

MAGDALENA WĄSIK¹, ANNA ZIEMIAŃSKA¹, MARZENA LENART²

Rola receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną w przewlekłych zakażeniach wirusowych*

The role of immune response inhibitory receptors in chronic viral infections

¹Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków

²Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Pediatrii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków

KEYWORDS

inhibitory receptors, PD-1, CTLA-4, chronic viral infections

SUMMARY

Inhibitory receptors play a vital role in regulation of the immune response. They prevent lymphocytes from acquiring autoreactive or neoplastic characteristics, by restricting their activation, proliferation and effector functions. High expression of inhibitory receptors can be observed on “exhausted” T lymphocytes. Appearance of dysfunctional T cells may lead to a dampening of immune response that can occur in chronic viral diseases, such as viral hepatitis type B or C and also HIV infection. Function of inhibitory receptors and their role in viral infections and cancer are still being studied. It was observed that in many cases a negative immunoregulation blockage result in an increased proliferation and recovery of specific T cell functionality. Development of immunotherapy with specific antibodies against known ligands of inhibitory receptors seem to be especially important in cases of chronic, drug-resistant viral infections and cancer resistant to standard treatment. Here we present current knowledge about the most important inhibitory receptors such as PD-1, CTLA-4, BTLA, CD160, LAG-3 and TIM-3 and potential possibilities of their blockage in immunotherapy.

WPROWADZENIE

Odpowiedź układu immunologicznego na toczące się w ludzkim organizmie infekcje jest niezbędna do przywrócenia prawidłowego stanu zdrowia. Ważnym aspektem regulacji tych mechanizmów jest kontrola rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej, która może być skierowana przeciw zewnątrzpocho-dnym patogenom, a także własnym komórkom o nieprawidłowej budowie lub funkcji. Regulacja ta pozwala uniknąć odpowiedzi skierowanej przeciwko antygenom prawidłowych komórek własnego organizmu. W tym celu został wykształcony mechanizm tolerancji immunologicznej, którą dzielimy na: centralną, odpowiedzialną za apoptozę autoreaktywnych limfocytów T w grasicy i limfocytów B w szpiku kostnym, oraz obwodową, w której uczestniczą m.in. limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells* – T_{reg}) (1, 2). W regulacji odpowiedzi immunologicznej ważną rolę pełnią również obecne na limfocytach

receptory hamujące (ang. *inhibitory receptors*), które są aktywowane wskutek interakcji limfocytu z komórką prezentującą antygen (ang. *antigen-presenting cell* – APC). Rozpoznanie prezentowanego antygeny za pomocą receptora limfocytu T (ang. *T-cell receptor* – TCR) lub limfocytu B (ang. *B-cell receptor* – BCR) oraz przekazanie sygnału od receptorów kostymulujących, np. CD28, CD4, prowadzi do aktywacji limfocytów, czego następstwem jest pobudzenie receptorów hamujących, odpowiedzialnych za hamowanie aktywacji, proliferacji i funkcji efektorowych tychże komórek. Stanowi to ochronę przed nabywaniem przez limfocyty cech nowotworowych lub autoreaktywnych w końcowym etapie odpowiedzi na stymulację antygenową oraz wygaszanie stanu zapalnego (3, 4).

Wzrost ekspresji receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną obserwowany jest szczególnie na powierzchni komórek biorących udział w zwalczaniu przewlekłych

*Praca została sfinansowana z dotacji celowej dla młodych naukowców Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, grant nr K/DSC/003576.

zakażeń wirusowych. Mechanizm ten chroni przed rozwojem nadmiernej odpowiedzi układu immunologicznego na toczącą się infekcję. Szczególnie wysoki poziom ekspresji hamujących receptorów widoczny jest na tzw. „wyczerpanych” limfocytach T (ang. *T-cells exhausted*) (5, 6). „Wyczerpanie” limfocytów to proces, w wyniku którego dochodzi do utraty ich funkcji cytotoksycznych, co skutkuje zaburzeniem odpowiedzi immunologicznej głównie w przebiegu przewlekłych infekcji wirusowych, tj. wirusowe zapalenie wątroby typu B, typu C, zakażenia wirusem HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), a także chorób nowotworowych, malarii czy zakażeń *Mycobacterium tuberculosis* (6). Czas narażenia na wirusowe antygeny oraz wysoki poziom ich ekspresji w przebiegu ciężkich infekcji wirusowych stanowią główne czynniki odpowiedzialne za powstawanie populacji „wyczerpanych” limfocytów. Pierwszą oznaką „wyczerpania” limfocytów jest spadek wydzielania interleukiny-2 (IL-2) oraz kolejno innych cytokin, w tym czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor* – TNF- α). Inną cechą „wyczerpanych” limfocytów T jest upośledzona zdolność do proliferacji po zetknięciu się z antygenem oraz utrata zdolności do samoodnawiania przy udziale cytokin IL-7, IL-15 (6, 7).

