

Znaczenie zjawiska alloreaktywności indukowanej infekcjami wirusowymi u chorych po przeszczepieniach allogenicznym krwiotwórczych komórek macierzystych

The role of viral infection induced alloreactivity in patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantations

Mateusz Sowiński, Alicja Bukowska

Laboratorium Zgodności Tkankowej z Pracownią Diagnostyki Genetycznej,
Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Poznań

Streszczenie

Krzyżowa odpowiedź alloreaktywnych limfocytów T pamięci aktywowanych infekcjami wirusowymi jest jedną z przyczyn powikłań u pacjentów poddawanych procedurze przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych od dawcy niespokrewnionego oraz przeszczepienia haploidentycznego. Homologia mechanizmów rearanżacji genów V(D)J kodujących receptory komórek T oraz część zmienną przeciwciał ułatwia zrozumienie zjawiska alloreaktywności komórkowej i humoralnej, w której pośredniczą odpowiednio limfocyty T pamięci wykazujące reaktywność krzyżową w stosunku do alloantygenów oraz alloreaktywne przeciwciała przeciw układowi ludzkich antygenów leukocytarnych. Proste testy oparte na pomiarze aktywacji komórek pamięci dawcy w kontakcie z komórkami prezentującymi niezgodny antygen oraz bardziej skomplikowane procedury oparte na cytometrycznym oznaczaniu markera degranulacji komórek naturalnej cytotoksyczności pozwalają pozyskać informacje o stopniu możliwych powikłań w przypadku alloreaktywnej odpowiedzi komórek biorcy na przeszczep.

Słowa kluczowe: alloreaktywność, domeny hiperzmiennie, hierarchia immunodominacji, komórki SAL, peptyd immunodominujący, reaktywność krzyżowa, rekombinacja V(D)J, regiony RSS, terapia immunoadoptywna

Hematologia 2018; 9, 1: 15–21

Abstract

Viral infection activated alloreactive peripheral memory T-cells present in the host are considered as one of the causes of transplant related complications during post-transplant period of unrelated donor and haploidentical graft transplantation procedures. Antibody and T-cell receptor coding genes homology and their analogous rearrangement process help to understand cellular and humoral alloreactivity, mediated by alloreactive memory T-cells and antibodies, respectively. Simple tests using single antigen presenting cells or human leukocyte antigen (HLA)-mismatched recipient peripheral

Adres do korespondencji: Mateusz Sowiński, Laboratorium Zgodności Tkankowej z Pracownią Diagnostyki Genetycznej, Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, ul. Marcelińska 44, 60-354 Poznań, tel. 61 886 33 58, faks 61 886 33 58 e-mail: matsow@gmail.com

blood mononuclear cells vs. virus specific donor T-cells and more sophisticated natural killer cells degranulation marker assays based on flow cytometry enable to rule out or confirm alloreactivity thus increasing the chance of appropriate post-transplant treatment path selection.

Key words: alloreactivity, cross reactivity, hypervariable regions, immunoadoptive therapy, immunodominance hierarchy, immunodominant peptide, RSS regions, SAL cells, V(D)J recombination

Hematologia 2018; 9, 1: 15–21

Wprowadzenie

W procedurach doboru dawcy niespokrewnionego oraz przeszczepieniach haploidentycznych bada się zgodność układu ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA, *human leukocyte antigens*) oraz obecność specyficznych przeciwciał dawcy (DSA, *donor specific antibodies*), a w przypadku alokacji narządów od dawców zmarłych wykonuje się dodatkowo próby krzyżowe dla wyselekcjonowanych biorców narządów [1, 2]. Powyższe metody nie pozwalają jednak przewidzieć odpowiedzi krzyżowej, w której biorą udział przeciwciała i limfocyty T biorcy po przeszczepieniu, polegającej na rozpoznawaniu publicznych epitopów przez DSA oraz zmianach wzajemnej relacji kompleksów głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*)–peptyd–receptor T komórkowy (TCR, *T-cell receptor*) opartych na modulacji strukturalnej dopasowania TCR i HLA pod wpływem peptydu, zmiany orientacji przestrzennej TCR w stosunku do HLA, mimikry molekularnej oraz zależnej od antygeny zdolności cząsteczki MHC do zmiany przestrzennej miejsca jego wiązania [1, 3]. Zgodnie z pracą Yoshihary i wsp. [1] alloreaktywność związana z przeciwciałami polega na rozpoznawaniu przez nie antygenów prezentowanych w kontekście HLA, zawierających tak zwane publiczne epitopy, czyli fragmenty cząsteczek MHC, które wraz z antygenem stanowią wspólne dla wielu specyficzności miejsca wiązania przeciwciał anty-HLA. W zrozumieniu zjawiska reaktywności krzyżowej przydatna jest znajomość takich procesów, jak: zasada restrykcji MHC, która powinna zapewniać specyficzność komórkowej odpowiedzi immunologicznej, w której pośredniczą limfocyty T i komórki naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killers*), grasicza selekcja klonalna oraz humoralna odpowiedź zależna od przeciwciał i limfocytów B. Zjawisko restrykcji MHC polega na specyficznym rozpoznawaniu cząsteczki peptydu przez receptor TCR, jeśli jest ona prezentowana w kontekście ściśle określonej cząsteczki HLA. Komórki prezentujące antygeny selfu na obwodzie

