

Nowe obserwacje dotyczące immunobiologii granulocytów w świetle doniesień XIII Europejskiego Sympozjum Immunobiologii Płytek i Granulocytów (3–6 lipca 2014, Bad Homburg, Niemcy)

New observations on granulocyte immunobiology presented during the
XIIIth European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology
(July 3–6th 2014, Bad Homburg, Germany)

Katarzyna Guz, Małgorzata Uhrynowska, Agnieszka Wróbel, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
w Warszawie

Duża część prezentowanych na sympozjum wykładów i doniesień dotyczyła swoistych antygenów granulocytów (HNA, *human granulocyte antigens*), ich nomenklatury i metod wykrywania przeciwciał do nich skierowanych. Przedstawiono także prace, w których opisano patomechanizmy udziału granulocytów w odpowiedzi immunologicznej, w tym najgroźniejszego obecnie powikłania poprzetoczeniowego, jakim jest ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (TRALI, *transfusion related acute lung injury*) oraz dowody uczestnictwa tych komórek w procesach zapalnych.

Zmiany w nomenklaturze antygenów HNA

Podczas sesji Grupy Roboczej ds. Immunobiologii Granulocytów dr Bridgette Flesch przedstawiła aktualną nomenklaturę antygenów HNA granulocytów [1]. Zasady nomenklatury zostały pierwotnie ustalone w roku 1998 przez Zespół ds. Nomenklatury Grupy Roboczej ds. Granulocytów Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (*Granulocyte Working Party ISBT*). Na przestrzeni lat poznane dotychczas antygeny zgrupowano w 5 systemów HNA. Ze względu na odkrycie nowych antygenów i alleli genu *FCGR3B* oraz ustalenie podłoża molekularnego antygeny HNA-3a

Komitet postanowił ponownie ogłosić zasady tworzenia nomenklatury HNA. Ustalono, że w nomenklaturze — jak dotąd — używa się oficjalnej nazwy genu, po niej wstawiana jest gwiazdka, a następnie dwucyfrowe określenie allelu. Uwzględniane są tylko mutacje w obrębie eksonów, prowadzące do zmian aminokwasów w białku. Nowe allele muszą być potwierdzone przez niezależne doniesienia poparte badaniami serologicznymi poświadczającymi obecność epitopów antygenowych. Nazwy alleli muszą być zgodne z nazwami rekomendowanymi przez *Human Genome Variation Society* (www.hgvs.org). Nazwy antygenów zawierają symbol układu antygenowego przypisany poszczególnym glikoproteinom, to jest HNA-1, HNA-2 itd. Epitopy/fenotypy danej glikoproteiny są oznaczane małymi literami, na przykład HNA-1a i HNA-1b itd.

Wymienione reguły spowodowały rewizję nazwy antygeny HNA-2a na HNA-2, gdyż udowodniono, że jest to izoantigen. Brak ekspresji HNA-2 wynika z różnych mechanizmów mutacji, a nie z obecności przeciwstawnego allelu genu kodującego glikoproteinę CD177. Zatwierdzono też 2 nowe allele w układzie HNA-1: *FCGR3B*04*, to jest wariant *FCGR3B*01 316(349)G>A*, tworzący receptor FcγRIIIb rozpoznawany przez przeciwciała anti-HNA-1a i *FCGR3B*05*, to jest wariant

Adres do korespondencji: dr n. przyr. Katarzyna Guz, Pracownia Genetyki Komórek Krwi i Chimeryzmu, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, tel.: 22 349 66 30, faks: 22 349 66 14, e-mail: kguz@ihit.waw.pl

*FCGR3B*02 244(277)A>G* z częściową utratą ekspresji epitopu HNA-1b (zmiana Asn82Asp), co u osób z takim wariantem może skutkować immunizacją wobec antygeny HNA-1b (udokumentowano taki przypadek konfliktu matczyno-płodowego). Oficjalnie do nomenklatury HNA włączono również niedawno opisany przez Reil i wsp. [2] antygen HNA-1d tworzony przez epitop Ala78-Asn82, który wydaje się być przeciwstawnym epitopem do antygeny HNA-1c, gdyż przeciwciała anty-HNA-1d nie reagują z receptorem FcγRIIIb o swoistości HNA-1c ani HNA-1a, rozpoznając jedynie swoistość HNA-1b. Obecnie nomenklatura HNA liczy 9 antygenów i 11 alleli pogrupowanych w 5 systemów.

W dalszej części wykładu Flesch rozważała znaczenie kliniczne zróżnicowania antygenów HNA-1. Przytoczyła wyniki badań, w których wykazano związek pomiędzy częstszą zachorowalnością na agresywną paradontozę u osób z allelem *FCGR3B*02*. Okazuje się, że neutrofile z ekspresją antygeny HNA-1b są mniej efektywne w niszczeniu bakterii opłaszczonych przeciwciałami niż neutrofile HNA-1a dodatnie. Z kolei neutrofile z ekspresją antygeny HNA-1a ulegają silniejszej aktywacji i mogą indukować procesy niszczenia własnych tkanek, na przykład obecność allelu *FCGR3B*01* jest czynnikiem ryzyka idiopatycznej fibrozy płuc. Za to obecność allelu *FCGR3B*03* może mieć znaczenie ochronne przed malarią, gdyż zdecydowanie częściej odnotowuje się go w populacjach endemicznych występowania malarii (aż 8,5% osób jest tam homozygotami w zakresie tego allelu). Znaczenie kliniczne może też mieć kopijność genu *FCGR3B*. Obecnie uważa się, że liczba kopii tego genu może się wahać pomiędzy 0 a 4. Początkowe założenia o jego bialleliczności i determinowaniu przeciwstawnych antygenów HNA-1a i HNA-1b zostało szybko podważone odkryciem trzeciego allelu *FCGR3B*03*, kodującego antygen HNA-1c, który często występuje w sprzężeniu z allelem *FCGR3B*01*, **02* lub **04*. U niektórych osób występuje też całkowita delecja genu *FCGR3B*. Wśród osób z mniej niż 2 kopiami genu *FCGR3B* występuje wzrost ryzyka chorób autoimmunologicznych, między innymi reumatoidalnego zapalenia stawów i tocznia układowego. Prawdopodobnie patomechanizm tych chorób wynika z niskiej ekspresji receptora FcγRIIIb, co osłabia wiązanie się neutrofilii do kompleksów immunologicznych i redukuje proces usuwania tych kompleksów, dlatego stężenie patologicznych autoprzeciwciał jest tak wysokie. Ponadto delecja genu *FCGR3B* pociąga za sobą uszkodzenie regulatorowej sek-

wencji 5' genu *FCGR2C* i sekwencji kodującej genu *FCGR2B*, innych genów odpowiedzialnych za ekspresję receptorów z rodziny FcγR dla fragmentów Fc immunoglobulin. Udokumentowano wyższą, bo aż 2-procentową częstość genotypu HNA-1 null u osób z chorobami autoimmunologicznymi w porównaniu z 0,1-procentową częstością tego genotypu u osób zdrowych.

Nowe aspekty udziału granulocytów w procesach zapalnych

W trakcie pierwszej sesji dotyczącej granulocytów skupiono się na biologii tych komórek. Wiele prac miało charakter typowo naukowy, analizowano w nich między innymi przebieg procesów zapalnych. Są to prace ważne z punktu widzenia immunologii, na których łamach ustala się rolę biologiczną antygenów granulocytów, lecz ich wyniki zasadniczo nie mają implikacji praktycznych dla transfuzjologii. Nie można jednak wykluczyć, że te badania będą mogły wskazać, na przykład, na możliwości zapobiegania takim immunologicznym powikłaniom jak TRALI.

Bieber i wsp. [3] prezentowali wyniki badań nad regulacją udziału neutrofilii w procesach zapalnych przez limfocyty T. Badania były przeprowadzone u myszy i dotyczyły mechanizmu pęcherzowego oddzielania się naskórka z powodu rozwoju choroby autoimmunologicznej, w której komórkami efektorowymi są neutrofile. Przeciwciała wiążą się do kolagenu typu VII, powodując wynaczynienie i aktywację neutrofilii. Na modelu myszy pozbawionych limfocytów T wykazano, że proces ten zależy od działania limfocytów T, ponieważ u takich myszy proces zapalny tkanek nie następuje, ale jest u nich inicjowany po wszczępieniu limfocytów T od zdrowych osobników.

Burg-Röderfeld i wsp. [4] przedstawili dane z eksperymentów świadczące o roli specyficznego antygeny NB1 (HNA-2) w procesie diapedezy, czyli przechodzenia neutrofilii przez warstwy śródbłonna tkanek. Antygen ten w połączeniu z proteazą PR3 stanowi receptor dla cząsteczki PECAM-1. Antygen NB1 jest konieczny dla ekspresji PR3 na powierzchni neutrofilii, wzmacnia aktywność proteolityczną PR3, stabilizuje interakcję PR3 z PECAM-1 i powoduje degradację VE-kadheryny pojawiającej się na połączeniach komórek endotelium. Te procesy proteolityczne wspomagają migrację neutrofilii podczas procesu zapalnego.

Zespół Bayat i wsp. [5] udokumentował wpływ peptydów bakteryjnych (fMLF) na wzmożoną ekspresję antygeny NB1, czego skutkiem jest z kolei ha-

mowanie migracji neutrofilii przez warstwy endotelium. Niekorzystne działanie wysokiego stężenia antygeny NB1 obniża ekspresję receptora PECAM-1, co indukuje akumulację neutrofilii na ścianach naczyń i prowadzi do niszczenia powierzchni endotelium. Te badania potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że ekspresja NB1 bardzo wzrasta w czasie sepsy bakteryjnej. Peptydy bakteryjne mają wpływ jedynie na subpopulację neutrofilii NB1 dodatnich, które migrują przez endotelium szybciej niż subpopulacja neutrofilii NB1 ujemnych, naturalnie współwystępujących u osób NB1 dodatnich. Sekwencjonowanie genu *NB1* u zdrowych dawców krwi zaowocowało odkryciem dimorfizmu -42C > G: homozygoty CC miały zdecydowanie więcej subpopulacji komórek NB1 dodatnich niż homozygoty GG. U pacjentów z sepsą zaobserwowano jeszcze wyższą częstość allelu -42C, więc autorzy sugerują znaczenie badania tego allelu jako potencjalnego czynnika ryzyka rozwoju sepsy.

Praca prezentowana przez Behnen i wsp. [6] dotyczyła tworzenia przez neutrofile zewnątrzkomórkowych pułapek (NET, *neutrophil extracellular trap*) w wyniku kontaktu komórek z unieruchomionymi kompleksami immunologicznymi. W procesie tym biorą udział cząsteczki receptora FcγRIIIb i adhezyny Mac-1. Pułapki te mogą odgrywać rolę w patofizjologii chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym, ponieważ patogenne kompleksy immunologiczne tworzą się z macierzy zewnątrzkomórkowej i tam są unieruchamiane. W prezentowanej pracy neutrofile inkubowano na unieruchomionych kompleksach HSA/anty-HSA (w skrócie zwanymi iIC) i oceniano ich zdolność do produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) oraz tworzenia zewnątrzkomórkowych siatek. Zaobserwowano, że kontakt ludzkich neutrofilii z iIC indukuje wytwarzanie pułapek NET, a do tego procesu konieczne jest uwalnianie wolnych rodników przez oksydazę NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) i mieloperoksydazę. Traktowanie komórek swoistymi inhibitorami tych procesów hamowało wytwarzanie pułapek NET. Badania przy użyciu przeciwciał blokujących wymienione procesy wykazały, że wybuch tlenowy zależy od stymulacji receptorów FcγRIIa i FcγRIIIb na neutrofilach, a uwalnianie NET zachodzi za pośrednictwem FcγRIIIb.

Patomechanizm TRALI i innych neutropenii immunologicznych

W sesji poświęconej TRALI interesujące wyniki badań zaprezentował zespół Bayat i wsp. [7],

który analizował model zwierzęcy TRALI indukowany przeciwciałami anti-HNA-3a. Wiadomo, że przeciwciała anti-HNA-3a powodują silną aglutynację granulocytów obojętnochłonnych, którą można wykryć przy zastosowaniu testu GAT (*granulocyte agglutination test*). Do tej pory uważano, że właśnie tworzenie agregatów granulocytów odgrywa kluczową rolę w patomechanizmie TRALI wywołanego przeciwciałami anti-HNA-3a, często kończącego się śmiercią. Obserwowana w teście GAT agregacja *in vitro* neutrofilii przez przeciwciała anti-HNA-3a jest uzależniona od obecności w środowisku reakcji czynnika von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*) i może być hamowana przez inhibitor staurosporyny (PKC inhibitor), a także przez przeciwciało monoklonalne skierowane do domeny A1-domain. Przeciwciała anti-HNA-3a skierowane są do epitopu mieszczącego się na białku CTL-2 (*choline transporter like protein-2*) i wiążą się z izoformą Arg154 tego białka. Białko CRL-2 występuje na wielu komórkach krwi — nie tylko na granulocytach obojętnochłonnych, ale także na płytkach krwi i komórkach endotelium. Autorzy prezentowanej pracy wykazali, że anti-HNA-3a wiążą się do CTL-2, który ulega interakcji z vWF i aktywuje integrynę CD11b/CD18 neutrofilii poprzez drogę zależną od PKC. Ten proces prowadzi do tworzenia agregatów i aktywacji neutrofilii. Badania autorów wskazują jednak, że alloprzeciwciała anti-HNA-3a, wiążąc się do mysich i ludzkich komórek endotelialnych, mogą powodować zaburzenia nawet przy braku granulocytów obojętnochłonnych. Stwierdzono, że w wyniku ich połączenia z białkiem CRL-2 na komórkach endotelium następuje produkcja wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*), które powodują przemieszczanie się endotelialnych kadheryn. Podanie myszom pozbawionym granulocytów przeciwciał anti-HNA-3a spowodowało wystąpienie TRALI. Efekt wywoływania TRALI poprzez przeciwciała anti-HNA-3a uzyskiwano też u myszy pozbawionych vWF. Prezentowane wyniki badań *in vitro* i na mysich modelach TRALI wykazały, że agregacja neutrofilii nie jest niezbędna do wywołania efektu TRALI. Otrzymane wyniki niezbicie wskazują, że wiązanie przeciwciał anti-HNA-3a do komórek endotelium leży u podłoża TRALI indukowanego tymi przeciwciałami. Ewentualne działania prewencyjne lub lecznicze TRALI powinny być zatem skierowane na stabilizację endotelium płuc.

McKenzie i wsp. [8] także badali mechanizm TRALI na modelu mysim. Skoncentrowali się na ocenie roli regionów F(ab')₂ i regionu Fc immunoglobulin w TRALI zależnym od przeciwciał

klasy IgG skierowanych do antygenów MHC klasy I. Stwierdzili, że F(ab')₂ tych przeciwciał istotnie zwiększa stężenie chemoatraktantu MIP-2 granulocytów obojętnochłonnych w porównaniu z regionem Fc. Mimo zwiększonego stężenia liczba granulocytów w płucach była jedynie nieznacznie podwyższona; nie obserwowano obrzęku płuc i nie występowała śmierć myszy. Fragmenty Fc nie powodowały natomiast zmian wymienionych parametrów. Indukowanie TRALI pełnymi cząsteczkami przeciwciał było całkowicie zniesione po deplecji monocytów chlorkiem gadolinu (GdCl₃) lub w wyniku blokady chemokin przez agonistę receptora MIP-2. Efekt wywoływania TRALI przez przeciwciała był przywrócony po podaniu myszom oczyszczonych komórek CD14⁺ (monocytów). Otrzymane wyniki wskazują, że indukcja TRALI zachodzi dwuetapowo: w pierwszym etapie konieczne jest związanie przeciwciała z antygenem na krążących monocytach, co powoduje produkcję chemokin i rekrutację płucnych neutrofilów. Drugi etap prowadzony jest przez monocyty opłaszczone przeciwciałami, które inicjują niszczenie tkanek płuc poprzez działanie receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał klasy IgG.

Ciekawa i istotna z punktu widzenia praktycznego była praca Lucasa i wsp. [9], w której wskazano na udział przeciwciał anti-HNA-3a w niepowodzeniu przeszczepienia nerki od niespokrewnionego dawcy, zgodnego w 50% w antygenach HLA, u 56-letniej kobiety. W badaniach przed przeszczepieniem nie stwierdzono u chorej przeciwciał HLA klasy I i klasy II. Wykluczono też efekt „prozony”. Próba krzyżowa w teście LCT była negatywna, lecz w teście opartym na badaniach w cytometrze przepływowym z przystawką sortującą (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) — dodatnia, zarówno z limfocytami B, jak i T. Uznano, że kobieta ma przeciwciała nie-HLA powstałe w wyniku ciąży i przetoczenia krwi 21 lat przed transplantacją. Po przeszczepieniu stwierdzono opóźnienie w podejmowaniu funkcji nerki, a w 13. dniu rozpoczęło się odrzucanie przeszczepu. Pacjentkę leczono immunoglobuliną antytymocytarną i pięciokrotną transfuzją wymienną. Po roku filtracja wynosiła 19 ml/min. Pacjentka otrzymywała prednizolon, takrolimus i myfortic. Próba krzyżowa w FACS była zgodna i nie wykryto ani przeciwciał anti-HLA I, II, ani przeciwciał MICA i anti-B techniką Luminex. W dalszych badaniach za pomocą testu immunofluorescencji i chemiluminescencji z granulocytami o oznaczonych antygenach HNA ustalono, że chora ma przeciwciała do antygeny HNA-3a. Ich obecność i swoistość potwierdzono, stosując komórki

