

# Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra Graft Versus Host Hastalığı ve Minör Histokompatibilite Antijenleri Arasındaki İlişki: Ön Rapor

## The Relationship Between Minor Histocompatibility Antigens And Graft-Versus-Host Disease After The Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Arş.Gör.Dr.Çiğdem KEKİK<sup>2</sup>, Prof.Dr. Sevgi BEŞİŞİK<sup>1</sup>, Prof.Dr.Deniz SARGIN<sup>1</sup>  
Prof.Dr. Mahmut N. ÇARİN<sup>2</sup>, Doç.Dr. Fatma S. OĞUZ<sup>2</sup>, Arş.Gör.Dr. Yalçın SEYHUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İÜ İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD  
<sup>2</sup>İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

### Özet

Hematopoetik kök hücre naklinin (HKHN) en önemli komplikasyonu graft versus host hastalığı (GVHH) veya graft yetmezliğidir. GVHH'da en önemli belirleyici faktörler alıcı ve verici arasındaki doku antijenleri uyumluluğu ("HLA matching"), minör histokompatibilite antijenleri (mHAg), yaş, cinsiyet farklılığı, verici gebelik sayısıdır. mHAg, HKHT öneminin ortaya çıkması bu antijenlerin daha çok araştırılmasına neden olmuştur. Bu antijenlerden biri HA-1'dir ve HLA uyumlu kardeşler arası nakillerde HA-1 uyumsuzluğunun GVHH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın amacı; HKHT yapılmış hasta ve verici HA-1 genotipleri ile GVHH arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. 1998-2004 yılları arasında tanı ve tedavileri yapılan hastalarda HA-1 lokusunu çalıştık. HA-1 tiplemesi için PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile diziyi özgü primerler kullanılarak 20 HLA-A2 pozitif HKHN alıcısı ile vericilerinden 40 örnek analiz edildi. Alıcılarda RR, RH ve HH genotiplerinin sıklığı sırası ile %35, %45, %20 ve vericilerde ise %35, %65, %0 saptandı. 20 hastadan 4'ü (%20) GVHH evre II ve III idi. GVHH'li yalnızca 2 hastada alıcı ve verici arasında HA-1H uyumsuzluğu vardı. mHAg'ler; 20 alıcı/verici çiftinin 8'inde uyumsuz bulunurken mHAg ile GVHH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı.

**Anahtar Kelimeler:** Hematopoetik kök hücre nakli, minör antijen, graft versus host hastalığı

### Abstract

The major complication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is graft-versus-host disease (GVHD) or graft. HLA incompatibility increases the frequency of GVHD. On the other hand, the risk is still available despite full matched HLAs, which may be related with non-HLAs or minor antigens. One of these minor antigens, HA-1 allelic incompatibility has been shown to be associated with GVHD in HLA-identical sibling transplants. The HA-1 is an HLA-A\*0201 restricted non-peptide, which derives from the cleavage of a protein encoded at chromosome 19. There are two alleles of HA-1 created by a polymorphism at position 504 that results in either Histidine (HA-1H) or Arginine (HA-1R). The aim of the study is investigate the relationship between HA-1 and GVHD. We retrospectively examined the HA-1 locus in patients diagnosed and treated between 1998-2004. We used PCR-SSP for typing HA-1. Forty samples from 20 HLA-A2 positive HSCT (BMT, n=3 ; PBSC, n=17) recipients and their donors were included in our study. The frequencies of the three possible genotypes RR, RH, HH were 35%, 45% and 20%, respectively, in recipients and 35%, 65% and 0% in donors. Four of the 20 patients (20%) were determined as having evre II or III GVHD. There is HA-1H incompatibility between donor and recipient only in two patients with GVHD. mHAg were found to be incompatible in 8 out of 20 recipient/donor pairs.

**Key Words:** Hematopoietic stem cell transplantation, minor antigen, graft versus host disease

Gaziantep Tıp Dergisi 2008, 1-4.