objęte są zjawiskiem tak zwanej tolerancji immunologicznej, ponieważ limfocyty, które mogłyby ulec aktywacji w kontakcie z tymi antygenami, już usunięto w grasicy. Mechanizm ten jest uwarunkowany istnieniem różnic w zakresie powinowactwa TCR do cząsteczek MHC wiążących peptyd selfu i ulegających ekspresji na komórkach nabłonkowych zrębu grasicy (mTEC, *medullary thymic epithelial cells*). Peptydy selfu produkowane w tych komórkach są kodowane przez geny zorganizowane w klastry, a za regulację ich ekspresji jest odpowiedzialny regulator *AIRE* (*autoimmune regulator*). Klony limfocytów nierozpoznające peptydów selfu prezentowanych w kontekście autogenicznych cząsteczek HLA oraz te charakteryzujące się wysokim powinowactwem do takich kompleksów ulegają selekcji negatywnej w grasicy. Pozostałe limfocyty T wydostają się na obwód w postaci komórek naiwnych i odznaczają się tolerancją immunologiczną w stosunku do własnych tkanek oraz ulegają aktywacji w przypadku napotkania obcych peptydów prezentowanych przez allo- lub autogeniczne cząsteczki HLA. Istnieje jednak zjawisko, które stanowi odstępstwo od tej reguły i wiąże się ze zdolnością do tak zwanej mimikry molekularnej peptydów prezentowanych na cząsteczkach HLA, polegającej na posiadaniu przez nie wspólnych epitopów, a także, wspólnym dla różnych TCR, kształtem miejsca wiązania antygeny, możliwością jego dopasowania oraz podobieństwem domen CDR3 (*complementarity-determining region 3*), wskutek czego może dojść do aktywacji tego samego klonu limfocytów T w obecności dwóch różnych par HLA–peptyd [1, 3, 4]. Ponadto takie komórki mogą ulegać aktywacji w kontakcie z tym samym antygenem prezentowanym na autogenicznej i allogenicznej cząsteczce HLA, odpowiednio, w procesie pośredniej i bezpośredniej prezentacji [5]. Wirusowa indukcja alloreaktywnej odpowiedzi komórkowej jest uwarunkowana podobieństwem odpowiedzi biorcy na komórki przeszczepu do mechanizmów aktywujących i regulujących odpowiedź organizmu na infekcję wirusową. Różnice dotyczą jedynie specyficznych składowych danej

reakcji immunologicznej w postaci cząsteczek HLA, peptydów oraz repertuaru biorących w niej udział TCR [6].