HEK293 produkujące rekombinowane antygeny (r) HNA-3a and (r)HNA-3b. Przeciwciała anti-HNA-3a wykryto zarówno w próbce przed transplantacją, jak i po niej. Genotypowanie wykazało, że pacjentka była *HNA-3b/3b*, a dawca nerki *HNA-3a/3a*. Również mąż pacjentki miał genotyp *HNA-3a/3a*, co potwierdza możliwość immunizacji w czasie ciąży; następuje to u około 7% kobiet ciężarnych. Autorzy pracy uważają, że u pacjentów, którzy przebyli transfuzję, oraz u pacjentek, które były w ciąży, powinno się wykonywać badanie przeciwciał do antygeny HNA-3a.

Celem doniesienia Yasui i wsp. [10] było określenie częstości występowania niedawno odkrytego antygeny HNA-1d u japońskich krwiodawców i ocena częstości występowania przeciwciał anti-HNA-1d u chorych z TRALI (3 przypadki) lub z neutropenią (18 przypadków). Częstość allelu odpowiedzialnego za ekspresję epitopu HNA-1d w japońskiej populacji wyniosła 3,8%. Przeciwciała anti-HNA-1d wykryto w 3 na 21 surowic — wszystkie pochodziły od pacjentów z neutropenią. Swoistość tych przeciwciał różniła się jednak od oryginalnego doniesienia Reil i wsp. [2], ponieważ wiązały się one do linii komórkowych wyrażających antygen HNA-1a, ale nie do HNA-1b jak w badaniach Reil. Te różnice w reaktywności krzyżowej autorzy tłumaczą tym, że badana przez nich surowica anti-HNA-1d rozpoznaje prawdopodobnie antygen podobny do HNA-1d, lecz nie ten sam, który odkryła Reil [2]. Ten epitop „HNA-1d-like” może być nowym antygenem układu HNA-1.

Piśmiennictwo

1. Flesch B. Report from the Nomenclature Subcommittee. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 10.
2. Reil A., Sachs U.J., Siahianidou T., Flesch B.K., Bux J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fcγ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion* 2013; 53: 2145–2151.
3. Bieber K., Witte M., Zillikens D., Ludwig R. T cells govern neutrophil-dependent inflammation. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 21.
4. Burg-Röderfeld M., Bayat B., Gisbrecht L., Chavakis T., Newman P.J., Santoso S. The role of NB1/PR3 complex as a heterophilic counter-receptor for endothelial PECAM-1 during diapedesis. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 21.
5. Bayat B., Santoso V., Burg-Röderfeld M., Sachs U.J., Rogler G., Kehrel B., Santoso S. Up-regulation of NB1 expression on neutrophils transendothelial migration: Impact in systemic inflammation? W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 21.
6. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Solbach W., Laskay T. Immobilized immune complexes induce neutrophil

- extracellular trap (NET) release via FcRIIIB and Mac-1. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 23.
7. Bayat B., Gisbrecht L., Weissmann N. i wsp. CTL-2 on endothelial and neutrophil: A new insight on TRALI mechanism. XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 22.
 8. McKenzie C., Kim M., Singh T., Milev Y., Semple J. Peripheral blood monocyte-derived chemokine blockade prevents murine antibody-mediated transfusion-related acute lung injury (TRALI). W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 23.
 9. Lucas G., Day S., Parsons J. i wsp. HNA-3a antibodies: a potential factor in delayed renal function and vascular rejection following kidney transplantation? W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 23.
 10. Yasui K., Amakishi E., Matsuyama N. i wsp. Detection of alloantibodies against HNA-1d-like antigen in sera from neutropenia patients. W: XIII European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology. 2014: 24.