

Gabriel Turowski, Anna Kędzierska

Antygeny HLA klasy I nieklasycznych układów (HLA-Ib)

HLA class I antigens of nonclassical systems (HLA-Ib)

Samodzielna Pracownia Immunologii Klinicznej, Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Antygeny nieklasycznych układów HLA klasy I (HLA-Ib) ze względu na swą charakterystyczną ekspresję i molekularne techniki ich typowania wzbudzają zrozumiałe zainteresowania immunogenetyków i klinicystów. Aktualna wiedza na ich temat - ze względu na późne ich odkrycie - jest nie wystarczająca w krajowym piśmiennictwie.

HLA class I antigens of nonclassical systems (HLA-Ib) arouse great interest of immunogeneticists and clinicians due to their characteristic expression and molecular typing techniques. Current knowledge about the nonclassical HLA class I antigens, due to their late exploration, is inadequate in the national literature.

Słowa kluczowe: układ HLA, MHC, nieklasyczne antygeny HLA klasy I (HLA-Ib)

Key words: HLA system, MHC, nonclassical HLA class I antigens (HLA-Ib)

Dwudziestolecie intensywnych badań nad układem HLA człowieka, głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC, uwieńczone zostało opracowaniami monograficznymi i podręcznikowymi. Obejmowały one głównie strukturę i polimorfizm warunkowanych antygenów i ich hapiotypów, zagadnienia genetyki populacyjnej, określeń współzależności z odziedziczeniem charakterystycznych antygenów w poszczególnych jednostkach chorobowych wraz z oszacowaniem względnego ryzyka zachorowania. Oddzielną grupą tematyczną w zakresie badań nad układem HLA stanowią nadal problemy związane z funkcją immunogenetyczną a także z rolą i znaczeniem rozpuszczalnych postaci antygenów HLA, obecnych w płynach ustrojowych.

Równolegle do zainteresowań antygenami HLA klasy I i klasy II wraz z wprowadzeniem technik biologii molekularnej podjęte zostały badania nad nieklasycznymi układami HLA klasy I (HLA-Ib). Pod koniec lat osiemdziesiątych,

w opublikowanych pracach, wykazano, że wszystkie trzy nieklasyczne geny rejonu MHC klasy I, a mianowicie HLA-E, HLA-F i HLA-G są wysoce homologiczne w stosunku do genów kodujących klasyczne antygeny układu zgodności tkankowej, warunkowane przez geny loci HLA-A, HLA-B i HLA-C, oznaczonych jako HLA-Ia. Geny loci HLA-E, F i G zdaniem Alizadeh i in. (2) oraz Grimsley i Ober (12) cechuje nie tylko brak względnie niski stopień polimorfizmu ale ograniczona ekspresja dla niektórych ich produktów. Z badań sekwencji nukleotydowych produktów genowych HLA-E, F i G wynika również, że są one zdolne do podstawowej funkcji antygenów HLA, jakim jest prezentacja peptydów. Wśród genów warunkujących „nieklasyczne” zostały także poznane loci pseudogenów HLA-H, HLA-J, HLA-K oraz HLA-L powstałe na skutek mutacji lub częściowej delecji genów (15).

W 1990 roku Wei i Orr (31) w przeprowadzonych badaniach wykazali obecność genu **HLA-E** w ludzkim łożysku, aczkolwiek nie zlokalizowano transkryptów tego genu *in situ*. Boucraut i in. (7) w 1993 roku opisali wyniki swych doświadczeń, z których wynikało, że HLA-E był jedynym aktywnym transkrypcyjnie genem MHC klasy I w ludzkich, wywodzących się z trofoblastu, komórkowych liniach kosmówkowego nabłonika złośliwego (JAR). Przy zastosowaniu techniki slot-blotting z użyciem mRNA wyosobnionego z ludzkich linii komórkowych oraz tkanek różnego pochodzenia umożliwiło autorom wykazanie obecności transkryptów HLA-E we wszystkich limfoidalnych i nielimfoidalnych tkankach i liniach komórkowych. Na uwagę zasługuje fakt, że liczba stwierdzanych transkryptów HLA-E była różna w poszczególnych badanych liniach komórkowych. Najwyższy ich poziom obserwowano w spoczynkowych limfocytach B oraz w aktywowanych limfocytach T.