Reaktywność krzyżowa jako odstępstwo od reguły restrikcji MHC

W zrozumieniu zjawiska reaktywności krzyżowej limfocytów T przydatna jest znajomość takich pojęć, jak odporność wrodzona (nieswoista) oraz nabyta (swoista), synapsa immunologiczna, restrikcja MHC oraz wyżej wspomniana grasicza selekcja klonalna. Podstawą odporności wrodzonej jest istnienie naturalnych, nieswoistych barier, w postaci cząsteczek, receptorów i komórek, które umożliwiają natychmiastową odpowiedź ustroju na obcy dla niego antygen lub czynnik infekcyjny oraz inicjację odpowiedzi nabytej. W przypadku komórek z linii mieloidalnej i limfoidalnej barierę tę stanowią, odpowiednio, makrofagi oraz komórki NK. Z kolei w odporności swoistej biorą udział przede wszystkim limfocyty T oraz limfocyty B, które po napotkaniu antygeny, odpowiednio, proliferują i wytwarzają przeciwciała. W przypadku linii mieloidalnej w odpowiedzi swoistej biorą udział komórki dendrytyczne. Rolą odpowiedzi swoistej jest wytworzenie specyficznej pamięci immunologicznej, która prowadzi do natychmiastowej reakcji układu immunologicznego w przyszłości, po rozpoznaniu wcześniej napotkanego antygeny. W odporności nabytej podstawową rolę odgrywa obecność tak zwanej synapsy immunologicznej, która występuje w miejscu złączenia się komórki prezentującej antygen (APC, *antigen presenting cell*) z limfocytym. Synapsę immunologiczną tworzą liczne receptory i ligandy, w tym kompleksy HLA prezentujące antygen rozpoznawane przez TCR oraz wiele cząsteczek pomocniczych. W pojęciu genetycznym HLA to najbardziej polimorficzny region w genomie człowieka kodujący białka budujące ludzkie cząsteczki MHC. Wyróżnia się trzy klasy produktów genów kodujących te cząsteczki, przy czym do najważniejszych należą cząsteczki klasy I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) oraz klasy II (DR, DQ i DP) [7]. Niektóre elementy odpowiedzi swoistej i wrodzonej są ze sobą ściśle związane, na przykład po aktywacji limfocytów T dochodzi do produkcji cytokin, które rekrutują komórki NK i makrofagi, a do pełnej aktywacji limfocytów T potrzebna jest tkankowo-specyficzna produkcja elementów dopełniacza [8, 9]. Ponadto niektóre naturalne antybiotyki peptydowe, takie jak defensyny i katelicydyny, odgrywają rolę chemoatraktantów w stosunku do limfocytów T [10].

Jakiegokolwiek zmiany sekwencji peptydowej antygeny i wiążącego go miejsca rozpoznawania antygeny (ARS, *antigen recognition site*) na cząsteczce MHC, związane na przykład z infekcją wirusową lub obecnością komórek dawcy, które spowodowałyby zwiększenie powinowactwa receptorów TCR do takich kompleksów, zainicjują odpowiedź immunologiczną. W związku z tym na obwodzie powinny funkcjonować tylko limfocyty zawierające TCR rozpoznające autogeniczne HLA, które prezentują peptydy selfu oraz ulegają aktywacji w obecności kompleksów utworzonych przez auto- lub allogeniczne cząsteczki HLA prezentujące obce peptydy. Wyzwania współczesnej transplantologii związane z powikłaniami typu choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft versus host disease*) czy reakcja gospodarz przeciwko przeszczepowi (HvG, *host versus graft*) wynikają, między innymi, z reaktywności krzyżowej limfocytów T, komórek NK oraz przeciwciał, która w kontekście odpowiedzi immunologicznej biorcy na komórki przeszczepu zwana jest alloreaktywnością [11].

Alloreaktywność związana z odpowiedzią komórkową

Alloreaktywność związana z odpowiedzią komórkową polega na pojawieniu się u biorcy, na przykład wskutek infekcji wirusowej, limfocytów T pamięci wyposażonych w TCR niespecyficznie wiążące określone peptydy prezentowane przez allogeniczne cząsteczki HLA, często reprezentujące niezgodność alleliczną lub antygenową. W 1994 w roku Burrows i wsp. [12] po raz pierwszy zademonstrowali, badaną później między innymi przez d'Orsogna i wsp [13], podwójną specyficzność klonów limfocytów T pobranych od pacjenta z wirusem Epstein-Barr (EBV, *Epstein-Barr virus*) prezentującego peptydy wirusowe FLRGRAYGL przy udziale HLA-B8. Komórki te ulegały ponownej aktywacji *in vitro* w kontakcie z tym samym peptydem prezentowanym przez HLA-B*44:02. Oprócz alloreaktywnych limfocytów T istnieje zjawisko alloreaktywności, w którym biorą udział komórki NK. De Santis i wsp. [14] opisali algorytm postępowania diagnostycznego umożliwiającego detekcję alloreaktywnych komórek NK oparty na zastosowaniu cytometrii przepływowej. Opracowana metodyka umożliwia detekcję ekspresji białka CD107a jako swoistego markera degranulacji limfocytów wielokrotnie wykorzystywanego przez innych badaczy, między innymi w pracy przeglądowej Bharadwaj i wsp. [15] z 2012 roku, w której opisano metody oznaczania alloreaktywnych limfocytów T pod kątem ryzyka wystąpienia GvHD.

