ย่อวารสาร

HLA-DRB1 molecules and the presentation of anchor peptides from RhD, RhCE, and KEL proteins

Conceiçao Pinheiro De Souza[1], Wilson Baleotti[2], Elyse Moritz[1], Sidneia Sanches[1], Larissa Barbosa Lopes[1], Akemi Kuroda Chiba[1] Eduardo Antônio Donadi[3] and José Orlando Bordin[1]

[1]Department of Clinical and Experimental Oncology, Hematology and Hemotherapy Discipline, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP); [2]Faculty of Medicine of Marília, FAMEMA; [3]Department of Medicine, Division of Clinical Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil. Transfusion. 2021;61:1617-30.

บทนำ

แอนติเจนจากระบบหมู่โลหิต Rh และ Kell สามารถก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านได้มากในเชิงคลินิค การสร้าง antibody ต่อหมู่เลือดเริ่มต้นจากการที่ antigen-presenting cell นำเสนอ antigen peptide ให้ CD4 T cell รับรู้ ผ่าน HLA-class II โดย 90% ของ HLA-class II isotype จะเป็น HLA-DR โครงสร้างของ HLA class II ประกอบด้วย alpha และ beta chain ที่จะวางตัวกันเป็น groove ซึ่งประกอบด้วย 9 pocket ย่อยๆ (P1-9) ไว้จับกับ peptide ที่ต้องการนำเสนอ ขนาด 12-25 molecule โดย DRB1 gene ที่ encode beta chain จะมีความหลากหลายในประชากร (polymorphism) มาก ส่งผลให้มีโครงสร้างของ HLA-DR molecule ที่แตกต่างกันในแต่ละคน และทำให้ความสามารถในการ present antigen peptide จนไปถึงความสามารถในการสร้าง antibody ต่อหมู่เลือดแตกต่างกันไปด้วย การศึกษานี้มีจุดประสงค์ 3 อย่าง ประกอบด้วย การที่ HLA-DRB1 allele ชนิดใดที่มีความสัมพันธ์กับการสร้าง antibody ต่อ D, C, E และ K antigen อย่างมีนัยสำคัญ การที่ Anchor peptide จาก RhD, RhCE และ Kel protein แบบใด ที่สามารถจับกับ DRB1 molecules ได้ดีกว่า และ การจับกันของ DRB1 และ antigenic peptide มีกลไกทางโมเลกุลเป็นอย่างไร โดยใช้ in silico analysis (การศึกษาในโปรแกรมคอมพิวเตอร์) ในการศึกษา ซึ่งจะมีข้อดีกว่า in-vitro study (การศึกษาในหลอดทดลอง) คือ ราคาถูกกว่า การวิจัยนี้ศึกษากลไกทางโมเลกุลของ DRB1 ที่มีความสัมพันธ์กับเปปไทด์ของ antigen ที่จะช่วยอธิบายความถี่ของการตรวจพบ antibody ต่อ D+C antigen และ anti-K ในการให้โลหิตและการตั้งครรภ์

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้ได้รวบรวมข้อมูลของผู้ป่วย 201 คนที่มี antibody ต่อ antigen ระบบ Rh และ Kell แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 174,015 คน โดย identify antibody ด้วย gel test ของบริษัท Biorad และ Grifols ได้ทำ genotype HLA-DRB1 ด้วยวิธี sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSO) ด้วยชุดตรวจ LABType SSO-HD ของบริษัท One Lambda