Uzyskane przez zespół Boucraut (7) wyniki sugerują jednoznacznie, iż gen HLA-E podlega „wszędobylskiej ekspresji” i to właśnie odróżnia go od innych nieklasycznych genów HLA klasy I. Czy fakt ten może sugerować odmienną od pozostałych funkcję biologiczną produktów genu HLA-E. Istotnie ważną była obserwacja, że rejon genu HLA-E nie podlega metylacji, jako jednego z czynników regulujących ekspresję genów u eukariotów. Metylacja bowiem dotyczy cytozyn w pozycji 5'. Modyfikacje chromatyny w rejonach aktywnych transkrypcyjnie dotyczą nie tylko składników białkowych lecz również DNA. Wyniki tych badań wskazują także na fakt, że chromatyna HLA-E nigdy nie podlegała modyfikacji poprzez metylację oraz, że stan niemetylacji był utrzymywany w trakcie ewolucji.

Chromosomalny region HLA-E obejmuje gen (geny), których ekspresja jest prawdopodobnie niezbędna dla przeżycia komórki i pozostaje to w ścisłej zależności z brakiem metylacji cytozyny w sekwencjach zawierających dwunukleotyd -CpG-

Z przeprowadzonych przez Liano i in. (19) oraz Navarro i in. (22) badań wynika, że cząsteczki HLA-E pełnią funkcję naturalnych ligandów dla lektynopodobnych receptorów, określanymi jako CD94/NKG2, cytotoksycznych limfocytów NK. Nieklasyczna cząsteczka HLA-E jest swoiście rozpoznawana przez kompleks receptora CD94/NKG2 i wydaje się być głównym, jak nie jedynym ligandem dla tego lektynowego receptora. Powierzchniowa ekspresja

cząsteczek HLA-E natomiast uzależniona była od związania ich przez łańcuch alfa peptydów TAP-zależnych, pochodzących z pojedynczych sekwencji HLA klasy I z dominującymi resztami kotwiczymi w pozycjach 2 i 9. Niewyjaśnionym nadal pozostaje zjawisko w jaki sposób struktura kompleksu cząsteczek HLA-E i peptydów oddziałują na receptor hamujący CD94/NKG2A oraz receptor aktywujący CD94/NKG2C związany z postacią rozpuszczalnych cząsteczek HLA-E.

HLA-F jako nieklasyczna cząsteczka MHC klasy I wykazuje ekspresję ograniczoną do limfocytów B, spoczynkowych limfocytów T oraz komórek skóry (21). Funkcja biologiczna produktów genu HLA-F pozostaje nadal niewyjaśniona. W badaniach Kunishima i in. (17) z roku 1999 wykazali istnienie w populacji japońskiej kilku genetycznych odmian genu HLA-F 1243G w egzonach 2 i 3. W analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA stwierdzono wśród poddanych badaniu 50 zdrowych osób heterozygot dla 1243C/G a 40 homozygot dla 1243G. Wykazano ponadto, że istnieje odchylenie od równowagi w wyniku sprzężenia między HLA-A31(19) a HLA-F 1243G. O istnieniu „niemych” (nuli) alleli HLA-F w populacji japońskiej podali w 1997 roku Uchigiri i in. (28). Jak dotąd stopień polimorfizmu locus HLA-F w innych grupach etnicznych jest nieznany.

Gen HLA-H został po raz pierwszy opisany przez Federa i in. (9) w roku 1996. W obrębie locus HLA-H wykazano istnienie dwuallelicznego polimorfizmu oraz obserwowano, że gen HLA-H pozostaje w odchyleniu od równowagi w wyniku sprzężenia z dwoma mutacjami 845 G - A (845A; Cys282Tyr) i 187 C - G (His63Asp) zachodzącymi w jego obrębie. Feder i in. (9) wskazują na bardzo wysoki zasięg mutacji 845 A (C282Y) w genie HLA-H u chorych z hemochromatozą. Bezsparnie stwierdzono, że zachodzące w genie HLA-H mutacje są silnie sprzężone z występowaniem u osób rasy białej dziedzicznej hemochromatozy (HH). Jest to choroba o autosomalnym, recesywnym sposobie dziedziczenia, występująca u homozygot z częstością około 0,005 (0,0045-0,002), natomiast u heterozygot z częstością 0,08-0,13 (1, 10, 15). Chorobę cechują zaburzenia w absorpcji żelaza w jelitach, gromadzenie się dużych ilości tego pierwiastka w komórkach mięszowych wątroby w stanach marskości narządu, w cukrzycy, chorobie serca oraz w artropatiach. To nadmierne gromadzenie się żelaza w komórkach prowadzi do ich uszkodzenia w tkankach i narządach. Dotyczy to wątroby w jej marskości, trzustki w cukrzycy, w zaburzeniach barwnikowych melanin, w uszkodzeniu mięśnia serca i następnej niewydolności krążenia a także w chorobach skóry i stawów (5, 6, 14, 26).