Rola komórek NK

Komórki NK mają przede wszystkim zdolność do atakowania i unieszkodliwiania komórek nowotworowych oraz komórek prezentujących antygeny wirusowe, a ich potencjał terapeutyczny jest wykorzystywany w przeciwdziałaniu wznowie białaczkowej oraz GvHD w procedurach niemieloablacyjnych [16]. Komórki NK są wyposażone w receptory inhibitorowe CD94/NKG2A i aktywujące Nkp30, Nkp44, Nkp46, CD16 oraz należące do obu grup receptory KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*). Reaktywność komórek NK jest uwarunkowana przede wszystkim istnieniem receptorów aktywujących, rozpoznających antygeny prezentowane na komórkach transformowanych oraz hamowaniem aktywacji dojrzewających komórek NK w szpiku za pomocą receptorów inhibitorowych biorących również udział w procesie zwanym licencjonowaniem komórek NK [17]. Kluczowa jest także zdolność receptorów z grupy KIR do rozpoznawania epitopów wspólnych dla różnych alleli należących do grup HLA-B oraz HLA-C. Wszystkie cząsteczki HLA-C można podzielić na dwie grupy na podstawie analizy polimorfizmu występującego w kodonie 80. Wyróżnia się dwie grupy alleli — C1 oraz C2 — zawierające w tym miejscu, odpowiednio, argininę rozpoznawaną przez KIR2DL2 i KIR2DL3 oraz lizynę rozpoznawaną przez KIR2DL1. Cząsteczki HLA-B dzieli się na grupy Bw4 oraz Bw6 w zależności od sekwencji między kodonami 77 a 83. Kompleksy MHC-peptyd tworzone przez cząsteczki HLA zawierające epitopy należące do Bw4 stanowią ligand dla KIR3DL1 i są kodowane zarówno w *locus* A, jak i w *locus* B [9, 14]. Jeśli znana jest niezgodność antygenowa między dawcą a biorcą w obrębie grup C1, C2 i/lub Bw4, to oddziaływanie hamujące aktywację komórek NK dawcy u biorcy po przeszczepieniu powinno się móc z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć, pod warunkiem uwzględnienia zjawisk manifestujących się, na przykład, brakiem specyficznego oddziaływania między receptorem KIR3DL1 a epitopem Bw4 obecnym na antygenie B13 [18], istnieniem oddziaływań między receptorami KIR2DL2 oraz KIR2DL3 a grupą C2 [19–21], a także zjawiska występowania komórek NK, które nie podlegają licencjonowaniu i są słabo reaktywne. Do wystąpienia alloreaktywnej odpowiedzi potrzebna jest przede wszystkim sygnalizacja wywodząca się z receptorów aktywujących, które ulegają indukcji tylko w kontakcie z antygenami prezentowanymi na komórkach nowotworowych i zakażonych przez wirusa, które niekoniecznie muszą być prezento-

wane na komórkach biorcy niezgodnego w zakresie układu HLA, a mogą ulegać ekspresji u biorcy nawet całkowicie zgodnego w zakresie układu HLA z dawcą [17]. Zgodnie z de Santis i wsp. [14] częstość występowania alloreaktywności wśród komórek NK rozpoznających HLA z grup C2, C1 i Bw4 wyniosła, odpowiednio, 6%, 10% oraz 2%. Dodatkowo w pracy tej potwierdzono wcześniejsze obserwacje dotyczące braku u dawców Bw4+ komórek NK wyposażonych w receptory KIR3DL1, które ulegałyby degranulacji w obecności APC Bw4– [14].

Rekombinacja V(D)J a homologia zjawisk krzyżowej odpowiedzi komórkowej i humoralnej

Oprócz alloreaktywności związanej z odpowiedzią komórkową istnieje podobny mechanizm wynikający z reaktywności krzyżowej przeciwciał produkowanych, na przykład, w odpowiedzi na pojawienie się u biorcy przeszczepu allogenicznego komórek dawcy zawierających tak zwane publiczne epitopy [1]. Podobne obserwacje dotyczące alloreaktywności pochodzącej z odpowiedzi komórkowej i humoralnej wynikają z podobieństwa budowy i funkcji części zmiennej cząsteczki immunoglobulinowej i TCR oraz identycznego procesu ekspresji i rearanzacji kodujących je genów. Podobnie jak w przypadku łańcuchów lekkich i ciężkich przeciwciał do poszczególnych części funkcjonalnego białka TCR można zaliczyć, odpowiednio, łańcuchy α i β (rzadziej γ i δ , a wyjątkowo γ i γ , β i β oraz β i δ) kodowane przez geny homologiczne z immunoglobulinowymi, N-końcowe części zmienne V, C-końcowe części stałe C oraz części łącznikowe J (rozdzielone fragmentami D w *locus* β). Ponadto między tymi fragmentami występują regiony sekwencji sygnałowej rekombinacji (RSS, *recombination signal sequences*), do których przyłączają się te same co w przypadku immunoglobulinowych *loci* enzymy sterujące procesem ich rearanzacji oraz te same co w przypadku genów immunoglobulinowych insercje P i N katalizowane przez końcową transferazę deoksynukleotydylową (TdT, *terminal deoxynucleotidyl transferase*) w miejscu występowania złączeń genów V, D i J [22]. Homologiczne jest również miejsce dopasowania receptora do antygeny, które tworzy domena hiperzmienna CDR3 powstająca w wyniku fuzji genów D oraz J, a pozostałe regiony, tj. CDR1 (*complementarity-determining region 1*) i CDR2 (*complementarity-determining region 2*), tak jak w przypadku immunoglobulin, są kodowane przez część zmienną V. Finalnie zarówno TCR, jak