### GİRİŞ

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN), hematolojik habis hastalıklar için önemli gittikçe artan bir tedavi şeklidir. Bununla birlikte HLA uyumlu HKHN, sıklıkla GVHH veya graft yetmezliği gibi komplikasyonlar ile sonuçlanmaktadır (1,2). HLA uygun HKHT serilerinde akut GVHH sıklığı %15-45 arasında bildirilmektedir (3).

Bu komplikasyonların, HLA sınırlı T lenfositlerinin tanıdığı minör histokompatibilite antijenlerince (mHAg) başlatıldığı düşünülmektedir (4).

Bunun dışında yaş, cinsiyet farklılığı ve verici gebelik sayısı da GVHH gelişiminde etken faktörlerdir. mHAg'leri, Snell ve arkadaşları tarafından 1940 yıllarında ilk kez tanımlanmış (5) ve 1966 yılında kemik iliği transplantasyonu yapılan HLA uyumlu kardeşlerde, mHAg (6) ve H-Y aracılı immün reaksiyonlar gösterilmiştir (7). Bu antijenler, Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) molekülünü kodlayan genler dışındaki (otozomal ve cinsiyet) genler tarafından kodlanır ve mHAg'leri, polimorfik olan antijenlerdir. Proteozomlarda peptid parçalarına dönüşerek immünolojik peptidler olarak antijen sunan hücreler ile T lenfositlerine sunulurlar. mHAg'lerindeki uyumsuzluk, HLA uyumlu kardeşlerde HKHN sonrası alıcılarda akut GVHH gelişmesini sağlar.

✉ Yazışma Adresi:  
Arş.Gör.Dr., Çiğdem KEKİK  
İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD  
Temel Bilimler Binası Çapa / İSTANBUL  
Tel:0 212 635 11 68  
Fax:0 212 635 11 68  
E-mail: citcim@gmail.com

Yapılan çalışmalar, kemik iliği nakillerinde alıcı-verici arasındaki mHAg HA-1 uyumsuzluğunun GVHH ile ilişkili olduğunu göstermiştir (8).

Genel olarak minor H antijenlerini kodlayan lokuslar bialelektirler ve mHAg HA-1, HLA-A\*0201 alelli ile sınırlı, peptid olmayan ve 19 kromozom üzerinde kodlanan bir proteinin yarıklanması ile oluşan moleküldür. 504 pozisyonundaki Histidin (HA-1H-immünojenik) veya Arginin (HA-1R- non-immünojenik)'e bağlı olarak iki alelli vardır. Genetik sıklığı değişken olup, farklı genotipler birbirinden bağımsız olarak Mendel kuralları ile geçerler (9,10). Çalışmanın amacı; HKHT yapılmış hasta ve vericilerin HA-1 genotipleri saptamak, uyumlu ve uyumsuz genotipler taşıyanlar ile nakil sonrası ortaya çıkabilecek GVHH arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

### GEREÇ VE YÖNTEM ÇALIŞMA GRUBU

1998-2004 yılları arasında (İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, Hematoloji Bilim Dalı'nda) tanı ve tedavileri yapılan 20 kök hücre nakli olan hasta (Kemik iliği nakli-BMT, n=3; Periferik kan kök hücre nakli-PBSCT, n=17) ile onların HLA uyumlu vericileri çalışmaya alındı. Hastaların E/K oranı 11/9, yaş ortalamaları 34.55 iken vericilerin E/K oranı 11/9, yaş ortalamaları ise 34.7 idi. Hastaların hastalık tipi dağılımı AML:8, ALL:4, KML:6, Aplastik Anemi:1 ve Fanconi anemisi:1 idi. Çalışma grubunun (40 örnek) mHAg HA-1 tipleri İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da yapıldı. Örneklerin DNA izolasyonu ethyl trimetil bromid tuzları ile denatürasyon ve presiptasyon yöntemi ile izole edildi (11). Tüm hastalarda GVHH profilaksi aynı idi (siklosporin ve metotreksat) ve aynı antimikrobiyal profilaksi verildi. İki verici hariç diğerleri hastaların kardeşiydi (biri HLA uyumlu aile üyesi diğeri ise hastanın ikizi idi).