Uprzednio opisane, sięgające 1975 roku, genetyczne związki dziedzicznej hemochromatozy z antygenami MHC dotyczyły asocjacji z HLA-A3, HLA-B7 oraz HLA-B 14. Według Simon i in. (25) u około 70% chorych z hemochromatozą stwierdzono obecność w fenotypie antygeny HLA-A3. Wskazywać to może na dziedziczną mutację zachodzącą w chromosomie z występującymi w jego obrębie alielami kodującymi antygeny HLA-A3. Obecność w fenotypie chorych na hemochromatozę innych antygenów HLA-A niż A3 autorzy tłumaczą rzadko zachodzącą rekombinacją między locus HLA-A i locus HLA-H.

Gen HLA-G został po raz pierwszy opisany w 1987 roku przez Geraghty i in. (11).

Początkowo sądzono, że koduje on monomorficzny antygen, występujący w cytotrofoblastie, z różną ekspresją w I oraz w III trymestrze ciąży. Już w latach następnych Alizadeh i in. (2), Van der Ven i Ober (29) oraz Watanabe i in. (30) wykazali w obrębie regionów kodujących peptydy HLA-G kilka polimorficznych sekwencji DNA. Te różnorodne peptydy, jako produkty genu HLA-G, mogą występować w dwóch postaciach, tj. związanej błonowo z powierzchnią komórek (M*HLA-G) lub w formie rozpuszczalnej (S*HLA-G). Wśród cząsteczek HLA-G rozróżnia się 5 różnych izoform, określanych jako HLA-G1, -G2, -G3, -G4 i -G5 o ciężarze 37-39 kDa i o optymalnej długości 9 reszt aminokwasowych. Z przeprowadzonych badań wynika, że izoformiczne cząsteczki HLA-G powstają na skutek alternatywnego „składania” transkryptów mRNA (23, 27).

Gen HLA-G w przeciwieństwie do genów kodujących klasyczne antygeny zgodności tkankowej odznacza się wybitnie ograniczonym polimorfizmem. Aktualnie poznano tylko kilka alleli występujących w obrębie tego locus, a mianowicie G*01011, G*01012, G*01013, G*0102 i G*0104. Przyjmuje się, że ograniczony antygenowy polimorfizm układu HLA-G jest istotny w matczyno-łożyskowej odpowiedzi immunologicznej.

Ekspresja antygeny HLA-G w błonie doczesnej ograniczona jest zasadniczo do pozakosmkowego cytotrofoblastu. Komórki ludzkiego trofoblastu posiadają różną lokalizację w obrębie łożyska i dlatego obecność cząsteczek HLA-G w znacznym stopniu zależy od ich położenia. Z przeprowadzonych badań wynika, że łańcuch alfa cząsteczki HLA-G wykazuje ekspresję głównie w pierwszym trymestrze ciąży, w trzecim trymestrze zaś ulega ona znacznej redukcji. Jest to związane ze stadium rozwojowym łożyska. Dlatego w czasie ciąży mają miejsce czasowe i przestrzenne zmiany w ekspresji produktów genu HLA-G a ich poziom zmniejsza się w miarę jej zaawansowania. Sugeruje się także, że spontaniczne poronienia, obejmujące poronienia nawykowe lub opóźnienie wzrostu płodu mogą być tłumaczone udziałem HLA-G. Uprzywilejowana ekspresja HLA-G w tkankach płodowych wskazuje na istotną rolę tego genu w rozwoju zarodkowym i/lub matczyno-łożyskowej odpowiedzi immunologicznej. Obecność niepolimorficznych cząsteczek HLA-G na cytotrofoblastie może zabezpieczać łożysko przed matczynymi, nie podlegającymi restrykcyi MHC a obecnymi w doczesnej cytotrofoblastycznej komórkami limfoidalnymi z markerami powierzchniowymi CD16⁺. Rozważana jest także możliwość udziału cząsteczek HLA-G obecnych w inwazyjnym, pozakosmkowym trofoblastie w mediowaniu adhezji komórka-komórka (8, 13, 16, 20). Z opublikowanych danych wynika, że cząsteczki HLA-G mogą wydatnie zmniejszać podatność płodu na działanie limfocytów NK oraz subpopulacji CD16⁺CD56⁺ obecnych w doczesnej. To zabezpieczenie płodowych trofoblastów przed liżą ze strony matczynych komórek NK wydaje się istotnym w nadawaniu płodowi tolerancji immunologicznej wobec matki. Rozpuszczalna postać S*HLA-G może wchodzić w interakcje z receptorami limfocytów T i tym samym indukować brak reaktywności immunologicznej (18, 24).