Wysoka ekspresja hamujących receptorów, a w konsekwencji stan immunosupresji wywołany przez sygnały hamujące funkcje efektorowe oraz proliferacyjne komórek biorących udział w zwalczaniu przewlekłych infekcji wirusowych stanowi główną przyczynę powstawania ciężkich/przetrwających infekcji wirusowych opornych na leczenie (7). W niniejszej pracy przedstawiono wybrane receptory hamujące odpowiedź immunologiczną: PD-1, CTLA-4, BTLA, CD160, LAG-3 oraz TIM-3.

PD-1

Receptor PD-1 (ang. *programmed death 1*, CD279) to transbłonowa glikoproteina należąca do rodziny CD28:B7 (8, 9). Receptor PD-1 ulega indukowanej ekspresji na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺, limfocytach B, komórkach NK, monocytach oraz aktywowanych komórkach dendrytycznych (9, 10). Posiada dwa ligandy, PD-L1 (B7-H1, CD274) oraz PD-L2 (B7-DC, CD273), obecne na komórkach prezentujących antygen. PD-L1 dodatkowo ulega ekspresji na niektórych komórkach niehematopoetycznych (10, 11). Cytoplazmatyczna domena PD-1 zawiera dwa motywy immunoreceptorowe oparte na tyrozynie: ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) oraz ITSM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (12). Ligacja PD-1 z PD-L1 lub PD-L2 hamuje sygnał przekazywany od aktywowanych limfocytów T, a także zmniejsza ekspresję cytokin prozapalnych i cząsteczek antyapoptotycznych (11). Może również zaburzać cykl komórkowy poprzez zwiększenie ekspresji białka p15 oraz hamowanie transkrypcji białka SKP2 (ang. *S-phase kinase-associated protein 2*), które tworzy kompleks z ligazą ubikwityny i odpowiada za degradację białka p27 (13).

Wzrost ekspresji PD-1 następuje w ciągu 24-72 godzin od stymulacji receptora TCR. Długotrwała ekspresja PD-1 na

limfocytach T prowadzi do zjawiska ich „wyczerpania” (10). Aktywacja limfocytów B również prowadzi do wzrostu poziomu receptora PD-1 na ich powierzchni. Powoduje to obniżenie syntezy IL-6 i zahamowanie proliferacji limfocytów B, nie wpływa jednak na ich żywotność ani na produkcję innych chemokin (np. MIP-1 β i IL-8) (12).

W przewlekłych zakażeniach wirusowych odnotowano spadek produkcji cytokin i zahamowanie proliferacji komórek zaangażowanych w walkę z wirusem. Za zaburzenia w funkcji tych komórek odpowiedzialny jest m.in. receptor PD-1. Wzrost jego ekspresji zaobserwowano na HIV-specyficznych limfocytach T CD8⁺ oraz CD4⁺, przy czym poziom jego ekspresji korelował z replikacją wirusa (14, 15). W zakażeniu HIV limfocyty T CD4⁺ obecne w węzłach chłonnych posiadały znacznie wyższy poziom ekspresji tego receptora w porównaniu z limfocytami T CD4⁺ we krwi obwodowej. Porównano również ekspresję PD-1 pomiędzy populacjami limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, która okazała się dwukrotnie wyższa na limfocytach T CD4⁺ (16). Blokada receptora PD-1 pozwoliła na przywrócenie funkcji i zwiększenie proliferacji limfocytów T HIV-specyficznych, zarówno CD8⁺, jak i CD4⁺ w warunkach *in vitro* (14, 15). Badania te sugerują, że ekspresja receptora PD-1 na limfocytach T CD4⁺ może stanowić marker przebiegu zakażenia wirusem HIV, a jego blokada mogłaby być wykorzystana w terapii tegoż zakażenia (16).

W wirusowym zapaleniu wątroby typu B ekspresja receptora PD-1 wzrasta na limfocytach T CD4⁺ oraz CD8⁺ i wykazuje pozytywną korelację w stosunku do ilości DNA wirusa HBV (ang. *hepatitis B virus*). Ponadto, zaobserwowano istotną korelację poziomu ekspresji PD-1 z poziomem aminotransferazy alaninowej w surowicy chorych. Sugeruje to, iż poziom ekspresji PD-1 może stanowić nowy parametr, pośrednio związany z zaawansowaniem infekcji HBV (17). Pomimo zaburzonej funkcji HBV-specyficznych limfocytów T CD8⁺, posiadają one wysoki poziom ekspresji receptora IL-7 (CD127), która zaangażowana jest w różnicowanie funkcjonalnych limfocytów T pamięci (18, 19). Zaobserwowano także różnice w fenotypie HBV-specyficznych limfocytów T CD8⁺ pochodzących z wątroby i z krwi obwodowej. Wewnątrzwątrobowe limfocyty T CD8⁺ wykazywały wyższą ekspresję receptora PD-1 i niższy poziom ekspresji CD127 w porównaniu do limfocytów T CD8⁺ z krwi obwodowej. Blokada PD-1/PD-L1 pozwoliła na przywrócenie prawidłowych funkcji limfocytów T, przy czym poprawa była bardziej zaznaczona w populacji limfocytów T CD8⁺ pochodzących z wątroby (18).