### MİNOR ANTİJEN TİPLEMESİ

mHA-1 tiplemesi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile diziyeye özgül primerler (sequence specific primer-SSP) kullanıldı (PCR-SSP kiti -One lamda Inc). HA-1 antijeninin iki alellinin tanımlandığı alanlar tablo 1'de görülmektedir. Her bir PCR reaksiyonu için 100 ng genomic DNA kullanılarak 10.5l'de amplifikasyon yapıldı. Döngü koşulları; 96°C'de 130 sn, 63°C'de 1 dk (1 döngü); 96°C'de 10 sn, 63°C'de 60 sn (9 döngü); 96°C'de 10 sn, 59°C'de 50 sn (20 döngü) ve 72°C'de 30 sn olarak uygulandı. Amplifiye edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz-gel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV transilluminator'de görüntülendi.

### BULGULAR

Alıcı ve verici arasındaki HA-1 uyumsuzluğu, 20 alıcı/verici çiftinin 8 (%40)'inde saptandı. Evre II-IV GVHH gelişen 4 hastanın sadece 2 (%50)'sinde HA-1 uyumsuzluğu bulundu (Tablo 2). RR, RH ve HH genotiplerinin sıklığı alıcılarda sırası ile %35, %45, %20; vericilerde ise %35, %65, %0 belirlendi (Tablo 3).

### TARTIŞMA

GVHH gelişimi üzerine mHAg uyumsuzluğunun etkisi en iyi HLA uyumlu kardeş çiftleriyle yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır (8). HA-1 lokusundaki uyumsuzluğun, aGVHH gelişimi için potansiyel bir risk faktörü olduğu Goulmy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda belirtilmiş ve ayrıca aGVHH'li hastaların periferik kanlarında HA-1 spesifik sitotoksik T lenfositlerinin yükseldiğini de göstermişlerdir (12).

**Tablo 1.** PCR-SSP HA-1 kiti.

Aleller	5'tanımlanma alanı	3' tanımlanma alanı	Büyükklüğü
HA-1H (Histidin)	345ACACT349	500CTGCA504	190bp
HA-1R (Arginin)	345ACACT349	500TTGCG504	190bp

**Tablo 2.** HKHN olan 20 alıcı/verici çifti

HA-1 aleli				
	Alıcı	Verici	aGvHH	Ex
Çift 1 ( BM )	RR	RR	---	+ (Tx-R)*
Çift 2 ( PB )	HR	HR	---	---
Çift 3 ( BM )	HR	HR	---	---
Çift 4 ( PB )	HR	HR	---	+ (Tx-R)
Çift 5 ( BM )	HH	HH	+	---
Çift 6 ( PB )	RR	RR	---	+ (Tx-R)
Çift 7 ( PB )	HH	HR	---	
Çift 8 ( PB )	HR	HR	+	+ (Tx-R)
Çift 9 ( PB )	RR	HR	---	+ (Tx-R)
Çift 10 ( PB )	RR	RR	---	
Çift 11 ( PB )	HR	RR	---	+ (Tx-R)
Çift 12 ( PB )	HH	HR	---	+ (Relapse)
Çift 13 ( PB )	RR	RR	+	---
Çift 14 ( PB )	RR	HR	+	---
Çift 15 ( PB )	HR	HR	---	---
Çift 16 ( PB )	HR	RR	---	+ (Relapse)
Çift 17 ( PB )	HR	HR	---	+ (Relapse)
Çift 18 ( PB )	HR	HR	---	---
Çift 19 ( PB )	RR	RR	---	---
Çift 20 ( PB )	HR	HR	---	---

Graft versus lösemi (GVL) etkisinin düzenlenmesi allogeneik kök hücre transplantasyonlarında en önemli konulardan birisidir. GVHH baskılanırken, aynı zamanda GVL/T etkisini uyararak gerekmektedir. Bu noktadan yola çıkarak HA-1 gibi minor H antijenlerine karşı CTL'leri uyararak yararlı olabilir (13).