Do ciekawych obserwacji należą wyniki wskazujące na rolę HLA-G w indukowaniu aktywacji komórek supresorowych stwierdzanych w doczesnej a także ich uczestnictwo w odpowiedzi układu odpornościowego w stosunku do antygenów ojcowskich przekazanych dziecku. Allele ojcowskie HLA-G mogą

odgrywać główną rolę nie tylko w rozwoju i różnicowaniu trofoblastów ale brać udział w prezentacji w łożysku antygenów wewnątrz i zewnątrz pochodnych w procesach odpornościowych. Do wyjaśnienia pozostają nie tylko problemy interakcji matka-łożysko ale jakościowe i ilościowe zależności między ekspresją HLA-G a stanami niepłodności i spontanicznymi poronieniami (8, 18, 27).

Opisane w wielkim skrócie produkty genów oraz pseudogenów MHC kompleksu HLA człowieka wskazują na ich szczególną rolę w naszym organizmie a także na fakt jak niewiele jeszcze wiadomo o ich udziale w życiowo istotnych procesach biologicznych. Przyjmuje się, że w rejonie HLA klasy I istnieje jeszcze około 20 innych miejsc, wymagających genetycznej analizy. W 1994 roku Bahram i in. (3) i następnie w 1996 roku Bahram i Spies (4) opisali nową polimorficzną rodzinę genów w regionie HLA klasy Ib nazwaną MIC. Obok dwóch funkcjonalnych genów MICA i MICB opisanych zostało 3 pseudogeny MICC, MICD i MICE. Uważa się, że nowo poznany układ MIC odgrywa ważną rolę w interakcjach między komórkami nabłonkowymi, keratynocytami i monocytami a komórkami układu odpornościowego (32).

PIŚMIENNICTWO

1. Ajioka R.S., Jorde L.B., Gruen J.R., Yu P., Dimitrova D., Barrow J., Radisky E., Edwards C.Q., Griffen L.M., Kushner J.P.: Haplotype analysis of hemochromatosis: Evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60, 1438-1447.
2. Alizadeh M., Legras C., Semana G., Le Bouteiller P., Genetet B., Fauchet R.: Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum. Immunol.*, 1993, 38, 206-212.
3. Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E., Spies T.: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 6259-6263.
4. Bahram S., Spies T.: Nucleotide sequence of a human MHC class I M/CSdDNA. *Immunogenetics*, 1996, 43, 230-233.
5. Beutler E.: Genetic irony beyond haemochromatosis: Clinical effect of HLA-H mutations. *The Lancet*, 1997, 349, 296-297.
6. Beutler E., Gelbart T., West C., Lee P., Adams M., Blackstone R., Phatak P.D., Seese N.K., Chorney K.A., Ten Elshof A.E., Gerhard G.S., Chorney M.: Mutation analysis in Hereditary Hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1996, 22, 187-194.
7. Boucraut J., Guillaudeux T., Alizadeh M., Boretto J., Chimini G., Malecaze F., Semana G., Fauchet R., Pontarotti P., Le Bouteiller Ph.: HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. *Immunogenetics*, 1993, 38, 117-130.
8. Clark D.A.: HLA-G finally does something! *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1997, 38, 75-78.
9. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F.: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 1996, 13, 399-408.
10. Gasparini P., Borgato L., Piperno A., Girelli D., Olivieri O., Gottardi E., Roetto A., Dianzani I., Fargion S., Schinaia G., Cappellini M.D., Gandini G., Pignatti P., Fiorelli G., De Sandrè G., Camaschella C.: Linkage analysis of 6p21 polymorphic markers and the

hereditary hemochromatosis: localization of the gene centromeric to HLA-F. *Hum. Mol. Genet.*, 1993, 5, 571-576.

11. Geraghty D.E., Koller B.H., Orr H.T.: A human major histocompatibility complex class I gene that encode a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1987, 84, 9145-9149. -12. Grimsley C., Ober C: Population genetic studies of HLA-E. Evidence for selection. *Hum. Immunol.*, 1997, 52, 33-40. -13. Hashimoto K., Azuma Ch., Koyama M., Nobunaga T., Kimura T., Shimoya K., Kubota Y., Saji F., Murata Y.: Biparental alleles of HLA-G are co-dominantly expressed in the placenta. *Jpn. J. Human Genet.*, 1997, 42, 181-186. -14. Jazwinska E.C., Lee S.C., Webb S.I., Halliday J.W., Powell L.W.: Localization of the Hemochromatosis Gene Close to D6S105. *Am. J. Hum. Genet.* 1993, 53, 347-352. -15. Kędzierska A., Turowski G.: Układ zgodności tkankowej człowieka - HLA. Rozważania w świetle aktualnych poglądów. VII. Nieklasyczne układy HLA-E, F i H. *Przeg. Lek.*, 2000 (w druku). -16. Krzysiek J., Turowski G.: Immunologia wczesnej ciąży. II. Wzajemna relacja doczesnej i trofoblastu. *Gin. Pol.*, 1996, 67, 467-471. -17. Kunishima S., Nagae M., Mizuno S., Kamiya T., Ozawa K.: A new polymorphism in the HLA-F gene (67 Ala[GCC] to Ala[GCG]). *Immunogenetics*, 1999, 49, 147-148. -18. Lee Ni., Malacko A.R., Ishitani A., Chen M-C, Bajorath J., Marquardt H., Geraghty D.E.: The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunol.*, 1995, 3, 591-600. -19. Liano M., Lee N., Navarro F., Garcia P., Albar J.P., Geraghty D.E., López-Botet M.: HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NK G2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur. J. Immunol.*, 1998, 28, 2854-2863. -20. Loke Y.W., King A., Burrows T., Gardner L., Bowen M., Hiby S., Howlett S., Holmes N., Jacobs D.: Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody. *Tissue Antigens*, 1997, 50, 135-146.

21. Lury D., Epstein H., Holmes N.: The human class I MHC gene HLA-F is expressed in lymphocytes. *Int. Immunol.*, 1990, 2, 531-537. -22. Navarro F., Liano M., Bellon T., Colonna M., Geraghty D.E., Lopez-Botet M.: The ILT2 (LIR1) and CD94/NK G2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29, 277-283. -23. Rebmann V., Pfeiffer K., Passler M., Ferrone S., Maier S., Weiss E., Grosse-Wilde H.: Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens*, 1999, 53, 14-22. -24. Sasaki H., Xu X.C, Smith D.M., Howard T., Mohanakumar T.: HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity. *Transplantation*, 1999, 67, 31-37. -25. Simon M., Bourei M., Fauchet R., Genetet B.: Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut*, 1976, 17, 332-334. -26. Totaro A., Grifa A., Carella M., Ambrosio L.D., Valentino M., Roth M.P., Borot N., Cappin H., Roetto A., Camaschella C, Gasparini P.: Hereditary hemochromatosis: a HpaI polymorphism within the HLA-H gene. *Mol. Celi. Probe*, 1997, 11, 229-230. -27. Turowski G., Kędzierska A.: Układ zgodności tkankowej człowieka - HLA. Rozważania w świetle aktualnych poglądów. VI. Antygenowy polimorfizm układu

^ 7 *Przeg. Lek.* 2000 (w druku) ~28 Ucnigiri Mizuno S., Wada K Tsutsumi M., Kato T., Kamiya T., Ozawa K.: An Identification of the HLA-F null allele in Japanese. *Immunogenetics*, 1997, 45, 466-467. -29. Van der Ven K Ober C: HLA-G polymorphisms in African Americans. *J. Immunol* 1994 153' 5628-5633. -30. Watanabe Y., Fujii T., Tokunaga K., Tadokoro K., Taketani Y' Juji T.: Polymorphism of HLA-G gene in Japanese. *Hum. Immunol* 1995 44' suppl. 1,13-17.

31. Wei X., Orr H.T.: Differential expression of HLA-E, HLA-H, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum. Immunol.*, 1990, 29, 131-142 -32 Zwirner N.W., Fernandez-Viña M.A., Stastny P.: MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes *Immunogenetics*, 1998, 47, 139-148.

Adres autorów:

Samodzielną Pracownia Immunologii Klinicznej CM UJ
31-531 Kraków
ul. Grzegórzecka 16