i przeciwiła tworzą unikatową dla danego klonu, odpowiednio, limfocytów B i T kombinację produktów rearanzacji V(D)J specyficznie wiążących antygeny w postaci peptydów prezentowanych przy udziale ściśle określonej cząsteczki HLA. Ponadto procesy te mogą być różnicowane przez polimorfizmy genów kodujących te homologiczne cząsteczki, a zmienność ta warunkuje występowanie szerokiego repertuaru odpowiedzi immunologicznej.

Alloreaktywność indukowana infekcjami wirusowymi

W przypadku infekcji wirusowej u osoby, która wcześniej wykazywała objawy zarażenia innym wirusem specyficznie rozpoznawanym przez ten sam TCR, zmienny repertuar odpowiedzi komórkowej ulega redukcji wskutek aktywacji komórek wykazujących reaktywność krzyżową w stosunku do wąskiego zakresu epitopów wirusowych wspólnych dla obu wirusów oraz supresji odpowiedzi komórek niewykazujących w stosunku do nich reaktywności krzyżowej [4, 23, 24]. Związane z tym zawężenie lub zmiana repertuaru odpowiedzi immunologicznej może prowadzić do zwiększenia lub zmniejszenia się reaktywności krzyżowej limfocytów na inny, niemożliwy do przewidzenia czynnik immunogeny, co w kontekście przeszczepienia może prowadzić do komplikacji.

Doniesienia z opublikowanej w czasopiśmie „Blood” w 2010 roku pracy Amir i wsp. [25] na temat łatwiejszej niż w przypadku komórek naiwnych aktywacji alloreaktywnej odpowiedzi komórek pamięci oraz eksperymenty opisane w pracach Selin i wsp. [4], w ramach których u pacjentów wielokrotnie narażonych na kontakt z heterologicznymi peptydami wirusowymi zawierającymi publiczne epitopy wykazano przewagę komórek o zawężonym repertuarze TCR, mogą pomóc wyjaśnić patogenezę takich powikłań, jak GvHD czy HvG [4, 11, 25]. Gdy w przypadku infekcji wirusowej, na przykład u biorcy niezgodnego w zakresie układu HLA w stosunku do dawcy, pojawią się limfocyty T efektorowe zawierające TCR skierowane specyficznie przeciwko określonemu peptydowi wirusa, to może się okazać, że te same receptory wykażą powinowactwo do komórek zawierających niezgodność w układzie HLA. Analogiczna sytuacja może wystąpić w przypadku dawcy zimmunizowanego lub, na przykład, po zastosowaniu terapii immunoadoptywnej w postaci komórek zawierających niezgodność w układzie HLA, które spowodują odpowiedź specyficzną zarówno w stosunku do komórek prezentujących antygen wirusowy, jak i do

zdrowych APC w kompleksie peptyd własny–HLA autogeniczne lub peptyd własny–HLA allogeniczne (w tym np. komórek przeszczepionych), wskutek czego może dojść, odpowiednio, do GvHD lub HvG i zjawiska gospodarz przeciwko białaczce (HvL, *host versus leukemia*) [25]. Ponadto podprogowy stan pobudzenia hamujący przejście limfocytów T naiwnych w stan anergii zależny od liczby APC może w stanach limfopenii lub podczas odbudowy układu immunologicznego stanowić wystarczający bodziec aktywujący proliferację limfocytów T pamięci wyposażonych w receptory krzyżowo reaktywne w stosunku do własnych antygenów [26]. W przypadku braku komórek pamięci specyficznie reagujących na dany alloantygen do wywołania u biorcy wyżej opisanej odpowiedzi immunologicznej opartej na komórkowej alloreaktywności niezbędna jest infekcja wirusowa. Zależność ta polega na mechanizmie kostymulacji komórek naiwnych związanej z jednoczesną ligacją cząsteczek CD80/CD86 obecnych na APC i limfocytach B z cząsteczkami CD28 obecnymi na limfocytach CD4 lub CD8 oraz aktywacją białek sygnałowych wywołaną prezentacją antygeny wirusowego alloreaktywnym limfocytom T za pośrednictwem komórek APC oraz limfocytów B [13].