Kirsher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GVHH görülmediğinde, HA-1 spesifik T hücrelerinin GVL aktiviteden sorumlu olduklarını göstermişlerdir (14). Tseng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; HA-1 uyumsuz çiftlerde, evre II-IV aGVHH'nın gelişme riskinin 2.5 kat arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada GVHH riskinin yetişkinlere göre genç hastalarda daha az olduğu belirtilmiştir (8).

Çalışmamıza 20 yetişkin alıcı/verici çifti dahil edilmiştir. Bu 20 hastanın, 4'ünde aGVHH gelişmiş ve bu 4 hastanın da 2'sinde HA-1 uyumsuzluğu saptanmıştır.

Bu çalışma grubunun 20 nakil hastası ve vericileri değerlendirildiğinde sayının yetersiz olmasına rağmen HA-1 uyumsuzluğu olan 8 hastanın %50'sinde GVHH ortaya çıkmıştır. HA-1 uyumsuzluğu ve aGVHH arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

**Tablo 3.** Genotiplerin sıklığı.

HA-1 genotipi	Alıcı (%)	Verici (%)
RR	35	35
RH	45	60
HH	20	---

Sonuç olarak, mHAg saptanması, mHAg'lerine karşı immün cevabın aydınlatılmasında, GVHH riskinin, en uygun vericinin ve hematolojik habis hastalıklarda adoptif immünoterapinin belirlenmesinde önemli bir belirteçtir. Literatürdeki çalışmalarda çalışmaya katılan hasta sayısının artırılmasının sonuçları anlamlı kılacağı düşüncesindedir.

Kemik iliği transplantasyonlarında hasta ve vericinin minor antijen uyumsuzluğunun nakil sonrası sağ kalımı azalttığı ve akut yada kronik GVHD'yi arttırdığı bilinmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Mats R, Ulla P, Dan H, Olle R. An association between human leucocyte antigen alleles and acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2002;119:751-9.
- Rufer N, Starobinski M, Chapuis B, Gratwohl A, Jeannot M, Helg C, Roosnek E. Clinical consequences of sensitisation to minor histocompatibility antigens before allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transp.* 1998;22:895-8.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555-62.
- Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie PG, Brasseur F, Mensink E, et al. A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. 1999;189(2):301-8.
- Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948;49:87-103.
- Graf RJ, Hildemann WH, Snell GD. Histocompatibility genes of mice. VI. Allografts in mice congenic at various non-H2 histocompatibility loci. *Transplantation.* 1966;4:425-37.
- Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ. Alloimmunity to human H-Y. *Lancet.* 1976;ii:1206.
- Tseng L, Lin M, Hansen J. Correlation between disparity for the Minor Histocompatibility Antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* vol 1999;94:2911-2914.
- Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Offringa R, Hunt DF, et al. The minor histocompatibility antigen HA-1: A diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science.* 1998;279:1054.
- Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immun Rev.* 1997;157:125-40.
- Gustincich S., Manfiolett G., Del Sal G., Schneider C. and Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques.* 1991;11:298-302.
- Goulmy E., Schipper R., Pool J et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *New Engl J Med.* 1996;334:281-5.
- Tanaka J. Target antigens for graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-leukemia/tumor (GVL/T). *Nippon Rinsho.* 2003;61(9):1512-9.
- Kircher B, Wolf M, Stevanovic S, Rammensee HG, Grubeck-Loebenstien B, Gastl G, Nachbaur D. Hematopoietic lineage-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 in graft-versus-leukemia activity after donor lymphocyte infusion. *J Immunother.* 2004;27(2):156-60.