Ekspresja receptora PD-1 ulega znaczącemu wzrostowi również na HCV-specyficznych limfocytach T CD8⁺ zarówno wątrobowych, jak i pochodzących z krwi obwodowej. Zablockowanie sygnału przekazywanego od receptora PD-1 przez przeciwciała anti-PD-L1 lub anti-PD-L2 skutkuje wzrostem produkcji IFN- γ , IL-2, a także zwiększeniem proliferacji HCV-specyficznych limfocytów T CD8⁺ (20). Podobnie, w limfocytarnym zapaleniu splotu naczyniówkowego i opon mózgowych (ang. *lymphocytic choriomeningitis*) wywołanym przez wirusa limfocytowego zapalenia opon i naczyń

(ang. *lymphocytic choriomeningitis virus* – LCMV) zaobserwowano wzrost ekspresji receptora PD-1 na specyficznych limfocytach T CD8⁺. Blokada receptora PD-1 w modelu mysim skutkowała wzrostem liczby LCMV-specyficznych limfocytów T CD8⁺, a także przywróceniem ich funkcji, co w efekcie przyczyniło się do spadku wirerii (21). PD-1 reguluje odpowiedź limfocytów T również w ostrych infekcjach, takich jak: wścieklizna, krowianka, zakażenie *Histoplasma capsulatum* czy *Listeria monocytogenes* (10).

Receptor PD-1 pełni także istotną rolę w patomechanizmie rozwoju nowotworów. Poprzez hamowanie funkcji limfocytów T przyczynia się do „ucieczki” nowotworu spod nadzoru układu odporności. Blokada PD-1/PD-L1 daje obiecujące wyniki w terapii czerniaka, niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. *non-small-cell lung cancer* – NSCLC), raka pęcherza, raka nerkowokomórkowego (ang. *renal cell carcinoma* – RCC), a także raka piersi, jajników, prostaty, trzustki i jelita grubego (9). Do obecnie testowanych w terapii chorób nowotworowych przeciwciał anty-PD-1 należy w pełni ludzkie przeciwciało IgG4 – Nivolumab oraz przeciwciała humanizowane – Lambrolizumab i Pidilizumab (8).

CTLA-4

Receptor CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CD152) to receptor negatywnie regulujący sygnały na wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej. Strukturalnie jest to glikozylowane białko wykazujące 30% homologię do powierzchniowego receptora CD28. Ekspresję CTLA-4 obserwuje się na limfocytach T_{reg} oraz na powierzchni aktywowanych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (22). Ligandami dla tego receptora są cząsteczki B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86), obecne na komórkach APC, które jednocześnie posiadają zdolność do wiązania z cząsteczką CD28. Wyróżniono dwie formy receptora CTLA-4: zakotwiczony w błonie komórkowej fICTLA-4 i rozpuszczalny w surowicy sCTLA-4 (23).

W procesie aktywacji limfocytów T uczestniczą dwa sygnały docierające do jądra komórkowego. Po rozpoznaniu obcego antygeny, kompleks receptora TCR wraz z cząsteczką CD3 inicjuje powstawanie pierwszego sygnału. Drugi sygnał pochodzi od cząsteczek kostymulujących, do których należą m.in. CTLA-4 czy CD28 (24). Cząsteczka CD28 jest glikoproteiną ulegającą konstytutywnej ekspresji na powierzchni większości dziewczyczych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W wyniku aktywacji limfocytów T przez komórki APC dochodzi do związania CD28 przez cząsteczki B7. Następnie przekazany zostaje sygnał kostymulujący, który potęguje i podtrzymuje proliferację oraz wytwarzanie cytokin przez komórki CD4⁺ i CD8⁺ (25). Aktywacja limfocytów T prowadzi jednocześnie do wzrostu ekspresji CTLA-4 na ich powierzchni. Receptor ten wykazuje silniejsze od receptora CD28 powinowactwo do cząsteczek B7, wskutek czego dochodzi do wyparcia wiązania CD28-B7. Prowadzi to do zahamowania aktywacji, proliferacji oraz obniżenia funkcji efektorowych limfocytów T (26).

Receptor CTLA-4 uczestniczy także w oddziaływaniu limfocytów T_{reg} na limfocyty efektorowe. W mechanizmie

supresji pośredniej dochodzi do ligacji tego receptora z cząsteczkami B7.1 oraz B7.2, skutkiem czego jest obniżenie zdolności do stymulacji dziewicznych limfocytów T przez komórki dendrytyczne (27). Wykazano również, że w wyniku interakcji limfocytów T_{reg} z komórką APC, przy udziale receptora CTLA-4, dochodzi do wzrostu produkcji białka o aktywności oksygenazyIDO (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*). Białko to katalizuje proces degradacji tryptofanu, skutkując powstaniem kynureniny, wykazującej właściwości supresorowe w stosunku do komórek efektorowych (28).

Receptor CTLA-4 odgrywa aktywną rolę w procesie „wyczerpania” limfocytów T specyficznych dla wirusa HIV. Dowiedziono, że wzrost ekspresji CTLA-4 na limfocytach T CD4⁺ koreluje bezpośrednio ze wzrostem wirerii, a pośrednio z liczbą limfocytów T CD4⁺. Zaobserwowano wyższy poziom ekspresji CTLA-4 na HIV-specyficznych komórkach CD4⁺ produkujących tylko IFN- γ , niż na wielofunkcyjnych limfocytach T CD4⁺ produkujących zarówno IL-2, jak i IFN- γ (29, 30). Ponadto zaobserwowano, iż poziom ekspresji CTLA-4 na komórkach T CD4⁺ był znacznie niższy w grupie pacjentów przed leczeniem i po leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B, w porównaniu do zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Wykazano, że receptor ten posiada zdolność do hamowania przesunięcia wzajemnego stosunku limfocytów Th1/Th2 w kierunku Th2, co może odpowiadać za przewlekłą postać choroby wywołanej przez wirus HBV. W przypadku pacjentów, którzy przeszli terapię leczniczą, poziom CTLA-4 na limfocytach T CD4⁺ wzrastał. Zatem przypuszcza się, że poziom ekspresji CTLA-4 może być wykorzystany w ocenie funkcji immunologicznych limfocytów T CD4⁺ u pacjentów cierpiących na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (17, 31). W przypadku HBV-specyficznych limfocytów T CD8⁺ zaobserwowano równoczesny wzrost poziomu ekspresji CTLA-4 oraz proapoptotycznego białka Bim, co może wiązać się z przedwczesnym niszczeniem aktywnych cytotoksycznych limfocytów T. Prowadzona u chorych terapia przeciwwirusowa, pomimo spadku wirerii, nie skutkowała spadkiem poziomu ekspresji CTLA-4 oraz białka Bim. Przypuszcza się, że sygnały pochodzące od CTLA-4 prowadzą do spadku poziomu IL-2 oraz wzrostu TGF- β , mogą być odpowiedzialne za proces „wyczerpania” limfocytów zależny od białka Bim. Stąd przypuszcza się, iż blokada receptora CTLA-4 może odegrać rolę w złożonym procesie leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu B (32).

W wielu badaniach przedklinicznych wykazano, że blokada receptora CTLA-4 może powodować wzrost przeciwnowotworowej odpowiedzi układu immunologicznego. W badaniach klinicznych stwierdzono natomiast, że użycie przeciwciał anty-CTLA-4 może prowadzić do wzrostu czasu przeżycia, bez progresji choroby, pacjentów cierpiących na niedrobnokomórkowego raka płuc. Inne obiecujące dane dotyczące skuteczności leczenia nowotworów złośliwych obejmują połączenie inhibicji receptora CTLA-4 z równoczesną blokadą receptora PD-1 (33).

BTLA i HVEM

Receptor BTLA (ang. *B- and T-lymphocyte attenuator*, CD272) to receptor podobny do immunoglobuliny, należący do rodziny CD28:B7 (34). Częsteczka ta wykazuje najwyższą ekspresję na powierzchni limfocytów B i limfocytów T CD4⁺ oraz niższą na limfocytach T CD8⁺, komórkach NK, makrofagach czy komórkach dendrytycznych (35). Ligandem dla tego receptora jest receptor uczestniczący we wnikaniu herpeswirusów (ang. *herpesvirus entry mediator* – HVEM) (34). Ligacja HVEM prowadzi do fosforylacji tyrozyny w części cytoplazmatycznej receptora BTLA. Znajdują się tam motywy ITIM oraz domeny homologiczne do fragmentu onkogenu src-SH2 (ang. *src homology domain 2*). Do efektywnego zahamowania proliferacji i produkcji cytokin przez limfocyty T konieczna jest fosforylacja wielu tyrozyn w części cytoplazmatycznej receptora BTLA. Aktywacja receptora na limfocytach B powoduje zaburzenie fosforylacji kinazy syk (ang. *spleen tyrosine kinase*), białka BLNK (ang. *B-cell linker protein*) oraz fosfolipazy Cy2. Następuje redukcja aktywności receptora BCR oraz zahamowanie proliferacji (34, 35).

Receptor BTLA jest istotny do utrzymania tolerancji immunologicznej i zapobiega rozwojowi chorób z autoagresji (36). U myszy BTLA^{-/-} wykazano, iż brak tego receptora prowadzi do rozwoju choroby podobnej do autoimmunologicznego zapalenia wątroby. Zaobserwowano także wystąpienie hipergammaglobulinemii i wzrost ilości aktywowanych limfocytów T CD4⁺. Wraz z wiekiem, we krwi badanych myszy zwiększał się poziom przeciwciał przeciwjądrowych ANA (ang. *antinuclear antibody*), przeciwciał przeciwko podwójnym niciom DNA (ang. *anti-double stranded DNA* – anti-dsDNA) i przeciwciał anty-SS-A (ang. *Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen A*) (36).

Powierzchniowa ekspresja BTLA zwiększa się wraz z dojrzewaniem limfocytów B u człowieka (35). Odmienne spostrzeżenia odnotowano w przypadku limfocytów T CD8⁺, na których ekspresja zmniejsza się wraz z postępowaniem różnicowania do komórek efektorowych. Spadku ekspresji nie zaobserwowano jednak na limfocytach T CD8⁺ specyficznych dla czerniaka. Może to sugerować udział receptora w patomechanizmie rozwoju czerniaka przerzutowego (34). W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że osobniki z obniżoną ekspresją receptora BTLA lub jego ligandu wykazują zwiększoną liczbę limfocytów T CD8⁺ pamięci (37). Zmniejszona ekspresja BTLA na limfocytach CD4⁺ u myszy, podobnie jak PD-1, przyczynia się do przedłużenia i zaostrzenia przebiegu alergicznego zapalenia dróg oddechowych (38). Wzrost ekspresji BTLA wykryto na limfocytach T w modelach doświadczalnych malarii mózgowej. Zablokowanie interakcji BTLA-HVEM pozwoliło na zmniejszenie odsetka limfocytów T sekwestrowanych w kapilarach mózgowych myszy. Częsteczka ta może być zatem potencjalnym celem w terapii ostrej malarii (39).

Receptor HVEM, znany również jako TNFRSF14, jest obecny na limfocytach T i B, komórkach mieloidalnych,

NK i wielu komórkach nowotworowych (34, 40). Receptor ten wiąże kilka cząsteczek odpowiedzialnych za modulację odpowiedzi immunologicznej. Należą do nich: białko LIGHT (ang. *homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes*), glikoproteina D HSV, BTLA oraz CD160. HVEM uczestniczy więc zarówno w aktywacji, jak i hamowaniu funkcji komórek układu odporności. W przypadku połączenia HVEM-BTLA, cząsteczka HVEM wykazuje działanie dwukierunkowe. Dochodzi do aktywacji czynnika NFκB i związanej z tym indukcji ekspresji cząsteczek prozapalnych oraz do pobudzenia sygnału hamującego zależnego od fosfatazy tyrozynowej. W modelach wielu chorób wykazano, że brak sygnału HVEM-BTLA może skutkować wystąpieniem ciężkiego zapalenia błony śluzowej jelita i płuc, zaburzeniem odporności w infekcjach bakteryjnych i schorzeniami przypominającymi choroby autoimmunologiczne (40).

CD160

Receptor CD160 to białko błonowe o pojedynczej domenie Ig-podobnej, wykazujące niewielką homologię z cząsteczką KIRDL4. Jego ekspresja jest ściśle związana z silnie cytotoksycznymi komórkami krwi obwodowej: komórkami NK CD56^{dim}CD16⁺, limfocytami TCRαβ, cytotoksycznymi limfocytami T CD8⁺CD28⁺ oraz z komórkami NKT i niewielką populacją limfocytów T CD4⁺. W tkankach, cząsteczka CD160 obecna jest na większości limfocytów śródnamionkowych jelit, stanowiących populację CD3⁺TCRαβ⁺CD4⁺CD8⁺CD11b⁺CD28⁺CD45ROCD56⁺CD101⁺CD103⁺ (41, 42). Wyróżniono dwie formy receptora: CD160 GPI-zakotwiczone (ang. *GPI-anchored*) oraz transbłonowe CD160-TM (ang. *transmembrane isoform*) (43).

Receptor CD160 wykazuje zdolność do wiązania z klasycznymi cząsteczkami MHC I, np. z HLA-A2, HLA-B7, HLA-Cw3, oraz nieklasycznymi, tj. HLA-E i HLA-G. Wykazano również, że cząsteczka CD160 obecna na ludzkich komórkach NK, wskutek wiązania z obecną na komórkach docelowych cząsteczką HLA-Cw3, wzmacnia ich cytotoksyczność oraz produkcję cytokin. Jednocześnie zaobserwowano obniżony poziom ekspresji receptora na powierzchni komórek NK, wskutek ich stymulacji za pomocą IL-2 czy estrów forbolu (ang. *phorbol myristate acetate* – PMA) (41, 42, 44).

Funkcje regulatorowe receptora CD160 są złożone. Wiążąc się z odpowiednimi ligandami, uczestniczy on w hamowaniu bądź wzmacnianiu odpowiedzi limfocytów T. Wraz z białkami BTLA, LIGHT i LT-α, CD160 stanowi ligand dla HVEM. Wskutek interakcji cząsteczki CD160 z HVEM dochodzi do hamowania proliferacji limfocytów T CD4⁺. Ligacja ta zachodzi przy udziale bogatej w cysteinę domeny 1 (CRD1), której blokada prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej oraz reakcji poszczepiennej (6, 45).

W przebiegu przewlekłych infekcji wirusowych, takich jak HIV czy zakażenie wirusem HCV, zaobserwowano wzrost ekspresji receptora CD160 na komórkach T CD8⁺. W przypadku

koekspresji CD160 z receptorem PD-1, wskutek przewlekłej stymulacji, dochodzi do zjawiska „wyczerpania” limfocytów T CD8⁺, co prowadzi do zahamowania prawidłowej odpowiedzi immunologicznej organizmu na toczące się zakażenie. Blokada interakcji CD160 z HVEM skutkuje wzrostem produkcji cytokin oraz wzmacnia proliferację specyficznych limfocytów T CD8⁺ (46, 47).

LAG-3

Receptor LAG-3 (ang. *lymphocyte-activation gene 3*, CD223) to białko transbłonowe należące do nadrodziny immunoglobulin, o wysokim podobieństwie do cząsteczki CD4. Powierzchniowa ekspresja cząsteczki LAG-3 obecna jest na aktywowanych limfocytach T (CD4, CD8, T_{reg}), limfocytach B, komórkach NK oraz plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych (48). Podobnie do PD-1 i CTLA-4, LAG-3 negatywnie reguluje aktywację i proliferację limfocytów T oraz hamuje wytwarzanie cytokin. Cząsteczka ta wspomaga także funkcje supresorowe limfocytów T_{reg} (48, 49).

Wykazano, że w przebiegu przewlekłego zakażenia wirusem LCMV dochodzi do wzrostu ekspresji LAG-3 oraz PD-1 na powierzchni limfocytów T CD8⁺, co świadczy o udziale tej cząsteczki w powstawaniu populacji „wyczerpanych” limfocytów T. Jednakże stwierdzono, że sam receptor LAG-3 nie prowadzi do „wyczerpania” limfocytów T. Jedynie koekspresja z innymi receptorami hamującymi odpowiedź immunologiczną wpływa na stopień „wyczerpania” limfocytów T (50, 51).

Receptor LAG-3 posiada zdolność do silniejszego wiązania z obecną na komórce APC cząsteczką MHC klasy II, w porównaniu do cząsteczki CD4. Wysoka awidność receptora LAG-3 do cząsteczki MHC klasy II prowadzi do zwiększenia zdolności makrofagów oraz niedojrzałych komórek dendrytycznych do indukowania odpowiedzi przeciwwirusowej oraz przeciwnowotworowej przez cytotoksyczne limfocyty T (52).

W przebiegu przewlekłego zakażenia wirusem HIV zaobserwowano wzrost ekspresji LAG-3 na powierzchni HIV-specyficznych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, zarówno we krwi obwodowej, jak i w węzłach chłonnych, co równocześnie korelowało z postępowaniem choroby. Przedłużona terapia przeciwwirusowa prowadzi do spadku ekspresji tego receptora na powierzchni obu subpopulacji limfocytów T. Blokada *ex vivo* receptora LAG-3 skutkuje wzrostem odpowiedzi limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ na toczące się zakażenie wirusem HIV (53). Receptor LAG-3 znalazł także zastosowanie w leczeniu wielu chorób nowotworowych, czego przykładem jest lek IMP321 – rozpuszczalna wersja cząsteczki LAG-3, stosowana w celu wzmocnienia przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej (54).

TIM-3

Receptor TIM-3 (ang. *T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 3*) to transbłonowa glikoproteina typu I (55). Ulega ekspresji na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺, makrofagach i komórkach dendrytycznych. Występuje na

limfocytach Th1, natomiast brak go na limfocytach Th2. Ekspresja TIM-3 koreluje z dysfunkcyjnym fenotypem limfocytów T (CD127^{low}CD57^{high}) i obniżoną produkcją cytokin (56). Jedynym znanym ligandem dla tego receptora jest galektyna-9 (gal-9). Ligacja TIM-3-gal-9 powoduje hamowanie aktywności limfocytów Th1 oraz indukcję tolerancji immunologicznej (55). Oprócz hamującej roli w regulacji odpowiedzi zapalnej, wykazano, że TIM-3-gal-9 przyczynia się do wzrostu produkcji cytokin przez komórki dendrytyczne aktywowane lipopolisacharydami (57).

Zwiększoną ekspresję TIM-3 stwierdzono na powierzchni komórek macierzystych w ostrej białaczce szpikowej (ang. *acute myeloid leukemia* – AML). Receptor ten może zatem posłużyć jako marker odróżniający komórki białaczkowe od prawidłowych komórek szpiku (58). Receptor TIM-3, wraz z PD-1, ulegają koekspresji na „wyczerpanych” limfocytach T CD8⁺ w mysim modelu AML. Wraz z postępowaniem choroby, następuje wzrost ekspresji obu tych receptorów. Udowodniono, że blokada sygnałów przekazywanych od zarówno PD-1, jak i TIM-3 wykazuje efekt addytywny i pozwala na przywrócenie funkcji „wyczerpanych” limfocytów, spowalnia rozrost guza oraz zmniejsza śmiertelność związaną z chorobą (55).

Obniżoną ekspresję TIM-3 zaobserwowano na limfocytach T CD4⁺ wyizolowanych z płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane. Badania udowodniły, że brak tego receptora odpowiada za zwiększoną produkcję IFN-γ i zaburzenia immunoregulacji w stwardnieniu rozsianym oraz może być przyczyną autoreaktywności limfocytów Th1 w innych chorobach autoimmunologicznych (59).

Wzrost ekspresji TIM-3 na limfocytach T CD4⁺ oraz CD8⁺ zaobserwowano w przewlekłych zakażeniach wirusowych, takich jak HIV czy wirusowe zapalenie wątroby typu C. W badaniach dowiedziono, że blokada TIM-3 pozwala na zwiększenie produkcji IFN-γ i proliferacji limfocytów T u pacjentów z tymi schorzeniami (56, 60).

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy zebrano informacje dotyczące najważniejszych receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną oraz ich związek z przetrwałymi zakażeniami wirusowymi (tab. 1). Do najlepiej poznanych cząsteczek należy receptor PD-1 oraz CTLA-4. Dotychczas badania wykazały, iż mogą być one celem w terapii przewlekłych infekcji wirusowych, takich jak zakażenia wywołane przez wirusa HIV, LCMV, HBV czy HCV. Obiecujące wydają się również wyniki badań dotyczące preparatów hamujących przekaz sygnału przez te receptory w leczeniu nowotworów, głównie guzów litych, czerniaka, raka płuc, nerek czy jelita grubego. Proces hamowania odpowiedzi immunologicznej ma jednak złożony mechanizm, na który składa się najczęściej działanie wielu receptorów, a ich blokada wykazuje efekt addytywny. Dlatego w niektórych przypadkach klinicznych zapewne należałoby rozważyć zastosowanie blokady kilku receptorów jednocześnie.

Tab. 1. Charakterystyka receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną

Receptor	PD-1	CTLA-4	BTLA	CD160	LAG-3	TIM-3
Ligand	PD-L1 (CD274) PD-L2 (CD273)	B7.1 (CD80) B7.2 (CD86)	HVEM (TNFRSF14)	MHC kl. I HVEM (TNFRSF14)	MHC kl. II	galektyna-9
Komórki wykazujące ekspresję danego receptora	limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8 ⁺ , limfocyty B, komórki NK, monocyty, komórki dendrytyczne	limfocyty T _{reg} , limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8	limfocyty B, limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8 ⁺ , komórki NK, makrofagi, komórki dendrytyczne	komórki NK, limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8 ⁺ , komórki NKT, limfocyty śródnabłonkowe jelit	limfocyty T _{reg} , limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8 ⁺ , limfocyty B, komórki NK, komórki dendrytyczne	limfocyty T CD4 ⁺ , limfocyty T CD8 ⁺ , makrofagi, komórki dendrytyczne
Zastosowanie kliniczne inhibitorów receptora w leczeniu zakażeń	HIV (16) HBV (18) HCV (20) LCMV (21)	-	-	HCV (46) HIV (47)	HIV (53)	HCV (56) HIV (60)

**KONFLIKT INTERESÓW
CONFLICT OF INTEREST**

Brak konfliktu interesów
None

ADRES DO KORESPONDENCJI

Marzena Lenart
Zakład Immunologii Klinicznej
Instytut Pediatrii
Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński
– Collegium Medicum
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków
tel. +48 (12) 658-24-86
m.lenart@uj.edu.pl

PIŚMIENICTWO

1. Pączek L, Foronczewicz B: Tolerancja immunologiczna – wiodący problem transplantologii XXI wieku. *Post Nauk Med* 2003; 1-2: 40-44.
2. Kędzierska K, Nowosiad M, Kwiatkowska E et al.: Tolerancja immunologiczna u pacjenta z autosomalnym dominującym zwyrodnieniem wielotorbielowatym nerek po transplantacji nerki. *Forum Nefrol* 2010; 3: 174-178.
3. Yao S, Zhu Y, Zhu G et al.: B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 2011; 34: 729-740.
4. Kuształ M, Jezior D, Weyde W et al.: Odpowiedź układu immunologicznego na alo-przeszczep nerki. Część II. Udział cząsteczek kostymulujących i pomocniczych w aktywacji limfocyty T; faza efektorowa odpowiedzi. *Post Hig Med Dosw* 2007; 61: 21-27.
5. Grzywnowicz M, Giannopoulos K: Znaczenie receptora programowanej śmierci 1 oraz jego ligandów w układzie immunologicznym oraz nowotworach. *Acta Haematol Pol* 2012; 43: 132-145.
6. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ: T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* 2015; 479-480: 180-193.
7. Ha SJ, West EE, Koichi A et al.: Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev* 2008; 223: 317-333.
8. McDermott DE, Atkins MB: PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2013; 2(5): 662-673.
9. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E et al.: Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med* 2015; 21(1): 24-33.
10. Brown KE, Freeman GJ, Wherry EJ, Sharpe AH: Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(3): 397-401.
11. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677-704.
12. Thibult ML, Mamessier E, Gertner-Dardenne J et al.: PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 2013; 25(2): 129-137.
13. Patsoukis N, Brown J, Petkova V et al.: Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal* 2012; 5: 46.
14. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N et al.: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12: 1124-1125.

15. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P et al.: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 282-283.
16. D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG et al.: Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol* 2007; 179: 1979-1987.
17. Wang L, Zhao C, Peng Q et al.: Expression levels of CD28, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 as novel indicators of T-cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Biomed Rep* 2014; 2: 270-274.
18. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M et al.: Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010; 138: 682-693.
19. Van Leeuwen EM, de Bree GJ, Remmerswaal EB et al.: IL-7 receptor chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8 T cells. *Blood* 2005; 106: 2091-2098.
20. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J et al.: Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007; 81(17): 9249-9258.
21. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al.: Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687.
22. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF: A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature* 1987; 328: 267-270.
23. Walker LS: Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 2013; 45: 49-57.
24. Sharpe AH, Freeman GJ: The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126.
25. Edmead CE, Lamb JR, Hoyne GF: The T cell surface protein, CD28. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1053-1057.
26. Korecka A, Duszota A, Korczak-Kowalska G: Rola cząsteczki CD28 w tolerancji immunologicznej. *Post Hig Med Dosw* 2007; 61: 74-82.
27. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al.: CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322(5899): 271-275.
28. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F et al.: CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 1097-1101.
29. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F et al.: Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4 T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 2007; 8: 1246-1254.
30. Kaufmann DE, Walker BD: PD-1 and CTLA-4 Inhibitory Co-signaling Pathways in HIV Infection and the Potential for Therapeutic Intervention. *J Immunol* 2009; 182: 5891-5897.
31. Milich DR: Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Vir Hepat* 1997; 4: 48-59.
32. Schurich A, Pooja K, Lopes AR et al.: Role of the Coinhibitory Receptor Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 on Apoptosis-Prone CD8 T Cells in Persistent Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 2011; 53(5): 1494-1503.
33. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD: Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1974-1982.
34. Derre L, Rivals JP, Jandus C et al.: BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest* 2010; 120: 157-167.
35. Vendel AC, Calemine-Fenaux J, Izrael-Tomasevic A et al.: B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting Syk and BLNK. *J Immunol* 2009; 182(3): 1509-1517.
36. Oya Y, Watanabe N, Owada T et al.: Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis Rheum* 2008; 58(8): 2498-2510.
37. Krieg C, Boyman O, Fu YX, Kaye J: B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat Immunol* 2007; 8: 162-171.
38. Deppong C, Juehne TI, Hurchla M et al.: Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J Immunol* 2006; 176(7): 3909-3913.
39. Lepenies B, Pfeffer K, Hurchla MA et al.: Ligation of B and T lymphocyte attenuator prevents the genesis of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2007; 179(6): 4093-4100.

40. Shui JW, Steinberg MW, Kronenberg M: Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling. *J Leukoc Biol* 2011; 89(4): 517-523.
41. Anumanthan A, Bensussan A, Boumsell L et al.: Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1998; 161(6): 2780-2790.
42. Giustiniani J, Marie Cardine A, Bensussan A: A Soluble Form of the MHC Class I-Specific CD160 Is Released from Human Activated NK Lymphocytes and Inhibits Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* 2007; 178: 1293-1300.
43. Giustiniani J, Bensussan A, Marie-Cardine A: Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J Immunol* 2009; 182(1): 63-71.
44. Maeda M, Carpenito C, Russell RC et al.: Murine CD160, Ig-Like Receptor on NK Cells and NKT Cells, Recognizes Classical and Nonclassical MHC Class I and Regulates NK Cell Activation. *J Immunol* 2005; 175: 4426-4432.
45. Cai G, Anumanthan A, Brown JA et al.: CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2008; 9: 176-185.
46. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M et al.: Coexpression of PD1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000947.
47. Peretz Y, He Z, Shi Y et al.: CD160 and PD1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002840.
48. Segal EI, Leveson-Gover DB, Florek M et al.: Role of Lymphocyte Activation Gene-3 (Lag-3) in Conventional and Regulatory T Cell Function in Allogeneic Transplantation. *PLoS ONE* 2014; 9: e86551.
49. Liang B, Workman C, Lee J et al.: Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol* 2008; 180(9): 5916-5926.
50. Blackburn SD, Shin H, Haining WN et al.: Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2008; 10: 29-37.
51. Richter K, Agnellini P, Oxenius A: On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol* 2010; 22: 13-23.
52. Hemon P, Jean-Louis F, Ramgolam K et al.: MHC Class II Engagement by Its Ligand LAG-3 (CD223) Contributes to Melanoma Resistance to Apoptosis. *J Immunol* 2011; 186(9): 5173-5183.
53. Tian X, Zhang A, Qiu Ch et al.: The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *J Immunol* 2015; 194(8): 3873-3882.
54. Brignone Ch, Gutierrez M, Mefti F et al.: First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity. *J Transl Med* 2010; 8: 71.
55. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG et al.: Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 117: 4501-4510.
56. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N et al.: Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* 2009; 83: 9122-9130.
57. Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S et al.: Galectin-9 increases Tim-3 dendritic cells and CD8 T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol* 2008; 181(11): 7660-7669.
58. Jan M, Chao MP, Cha AC et al.: Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5009-5014.
59. Koguchi K, Anderson DE, Yang L et al.: Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 2006; 203: 1413-1418.
60. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD et al.: Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008; 205: 2763-2779.

nadesłano: 11.04.2017

zaakceptowano do druku: 05.05.2017