Podsumowując, można założyć, że wskutek współistnienia pięciu zjawisk warunkujących alloreaktywność, opisanych w pracy Yiyuan i wsp. [3], oraz wspólnego repertuaru fragmentów CDR3, opisanego w pracy Selin i wsp. [4], w wyniku infekcji wirusowej może dochodzić do przechylenia się profilu specyficzności odpowiedzi komórkowej u biorcy w stronę aktywacji limfocytów T alloreaktywnych wykazujących powinowactwo do allogenicznych cząsteczek HLA dawcy lub, w przypadku GvHD, antygenów biorcy.

W pracy autorstwa Amir i wsp. [25] podjęto próbę wyjaśnienia przyczyn GvHD na podstawie hipotezy, zgodnie z którą u pacjentów heterozygotycznych w układzie HLA po zastosowaniu komórek prezentujących antygen aktywujący alloreaktywność, na przykład w stosunku do określonego allelu HLA prezentującego peptyd wirusowy, może dojść do dodatkowej reakcji krzyżowej w stosunku do drugiego allelu z danej pary, a tym samym — do zaatakowania zdrowych komórek, które nie wymagają reakcji ze strony układu immunologicznego. Podobnie w przypadku przeszczepień haploidentycznych i przeszczepień krwiotwórczych komórek macierzystych niezgodnych w układzie klasycznych *loci* HLA wśród alloreaktywnych limfocytów CD8+ i CD4+ mogą znaleźć się takie, które będą reaktywne zarówno w stosunku do HLA autogenicznych prezentujących peptydy

wirusa, jak i w stosunku do komórek zawierających niezgodny haplotyp, *locus* lub allel [25]. Wskutek tej aktywacji może dojść zarówno do odrzucenia przeszczepu, jak i GvHD, w związku z czym autor sugeruje, że w badaniu powinno się wykluczyć lub potwierdzić alloreaktywność za pomocą badania przesiewowego alloreaktywnych, wirusowo-specyficznych limfocytów T dawcy w stosunku do komórek z kożuszka leukocytarnego biorcy lub, gdy znana jest niezgodność w układzie HLA między dawcą a biorcą, za pomocą transfekowanych komórek prezentujących pojedynczy antygen (SAL, *single antigen expressing lines*) linii K562 [27].

W pracy d'Orsogny i wsp. [28] opublikowanej w czasopiśmie „Tissue Antigens” w 2009 roku opisano badanie z wykorzystaniem dwóch linii komórek SAL (K562) różniących się allelicznie w *locus* B dwóch różnych alleli HLA-B w celu określenia wielkości zjawiska występowania klonalnej reaktywności krzyżowej pochodzącej od tego samego TCR. Przeprowadzono analizę zależności między prezentacją antygeny przy udziale cząsteczki HLA B*44:02 a występowaniem cytotoksycznej odpowiedzi krzyżowej tych samych limfocytów na obecność peptydu EBV prezentowanego przez HLA-B8. Doświadczenie dowiodło, że stymulacja limfocytów T pamięci za pomocą immunodominującego peptydu wirusowego prezentowanego na cząsteczce HLA-B*08:01 jest w stanie wzbudzić odpowiedź krzyżową przeciwko alloantypowemu na cząsteczce HLA-B*44 [28]. Udowodniono również, że w zjawisku restrikcji HLA-B*44:02 w prezentacji allogenicznego peptydu komórkom CD8+ rozpoznającym immunodominujący peptyd EBNA3A prezentowany na cząsteczce HLA-B8 biorą udział komórki reaktywne w stosunku do alloantypów prezentowanych na cząsteczkach HLA-B*55:01. W pracy opublikowanej w czasopiśmie „Transplant Immunology” w 2010 roku [13] ten sam autor sugeruje istnienie zjawiska mimikry molekularnej warunkującej wcześniej opisaną alloreaktywność komórek EBV-EBNA3A-specyficznych oraz wyklucza możliwość przewidzenia specyficzności alloreaktywności w wyniku innych infekcji ze względu na istnienie zwykle niższej niż w przypadku EBV immunodominacji alternatywnego peptydu biorącego udział w aktywacji limfocytów T. Ponadto są podane dwie hipotezy, zgodnie z którymi niezgodność B*44:02 (-) B*08:01 u biorcy nerki powinna się wiązać z niższym prawdopodobieństwem odrzutu, a niezgodność B*08:01 (-) B*44:02 u biorcy szpiku powinna powodować niższe prawdopodobieństwo GvHD i wyższe GvL. Na koniec autor sugeruje, że

zastosowanie komórek aktywowanych za pomocą wirusowo-specyficznych linii komórkowych może poprawić odbudowę układu immunologicznego i tym samym — przebieg leczenia przeciwwirusowego u pacjentów po zabiegach mieloablacyjnych lub z upośledzoną odpornością oraz opisuje ich możliwe zastosowanie w procesie doboru dawcy niespokrewnionego, przeszczepieniach haploidentycznych, monitorowania biorcy po przeszczepieniu i przygotowywaniu terapii za pomocą limfocytów T wirusowo specyficznych. W przypadku terapii immunoadoptywnej u zbadanych 73 biorców takich komórek nie zaobserwowano GvHD, jednak w tej grupie wszystkie pary dawca–biorca były zgodne 6 × 6. Ponadto podawane preparaty sprawdzano pod kątem efektu cytotoksycznego i odrzucano w przypadku większego niż 10 odsetka martwych blastów [28].

Podsumowanie

Zjawiska indukowanej zakażeniem wirusowym krzyżowej reaktywności immunokompetentnych komórek lub przeciwciał dawców i biorców allo-HSCT mogą stanowić istotny problem kliniczny. Zjawiska te z reguły uykają rutynowej diagnostyce przedprzeszczepowej. Badania alloreaktywności z wykorzystaniem linii komórkowych SAL oraz innych narzędzi umożliwiających potwierdzenie lub wykluczenie obecności limfocytów T alloreaktywnych w warunkach laboratoryjnych w praktyce nie są stosowane ze względu na krótki czas alokacji narządu i ograniczoną liczbę dostępnych zgodnych dawców krwiotwórczych komórek macierzystych. Zastosowanie, na przykład, transfekowanych komórek zawierających niezgodność w układzie HLA i badanie przesiewowe alloreaktywności za ich pomocą w obrębie linii wirusowo-specyficznych limfocytów T może służyć jedynie oszacowaniu ryzyka wystąpienia takich powikłań, jak GvHD, nie może natomiast być podstawą do podjęcia decyzji o poszukiwaniu nowego dawcy krwiotwórczych komórek macierzystych lub dyskwalifikacji biorcy narządu.

Piśmiennictwo

1. Yoshihara S, Taniguchi K, Ogawa H, et al. The role of HLA antibodies in allogeneic SCT: is the 'type-and-screen' strategy necessary not only for blood type but also for HLA? Bone Marrow Transplant. 2012; 47(12): 1499–1506, doi: [10.1038/bmt.2011.249](https://doi.org/10.1038/bmt.2011.249), indexed in Pubmed: [22231464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22231464/).
2. Kolasiński M. Udział pracowni typowania tkankowego w procedurze alokacji nerek pobranych od dawców zmarłych. In: Bogunia-Kubik K. ed. Badania immunogenetyczne w transplantologii i diagnostyce, praca zbiorowa. I-BIS S.C, Wrocław 2012: 58–65.