การทำ in silico analysis ของ HLA-DRB1 binding sites เพื่อศึกษาความสามารถในการจับกับ peptide ด้วยโปรแกรม NetMHCIIpan โดยใส่ข้อมูล peptide sequence ของ antigen หมู่เลือด RhD, RhCE และ Kell ตัดแบ่งเป็นส่วนละ 15 amino acid ซึ่งจะมี core sequence อยู่ 9 amino acid เรียกว่า 9-mer-sequence จะเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการ anchor peptide ลงใน peptide-binding groove ของ HLA-DRB1 ซึ่งโปรแกรม NetMHCIIpan จะวัดความสามารถของส่วน anchor peptides ในการเกาะกับ HLA-DRB1 ได้ ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถในการ present antigen นั้นให้ CD4 T-helper cell ด้วย นอกจากนี้ยังได้ทำ beta chain HLA-DRB1 pocket (P1-9) alignment analysis ด้วย IMGT/HLA database เพื่อดู residue identity (กรดอะมิโนซ้ำกันที่ตำแหน่งเดียวกัน) และ homology (คุณสมบัติทาง physicochemical คล้ายกัน) โดยหากค่า < 50% ถือว่าต่ำ ถ้า ≥ 50% แต่ < 75% ถือว่าปานกลาง และ ≥ 75% ถือว่าสูง

ผลการศึกษา

ในส่วนของสถิติความสัมพันธ์ระหว่าง HLA-DRB1 alleles และการเกิด alloimmunization ต่อระบบ Rh และ Kell พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยที่มี alloantibody ทั้งต่อระบบ Rh หรือ Kell จะมีความถี่ของ HLA-DRB1*15 allele สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี anti-D จะพบ HLA-DRB1*12 allele มากอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย ส่วนผู้ป่วยที่มี anti-C จะพบ HLA-DRB1*01 allele มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มผู้ป่วย anti-E หรือ anti-K จะพบ HLA-DRB1*15 allele มากเป็นพิเศษเพียงตัวเดียว

จากการทำ in silico analysis พบว่า C หรือ D antigen จะมี polymorphic point ร่วมกัน 3 จุด ได้แก่ 60I, 68S และ

103S ที่สามารถจับกับ DRB1 molecule ได้ดี (strong binder) หลาย allele ได้แก่ DRB1*12:01 (พบในผู้ป่วยที่มี anti-D เท่านั้น), DRB1*15:01 และ DRB1*15:03 ซึ่งผลไปในทางเดียวกับผลทางสถิติ HLA-DRB1*15 allele ที่พบได้ทั้งในผู้ป่วยที่มี anti-D และ anti-C จึงอาจอธิบายว่าทำไมถึงพบผู้ป่วยที่มี anti-D+C ได้บ่อย ในขณะที่ molecule HLA-DRB1*01 สามารถแสดง protein ได้ที่จุดๆ เดียวเท่านั้นคือ 121M polymorphic point บน RhCe protein แต่ HLA-DRB1*15:01 หรือ HLA-DRB1*15:03 จะสามารถแสดง protein ได้หลาย polymorphic point เช่น 60I, 68S, 103S, 169L, 170R และอื่นๆ เป็นจำนวนมาก จึงมี affinity ต่อ RhCe-derived anchor สูง สามารถนำเสนอ antigen ให้ T helper cell ได้ดี และกระตุ้นการสร้าง alloantibody ต่อ C antigen ได้ดีกว่า จากการศึกษา alignment analysis พบว่า HLA-DRB1*15 จะมีคุณสมบัติทาง physicochemical ที่ตำแหน่ง 11P (proline, non-polar) และ 13R (arginine, basic polar) ใน P4 pocket ต่างไปจาก HLA-DRB1 allele อื่นๆ ซึ่งทำให้สามารถตอบสนองกับ antigenic peptide ได้ดีกว่าเช่นกัน ส่วน DRB1*09:01 molecule แม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้าง antibody ในประชากรที่ศึกษาอย่างมีนัยสถิติ แต่การทำ In-silico analysis พบว่าจับกับ anchor peptides จาก sequence ที่มี polymorphic determinants ของ E antigen ได้ 4 ใน 5 ชนิด (ยกเว้น 217-WMFWPSVNS-225 ซึ่งจะจับได้ดีกับ DRB1*15:03) ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาในประชากรจีนที่พบว่า HLA-DRB1*09:01 จะมีความสัมพันธ์กับการสร้าง anti-E นอกจากนี้ anti-K alloimmunization ไม่ถูกจำกัดการตอบสนองต่อ DRB1 ชนิดใดชนิดหนึ่ง แสดงว่าในกลุ่มประชากรศึกษา มี DRB1 ที่สามารถเกาะกับ KEL-derived anchor peptides และผลิต anti-K ได้หมด ซึ่งสอดคล้องกับความถี่ของ anti-K ในประชากรชาวบราซิลที่ค่อนข้างสูง

