypu *NKG2D* rs1049174 CG wśród chorych w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,005$).

W badaniach przeprowadzonych metodą cytometrii przepływowej zaobserwowano istotne statystycznie różnice między grupą chorych na RZS a grupą kontrolną w odniesieniu do ekspresji receptorów z rodziny CD94/NKG2. Zaobserwowano istotnie wyższy odsetek komórek NK charakteryzujących się ekspresją cząsteczki CD94 u chorych na RZS w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p = 0,0350$). Natomiast proporcja limfocytów T CD3+CD94+ u pacjentów była znamienne niższa niż w grupie kontrolnej ($p = 0,0021$). Z kolei odsetek komórek T oraz NKT ekspresjonujących receptor NKG2A oraz NKG2C był istotnie niższy u chorych niż w grupie obejmującej osoby zdrowe. (T: $p = 0,0159$ oraz $p = 0,0030$; NKT: $p = 0,0386$ oraz $p = 0,0433$).

Ponadto u chorych na RZS zaobserwowano znamienne wyższy odsetek komórek NK, T oraz NKT wykazujących ekspresję receptora NKG2D w porównaniu do grupy kontrolnej (NK: $p = 0,0207$; T: $p = 0,0386$; NKT: $p = 0,0034$). W obrębie subpopulacji limfocytów T CD3+CD8+ oraz T CD3+CD8+CD28+ odnotowano także istotnie wyższą proporcję komórek ekspresjonujących receptor NKG2D u chorych na RZS w odniesieniu do osób zdrowych ($p = 0,0386$ oraz $p = 0,0449$).

Nie stwierdzono istotnych różnic w liczności subpopulacji T CD3+CD4+CD28+ oraz T CD3+CD4+CD28- między badanymi grupami. Natomiast u chorych na RZS odnotowano istotnie wyższy odsetek limfocytów T CD3+CD8+CD28- niż u osób zdrowych ($p = 0,0012$). Ponadto w obrębie subpopulacji T CD3+CD8+CD28- zaobserwowano wyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję receptora NKG2D niż w grupie kontrolnej ($p = 0,0212$).

Zaobserwowano również istotnie obniżony odsetek komórek T $\gamma\delta 2$ u pacjentów z RZS w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p = 0,0028$). Ponadto u chorych na RZS wykazano znamienne wyższy odsetek komórek pozytywnych pod względem receptora NKG2D w obrębie subpopulacji T $\gamma\delta 1$ oraz T $\gamma\delta 2$ ($p = 0,0296$ oraz $p = 0,0183$).

Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty wskazują na potencjalną rolę receptorów z rodziny CD94/NKG2 oraz cząsteczki HLA-E w rozwoju RZS oraz warunkowaniu odpowiedzi na terapię z zastosowaniem inhibitorów TNF- α .