3. Yin Y, Mariuzza RA. The multiple mechanisms of T-cell receptor cross-reactivity. *Immunity*. 2009; 31(6): 849–851, doi: [10.1016/j.immuni.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.12.002), indexed in Pubmed: 20064442.
4. Selin LK, Brehm MA. Frontiers in nephrology: heterologous immunity, T-cell cross-reactivity, and alloreactivity. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(8): 2268–2277, doi: [10.1681/ASN.2007030295](https://doi.org/10.1681/ASN.2007030295), indexed in Pubmed: 17634431.
5. Geneugelijck K, Thus KA, Spierings E. Predicting alloreactivity in transplantation. *J Immunol Res*. 2014; 2014: 159479, doi: [10.1155/2014/159479](https://doi.org/10.1155/2014/159479), indexed in Pubmed: 24868561.
6. Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, et al. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant*. 2012; 2012: 842141, doi: [10.1155/2012/842141](https://doi.org/10.1155/2012/842141), indexed in Pubmed: 22778908.
7. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. PWN, Warszawa 2012.
8. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med*. 2002; 8(6): 582–587, doi: [10.1038/nm0602-582](https://doi.org/10.1038/nm0602-582), indexed in Pubmed: 12042808.
9. Ślebioda, TJ, Kaszubowska L, Kmieć Z. Nowe mechanizmy aktywacji komórek NK w przebiegu infekcji wirusowych. *Post Biol Komórki*. 2012; 39: 61–83.
10. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010; 135(1): 1–11, doi: [10.1016/j.clim.2009.12.004](https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004), indexed in Pubmed: 20116332.
11. Vukmanovic S, Petroff M, Stevens A, et al. Alloreactivity-based medical conditions. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 1–2, doi: [10.1155/2013/567084](https://doi.org/10.1155/2013/567084).
12. Burrows SR, Khanna R, Burrows JM, et al. An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1994; 179(4): 1155–1161, doi: [10.1084/jem.179.4.1155](https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1155), indexed in Pubmed: 7511682.
13. D'Orsogna LJA, Roelen DL, Doxiadis IIN, et al. Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol*. 2010; 23(4): 149–155, doi: [10.1016/j.trim.2010.06.008](https://doi.org/10.1016/j.trim.2010.06.008), indexed in Pubmed: 20600900.
14. De Santis D, Foley BA, John E, et al. Rapid, flow cytometric assay for NK alloreactivity reveals exceptions to rules governing alloreactivity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16(2): 179–191, doi: [10.1016/j.bbmt.2009.10.026](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.026), indexed in Pubmed: 19879950.
15. Bharadwaj M, Mifsud NA, McCluskey J. Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods Mol Biol*. 2012; 882: 309–337, doi: [10.1007/978-1-61779-842-9_18](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_18), indexed in Pubmed: 22665242.
16. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295(5562): 2097–2100, doi: [10.1126/science.1068440](https://doi.org/10.1126/science.1068440), indexed in Pubmed: 11896281.
17. Moretta A, Pende D, Locatelli F, et al. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 2009; 157(3): 325–331, doi: [10.1111/j.1365-2249.2009.03983.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03983.x), indexed in Pubmed: 19664139.
18. Foley BA, De Santis D, Van Beelen E, et al. The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood*. 2008; 112(2): 435–443, doi: [10.1182/blood-2008-01-132902](https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132902), indexed in Pubmed: 18385451.
19. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, et al. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol*. 1998; 161(2): 571–577, indexed in Pubmed: 9670929.
20. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, et al. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol*. 2008; 180(6): 3969–3979, doi: [10.4049/jimmunol.180.6.3969](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3969), indexed in Pubmed: 18322206.
21. Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009; 113(13): 3119–3129, doi: [10.1182/blood-2008-06-164103](https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-164103), indexed in Pubmed: 18945967.
22. Janeway CA, Travers J, Walport M, Shlomchik MJ. *T-cell receptor gene rearrangement*. In: *The immune system in health and disease*. 5th edition. Garland Publishing, New York 2001.
23. Cornberg M, Chen AT, Wilkinson LA, et al. Narrowed TCR repertoire and viral escape as a consequence of heterologous immunity. *J Clin Invest*. 2006; 116(5): 1443–1456, doi: [10.1172/JCI27804](https://doi.org/10.1172/JCI27804), indexed in Pubmed: 16614754.
24. Brehm M, Pinto A, Daniels K, et al. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol*. 2002; 3(7): 627–634, doi: [10.1038/ni806](https://doi.org/10.1038/ni806), indexed in Pubmed: 12055626.
25. Amir AL, D'Orsogna L, Roelen DL, et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T-cells is common. *Blood*. 2010; 115(15): 3146–3157, doi: [10.1182/blood-2009-07-234906](https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234906), indexed in Pubmed: 20160165.
26. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011; 12(6): 478–484, doi: [10.1038/ni.2018](https://doi.org/10.1038/ni.2018), indexed in Pubmed: 21739670.
27. D'Orsogna LJA, Roelen DL, Doxiadis IIN, et al. Screening of viral specific T-cell lines for HLA alloreactivity prior to adoptive immunotherapy may prevent GvHD. *Transpl Immunol*. 2011; 24(3): 141, doi: [10.1016/j.trim.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.trim.2010.12.001), indexed in Pubmed: 21167283.
28. D'Orsogna LJ, Amir AL, Zoet YM, et al. New tools to monitor the impact of viral infection on the alloreactive T-cell repertoire. *Tissue Antigens*. 2009; 74(4): 290–297, doi: [10.1111/j.1399-0039.2009.01311.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01311.x), indexed in Pubmed: 19624615.