สำหรับการตรวจ alignment และ ลักษณะทาง physicochemical ของ HLA-DRB1 beta chain พบว่า DRB1*15:01, *15:03 และ *16:01 ที่ทำหน้าที่นำเสนอ 64-FLTSSFRRH-72 anchon peptide ของ RhD, RhCe จะมี mean identity 72.7% และ homology 90.9% ในขณะที่ DRB1*12:01 และ *15:01 ที่นำเสนอ 107-VITLFSIRL-115 anchor peptide ของ RhD จะมี identity ต่ำเพียงแค่ 36.4% แต่มี homology สูง 77.3% โดยทั่วไปแล้ว DRB1 ที่จับกับ RhD และ RhcE-derived strong binder ได้อย่างแข็งแรงจะมีคุณสมบัติ ของ physicochemical ที่คล้ายกันบริเวณ residue 28, 70 ของ P4 pocket ในขณะที่ DRB1 ที่สามารถจับกับ RhCe-derived strong binder ได้แข็งแรงจะมี residue 26, 28, 70, 74 และ 78 ที่คล้ายกัน ส่วนใน DRB1 molecule ทุกตัวที่สามารถนำเสนอ KEL-derived anchor protein ได้หลายชนิดแตกต่างกัน แต่ละชนิดอาจมี identity ที่ต่ำถึง ปานกลางได้ (ตั้งแต่ 31.8 ถึง 72.7%) แต่จะมีค่า homology ปานกลางสูงตลอด (63.6 ถึง 86.4%) มี P4 pocket homology (50 ถึง 100%) และจะมี 26, 28, 70 และ 78 residue ที่มีคุณสมบัติทาง physicochemical ที่คล้ายกัน จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติทาง physicochemical ของ residue มีผลต่อความสามารถของ HLA ในการนำเสนอ antigen ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า HLA-DRB1*15 allele สามารถใช้เป็นตัวบอกความเสี่ยงของการสร้าง alloantibody ต่อ D, C, E และ K antigen เมื่อได้รับเลือดที่มี antigen ไม่ตรงกันได้ in silico analysis ยังแสดงให้เห็นว่า HLA-DRB1*15 molecule มีลักษณะพิเศษทาง physicochemical ของ 11P และ 13 R ใน P4 pocket ที่จะส่งเสริมการเกิด immune response ต่อ antigenic peptide ต่างๆ การที่พบ anti-D และ anti-C ร่วมกันบ่อยในผู้ป่วย เกิดจากการที่ D และ C antigen มี polymorphic point 3 ตำแหน่งร่วมกัน มีความหลากหลาย (polymorphism) มาก และสามารถจับกับ DRB1 ได้หลายรูปแบบ ส่วน Kell antigen แทบทุกชนิด สามารถจับกับ DRB1 ได้ แสดงว่าในประชากรกลุ่มที่ศึกษา หากได้ Kell positive blood จะมีความเสี่ยงในการสร้าง anti-K สูง การทำ HLA genotyping สามารถนำมาใช้ป้องกัน alloimmunization โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้ chronic transfusion สามารถนำผล HLA genotype มาช่วยจัดเรียงลำดับความจำเป็นของผู้ป่วยที่ต้องหาเลือดตรงหมู่ให้

นายแพทย์อภิวรรษ ติยะพรรณ
แพทย์ประจำบ้านปีที่ 3
สาขาวิชาเวชศาสตร์บริการโลหิต ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล