

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE NEFROLOGICHE ED URO-ANDROLOGICHE

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: **Nefrologia MED/14**

**INFLUENZA DEL SISTEMA IMMUNOGENETICO KIR
NELL'ALLOREATTIVITA' NATURAL KILLER
NEL TRAPIANTO DI RENE**

Presentata da: **Dott.ssa SERENA CORSINI**

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof.

SANDRO MATTIOLI

Relatore

Chiar.mo Prof.

GAETANO LA MANNA

Esame finale anno 2011

SOMMARIO

ABSTRACT	4
1. GENERALITÀ SUL TRAPIANTO DI RENE	8
1.1 Epidemiologia del Trapianto di Rene	8
1.2 La risposta immunitaria nel Trapianto di Rene	9
1.3 Complicanze immunologiche del Trapianto di Rene	15
1.3.1 <i>Rigetto Iperacuto</i>	15
1.3.2 <i>Rigetto Acuto</i>	16
1.3.3 <i>Rigetto Cronico</i>	18
1.4 Terapia immunosoppressiva	20
1.5 Tolleranza immunologica e trapianto	22
2. BIOLOGIA DELLE CELLULE NATURAL KILLER (NK)	23
2.1 Origine e differenziamento	24
2.2 Ruolo fisiologico	25
2.2.1 <i>Attività citotossica</i>	25
2.2.2 <i>Produzione di citochine</i>	26
2.2.3 <i>Proliferazione</i>	26
2.3 Recettori delle cellule NK	27
2.4 Ruolo dei KIR nelle cellule NK	28
2.5 MHC I e cellule NK	31
3. GENI KIR	34
3.1 Nomenclatura dei geni KIR	34
3.2 Organizzazione genomica dei KIR	35
3.2.1 <i>Struttura del gene</i>	37
3.2.2 <i>Aplotipi</i>	38
3.2.3 <i>Linkage disequilibrium</i>	41

4. CELLULE NK, GENI KIR E TRAPIANTO.....	42
4.1 NK tra immunità innata ed adattativa.....	42
4.2 NK e rigetto acuto e cronico	43
4.3 NK e tolleranza	45
5. OBIETTIVO DELLO STUDIO	46
6. MATERIALI E METODI.....	47
6.1 Pazienti.....	47
6.2 Fasi dello studio	48
6.3 Metodiche di biologia molecolare	49
6.3.1 Estrazione del DNA genomico.....	49
6.3.2 KIR SSO Genotyping test-Luminex®.....	50
6.3.3 Acquisizione dei dati	56
6.4 Analisi statistica	57
7. RISULTATI.....	58
7.1 Analisi delle caratteristiche generali della popolazione	58
7.2 Analisi della genotipizzazione KIR e HLA nella popolazione.....	61
7.2.1 Correlazione con il rigetto acuto.....	61
7.2.2 Correlazione con outcome del trapianto a lungo termine.....	63
8. DISCUSSIONE.....	68
8.1 Geni KIR e rigetto acuto	68
8.2 Geni KIR e outcome a lungo termine	71
9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	75
10. BIBLIOGRAFIA.....	76

ABSTRACT

Il trapianto di rene rappresenta l'opzione terapeutica migliore per il ripristino della funzione renale sia escretoria che endocrina nei pazienti affetti da malattie renali croniche ed insufficienza renale terminale.

Il buon esito del trapianto è legato alla compatibilità genetica tra donatore e ricevente, nonché ai progressi fatti in campo chirurgico e nella terapia immunosoppressiva.

La tipizzazione tissutale del ricevente e del donatore eseguita prima del trapianto prende in considerazione la compatibilità dei gruppi sanguigni e del sistema HLA che rappresentano la barriera immunologica maggiore delle principali complicanze del trapianto.

Numerosi studi hanno accertato l'importanza dell'immunità innata nell'ambito della tolleranza ai trapianti, in particolare delle cellule Natural Killer (NK) che rappresentano una popolazione cellulare implicata nella difesa da agenti infettivi e cellule tumorali.

Le cellule NK esprimono sulla loro superficie i Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR), i quali, riconoscendo e legando gli antigeni MHC di classe I, impediscono l'uccisione delle cellule autologhe.

Nell'ambito del trapianto di organi solidi, e in particolare quello renale, gli studi presenti fino ad oggi mostrano alcune correlazioni fra l'incompatibilità KIR/HLA e l'esito del trapianto tanto da rappresentare un'interessante prospettiva, specialmente per quanto riguarda l'impostazione della terapia immunosoppressiva.

Lo scopo di questo studio è stato dunque quello di valutare se l'incompatibilità fra recettori KIR del ricevente e ligandi HLA di classe I del donatore possa rappresentare un fattore predittivo utile per migliorare la sopravvivenza del rene trapiantato, sia per selezionare i pazienti che potrebbero beneficiare di un regime terapeutico ridotto.

Sono stati arruolati, nel presente studio, 113 pazienti trapiantati di rene dal 1999 al 2005. Per ognuno di essi e per i rispettivi donatori è stato estratto il DNA genomico ed è stata effettuata la genotipizzazione degli HLA A, B, C e di 14 geni KIR.

L'analisi dei dati è stata condotta su due tipologie di studio caso-controllo: uno ha mirato a valutare il rigetto acuto e l'altro l'outcome del trapianto nel lungo termine.

I risultati ottenuti hanno mostrato come due geni, il KIR2DS1 e il KIR3DS1, siano associati allo sviluppo di rigetto acuto ($p=0.02$ e $p=0.05$).

La presenza del gene KIR2DS3 invece è risultato associato ad un miglior andamento della creatinina sierica e del filtrato glomerulare (MDRD) nel tempo (a 4 e 5 anni dal trapianto, $p<0.05$), mentre in presenza del relativo ligando l'andamento della creatinina sierica e del filtrato glomerulare (MDRD) sembrano peggiorare nel lungo termine.

L'analisi condotta sulla popolazione in base al peggioramento o meno della funzione renale a lungo termine dal trapianto ha evidenziato come l'assenza del gene KIR2DL1 sia fortemente associata ad un aumento del 20% del valore di creatinina a 5 anni, con un rischio relativo di avere una creatinina superiore al valore mediano a 5 anni pari a 2.7 (CI 95%: 1.7788 - 2.6631).

Infine la presenza di un rene negativo per l'HLA-A3/A11, rispetto ad uno positivo, in pazienti KIR3DL2 positivi ha mostrato un rischio relativo di avere una creatinina sierica superiore alla mediana a 5 anni dal trapianto pari a 0.6609 (CI 95%: 0.4529–0.9643), facendo ipotizzare un effetto protettivo dato dall'assenza di questo ligando.

In conclusione il presente studio mostra come il sistema immunogenetico KIR sia coinvolto nella risposta immunitaria al trapianto di rene, ma il cui ruolo a tutt'ora non è del tutto chiarito e data la sua complessità ancora marginale e valutabile su grandi numeri.

Kidney transplantation is the best treatment option for the restoration of excretory and endocrine kidney function in patients with end-stage renal disease.

The success of the transplant is linked to the genetic compatibility between donor and recipient, and upon progress in surgery and immunosuppressive therapy.

The tissue typing of the recipient and the donor performed before transplantation consider the compatibility of blood groups and the HLA system which are the major immunological barrier of the main complications of the transplant.

Numerous studies have established the importance of innate immunity in transplantation tolerance, in particular natural killer (NK) cells represent a population of cells involved in defense against infectious agents and tumor cells.

NK cells express on their surface the Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) which, by recognizing and binding to MHC class I antigens, prevent the killing of autologous cells.

In solid organ transplantation context, and in particular the kidney, recent studies show some correlation between the incompatibility KIR / HLA and outcome of transplantation so as to represent an interesting perspective, especially as regards setting of immunosuppressive therapy.

The purpose of this study was therefore to assess whether the incompatibility between recipient KIR receptors and HLA class I ligands of the donor could be a useful predictor in order to improve the survival of the transplanted kidney and also to select patients who might benefit of a reduced regimen.

One hundred and thirteen renal transplant patients from 1999 to 2005 were enrolled. Genomic DNA was extracted for each of them and their donors and genotyping of HLA A, B, C and 14 KIR genes was carried out.

Data analysis was conducted on two case-control studies: one aimed at assessing the outcome of acute rejection and the other to assess the long term transplant outcome.

The results showed that two genes, KIR2DS1 and KIR3DS1, are associated with the development of acute rejection ($p = 0.02$ and $p = 0.05$, respectively).

The presence of the KIR2DS3 gene is associated with a better performance of serum creatinine and glomerular filtration rate (MDRD) over time (4 and 5 years after transplantation, $p < 0.05$), while in the presence of ligand, the serum creatinine and MDRD trend seems to get worse in the long term.

The analysis performed on the population, according to whether there was deterioration of renal function or not in the long term, showed that the absence of the KIR2DL1 gene is strongly associated with an increase of 20% of the creatinine value at 5 years, with a relative risk to having a greater creatinine level than the median 5-year equal to 2.7 95% (95% CI: 1.7788 - 2.6631).

Finally, the presence of a kidney resulting negative for HLA-A3 / A11, compared to a positive result, in patients with KIR3DL2, showed a relative risk of having a serum creatinine above the median at 5 years after transplantation of 0.6609 (95% CI: 0.4529 - 0.9643), suggesting a protective effect given to the absence of this ligand.

In conclusion, the present study shows how the immunogenetic system KIR is involved in the immune response to kidney transplantation, but in which its role is still not fully understood and, given its complexity, still remains marginal and should be evaluated in large numbers.

1. GENERALITÀ SUL TRAPIANTO DI RENE

Negli ultimi vent'anni il trapianto di rene è divenuta la terapia di scelta per il trattamento dell'insufficienza renale terminale.

I progressi nella comprensione dei meccanismi di base molecolari e cellulari del rigetto e della risposta immunitaria, lo sviluppo di nuovi migliori farmaci immunosoppressivi, il miglioramento nelle tecniche chirurgiche, incluso il trapianto da donatore vivente, e la conservazione dell'organo stesso, nonché l'aumento nell'uso di organi precedentemente considerati inutilizzabili, hanno contribuito al successo di un numero sempre maggiore di trapianti [Levy GA, 2010]. Nonostante i miglioramenti nel breve termine e nel tasso di sopravvivenza dei pazienti, il trapianto di rene continua ad avere diversi punti critici. Questi includono un'aumentata carenza di donatori, una scarsa sopravvivenza del graft a lungo termine (derivante in gran parte da un rigetto cronico vascolare) e gravi effetti collaterali dovuti alla terapia immunosoppressiva prolungata nel tempo per prevenire l'insorgenza di rigetto acuto [Levy GA, 2010].

1.1 Epidemiologia del Trapianto di Rene

Dalla metà degli anni '50 in poi centinaia di migliaia di pazienti in tutto il mondo hanno ricevuto un trapianto di rene e negli ultimi vent'anni l'attività di trapianto è notevolmente aumentata.

Nel 2010, i trapianti di rene effettuati in Italia sono stati 1499. Dal 1992 al 2004 il numero dei trapianti è andato continuamente aumentando mantenendosi stabile negli ultimi 5 anni considerando anche i trapianti combinati. La sopravvivenza media dei pazienti ad un anno dal trapianto è del 97,1% e a 5 anni è pari al 92.1%.

Parallelamente la sopravvivenza del rene trapiantato è del 92.1 % ad un anno dal trapianto e dell' 81.7% a 5 anni.

A Bologna l'attività di trapianto è iniziata più di 35 anni fa (ottobre 1967) quando fu effettuato il primo trapianto di rene da donatore cadavere (secondo trapianto in Italia).

Al settembre 2010 sono stati effettuati 1825 trapianti di rene con una media di 70-80 trapianti/anno nel corso dell'ultimo decennio e risultati superiori alla media nazionale a fronte di una elevata complessità dei pazienti trapiantati (comorbidità vascolare, cardiaca, epatica) grazie anche ad una esperienza di chirurgia vascolare di alta specializzazione.

Presso il Centro di Bologna (piena attività 365 giorni l'anno) vengono attualmente effettuati trapianti di rene singolo, di doppio trapianto renale, di trapianto da donatore vivente e di trapianti combinati (fegato-rene, cuore-rene) [dal sito <http://www.aosp.bo.it/nefrosorsola/>]. Grazie all'introduzione di nuovi criteri di inclusione alla donazione di organi oggi vengono utilizzati anche reni derivanti da cosiddetti "donatori marginali" e da donatori a "cuore non battente" che hanno consentito il trapianto di un maggior numero di pazienti in lista d'attesa e che danno risultati sovrapponibili a quelli da donatore standard. [Dati CNT e CRT-ER].

1.2 La risposta immunitaria nel Trapianto di Rene

La reazione del sistema immunitario dell'individuo ricevente rappresenta tuttora il problema principale che si incontra in campo trapiantologico.

Il riconoscimento da parte del nostro organismo di antigeni esogeni è alla base della reattività sia nei confronti dei comuni germi patogeni che degli organi o tessuti trapiantati.

La principale risposta immunitaria ad un trapianto è rappresentata dall'immunità acquisita che si sviluppa quando l'individuo viene per la prima volta in contatto con un organismo estraneo. Accanto ad essa esiste un'altra forma di risposta immunitaria, chiamata immunità innata o naturale, dovuta a processi cellulari aspecifici: meccanismi di fagocitosi da parte di leucociti circolanti o cellule del sistema macrofagico-tessutale, distruzione degli organismi ingeriti ad opera dell'acidità dei succhi gastrici e degli enzimi digestivi, resistenza della cute alla penetrazione di organismi patogeni, presenza nel sangue di componenti in grado di attaccare organismi estranei (lisozima, sistema del complemento, cellule killer o natural killer).

Se l'immunità innata rappresenta la prima barriera difensiva e conferisce una resistenza completa o parziale ad alcune malattie, l'immunità acquisita è legata alla produzione di anticorpi e linfociti diretti verso specifici antigeni.

Si hanno due tipi fondamentali di immunità acquisita, tra loro strettamente correlati: l'immunità umorale e quella cellulo-mediata [Divate SA, 2000].

Quest'ultima immunità, svolta dai linfociti T, rappresenta per lo più la difesa contro i patogeni intracellulari, mentre l'immunità umorale è rappresentata dagli anticorpi secreti dai linfociti B, che contrastano soprattutto i microrganismi extracellulari e prevengono la diffusione di quelli intracellulari.

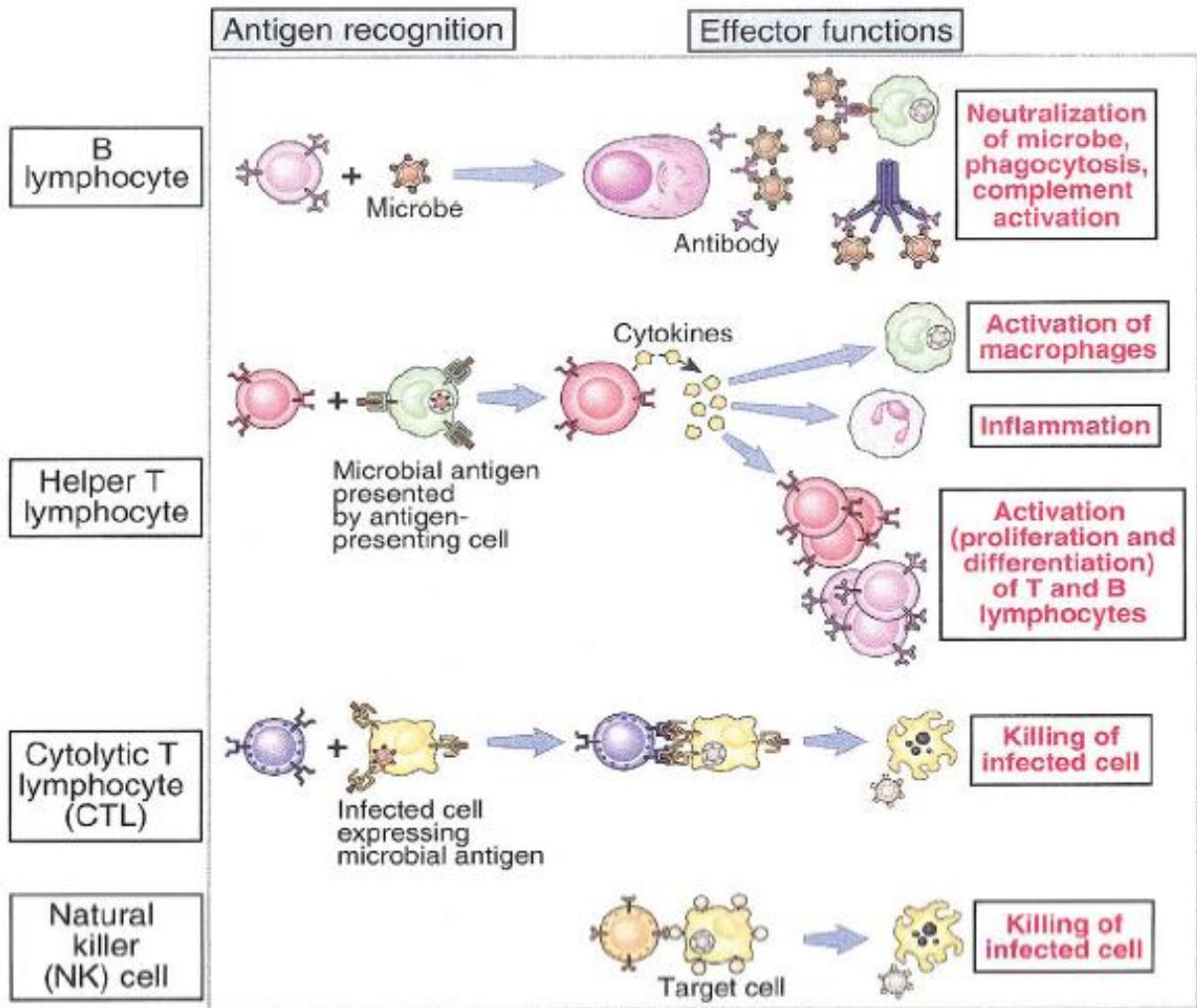


Figura 1 Da Connie L. Davis, AJKD 2004.

Riferendoci al tipo di trapianto più comune, cioè il trapianto allogenico, definiamo le molecole riconosciute estranee “alloantigeni”, mentre i fattori implicati nella risposta immunitaria, come i linfociti e gli anticorpi, si definiscono “alloreattivi”.

Le molecole di superficie del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) rappresentano gli antigeni più importanti implicati nel trapianto.

Ogni locus dell’MHC, definito anche Human Leucocyte Antigen (HLA), ha in diversa misura svariate forme alleliche e questo estremo

polimorfismo fa in modo che una condizione di perfetta identità fra non consanguinei sia estremamente rara; per tutti questi geni, inoltre, si ha l'espressione di entrambi gli aplotipi (codominanti).

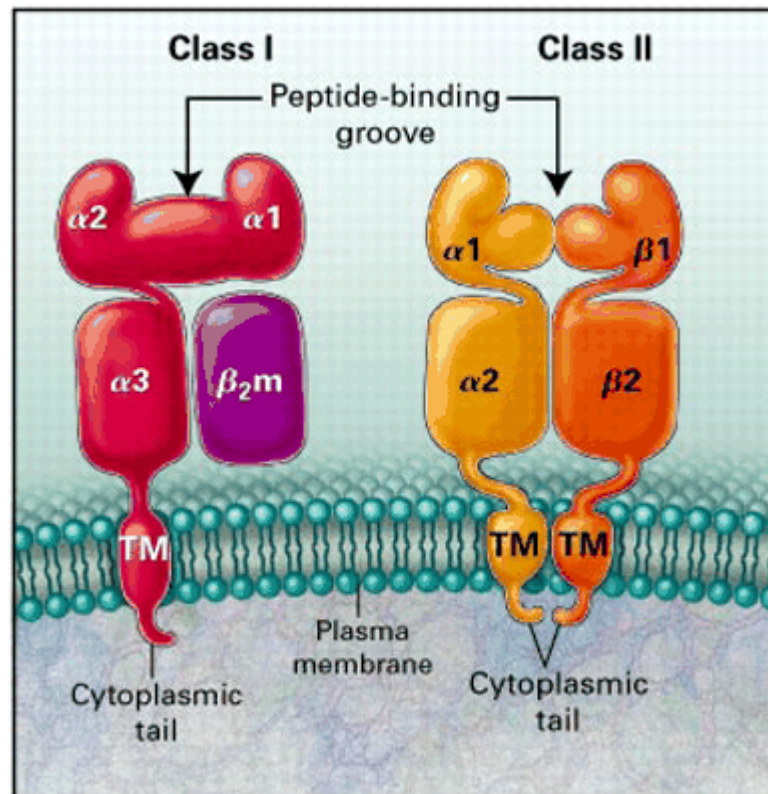


Figura 2 The Immune System. Peter J. Delves and Ivan M. Roitt. NEJM

Da tutto ciò si comprende il problema della compatibilità tra due soggetti, quali possono essere un donatore d'organo e il rispettivo ricevente. Uno dei criteri più importanti nei protocolli di selezione donatore-ricevente oggi in uso è rappresentato appunto dalla compatibilità dei loci dell'HLA (A, B e DR).

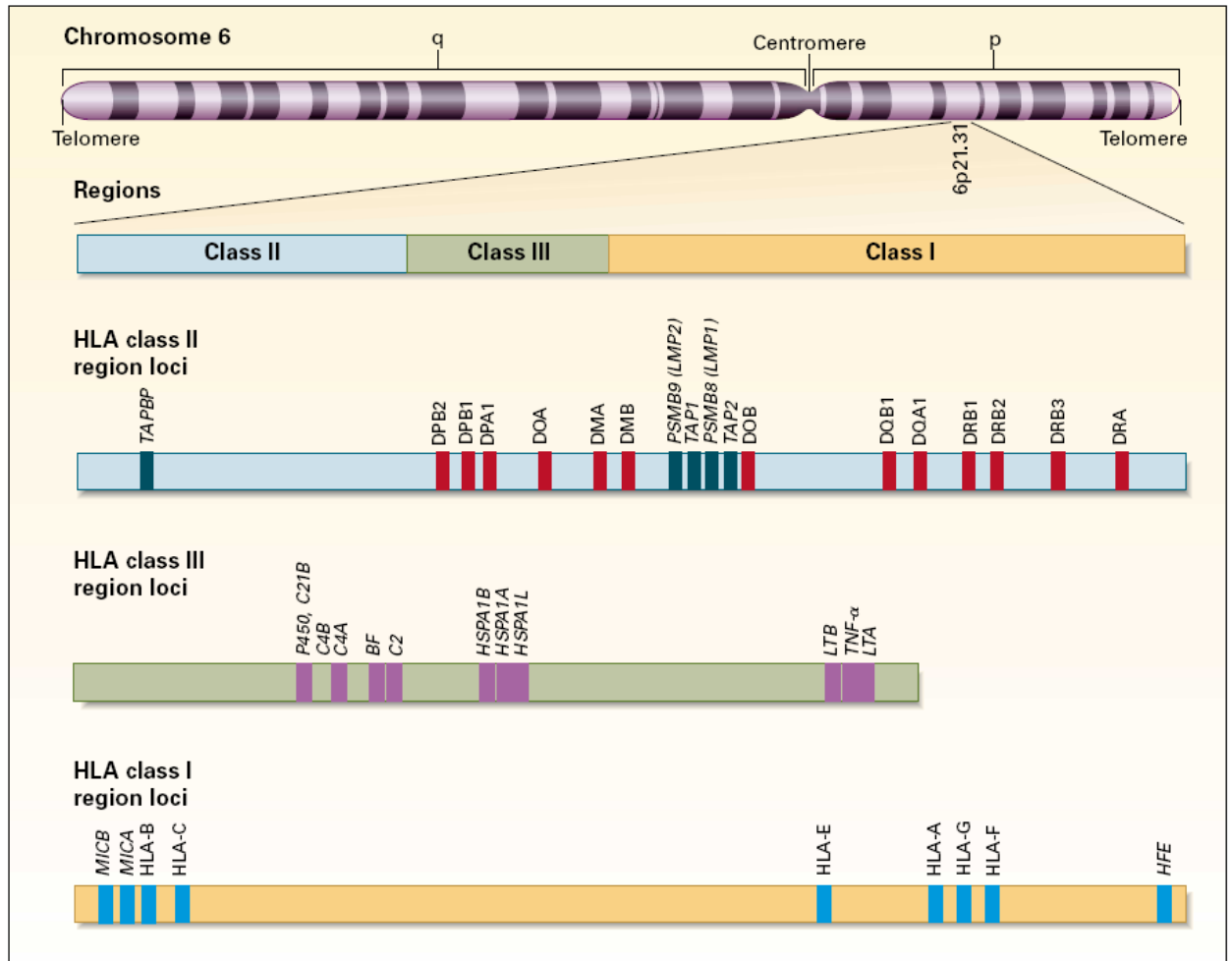


Figura 3. The HLA system, Jan Klein NEJM.

La risposta immune agli alloantigeni può essere sia umorale che cellulare, quest'ultima maggiormente coinvolta nel rigetto acuto (RA). In situazioni normali, il linfocita T riconosce differenze nei residui aminoacidici del peptide estraneo e successivamente si espande in modo clonale per combattere l'eventuale patogeno. Nel trapianto quello che succede è diverso: gli MHC allogenici danno una risposta che, rispetto alla normale, è superiore di diversi ordini di grandezza, probabilmente perché questi MHC, legando una larga varietà di peptidi differenti, determinano la risposta di un grande numero di cellule T alloreattive.

Secondo Divate et al. sembra che la via di riconoscimento più importante nel rigetto precoce del trapianto sia quella diretta, nella quale le cellule T responsive dell'ospite sono attivate dalle cellule dendritiche di passaggio MHC-incompatibili dell'organo trapiantato mentre il rigetto tardivo è progressivamente più influenzato dalla via indiretta [Divate SA, 2000].

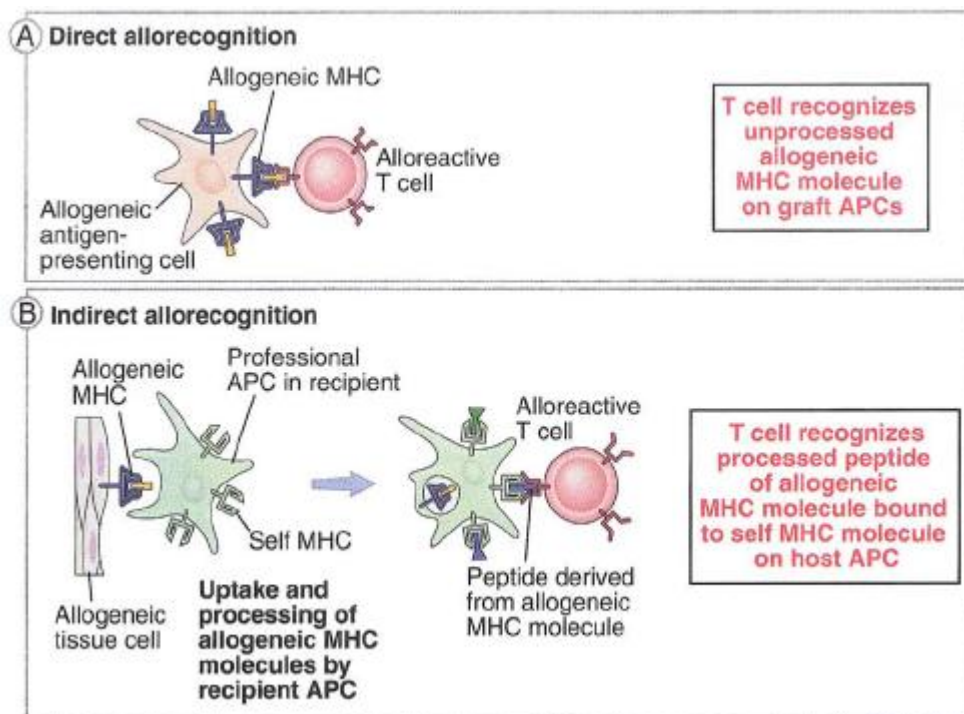


Figura 4 Da Connie L. Davis, *AJKD* 2004

Per quanto riguarda la risposta umorale, i processi che portano alla produzione di alloanticorpi contro MHC eterologhi sono molto meno conosciuti, ma intervengono anch'essi nella complessa reazione di rigetto. Solitamente l'immunità umorale media quello che è il rigetto iperacuto.

I meccanismi effettori implicati nel rigetto degli allotrapianti sono essenzialmente tre:

- i linfociti T citotossici (CTL) o CD8+, per la loro capacità citotossica intrinseca MHC-ristretta, possono lisare direttamente le cellule endoteliali e parenchimali del trapianto;
- i macrofagi attivati e reclutati dai linfociti T CD4+ alloreattivi innescano un danno di tipo DTH (Delayed Type Hypersensitivity, o ipersensibilità di tipo ritardato);
- gli alloanticorpi si legano all'endotelio e attivano il sistema del complemento, danneggiando i vasi sanguigni del tessuto eterologo.

1.3 Complicanze immunologiche del Trapianto di Rene

Uno dei problemi maggiori per la sopravvivenza del trapianto renale e strettamente correlato alla tolleranza è il rigetto d'organo, ossia l'insieme delle complesse risposte, prevalentemente di carattere immunitario, con cui l'organismo tende a distruggere i tessuti e gli organi riconosciuti come estranei.

Sono state identificate tre forme principali di rigetto: iperacuto, acuto e cronico.

1.3.1 Rigetto Iperacuto

Questa forma di rigetto è clinicamente caratterizzata dalla rapida distruzione dell'organo trapiantato che si verifica entro pochi minuti o qualche ora dal trapianto. Tale evento è difficilmente curabile e solitamente causa la perdita del rene, ma è ormai molto raro, quasi scomparso e facilmente evitabile grazie alle preventive prove di compatibilità tra donatore e ricevente (cross-match).

Il rigetto iperacuto è causato dalla presenza nel siero del ricevente di alti livelli di anticorpi preformati contro alloantigeni del donatore, per cause quali trasfusioni, gravidanze e precedenti trapianti. Questi

anticorpi sull'endotelio fissano il complemento, che attiva leucociti polimorfonucleati con distruzione dell'endotelio stesso in alcune ore o minuti.

Un rigetto simile è l'accelerato, ma in esso non vi sono anticorpi preformati e il rigetto può presentarsi dopo 2-3 giorni dal trapianto; tale evento riflette la presenza di una memoria immunologica specifica contro gli antigeni del trapianto, ed è dovuto a un rapido innalzamento delle cellule T e/o degli alloanticorpi contro gli alloantigeni.

1.3.2 Rigetto Acuto

Il RA si manifesta più frequentemente dopo la prima settimana o nei primi mesi dopo l'intervento, ma può verificarsi in ogni fase dell'evoluzione del trapianto soprattutto in conseguenza di una riduzione della terapia immunosoppressiva; esistono due principali forme di RA: cellulare o interstiziale e vascolare o umorale.

Il rigetto cellulare implica un infiltrato infiammatorio di linfociti e macrofagi che determina necrosi del parenchima del rene estraneo; qui vengono coinvolti diversi meccanismi effettori: lisi da macrofagi attivati, lisi da NK e, più importante tra questi, la lisi mediata da CTL CD8+.

Le Antigen Presenting Cells (APC) del donatore sembrano essere la popolazione cellulare più immunogenica, sia per l'elevata espressione di molecole costimolatorie e di adesione, sia per l'alta densità di MHC. Le APC dopo il trapianto migrano negli organi linfoidi secondari dove sono riconosciute dai linfociti CD4+ che si attivano e iniziano a produrre citochine che supportano l'espansione e la differenziazione di cellule effettrici (CD4+ attivate, CD8+, cellule B); queste migrano verso la sede del trapianto grazie al richiamo delle chemochine e

molecole d'adesione, originando le prime fasi del RA. [Diviate SA, 2000; Ponticelli C, 2001]

Il rigetto vascolare, caratterizzato dalla necrosi delle cellule dei vasi sanguigni e dei glomeruli dell'organo trapiantato, è mediato soprattutto dagli anticorpi IgG rivolti contro gli alloantigeni dell'endotelio e presuppone l'attivazione del complemento, ma anche i linfociti T contribuiscono a questo tipo di danno con lisi diretta o producendo citochine che reclutano e attivano cellule infiammatorie, responsabili della necrosi endoteliale.

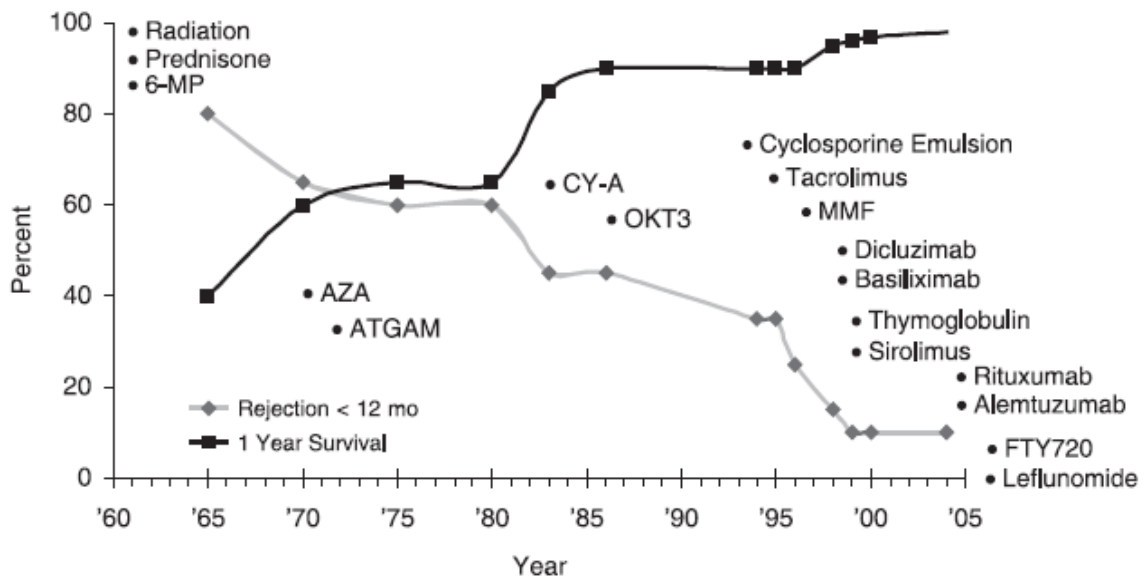


Figura 5 Episodi di rigetto ad 1 anno. Evoluzione nel tempo. Da Zand, Seminars in Nephrology, 2005.

Negli ultimi 10 anni il miglioramento delle terapie immunosoppressive con la scoperta di nuovi farmaci ha migliorato notevolmente l'outcome ad un anno dell'organo trapiantato.

Allo stato attuale la sopravvivenza dell'organo al primo anno di età risulta del 95% con l'incidenza del rigetto che si attesta attorno al 15%. Naturalmente non solo le nuove strategie terapeutiche, ma anche

il miglioramento delle tecniche di tipizzazione, di cross-match e della ricerca di anticorpi specifici contro il donatore hanno migliorato l'incidenza di eventi di rigetto acuto nel primo periodo post trapianto [Zand MS, 2005].

1.3.3 Rigetto Cronico

Il rigetto cronico si può verificare entro alcuni mesi dal trapianto o anche dopo anni: la sua patogenesi non è affatto chiara, ma è ipotizzabile l'intervento sia di fattori immunologici che non immunologici. Per questo motivo il termine "rigetto cronico" tende oggi ad essere sostituito dalla dicitura più corretta nefropatia cronica da trapianto (Chronic Allograft Disease, CAD). Essa rappresenta la principale causa di perdita tardiva dell'organo trapiantato che riduce gradualmente la sua funzione attraverso un lento processo di fibrosi a carico soprattutto delle cellule muscolari della tonaca intima delle arterie (arteriosclerosi) con conseguente atrofia parenchimale e fibrosi interstiziale.

Secondo Matas [Matas AJ, 1998] e altri autori [Joseph JT et al., 2001], il RA rappresenta un fattore di rischio per la CAD; è noto che riceventi con almeno un episodio di RA subiscono un decremento della sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato [Kamoun M, 2001; Matas AJ, 1998].

Cecka et al. [Cecka JM, 1991] affermano che riceventi senza episodi di rigetto nel primo mese post-trapianto hanno una percentuale di sopravvivenza dell'organo a un anno pari all'86% contro il 62% dei riceventi con almeno un RA durante il primo mese post-trapianto. Altre osservazioni riportano che l'emivita ($t_{1/2}$) dell'organo diminuisce sia all'aumentare del numero di RA [Cecka JM, 1991], sia all'aumentare del tempo di insorgenza; se l'episodio di RA si verifica

tardivamente (dopo il primo anno post-trapianto) il rischio di fallimento è maggiore [Matas AJ et al., 1999, Lindholm A et al., 1993].

Questa significativa dipendenza tra RA, CAD e perdita del trapianto, conduce la ricerca clinica attuale a finalizzarsi sulla prevenzione di entrambi gli eventi.

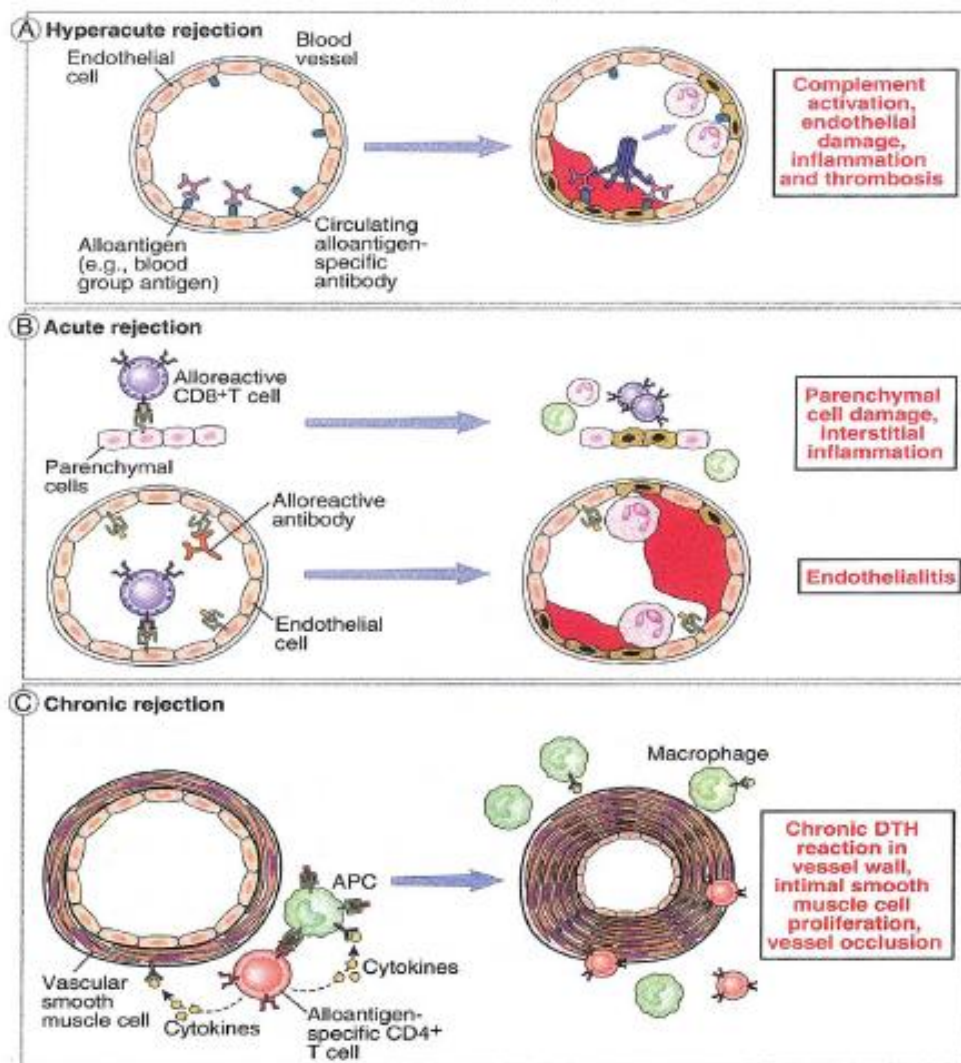


Figura 6 Connie L. Davis *American J Kidney Disease* vol 43 6(june) 2004

1.4 Terapia immunosoppressiva

La terapia immunosoppressiva usata attualmente prevede la combinazione di diversi farmaci al fine di sopprimere la risposta primaria e, in misura minore, la memoria immune, ma è gravata dal rischio di comparsa di infezioni e neoplasie.

La ciclosporina, introdotta negli anni '80, ha inaugurato una nuova era per l'immunodepressione ed ha notevolmente migliorato la sopravvivenza del rene trapiantato, tanto da rappresentare ancora oggi il farmaco di base nella terapia di mantenimento. La ciclosporina A (CsA) è un polipeptide di origine micotica che agisce inibendo la trascrizione dell'IL-2 e di altre citochine, bloccando di conseguenza la proliferazione delle sottopopolazioni linfocitarie.

È necessario un attento monitoraggio dei livelli ematici per raggiungere livelli terapeutici adeguati ed evitare il sovradosaggio. Occorre ricordare, infatti, che la ciclosporina ha importanti effetti collaterali quali nefrotossicità, ipertensione, epatotossicità, intolleranza al glucosio, irsutismo, iperplasia gengivale e tremori.

È utilizzata, con maggior efficacia, in associazione ai glucocorticoidi i quali, oltre ad impedire la migrazione dei monociti, esercitano un ulteriore blocco sulla produzione di IL-2. Tra questi, il più efficace è il prednisone: somministrato prima o al momento del trapianto, il suo dosaggio viene poi ridotto per evitare la predisposizione alle infezioni e il ritardo nella guarigione delle ferite, nonché altri importanti effetti collaterali, quali ipertensione, dislipidemia, intolleranza al glucosio, osteoporosi, gastrite e ulcera peptica.

I glucocorticoidi sono utilizzati, oltre che per la profilassi del rigetto, anche per il trattamento del rigetto acuto.

Un altro agente che presenta un meccanismo d'azione simile a quello della ciclosporina è il tacrolimus (FK-506), un macrolide lipofilico prodotto dallo *Streptomyces tsukubaensis* caratterizzato da un potente effetto immunosoppressore. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il tacrolimus è da 10 a 100 volte più potente della ciclosporina nell'inibire

la proliferazione linfocitaria di tipo T, la generazione dei linfociti citotossici, la produzione dei linfociti T attivati da mediatori solubili e nel diminuire i recettori di superficie solubili della IL-2.

La rapamicina (sirolimus), un immunosoppressore di recente introduzione (1999), è un altro macrolide micotico in grado di inibire la risposta linfocitaria alle citochine IL-2, IL-4 e IL-7 oltre che la proliferazione delle cellule muscolari lisce, dei fibroblasti e delle cellule endoteliali. Quest'ultima azione sembrerebbe utile nella prevenzione del rigetto cronico.

Un farmaco usato per decenni e poi reso opzionale dall'avvento della ciclosporina, è l'azatioprina. Questo agente inibisce la divisione e l'attivazione dei linfociti T e la proliferazione dei promielociti nel midollo osseo, interferendo con la sintesi del DNA e dell'RNA. Solitamente l'azatioprina si usa in associazione alla ciclosporina ed è necessario ridurre il dosaggio in caso di leucopenia, un effetto collaterale dovuto all'inibizione esercitata sul midollo osseo.

Attualmente viene spesso usato, in sostituzione all'azatioprina, il mofetil micofenolato che ha un meccanismo d'azione analogo. Determina un lieve grado di tossicità gastrointestinale e di soppressione del midollo osseo, a fronte di una maggior potenza nel prevenire il rigetto.

Un'altra classe di agenti è quella degli anticorpi monoclonali, prodotti dall'immunizzazione specifica di vari animali, che bloccano l'interazione MHC-TCR (T-cell receptor) per cui il linfocita perde funzionalmente i propri recettori ed è incapace di rispondere allo stimolo delle Antigen Presenting Cells (APC). Sono farmaci molto potenti, in genere utilizzati nel trattamento del rigetto acuto steroido-resistente. In tempi recenti, grazie alla tecnologia degli ibridomi è stato prodotto un ampio numero di anticorpi monoclonali diretti contro le molecole espresse dalle cellule effettrici del sistema immunitario.

1.5 Tolleranza immunologica e trapianto

Un ultimo aspetto da considerare quando si parla di risposta immunitaria e trapianto è quello della tolleranza immunologica. In questo contesto il termine tolleranza è inteso come il mancato danneggiamento dell'organo da parte dell'ospite, anche in assenza di terapia immunosoppressiva o anti-infiammatoria, o nel caso di una sua sospensione [Abbas A et al., 2002].

In condizioni di tolleranza immunologica si viene a creare uno stato di non responsività ad un antigene, indotto da una precedente esposizione a quello stesso antigene.

I meccanismi implicati nella tolleranza verso un allotrapianto sono:

- eliminazione a livello centrale delle cellule T alloreattive,
- anergia o inattivazione funzionale della cellula per assenza di segnali costimolatori o per la presenza di peptidi antigenici mutati
- delezione periferica dei linfociti T autoreattivi tramite morte cellulare apoptotica,
- ignoranza degli alloantigeni da parte dei linfociti T,
- soppressione attiva delle cellule T alloreattive per opera di cellule ad azione regolatrice.

L'induzione di tolleranza sarebbe estremamente auspicabile nel caso dei trapianti, trattandosi di un fenomeno specifico nei confronti degli alloantigeni, che eviterebbe gli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva non specifica, quali l'aumentata suscettibilità alle infezioni virali e alle neoplasie. Inoltre, l'ottenimento di una tolleranza verso il trapianto può ridurre l'incidenza di rigetto cronico, che ad oggi non è stata modificata dagli agenti immunosoppressivi di uso comune, capaci di prevenire e far recedere episodi di rigetto acuto [Abbas A et al., 2002].

2. BIOLOGIA DELLE CELLULE NATURAL KILLER (NK)

Le cellule Natural Killer sono una componente fondamentale dell'immunità innata e sono caratterizzate dalla capacità di lisi contro cellule bersaglio e di risposta precoce nella produzione di citochine immunoregolatorie senza bisogno di un riconoscimento antigene specifico, né di una precedente sensibilizzazione [Robertson MJ et al., 1990]. Esse costituiscono circa il 15% dei linfociti totali circolanti e sono caratterizzate fenotipicamente dall'espressione degli antigeni di superficie CD56 (NKH-1, Leu-19) e CD16 (Fc γ R III) e dalla assenza del corecettore CD3. L'antigene CD56, isoforma della molecola di adesione delle cellule neuronali NCAM, media l'interazione delle cellule NK con le cellule bersaglio; il CD16, invece, è un corecettore a bassa affinità della porzione Fc delle immunoglobuline G ed è implicato nella citotossicità cellulare anticorpo mediata [Cooper MA et al., 2001]. In base alla densità di superficie degli antigeni CD56 e CD16 sono state identificate due distinte sottopopolazione di cellule NK: quelle a bassa intensità di espressione del CD56 (CD56dim) e ad alta intensità del CD16, che costituiscono circa il 90%, e le cellule che esprimono CD56 ad alta intensità (CD56bright) e negative o a bassa intensità di espressione del CD16, che sono circa il 10%. Le cellule CD56dim svolgono una azione prevalentemente citotossica, le CD56bright secernono principalmente citochine [Cooper MA et al., 2001]. Le cellule NK esprimono costitutivamente anche i recettori ad intermedia ed alta affinità per l'interleuchina 2 (IL-2), che induce la proliferazione delle CD56bright e aumenta l'attività citolitica nelle CD56dim.

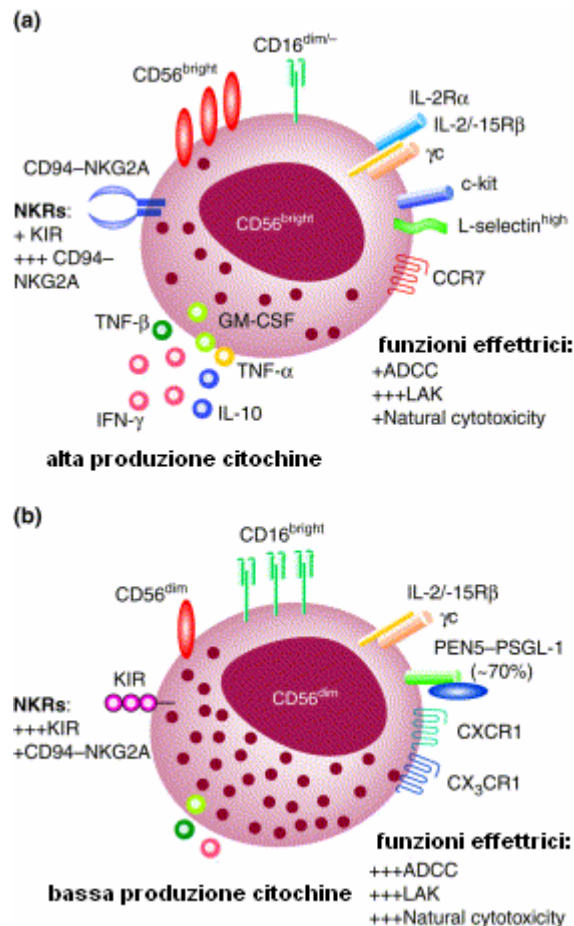


Figura 7. (a) cellula NK CD56bright, (b) cellula NK CD56dim

2.1 Origine e differenziamento

Le cellule NK derivano da precursori CD34+/Lin-/Flt3+/c-kit+ e la loro maturazione completa, funzionale e fenotipica, ha luogo nel midollo osseo. E' infatti necessario che il microambiente midollare sia intatto per evitare alterazioni cellulari. Lo stroma produce i fattori di crescita FL (ligando di flt3) e KL (ligando di c-.kit) che portano alla trasformazione del progenitore iniziale in un precursore intermedio, e l'interleuchina 15 (IL-15), che induce il differenziamento di quest'ultimo in cellula NK funzionale CD56bright [Cooper MA et al., 2001]. L'origine delle cellule NK CD56dim, invece, è ancora dibattuta: alcuni ipotizzano l'esistenza di un progenitore alternativo, altri invece suggeriscono lo stesso precursore attivato da fattori differenti. L'ipotesi più accreditata sostiene che derivino dalle cellule NK CD56bright.

Dopo il rilascio dal midollo osseo, la maggior parte delle cellule NK circola nel sangue periferico o migra nella milza; solo una piccolissima percentuale è rilevabile a livello del timo e dei linfonodi [Robertson MJ et al., 1990].

2.2 Ruolo fisiologico

I principali meccanismi di risposta funzionale in cui sono coinvolte le cellule NK nell'immunità innata sono tre:

1. Attività citotossica mediata da recettori di membrana o anticorpo mediata (ADCC) per l'eliminazione di cellule infettate da virus o tumorali.
2. Produzione di citochine coinvolte nella risposta infiammatoria o che attivano l'immunità adattativa o di regolazione dell'emopoiesi.
3. Proliferazione delle stesse cellule NK CD56bright e CD56dim.

2.2.1 Attività citotossica

L'attività citotossica delle cellule NK dipende dal bilancio tra recettori inibitori e attivatori espressi sulla superficie cellulare, così come dalla presenza di molecole di adesione e costimolatorie. Diversi sono gli studi che hanno dimostrato una maggior citotossicità da parte delle cellule NK CD56dim rispetto alle CD56bright. In accordo con questa differente funzione le cellule NK CD56dim mostrano una maggior granulosità. I meccanismi di lisi della cellula bersaglio sono diversi: le cellule NK immature richiedono l'intervento del TRAIL (tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand), mentre le cellule NK mature utilizzano preferenzialmente le vie di granulo-esocitosi mediate da granzima e perforina o da Fas-Fas ligand [Benjamin JE et al., 2010; Zamai L et al., 1998; Freud AG et al., 2006]. Altra via di attivazione della citotossicità è quella anticorpo mediata (ADCC) che coinvolge il recettore CD16. Il risultato finale è sempre l'induzione dell'apoptosi della cellula bersaglio.

2.2.2 Produzione di citochine

La secrezione di citochine da parte delle cellule NK crea un ponte tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa. Tramite la produzione di interferone- γ (IFN- γ) esse inducono una polarizzazione dei linfociti in senso Th1, l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche, un effetto diretto antivirale e antiproliferativo sulle cellule trasformate. Inoltre, producono tumor necrosis factor α (TNF- α) che aumenta la produzione di IFN- γ e il fattore di crescita dei granulociti-macrofagi (GM-CSF) che ne stimola la proliferazione e la capacità fagocitica [Benjamin JE et al., 2010].

2.2.3 Proliferazione

L'attività proliferativa delle cellule NK a differenza dei linfociti T o B non necessariamente richiede la presenza di fattori di costimolazione per partire. Questo è in accordo con la funzione precoce e aspecifica tipica delle cellule NK. Le cellule NK CD56bright sono in grado di proliferare in risposta a piccole dosi di IL-2 o di IL-15 ad alte concentrazioni *in vitro*. Anche altri fattori come FL, KL, IL-10 possono influenzare la proliferazione delle cellule NK CD56bright. Le cellule NK CD56dim, invece, richiedono stimoli più potenti per riprodursi.

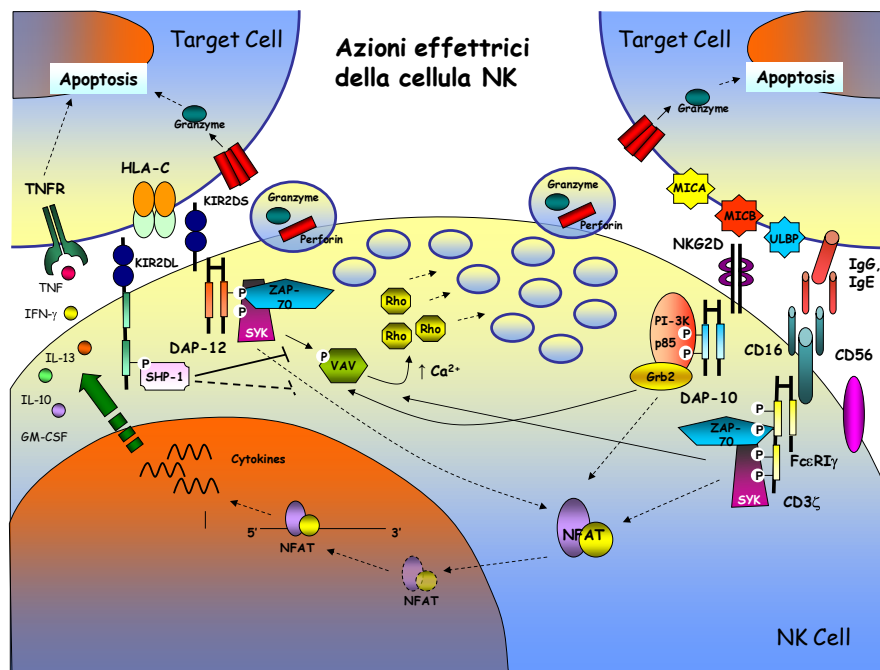


Figura 8. Azioni effettrici delle cellule NK

2.3 Recettori delle cellule NK

Le cellule NK esprimono uno svariato repertorio di recettori che si possono dividere in attivatori ed inibitori in base all'effetto che hanno sull'attività citotossica della cellula.

I recettori inibitori e attivatori possono classificarsi in due grandi gruppi:

- i Killer-cell Immunoglobulin-like receptors (KIR)
- i recettori eterodimerici contenenti domini lectinici “C-type” nella porzione extracellulare come il CD94/NKG2 e Ly49.

Hanno come ligandi le molecole MHC di classe I. Nell'uomo gli antigeni HLA-A, -B e -C e i non classici HLA-E,-G ed -F, sono espressi costitutivamente in quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo, anche se con diversa intensità.

Nel 1990 Ljunggren e Karre [Ljunggren HG et al., 1990] dimostrarono usando un modello tumorale sia *in vivo* che *in vitro* che le cellule NK erano attivate dalla perdita dell'antigene self dell'MHC di classe I sulla cellula bersaglio (Figura 9).

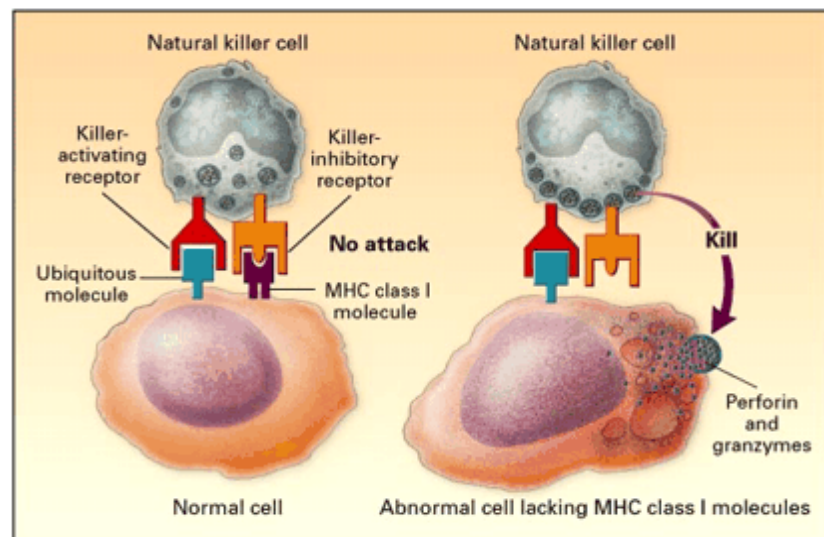


Figura 9. Attivazione NK secondo l'ipotesi del “missing self” (da Peter J. Delves e Ivan M. Roitt, *The Immune System*, NEJM).

Questa osservazione portò alla stesura dell'ipotesi del “missing self” che dimostrò che la perdita del MHC di classe I sulla cellula bersaglio rimuove il segnale inibitorio sull'attivazione citotossica delle cellule NK.

I recettori inibitori riconoscendo l'MHC di classe I permettono dunque la tolleranza del self e l'aggressione del non-self da parte delle cellule NK.

Recentemente sono stati identificati altri recettori sulla superficie delle cellule NK (NKR), definiti recettori della citossicità naturale (NKp46, NKp30, NKp44), e corecettori, che riconoscono molecole non MHC che vengono sovraespresse o espresse de novo in cellule sottoposte a stress, attivazione cellulare, infezione virale e trasformazione tumorale (es. le catene relate al complesso maggiore di istocompatibilità MICA e MICB, Rae-1, e ULBPs) [Moretta L. and Moretta A, 2004].

2.4 Ruolo dei KIR nelle cellule NK

I recettori KIR sono glicoproteine regolatorie, appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, espresse sulla superficie cellulare delle cellule NK. I recettori KIR interagiscono con le molecole HLA di classe I ed in particolare con quelle del locus HLA-C, con alcune specificità del locus HLA-B e del locus HLA-A e hanno la capacità di modulare l'attività citolitica delle cellule NK.

Sono suddivisi in due distinti gruppi a seconda del numero di domini extracellulari che presentano sulla membrana cellulare (2D e 3D). La parte intracitoplasmatica della glicoproteina è caratterizzata da una catena lunga “long” (2DL, 3DL), contenete due domini ITIM inibitori dell'attività citotossica NK, oppure dalla presenza di una catena corta “short” (2DS, 3DS) contenente un dominio ITAM che stimola l'attività citolitica (Figura 10).

L'unica eccezione è rappresentata dal recettore KIR2DL4 che, pur avendo una coda intracitoplasmatica lunga, possiede un solo dominio ITAM che media un segnale di tipo attivatore. In più, sembra essere l'unico KIR a non

avere un “corrispettivo” a catena corta e non ha una distribuzione clonale, ma è espresso in tutte le cellule NK.

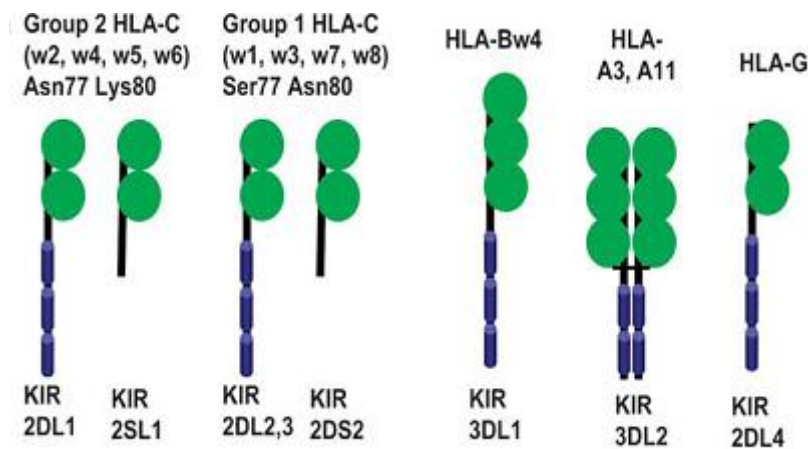


Figure 10. Struttura e funzione dei KIR. I KIR sono classificati in base al numero (2 o 3) di domini immunoglobulinici extracellulari (ovali in verde), e alla presenza di una coda citoplasmatica lunga “long” (L) o corta “short” (S). La coda citoplasmatica lunga dei KIR contiene i motivi ITIM (in blu che mediano un segnale inibitorio[da Farag SS et al., 2002]).

I KIR *inibitori* hanno principalmente la funzione di proteggere le cellule normali da un’azione citotossica autologa NK-mediata. Riconoscendo infatti le molecole MHC di classe I “self” sulla cellula bersaglio bloccano i segnali attivatori della citotossicità (Figura 11 A). In caso di *down-regolazione* o di assenza degli HLA autologhi, come in caso di cellule infette, neoplastiche, o allogeniche, tali recettori non sono più in grado di mediare il loro segnale inibitore e la cellula bersaglio diventa suscettibile alla lisi da parte delle cellule NK (Figura 11 B e C).

I KIR *attivatori*, il cui ruolo è stato meno indagato in letteratura, riconoscono gli stessi antigeni HLA dei KIR inibitori, anche se con un grado di affinità minore. Per questo motivo la loro azione è inibita dai KIR inibitori anche quando la cellula target esprime ligandi riconosciuti da entrambi (Figura 11 D).

In sostanza la cellula NK stabilisce un contatto con la potenziale cellula target tramite l’interazione dei suoi recettori, attivatori ed inibitori, con i ligandi disponibili sulla superficie di membrana di quest’ultima e

l'integrazione dei segnali trasmessi al suo interno determina poi l'attivazione o l'inibizione dell'attività citotossica.

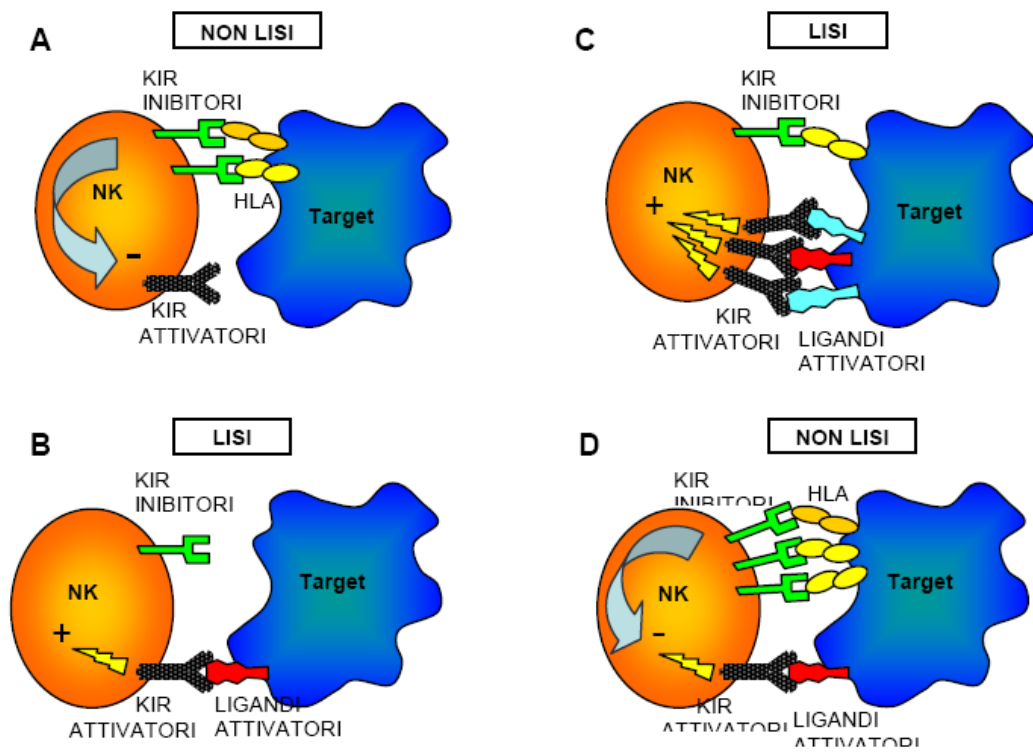


Figura 11. Regolazione dell'attività delle cellule NK attraverso i recettori KIR di tipo attivatorio e di tipo inibitorio. I KIR inibitori riconoscono come ligandi le molecole MHC di classe I (HLA) sulla superficie delle cellule e trasmettono un segnale di inibizione dell'attività citolitica delle cellule NK. I KIR attivatori in seguito al riconoscimento dei propri ligandi, mediano un segnale attivatorio che innesca l'azione citolitica delle cellule NK. A) Quando i recettori inibitori legano gli HLA, in assenza dell'interazione tra il recettore attivatorio e il proprio ligando, è generato un netto segnale negativo che blocca l'azione citolitica contro la cellula bersaglio. B) Al contrario, l'impegno del recettore attivatorio in assenza dell'interazione tra i KIR inibitori e i propri ligandi genera un netto segnale d'attivazione che innesca la lisi della cellula bersaglio. C) In questo caso, le interazioni tra ligandi e KIR attivatori predominano sulla debole interazione tra ligando e KIR inibitore con il netto risultato dell'attivazione della cellula NK e la lisi della cellula target. Questa situazione si può verificare quando i recettori attivatori o i ligandi sono sovraespressi, oppure quando i self-ligandi MHC di classe I sono sottoespressi, evento caratteristico durante le infezioni o le trasformazioni tumorali. D) Qui, predominano le interazioni tra HLA e KIR inibitori che preservano la cellula target dalla lisi [Farag SS and Caligiuri MA, 2006].

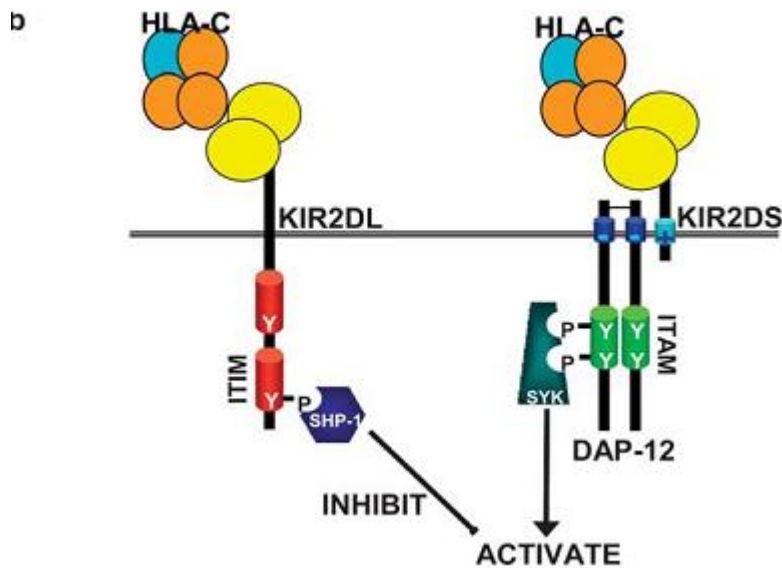


Figura 12 Segnalazione intracellulare dei KIR inibitori ed attivatori. I segnali inibitori sono mediati dalla fosforilazione dei motivi ITIM sulle code citoplasmatiche lunghe dalle chinasi della famiglia src, consentendo il legame delle tirosin fosfatasi SHP-1 e SHP-2 ai domini SH2 degli ITIM. SHP-1 è capace di defosforilare diversi target del pathway attivatorio mediato da ITAM, interponendo così un segnale negativo. Al contrario, le code corte dei KIR trasmettono il loro segnale attivatore in seguito a legame col ligando reclutando la molecola adattatrice DAP-12 che contiene i motivi ITAM fosforilati dalla famiglia delle chinasi src. Dap-12 fosforilata lega e attiva le tirosin chinasi Syk che genera la cascata attivatoria a valle. [Figura adattata da Farag SS et al., 2002].

2.5 MHC I e cellule NK

Come abbiamo visto, l'interazione tra l'antigene KIR e il corrispondente ligando ha come conseguenza la produzione di un segnale positivo o negativo che si estrinseca con un effetto regolatorio sulle cellule NK.

I principali ligandi dei geni KIR, come già detto, sono le molecole HLA di classe I e l'isotipo C è quello maggiormente coinvolto (Figura 13).

Il dominio HLA-Cw è sierologicamente distinto in due diversi allotipi:

- HLA-Cw di gruppo 1, caratterizzato dalla presenza di una serina in posizione 77 e di una asparagine in posizione 80.
- HLA-Cw di gruppo 2, contraddistinto da una asparagina in posizione 77 e da una lisina in posizione 80.

Dal punto di vista genomico al gruppo 1 appartengono HLA-Cw*01, *03, *07, *08, *12, *13, *14, *160, mentre fanno parte del gruppo 2 HLA-Cw *02, *04, *05, *06, *15, *162 e *170.

I KIR 2DL1 e 2DS1 interagiscono con il gruppo 2, mentre i KIR 2DL2, 2DL3 e 2DS2 con il gruppo 1.

La specificità per il Cw è definita unicamente da una singola sostituzione alla posizione 44 del KIR2D.

E' importante sottolineare che le cellule NK esprimenti recettori inibitori per il gruppo 2 possono lisare cellule che sono omozigoti per il gruppo 1 e viceversa.

Il KIR3DL1 interagisce con gli allotipi contenuti nella classificazione sierologica Bw4 mentre il KIR3DL2 con alcuni allotipi A (A*03 e A*11).

Possono comunque essere necessari residui addizionali per l'interazione con il KIR3DL1, come dimostrato dal fatto che gli allotipi HLA-A che presentano dei motivi appartenenti al gruppo sierologico Bw4 non sono capaci di legare il 3DL1.

Attualmente non sono stati dimostrati KIR che possano legare allotipi contenuti nella classificazione Bw6.[Carrington M and Norman P, 2003]

2DL1 and 2DS1	2DL2/3 and 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C grp 2	HLA-C grp 1	HLA-B Bw4	HLA-A	HLA-G	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Ligands for 2DL5, 2DS3, 2DS5, and 3DL3 remain undefined

Figura 13: Geni KIR e rispettivi ligandi HLA (da Carrington Mary, *The KIR Gene Cluster*)

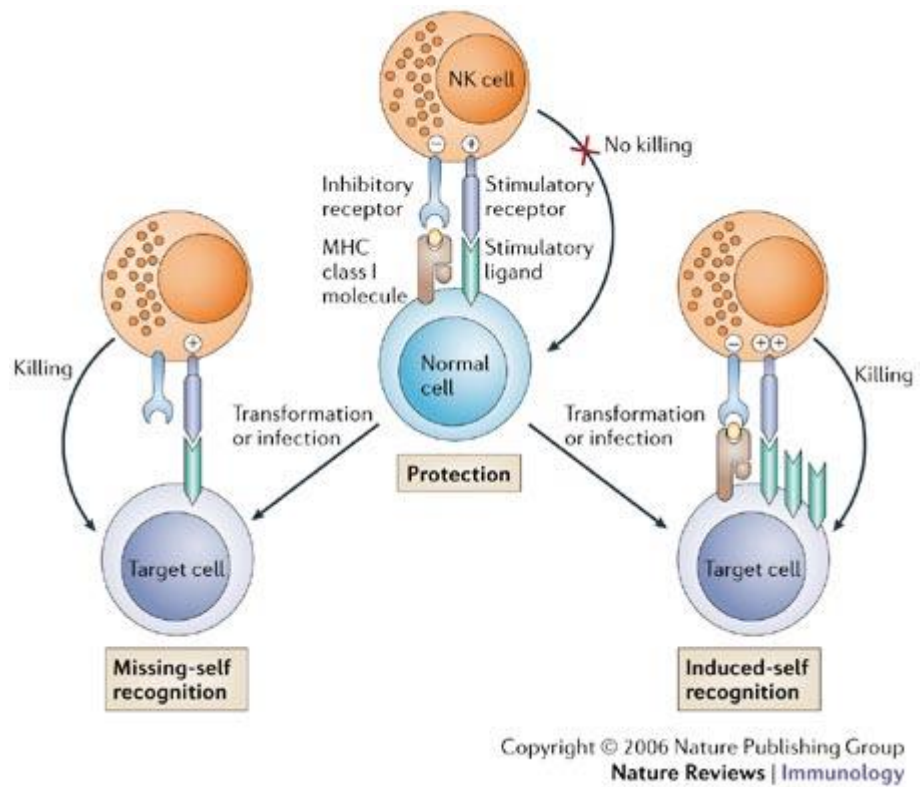


Figura 14. Attivazione o inibizione della citotossicità NK da parte degli antigeni MHC di classe I. (da David H. Raulet & Russell E. Vance Nature Reviews Immunology 2006).

3. GENI KIR

3.1 Nomenclatura dei geni KIR

Proprio per l'interesse nascente riguardo ai geni KIR e alle implicazioni che hanno sulla funzione delle cellule NK, la Commissione per la nomenclatura del Sistema HLA durante il 13° Workshop di Immunogenetica nel 2002 a Seattle, ha organizzato una sottocommissione che prendesse in esame e decidesse la nomenclatura universale, condivisa ed accettata dal mondo scientifico, per il Sistema KIR.

Circa 17 geni sono stati identificati e sono stati generati due sistemi per l'assegnazione dei nomi.

La più comune nomenclatura tiene conto delle strutture proteiche (Figura 15) e consiste di 4 suddivisioni maggiori basate su due caratteristiche:

- il numero di domini extracellulari (2D o 3D)
- le caratteristiche del dominio citoplasmatico

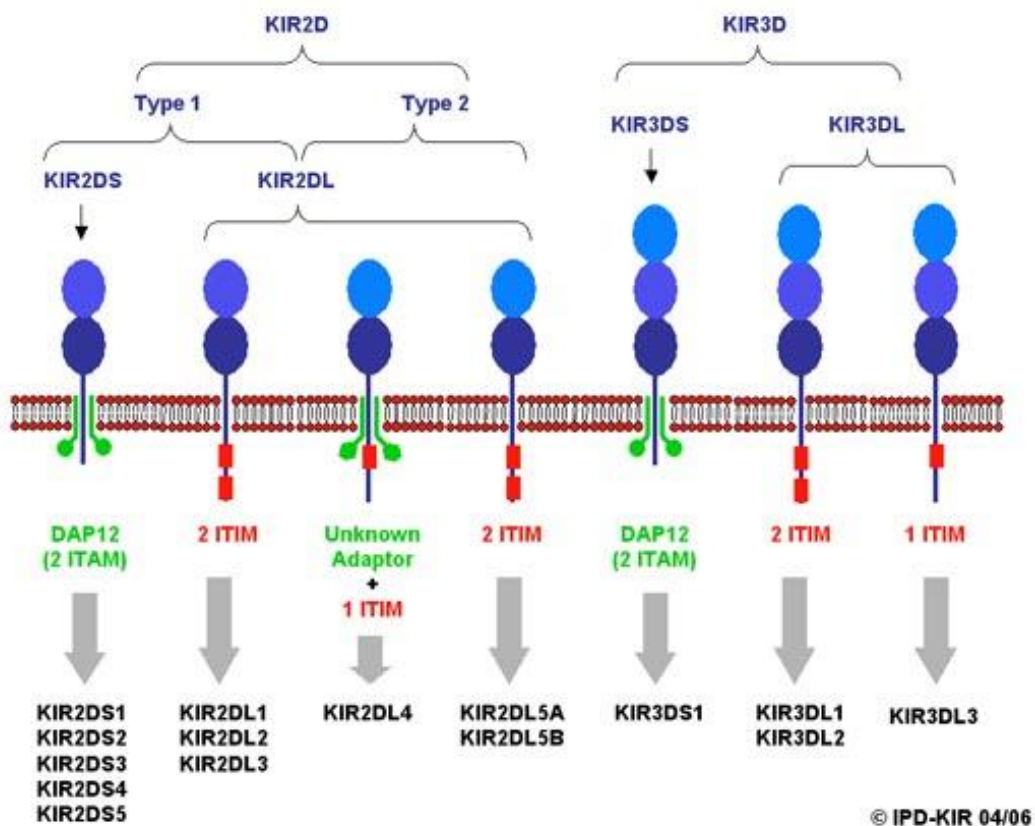


Figura 15: Struttura delle proteine KIR.

Essi sono anche classificati con la nomenclatura CD basata sull'approssimazione centrotelomerica dei geni sul cromosoma 19, ma questa classificazione non riflette la struttura, la funzione, l'espressione e la localizzazione.

La suddivisione in base al dominio citoplasmatico prevede la designazione L per il dominio lungo ed S per il dominio corto.

I recettori KIR con dominio citoplasmatico lungo hanno funzioni inibitorie in virtù della presenza degli immunorecettori inibitori per le tirosine (ITIM) lungo i domini intracitoplasmatici.

La coda corta, invece, trasmette segnali attivatori attraverso l'interazione con molecole adattatrici, come DAP12, che contengono immunorecettori attivatori delle tirosine (ITAM) [Uhrberg M et al., 2002; Cook MA et al., 2003].

Queste strutture sono caratteristiche anche di numerosi recettori come il CD5, CD22 e FcγRII.

Sono stati identificati anche due pseudogeni KIR: 2DP1 è simile al gene a due domini, mentre 3DP1 è simile al 3DL3 e rappresenta un gene ancestrale KIR [Hsu KC et al., 2002].

3.2 Organizzazione genomica dei KIR

La famiglia del gene KIR è localizzata sul cromosoma 19q13.4 nella regione del Leukocyte Receptor Complex (LCR). Più vicini al centromero si trovano i geni codificanti per il Siglec, incluso il CD22, il CD66 e, in regione telomerica, i geni codificanti per il FcαR, NKp46, GPVI (Figura 16).

La regione del KIR è allo stesso tempo estremamente variabile, ma anche altamente ordinata. I geni KIR sono arrangiati in maniera fortemente organizzata in 14 geni e 2 pseudogeni disposti in modo "testa-coda" a una distanza di circa 2.4 Kb l'uno dall'altro.

Inoltre un forte contributo alla diversità proviene dai polimorfismi dei geni KIR.

Lo scopo di questa diversità presumibilmente deriva dalla diversificazione della risposta immune nel contesto di un ambiente patogeno in continua evoluzione. Di conseguenza esiste una piccola probabilità che due individui selezionati a caso abbiano lo stesso genotipo KIR [Uhrberg M et al., 1997; Hsu KC et al., 2002].

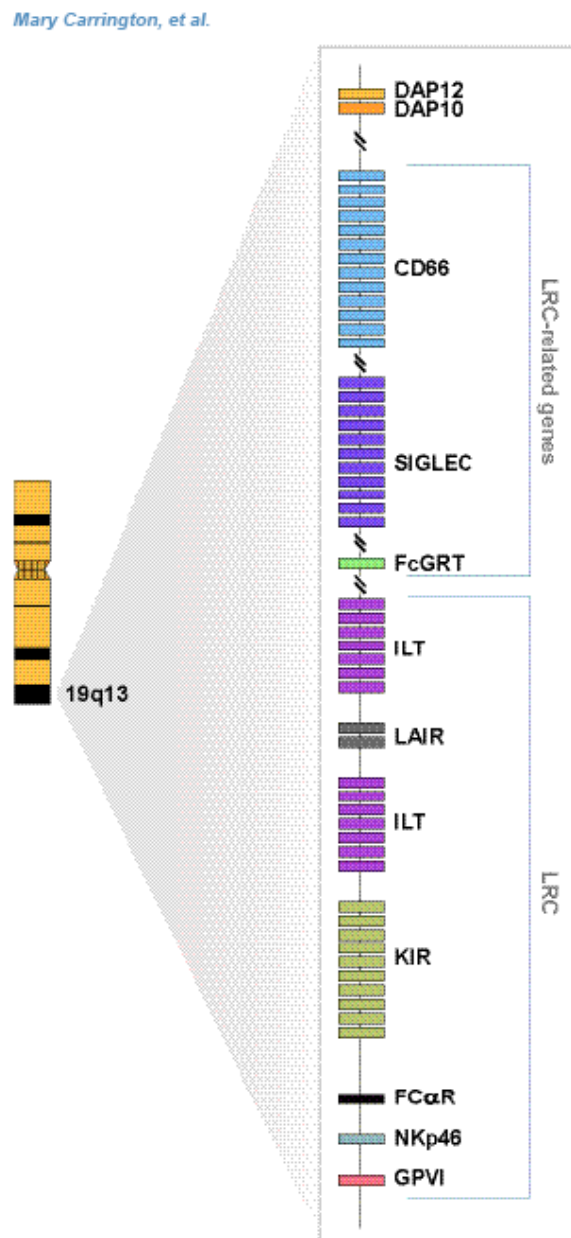


Figura 16: Regione genomica del gene KIR (da Carrington Mary, *The KIR Gene Cluster*).

3.2.1 Struttura del gene

I geni KIR sono costituiti da 9 esoni (Figura 17): gli esoni hanno un'altissima omologia di struttura nucleotidica superiore al 98%. Gli esoni 1 e 2 codificano la parte deputata al riconoscimento del peptide; i domini extracellulari D0, D1 e D2 sono codificati dagli esoni 3, 4 e 5 rispettivamente; l'esone 6 è strutturale; il 7 codifica per la parte transmembrana della molecola; la parte intracellulare è codificata dagli esoni 8 e 9.

I geni con 2 domini (2D) sono tutti funzionanti e la loro struttura è formata dagli esoni 1, 2, 4 e 9: la mutazione localizzata sul 3° esone è responsabile del blocco della trascrizione del dominio D0 della proteina di superficie. Tutte le cellule NK presentano almeno un gene con 2D. Particolare è la situazione di geni con 2 domini come i KIR2DL4, KIR2DL5A e KIR2DL5B, dove vengono codificati gli esoni dall'1 al 3, dal 5 al 9, mentre è assente l'esone 4 con conseguente mancata formazione del dominio D1.

Negli pseudogeni KIR2DP1 non viene codificato l'esone 3 con formazione di un codone di stop sul 4° esone, mentre nel KIR3DP1 si ha una delezione del 2° esone [Uhrberg M et al., 2002; Witt CS et al., 1999].

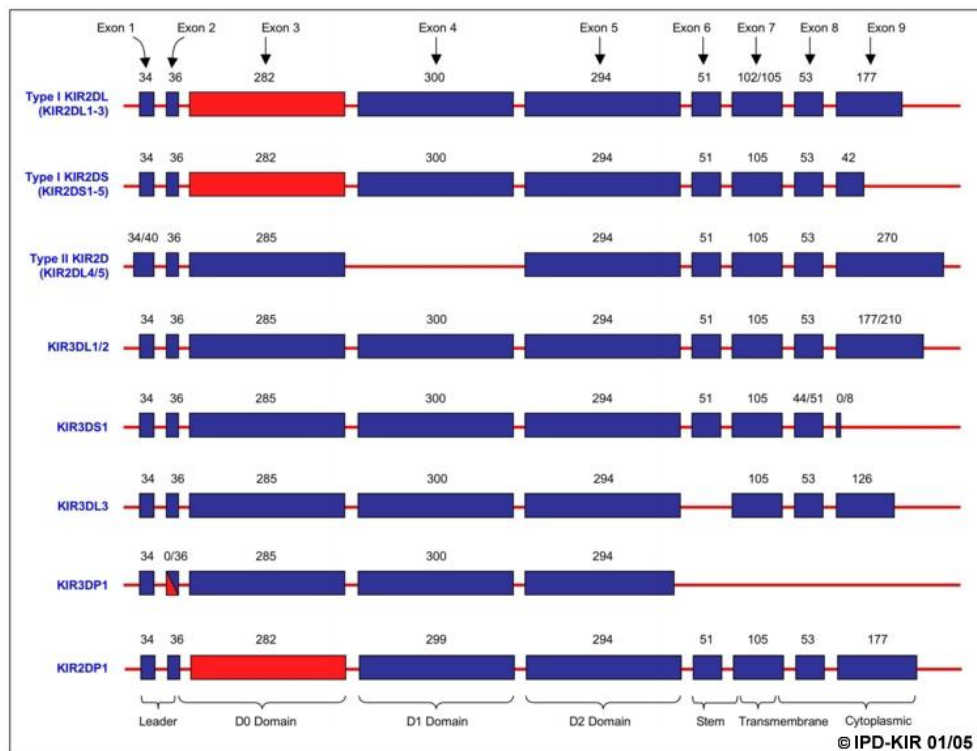


Figura 17: Struttura del gene KIR.

3.2.2 Aplotipi

Diversi studi hanno evidenziato due gruppi maggiori divisi in aplotipo A e B (Figure 18, 19, 20). L'aplotipo A è tradizionalmente definito da KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 e 3DL2. La sua caratteristica è quella di possedere un unico KIR attivatore il KIR2DS4. È stato anche dimostrato che la tipizzazione tradizionale per il gene KIR2DS4 non è capace di discriminare il gene intero da una sua variante comune, identica a 2DS4 ad eccezione di una delezione di 22 paia di basi nella sequenza codificante il dominio immunoglobulinico extracellulare [Hsu KC et al., 2002]. La delezione causa una interruzione nella traduzione e la prematura terminazione a livello del dominio transmembrana. Questa variante del gene 2DS4 è stata chiamata KIR1D34. La funzione di KIR1D è sconosciuta, ma la struttura proteica a cui corrisponde implica che probabilmente non svolga le stesse funzioni del recettore attivatorio intero. Con l'identificazione di KIR1D l'aplotipo A può essere diviso in 2 aplotipi, l'aplotipo A-1D e l'aplotipo A-2DS4, il primo ricorre con una frequenza del 38% nella popolazione caucasica e il secondo ad una frequenza dell'11,8%. L'identificazione dell'aplotipo A-1D ha richiamato su di sé molto interesse, perché indica che l'aplotipo più frequente nella popolazione caucasica manca di tutti i recettori KIR attivatori funzionali. L'unico recettore con funzione attivatoria, in questo aplotipo, rimane il gene strutturalmente centrale KIR2DL4, data la sua abilità, di mediare un segnale attivatorio oltre a quello inibitorio [Faure M et al., 2002; Selvakumar A et al., 1996].

L'aplotipo B è più variabile e caratterizzato dalla presenza di più di un gene KIR attivatore.

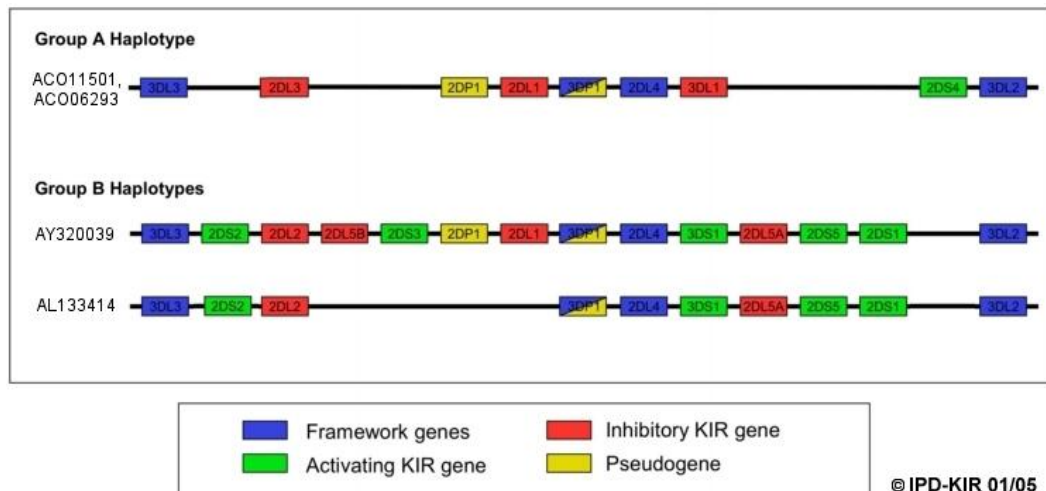


Figura 18: Aplotipi A e B

Nell'ambito dei geni KIR sono riconosciuti dei geni definiti "geni di struttura" quali il gene KIR2DL4, KIR3DP1, KIR3DL2 e KIR3DL3, che sono presenti in entrambi gli aplotipi.

L'aplotipo B è costituito da un numero variabile di geni (tra i 9 e i 12) ed è rappresentato nella popolazione con un numero maggiore di sottotipi.

Sono conosciuti ad oggi più di 100 profili genotipici, alcuni dei quali più rappresentativi nelle varie popolazioni, altri più rari se non unici.

La frequenza degli aplotipi A e B è pressoché sovrapponibile nella popolazione caucasica, ma sulla base del contenuto genetico gli aplotipi B presentano una più grande varietà di sottotipi [Uhrberg M et al., 2002,].

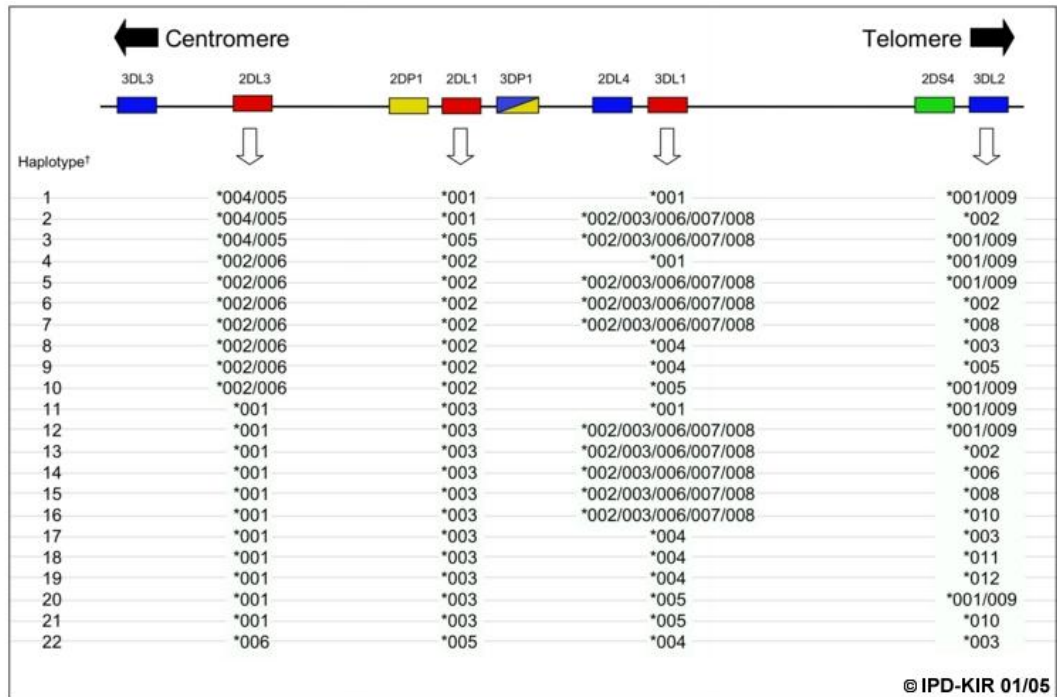


Figura 19: Varianti alleliche dell'aplotipo A (da Shilling et al, 2002).

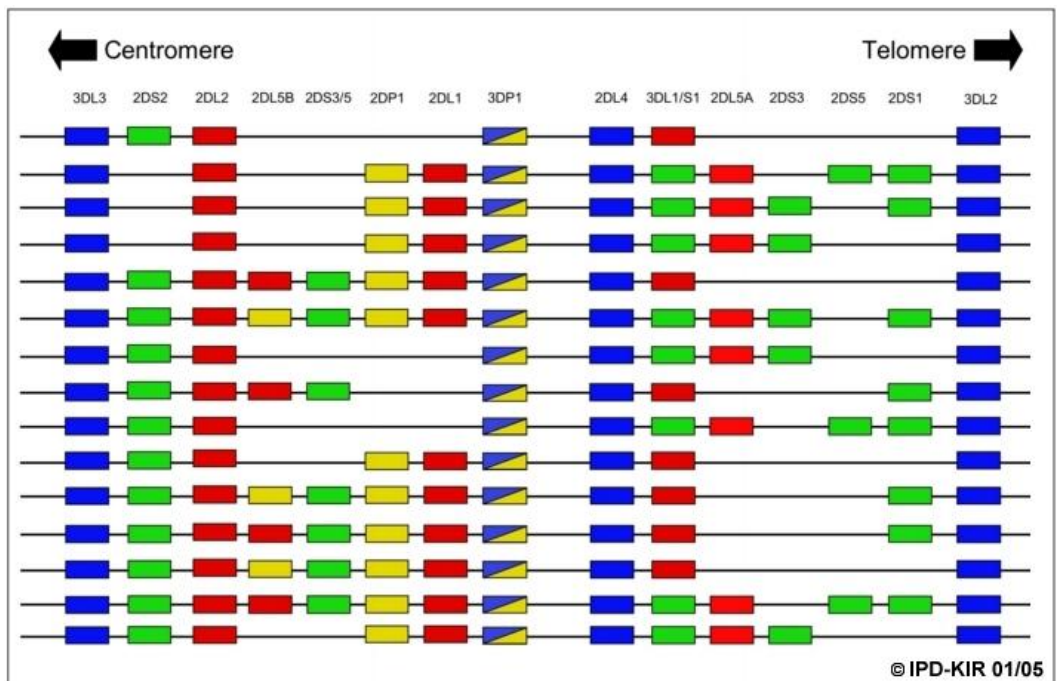


Figura 20: Diversità dell'aplotipo B (in blu sono indicati i geni KIR strutturali, in giallo gli pseudo geni, in rosso gli inibitori e in verde i geni attivatori).

3.2.3 Linkage disequilibrium

Grazie allo studio dei profili di soggetti non correlati si sono ottenute diverse informazioni sul linkage disequilibrium dei geni KIR e questo ha permesso di evidenziare come vi siano linkage disequilibrium negativi e positivi tra alcuni geni rappresentati negli aplotipi B.

Per esempio, se il gene KIR2DS1 è presente nel profilo osservato il gene KIR2DS4 è assente e viceversa, così come se il KIR3DS1 è assente il KIR3DL1 è sempre presente. Vi sono invece dei linkage disequilibrium positivi in cui la presenza del gene KIR2DL1 si associa quasi sempre alla contemporanea presenza dello pseudogene KIR2DP1.

Il sistema KIR si presenta con un certo polimorfismo nella sua composizione genetica, così come nel numero di alleli che si riconoscono nei vari geni. Tuttavia a differenza del sistema HLA, dove il polimorfismo è localizzato sul 2° esone per la classe II e sul 2°, 3° e 4° esone per la classe I, nel sistema KIR il polimorfismo allelico è distribuito su tutti gli esoni. Alcuni geni presentano caratteristiche particolari tanto che nel caso dei geni KIR2DS4 e KIR2DS1 si ipotizza che possano essere varianti dello stesso locus, mentre i geni KIR3DL1 e KIR3DS1 si ipotizza possano derivare da un crossing over tra un gene ancestrale non inibitore ed un gene ancestrale KIR3DL1.

Diversamente il gene KIR2DL2 si pensa che possa essere originato da una ricombinazione tra i geni KIR2DL1 e KIR2DL3.

Un'eccezione che conferma la regola è rappresentata dal gene KIR2DL4 che ha una coda citoplasmatica lunga, ma con un solo recettore per le tirosinchinasi, e contemporaneamente ha funzioni inibitorie e attivatorie.

4. CELLULE NK, GENI KIR E TRAPIANTO

Lo studio dell'alloreattività NK potrebbe dimostrarsi rilevante in tutte quelle situazioni in vivo in cui le cellule NK di un individuo incontrano cellule o tessuti con HLA di diversa origine.

I migliori risultati ottenuti dallo studio dell'alloreattività NK riguardano il trapianto di cellule staminali emopoietiche, ma recentemente si è puntata l'attenzione anche sul trapianto di organi solidi, specialmente per quel che riguarda l'outcome del trapianto nel breve termine, mentre resta mento indagato l'impatto di tale risposta immunitaria sul lungo termine.

4.1 NK tra immunità innata ed adattativa

Le cellule NK sono, tra gli attori principali dell'immunità innata, quelle che hanno maggiormente una funzione di ponte tra quest'ultima e l'immunità adattativa. Esse giocano un ruolo multiforme nel rigetto di un organo trapiantato. Da un lato, senza bisogno di una attivazione antigenica precedente, esse contribuiscono alla capacità del sistema dell'immunità innata di attaccare agenti patogeni, procurando una potente risposta citotossica di sorveglianza mediante l'espressione e l'escrezione di perforine, granzimi e fas-ligand. Dall'altro, le cellule NK, reclutate nei linfonodi, forniscono una fonte precoce di IFN- γ che promuove la attivazione dei linfociti in senso Th1. Nonostante questa loro importante azione contribuisca allo sviluppo di rigetto , non sembra essere comunque sufficiente a rigettare completamente un organo trapiantato.

4.2 NK e rigetto acuto e cronico

Le cellule NK hanno diversi modi di indurre o aumentare l'immunità adattativa e dunque contribuire al rigetto acuto di un organo. Innanzitutto esse hanno un ruolo importante nell'attivare le APC, specie le DC, potandole a maturazione e alla successiva attivazione delle cellule T. Inoltre le cellule NK sono una fonte precoce di IFN- γ che aiuta a personalizzare la generazione di immunità simil-Th1 da parte delle cellule T CD4 [Beilke JN et al., 2007].

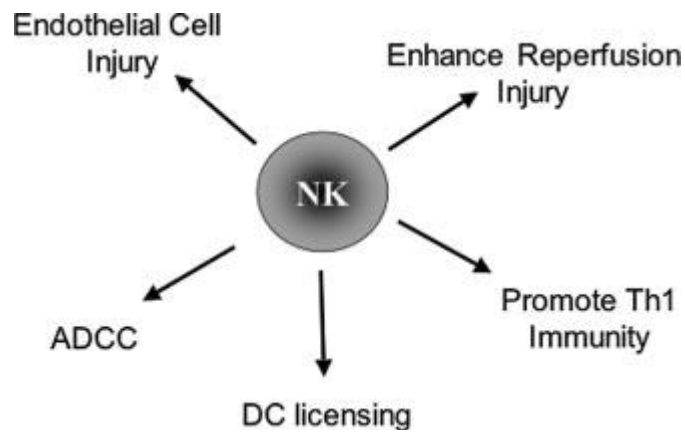


Figura 21. Diverse vie di coinvolgimento delle cellule NK nel rigetto acuto e cronico del trapianto (da Beilke JN et al., 2007).

Un contributo importante all'evidenza del ruolo delle NK nel rigetto viene da uno studio su trapianto cardiaco in topi CD28^{-/-} H-2b.

In assenza del recettore di costimolazione CD28, i cuori aploidentici (H-2b/d) sono tollerati senza necessità di immunosoppressione, mentre quelli provenienti da topi H-2d completamente mismatch rigettano acutamente.

La dimostrazione che questo rigetto dipende dalle cellule NK viene dal fatto che in seguito a deplezione di NK, i topi accettano sia i trapianti provenienti da topi H-2b/d che da quelli H-2d.

Un'interpretazione di questa risposta è che le NK nel topo H-2b siano sensibili all'assenza del self nei cuori H-2d, ma non in quelli H-2b/d (Figura 22).

Successivamente all'attivazione delle cellule NK, la cascata di eventi che porta al rigetto sorpassa l'assenza del recettore costimolatorio CD28. [Vilches C et al., 2006]

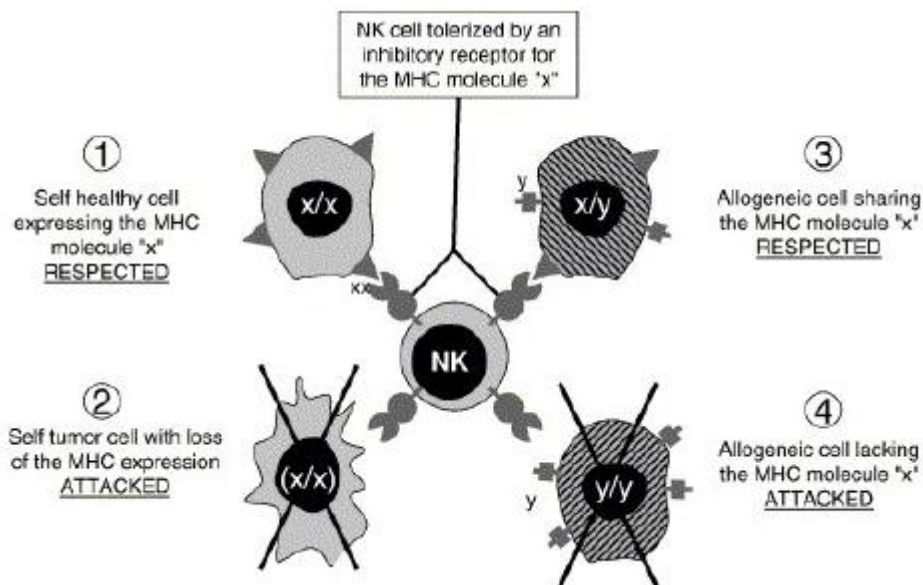


Figura 22: da Vilches Transplant Immunology 2006.

Infine le cellule NK sembrano avere un ruolo nel deterioramento cronico dell'organo trapiantato e sono coinvolte nel mediare patologie d'organo e vasculopatie. [Kim IK et al., 2008]

Coulson MT et al. hanno dimostrato come le cellule NK siano coinvolte nello sviluppo di danno cronico d'organo: infiltrano reni singenici trapiantati dopo danno da ischemia e riperfusione e in questo modo possono contribuire alla patologia d'organo cronica [Coulson MT et al., 2005]. Altri studi suggeriscono che le NK possano favorire lo sviluppo di vasculopatia cronica come risultato di "missing-self" MHC-I da parte delle cellule endoteliali [Uehara S et al., 2005].

4.3 NK e tolleranza

Meno indagato sicuramente è il ruolo delle cellule NK nella tolleranza d'organo. Esse mostrano infatti un duplice ruolo nel mediare rigetto o tolleranza d'organo. Beilke et al. hanno riportato in una serie di esperimenti che sia l'espressione di un pathway intatto dell'MHC di classe I dell'ospite, che le stesse cellule NK fossero necessarie per indurre la tolleranza di un organo.

Bersaglio delle cellule NK nell'induzione della tolleranza d'organo sono le cellule APC e le cellule T. Le cellule dendritiche (DC) sono regolate dalle NK, esse infatti ne dirigono la maturazione o l'uccisione in caso di "immaturazione". Non è ancora chiaro il meccanismo in base al quale dirigano l'azione in un senso o nell'altro. Nel trapianto una prima spiegazione potrebbe essere quella del "missing self" che porta all'eliminazione diretta delle cellule DC derivanti dal donatore. Questo porterebbe ad una riduzione della reattività diretta antidonatore da parte dei linfociti T. Un altro punto di vista potrebbe essere quello che le stesse cellule T attivate diventino target prossimali della regolazione NK mediata. Infatti l'induzione su tali cellule di segnali di stress cellulare (quali MICA o MICB) può portare all'attivazione della citotossicità NK tramite il recettore NKG2D [Beilke JN et al. 2007, Kim IK et al., 2008].

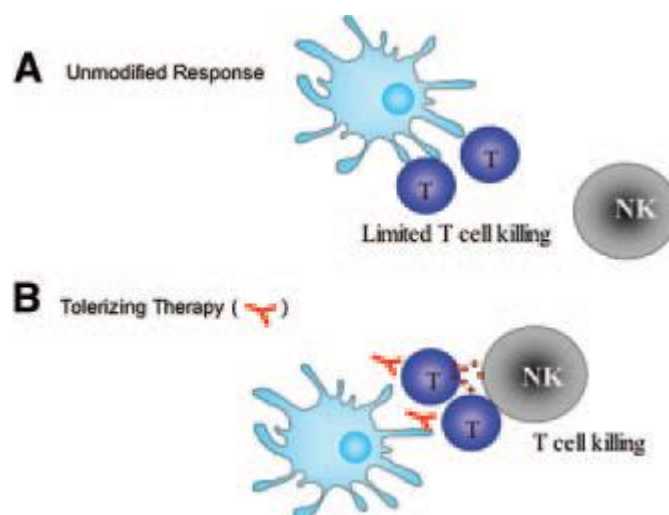


Figure 23. Targeting delle cellule T "stressate" da parte delle cellule NK durante l'induzione della tolleranza.

5. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare la funzione dei geni KIR delle cellule NK e dei rispettivi ligandi HLA nell'esito a breve e lungo termine del trapianto renale.

In particolare si sono volute verificare le ipotesi che un singolo gene KIR o la compatibilità fra KIR del ricevente e HLA di classe I del donatore potesse influire sullo sviluppo di rigetto acuto e sull'andamento della funzione renale post-trapianto.

Più in generale, questo progetto ha mirato ad ampliare le attuali conoscenze biologiche sul trapianto renale al fine di individuare nuovi possibili fattori di rischio per il rigetto acuto e cronico e migliorare la strategia terapeutica.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Pazienti

Il nostro studio ha arruolato 113 pazienti che hanno ricevuto un trapianto di rene presso l'U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico Universitario S.Orsola di Bologna tra il 1999 e il 2005.

Per ogni paziente abbiamo considerato anche rispettivo donatore. Tutte le coppie donatore / ricevente sono state analizzate in uno studio retrospettivo di tipo caso-controllo.

Criteri di inclusione:

Razza caucasica

Età > a 18 anni

Criteri di esclusione:

Gravidanza o allattamento

Gravi patologie a prognosi infausta a breve termine

Pazienti immunizzati, iperimmunizzati

Ritrapiantati

Pazienti portatori di trapianto renale combinato con altri organi (cuore, fegato...)

Pazienti con gravi complicanze urologiche

Primary non function

Presenza di neoplasia o di rigetto acuto vascolare.

La terapia immunosoppressiva era personalizzata e consisteva principalmente in due tipologie di trattamento:

Duplici: steroide + inibitore della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus)

Tripli: steroide + inibitore della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) + micofenolato.

6.2 Fasi dello studio

Il nostro studio è stato diviso in due fasi.

La prima è costituita da un'indagine retrospettiva e ha suddiviso la popolazione in casi e controlli in base all'assenza o presenza di rigetto acuto:

35 casi: pazienti con diagnosi clinica di almeno un episodio di rigetto acuto, diagnosticato con istologia o secondo criteri clinico-biochimici contemplati in letteratura, sia in corso di ricovero post-intervento che durante il follow-up (gruppo rigetto acuto: **RA**).

78 controlli: pazienti senza nessun episodio di rigetto acuto segnalato nella storia clinica (gruppo no rigetto acuto: **no RA**).

La seconda, sempre retrospettiva ha preso in considerazione la funzione renale a lungo termine.

La presenza di una riduzione della funzione renale del 20% è stata valutata considerando come criterio un aumento della creatinina sierica del 20% tra la creatinina a 3 mesi dal trapianto e la creatinina a 5 anni.

Sulla base di questi criteri diagnostici, la popolazione dei pazienti arruolati nello studio è stata divisa in 2 gruppi.

26 casi: pazienti che sono andati incontro ad un peggioramento della funzione renale (gruppo loss of renal function: **LRF**)

87 controlli: pazienti con funzione renale stabile (gruppo stable renal function: **SRF**).

Tutti i pazienti sono stati abbinati per sesso, età del donatore e ricevente, donatore cadavere o donatore vivente, il tempo in dialisi, il tempo di ischemia fredda, HLA mismatches e terapia.

6.3 Metodiche di biologia molecolare

6.3.1 Estrazione del DNA genomico

Per procedere all'analisi del genotipo è necessario estrarre il DNA genomico da un campione di sangue intero dei pazienti da analizzare.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue dal quale è stato estratto il DNA genomico mediante il kit Genomic Prep™ Blood Isolation Kit (Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA). Il kit è progettato per isolare il DNA da cellule nucleate del sangue.

Il primo passaggio è la lisi dei globuli rossi: ai 300 µl di sangue intero vengono aggiunti 900 µl di soluzione di lisi (RBC), si agita per inversione e si procede ad un'incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo una centrifugazione di un minuto a 13000-16000 g, si rimuove il sovrantante, lasciando il pellet in 10-20 µl di liquido residuo nel quale verrà risospeso. Mediante l'aggiunta di 300 µl di un detergente anionico (soluzione di lisi) che solubilizza i componenti cellulari, vengono lisate anche le cellule bianche in presenza di un agente DNA-protettivo; quest'ultimo limita l'attività delle DNasi presenti sia nella cellula che nell'ambiente.

A questo punto, per rimuovere contaminanti di RNA, viene effettuato un trattamento con 1,5 µl di RNasi a 37°C per 15 minuti.

Nella fase successiva vengono eliminate le proteine citoplasmatiche e nucleari con l'aggiunta di 100 µl di soluzione di precipitazione.

Dopo centrifugazione, le proteine formeranno un denso pellet ben separato dal sovrantante: tale frazione contiene il DNA e sarà raccolta in un'altra provetta.

Il DNA genomico viene isolato per precipitazione con l'aggiunta di 300 µl di alcool isopropilico al 100 %. Dopo due lavaggi consecutivi con 300 µl di etanolo al 70 %, il pellet viene lasciato asciugare all'aria per 10-15 minuti. Successivamente, il campione essiccato viene reidratato con 100 µl di acqua distillata sterile (H₂O RNase DNase free Ultra Pure, Invitrogene life technologies, Carlsbad, USA) overnight a temperatura ambiente.

Da un volume iniziale di 300 μ l di sangue intero è stata ottenuta una quantità di DNA genomico compresa tra 100 e 400 ng/ μ l.

6.3.2 KIR SSO Genotyping test-Luminex®

Uno dei più recenti approcci alla tipizzazione molecolare del sistema HLA, come di altri sistemi (es. geni KIR), è l'utilizzo di microsfere fluorescenti come supporto di oligonucleotidi specifici (Figura 24).

L'interpretazione dei dati avviene mediante un piccolo citofluorimetro, detto Luminex 100, sul quale sono stati recentemente sviluppati diversi sistemi di tipizzazione (Figura 25).

Si tratta di uno strumento che utilizza due laser: uno che emette luce ad una lunghezza d'onda di 532 nm (Reporter) in grado di eccitare il fluorocromo arancio (Ficoeritina) e l'altro che emette a 635 nm (Classification) e che eccita fluorocromi classificati fra il rosso e l'infrarosso.

Una miscela di biglie può essere utilizzata per legare antigeni, anticorpi o, nel caso della tipizzazione molecolare, oligonucleotidi diversi ed essere discriminata dal citofluorimetro sulla base dell'intensità di fluorescenza che viene attribuita ad ogni set di biglie.

La versatilità e la potenzialità fornita da una sospensione di microsfere permette un utilizzo del Luminex per più tecniche nel campo dell'immunogenetica.

Il principio della metodica è basato sulla tecnica di PCR-SSO reverse [Crum KA et al., 2000] in cui il supporto di immobilizzazione degli oligonucleotidi è rappresentato dalle microsfere e non da una membrana. Il DNA viene amplificato tramite PCR con l'utilizzo di primers e deossinucleotidi biotinilati per permetterne in seguito il rilevamento tramite ficoeritina coniugata a streptavidina (SAPE).

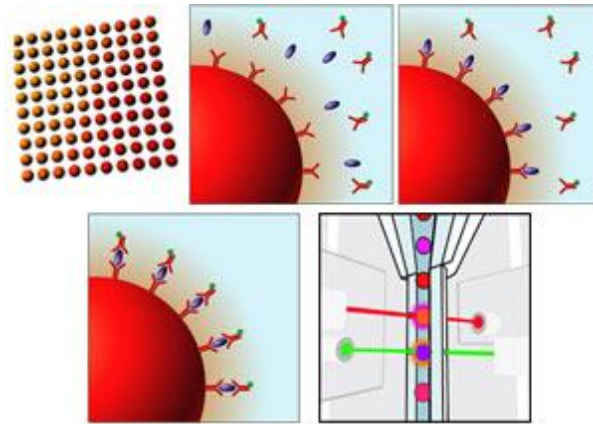


Figura 24: Sistema di tipizzazione molecolare con utilizzo di microsfeere.



Figura 25: Citofluorimetro Luminex 100.

Oltre all'utilizzo di sonde specifiche per il sistema HLA, recentemente è stato progettato un kit che utilizza sonde specifiche per i diversi geni KIR. [Nong T et al., 2007]

Lo studio complessivo del sistema KIR utilizza 3 miscele di primers che hanno lo stesso programma di amplificazione facilitando la tipizzazione estesa del singolo campione.[Gomez-Lozano N et al., 2000]

Il primer KIR-1 amplifica l'esone 3, il KIR-2 l'esone 5 e il primer KIR-3 gli esoni 7, 8 e 9.

Nella fase di ibridizzazione, il templatato denaturato viene incubato con una miscela di biglie, ognuna delle quali è legata ad uno specifico oligonucleotide.

Gli oligonucleotidi che riconoscono la sequenza complementare sull'amplificato si legano durante la fase di ibridizzazione.

Aggiungendo il complesso streptavidina-ficoeritrina (SAPE) che si lega per avidità alle biglie che hanno sulla loro superficie il filamento costituito dall'oligonucleotide e dall'amplificato biotinilato, è possibile discriminare le biglie positive.

L'acquisizione del segnale emesso dalle biglie viene raffigurato su una mappa in cui sono evidenziate le aree corrispondenti all'emissione di luce di ogni set di biglie presenti nella miscela.

Le biglie che hanno ibridizzato l'amplificato, e di conseguenza si sono legate alla SAPE, vengono elencate in una tabella e riportate per intensità di fluorescenza.

Per risolvere ambiguità di risultato o evidenziare nuovi alleli, il sistema permette di aggiungere dei set di nuove biglie legate ad oligonucleotidi.

I vantaggi della tecnologia, oltre al grado di risoluzione della tipizzazione, possono essere riassunti in:

- possibilità di testare contemporaneamente un alto numero di campioni;
- rapidità del test (per il sistema KIR possono essere acquisiti al Luminex circa 32 campioni diversi, considerando che ognuno viene amplificato con tre mix di primers differenti);

Il kit utilizzato è fornito dalla One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA ed è costituito dai seguenti componenti:

- Miscela pre-ottimizzata e testata di microsfere associate alle sonde con legame covalente
- Tamponi da usare nella reazione di ibridizzazione per agevolare il legame del DNA bersaglio alla sonda
- Tampone di lavaggio per rimuovere il DNA non legato
- Tampone SAPE per diluire la soluzione madre SAPE

- Reagenti per amplificazione del DNA (miscela primer pre-ottimizzata di KIR loci-specifici)
- Reagente D-Mix (amplificazione appositamente formulata)

Ciascuna miscela di microsfere, oltre alle microsfere fluorescenti coniugate alle sonde nucleotidiche sequenza specifiche, comprende un controllo negativo e positivo recante microsfere per la sottrazione dei segnali di sfondo non specifici e la normalizzazione dei dati grezzi per compensare la possibile variazione nella quantità di campione e nell'efficienza della reazione. Le miscele di microsfere sono preottimizzate per i particolari prodotti di PCR ottenuti mediante amplificazione del DNA usando le miscele di primers degli esoni 3, 5, 7-9. Le miscele primer sono pre-ottimizzate per consentire l'amplificazione locus specifica a partire da una quantità di DNA genomico pari a 40 ng in un volume di 20 µl, se utilizzato insieme alla D-Mix, con la quantità prescritta di Taq polimerasi ricombinante e seguendo il programma di amplificazione riportato dal kit.

Protocollo

La procedura applicata consta di più fasi riportate di seguito nel dettaglio:

Amplificazione:

1. Utilizzare DNA alla concentrazione tra 25-200 ng/µl con un rapporto A260/280 >1,65.
2. Preparare la miscela di amplificazione secondo lo schema:

N. di reazioni	D-mix	Primer	Taq polimerasi
1	13.8	4	0.2

Per preparare la reazione di PCR di un campione, prendere:

3. 2 µl di DNA alla concentrazione preferibile di 20 ng µl.
4. Aggiungere 18 µl della miscela di amplificazione (vedi tabella)
5. Mettere i campioni così preparati nel termociclatore impostando il seguente ciclo termico:

Step	Temperatura e tempo di incubazione	N° di cicli
Step 1	96°C 03:00	1
Step 2	96°C 00:20	5
	60°C 00:20	
	72°C 00:20	
Step 3	96°C 00:10	30
	60°C 00:15	
	72°C 00:20	
Step 4	72°C 10:00	1
Step 5	4°C forever	1

Denaturazione e neutralizzazione:

6. Accendere termociclatore impostato con programma a 60°C infinito;
7. Prendere una piastra da 96 pozzetti per amplificatore;
8. Aggiungere 2,5 µl di tampone di denaturazione;
9. Trasferire in ogni pozzetto 5 µl di amplificato, miscelare con cura ed incubare a temperatura ambiente per 10 minuti;
10. Aggiungere 5 µl di tampone di neutralizzazione e risospendere fino al viraggio di colore da rosa a giallo pallido;
11. Mettere su un panetto di ghiaccio.

Fase di ibridazione:

12. Preparare la miscela di ibridazione secondo lo schema. Le microsfere vanno agitate per 30 secondi. NON VANNO PIU' CONGELATE, MA CONSERVATE A + 4°C;

SCHEMA: 4 µl di sfere x N. campioni da testare +1

34 µl di tampone di ibridizzazione x N. campioni da testare +1.

13. Preparata la miscela, vortexare e prendere 38 μl da dispensare in ogni pozzetto;
14. Coprire la piastra con la membrana di carta plastificata ed agitare su vortex a bassa velocità;
15. Metterla nel termociclatore a 60°C utilizzando il cuscinetto rosso mattone ed incubare per 15 minuti (nel nuovo amplificatore non importa);

Lavaggi:

16. Togliere dall'amplificatore e aggiungere rapidamente 100 μl di tampone di lavaggio già pronto all'uso. Coprire con una membrana identica alla precedente;
17. Centrifugare per 5 minuti a 2700 giri;
18. Con un colpo secco rimuovere il sovrantante ed asciugare dolcemente la piastra su un tampone di carta.
19. Ripetere altre due volte i passaggi del lavaggio (16-19)

Trattamento con SAPE:

20. Durante la terza centrifugazione preparare la SAPE 1X. La SAPE è in soluzione madre 100X. Poiché il volume necessario è di 50 μl per campione, preparare un volume sufficiente per il numero dei campioni da testare +1.

N. TEST	SOL. MADRE SAPE 100X (μl)	TAMPONE SAPE (μl)
1	0.5	49.5
10	5	495

21. Accendere l'apparecchio per la lettura;
22. Terminato l'ultimo lavaggio, rimuovere il sovrantante, aggiungere 50 μl di SAPE 1X ad ogni pozzetto. Coprire la piastra ed agitare sul vortex;

23. Metterla nel termociclatore a 60°C, utilizzando il cuscinetto rosso mattone ed incubare per 5 minuti;
24. Rimuovere la piastra e aggiungere rapidamente 100 µl di tampone di lavaggio. Centrifugare per 5 minuti a 2700 giri (centrifuga haerus);
25. Eliminare il sovrnatante e aggiungere 70 µl di tampone di lavaggio, il volume finale sarà di circa 80 µl;
26. Miscelare bene la piastra cercando di evitare di fare delle bolle, perché altrimenti il citofluorimetro non distingue le bolle dalle biglie;
27. Trasferire nella piastra di lettura che ha un fondo conico. Coprire con la stagnola e mantenerlo a +4°C al buio fino alla lettura, che può essere effettuata anche il giorno seguente.

6.3.3 Acquisizione dei dati

I campioni per lo studio della tipizzazione vengono preparati in piastre da 96 pozzetti con una distribuzione univoca per permettere di collegare, con il programma dell'analisi, i risultati ottenuti dalle tre amplificazioni.

Il Luminex richiede inizialmente l'apertura di un foglio di lavoro comprendente tutte le anagrafiche dei campioni. Viene poi inserita una funzione di collegamento dei dati acquisiti nei tre pozzetti per la definizione della tipizzazione. Il Luminex acquisisce per in prima istanza i risultati, che vengono poi trasferiti in un successivo programma di analisi per la definizione della tipizzazione. Il programma di analisi prevede delle videate che evidenziano il confronto fra la reattività delle singole sonde nella seduta e quella ottenuta nel controllo di qualità della ditta.

Tramite un'apposita funzione è possibile evidenziare le singole sonde e la loro reattività.

Se le reattività non presentano dubbi e le sonde positive per quel determinato campione hanno tutte superato il valore di cut-off, il software è in grado di dare il risultato della tipizzazione.

6.4 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata eseguita con il software SAS 9.1 per Windows.

E' stato utilizzato il test del χ^2 o il test esatto di Fisher per valutare l'associazione tra i geni KIR e la coppia KIR-HLA e la riduzione di creatinina del 20% a 5 anni.

Il test del χ^2 è applicato a grandi campioni quando si è in presenza di variabili nominali e si vogliono confrontare le frequenze di due campioni provenienti dalla distribuzione in studio e dalla distribuzione teorica attesa.

Il test esatto di Fisher è un test utilizzato nell'ambito della statistica non parametrica che sostituisce il test del χ^2 in caso di piccoli campioni.

Per ciascun KIR e ciascuna coppia KIR-HLA è stato calcolato il Rischio Relativo e il corrispondente Intervallo di Confidenza al 95%, di avere una creatinina maggiore al valore mediano a 5 anni. Il Rischio Relativo è calcolato come il rapporto tra la probabilità di creatinina maggiore del valore mediano nei pazienti con l'assenza del KIR (KIR=negativo) e la probabilità di creatinina maggiore del valore mediano nei pazienti con presenza di KIR (KIR=positivo).

Infine è stato verificato l'effetto dei KIR e delle coppie KIR-HLA sulla funzione renale, considerando i valori di creatinina in continuo nei diversi follow-up. A tale scopo è stata calcolata una Analisi della varianza (ANOVA) non parametrica a misure ripetute. Successivamente è stata realizzata una analisi post hoc con il calcolo del test di Tukey per verificare le differenze tra tutte le possibili coppie di valori medi di creatinina in ciascun follow-up.

7. RISULTATI

7.1 Analisi delle caratteristiche generali della popolazione

Le caratteristiche demografiche dell'intera popolazione sono riportate nelle tabelle 1 e 2.

	RA (n=35)	no RA (n=78)	P
Maschi/Femmine	15/20	30/48	ns
Età paziente (anni)	47.6 ± 11.9	47.8 ± 12.8	ns
HLA mismatch			
HLA-A	1.32 ± 0.63	1.19 ± 0.67	ns
HLA-B	1.14 ± 0.71	1.08 ± 0.68	ns
HLA-DR	0.76 ± 0.64	0.45 ± 0.50	ns
Tempo d'ischemia fredda (ore)	16.49 ± 4.00	16.72 ± 5.06	ns
PRA > 5% picco	18.00 ± 24.67	9.88 ± 17.94	ns
PRA > 5% media	4.62 ± 5.95	2.85 ± 4.94	ns
N° rigetti			
1	31	0	ns
2	4	0	ns
Creatinina dimissione	1.67 ± 0.54	1.54 ± 0.57	ns
Creatinina a 3 mesi	2.04 ± 1.04	1.53 ± 0.44	ns
Creatinina a 5 anni	2.02 ± 0.82	1.48 ± 0.53	ns
MDRD dimissione	48.50 ± 21.63	51.57 ± 18.58	ns
MDRD a 3 mesi	37.63 ± 14.90	50.10 ± 14.62	ns
MDRD a 5 anni	38.96 ± 15.13	52.49 ± 16.22	ns
Tipo dialisi			
Emodialisi	29	63	ns
Dialisi peritoneale	6	15	ns
Età dialitica (mesi)	48.0 ± 45.04	37 ± 36.52	ns

Tabella 1: Caratteristiche demografiche della popolazione suddivisa in rigetto (RA)/non rigetto (no RA).

	LRF (n=26)	SRF (n=87)	P
Maschi/Femmine	16/20	52/35	ns
Età paziente (anni)	46.73 ± 12,8	47,8 ± 12,8	ns
HLA mismatch			
HLA-A	1.11 ± 0.71	1.26 ± 0.63	ns
HLA-B	1.15 ± 0.66	1.08 ± 0.70	ns
HLA-DR	0.57 ± 0.64	0.54 ± 0.5	ns
Tempo d'ischemia fredda (ore)	16.30 ± 5.28	16.68 ± 4.61	ns
PRA > 5% picco	8.5 ± 2.12	12.35 ± 19.99	ns
PRA > 5% media	4.00 ± 5.67	3.57 ± 1.41	ns
N° rigetti			
1	12	23	ns
2	1	3	ns
Creatinina dimissione	1.2 ± 0.70	1.57 ± 0.51	ns
Creatinina a 3 mesi	1.3 ± 0.57	1.71 ± 0.75	ns
Creatinina a 5 anni	2 ± 0.89	1.43 ± 0.38	ns
MDRD dimissione	61.5 ± 21.98	50.77 ± 18.75	ns
MDRD a 3 mesi	59.46 ± 17.21	45.81 ± 15.43	ns
MDRD a 5 anni	25.29 ± 11.99	53.61 ± 14.99	ns
Tipo dialisi			
Emodialisi	20	71	ns
Dialisi peritoneale	6	16	ns
Età dialitica (mesi)	40.93 ± 41.48	37.6 ± 32.60	ns

Tabella 2: Caratteristiche demografiche della popolazione suddivisa in loss of renal function (LRF)/stable renal function (SRF).

La distribuzione dei KIR nella nostra casistica è risultata in linea con le frequenze della popolazione italiana, come mostrato in tabella 3.

KIR	PAZIENTI n° (%)	DONATORI n° (%)	Studio Italiano^a (%)
2DL1	111 (98%)	108 (96%)	95%
2DL2	70 (62%)	59 (52%)	53%
2DL3	99 (88%)	95 (84%)	88%
2DL4	113 (100%)	113 (100%)	100%
2DL5	66 (58%)	61 (54%)	58%
2DS1	56 (50%)	47 (42%)	36%
2DS2	79 (70%)	64 (57%)	53%
2DS3	46 (41%)	40 (35%)	33%
2DS4	108 (96%)	105 (93%)	92%
2DS5	41 (36%)	39 (35%)	28%
3DS1	36 (32%)	42 (37%)	35%
3DL1	108 (96%)	105 (93%)	96%
3DL2	113 (100%)	113 (100%)	100%
3DL3	113 (100%)	113 (100%)	100%
2DP1	111 (98%)	108 (96%)	95%
3DP1	113 (100%)	113 (100%)	100%

Tabella 3: Frequenze dei geni KIR nella popolazione dei riceventi, dei donatori e della popolazione italiana. [^a Dati da Bontadini A et al.,2006].

L'analisi descrittiva della popolazione ha mostrato una distribuzione uniforme degli aplotipi nella popolazione esaminata, con una prevalenza della variante A rispetto alle varianti B (vedi tabella 4).

KIR APLOTYP	PATIENT	Italian study
AA	17 (15%)	28.5%
AB	91 (81%)	69.5%
BB	5 (4%)	2%

Tabella 4: Frequenze degli aplotipi dei KIR nella popolazione di pazienti in studio e della popolazione italiana.

7.2 Analisi della genotipizzazione KIR e HLA nella popolazione

Allo scopo di valutare l'impatto del genotipo sull'outcome del trapianto di rene, i pazienti arruolati sono stati analizzati mediante due studi paralleli di tipo caso-controllo: nel primo si è utilizzato come criterio il rigetto acuto, nel secondo un peggioramento della funzione renale del 20% (sulla base del valore di creatinina sierica) a 5 anni dal trapianto.

7.2.1 Correlazione con il rigetto acuto

Nell'analisi di tipo caso-controllo basata sul rigetto acuto, come criterio per valutare l'influenza del genotipo sull'outcome del trapianto, i pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi: casi, ovvero pazienti andati incontro ad almeno un episodio di rigetto (gruppo RA, n=35) e controlli, ovvero pazienti senza rigetto (gruppo no RA, n=78). I risultati delle indagini relative alla genotipizzazione KIR del campione sono riportate in tabella 5.

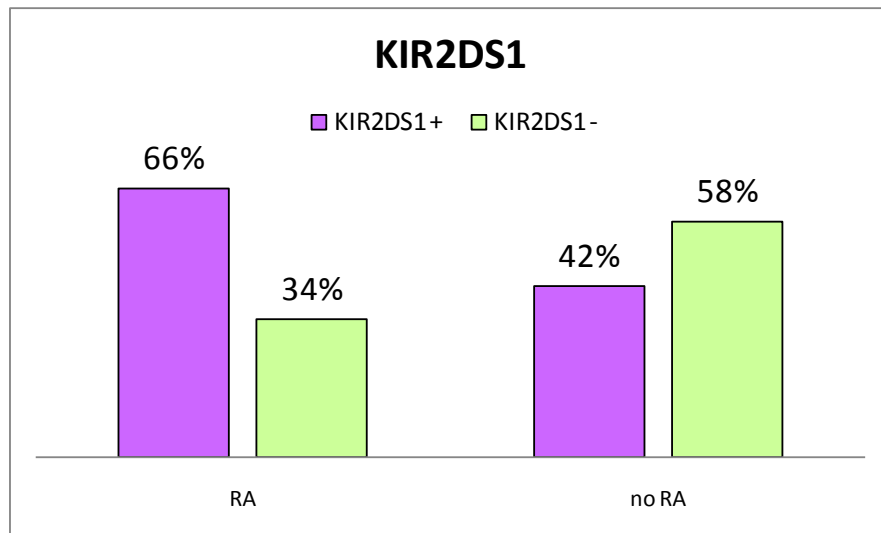
KIR	RA (n=35)	no RA (n=78)	P
2DL1	34(97%)	77 (98%)	0.5571
2DL2	19(55%)	51 (65%)	0.2612
2DL3	30(86%)	69 (88%)	0.6819
2DL4	35(100%)	78 (100%)	1.000
2DL5	25(72%)	41 (53%)	0.2534
2DS1	23(66%)	33 (42%)	0.0214
2DS2	23(66%)	56 (72%)	0.5146
2DS3	15(44%)	31 (40%)	0.7554
2DS4	35(100%)	73 (94%)	0.1255
2DS5	15(44%)	26 (33%)	0.3303
3DS1	22(63%)	34 (44%)	0.0582
3DL1	35(100%)	73 (94%)	0.1255
3DL2	35(100%)	78 (100%)	1.000
3DL3	35(100%)	78 (100%)	1.000
2DP1	34(97%)	77 (98%)	0.5571
3DP1	35(100%)	78 (100%)	1.000

Tabella 5: Frequenze dei geni KIR nella popolazione dei pazienti trapiantati suddivisa in suddivisa in rigetto (RA)/non rigetto (no RA).

Dal confronto delle frequenze dei geni KIR tra i pazienti con rigetto e quelli senza rigetto, si sono riscontrate differenze significative per il gene KIR2DS1; infatti tale gene è assente nel 58% dei controlli ed è presente nel 66% dei casi studiati, come risulta dalla figura 26. È stato calcolato anche l'odds ratio aggiustato che ha riportato un valore pari a 2.613 in un intervallo di confidenza CI 95% = 1.140 - 5.993.

Il gene KIR3DS1 è presente nel 63% dei casi e assente nel 56% dei controlli, come mostrato nella figura 26. Anche in questo caso si è calcolato il valore dell'odds ratio pari a 2.190 (95% CI = 0.966 - 4.966), al limite della significatività.

A



B

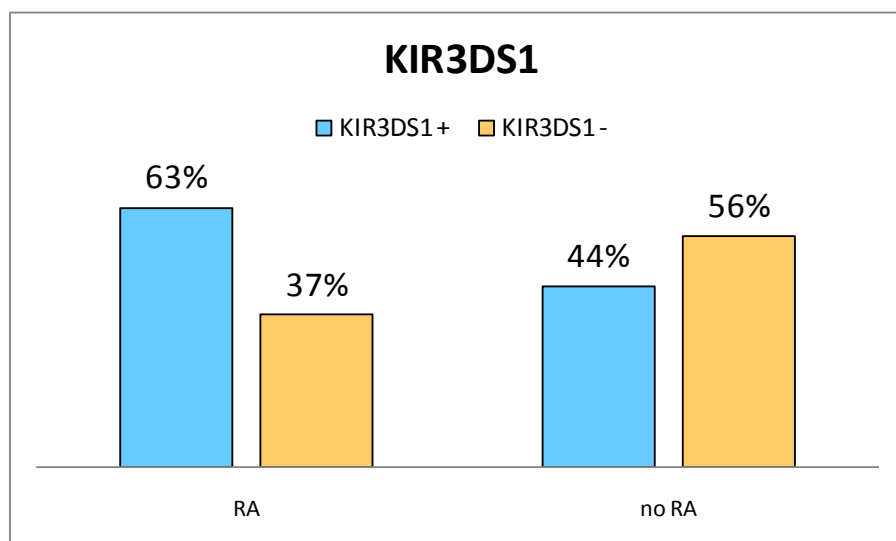


Figura 26: Distribuzione percentuale del gene KIR2DS1 (A) e del gene KIR3DS1 (B) nei pazienti "RA" e nei pazienti "no RA".

7.2.2 Correlazione con outcome del trapianto a lungo termine

Nell'analisi di tipo caso-controllo basata sul peggioramento della funzione renale del 20% (sulla base del valore di creatinina sierica) a 5 anni dal trapianto come criterio per valutare l'influenza del genotipo sull'outcome del trapianto, i pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi: casi, ovvero pazienti con peggioramento della funzione renale (gruppo LRF, n=26) e controlli, ovvero pazienti con funzione renale stabile (gruppo SRF, n=87). La tabella 6 riporta le frequenze dei diversi geni KIR nei 2 gruppi di pazienti.

KIR	LRF (n=26)	SRF (n=87)	valore P
2DL1	24 (92%)	87 (100%)	0.009
2DL2	15 (58%)	55 (63%)	0.6106
2DL3	23 (87%)	76 (88%)	0.8807
2DL4	26 (100%)	87 (100%)	1.000
2DL5	15 (58%)	57 (65%)	0.4665
2DS1	12 (46%)	44 (50%)	0.6924
2DS2	16 (62%)	63 (72%)	0.2887
2DS3	7 (27%)	39 (45%)	0.1030
2DS4	25 (96%)	83 (95%)	0.8701
2DS5	12 (46%)	29 (33%)	0.2329
3DS1	12 (46%)	44 (50%)	0.6924
3DL1	25 (96%)	83 (95%)	0.8701
3DL2	26(100%)	87 (100%)	1.000
3DL3	26(100%)	87 (100%)	1.000
2DP1	24 (92%)	87 (100%)	0.009
3DP1	26(100%)	87 (100%)	1.000

Tabella 6: Frequenze dei geni KIR nella popolazione dei pazienti trapiantati suddivisa in suddivisa in loss of renal function (LRF)/stable renal function (SRF).

Dal confronto delle frequenze dei geni KIR tra il gruppo LRF e il gruppo SRF, sono emerse differenze statisticamente significative per i geni KIR2DL1 e KIR2DP1 ($p=0.009$) normalmente espressi in linkage

disequilibrio. In particolare l'assenza di questi geni è stata riscontrata solo nel gruppo LRF. Poiché il numero di pazienti che non possedevano tali geni è risultato molto piccolo il valore dell'odds ratio stimato tende all'infinito.

Considerando l'intera popolazione di 113 pazienti trapiantati e suddividendola per presenza o assenza degli specifici geni KIR è stato valutato l'andamento della creatinina sierica e del filtrato glomerulare tramite il calcolo dell'MDRD secondo la formula dell'equazione a 4 variabili per MDRD CKD EPI standardizzata per creatinina sierica, età, razza e sesso.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come il gene KIR2DS3 sia presente nei pazienti che hanno un andamento della creatinina migliore rispetto a quelli che non hanno il KIR2DS3, specialmente nel lungo termine (a 5 anni dal trapianto, figura 27).

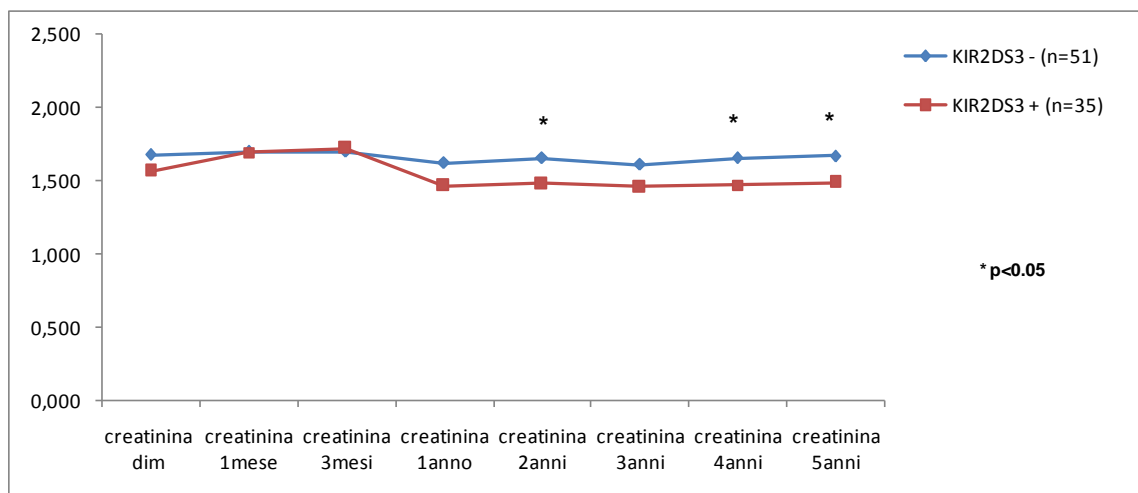


Figura 27: Grafico dell'andamento della creatinina a tempi diversi in relazione alla presenza (rosso) o assenza (blu) del gene KIR2DS3.

Allo stesso modo è risultata statisticamente significativa la presenza del KIR2DS3 e l'andamento migliore dell'MDRD (figura 28).

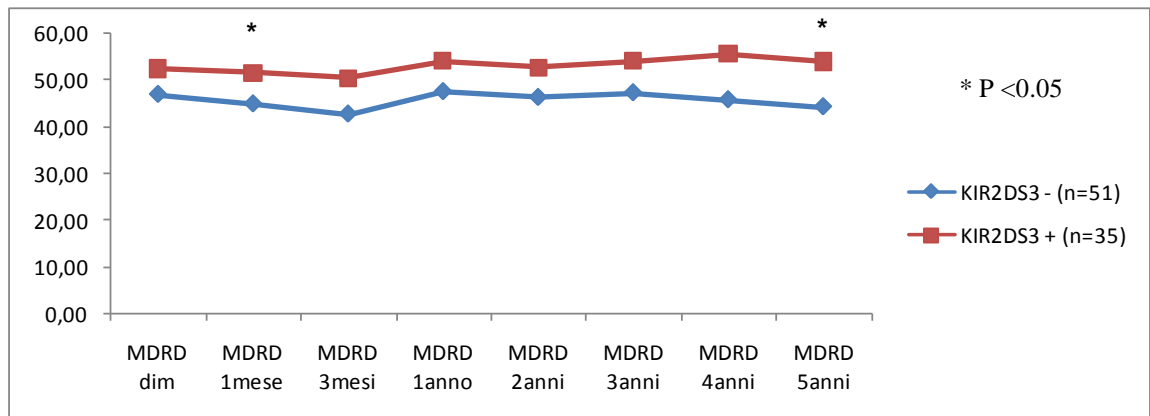


Figura 28: Grafico dell'andamento del filtrato glomerulare (MDRD) a tempi diversi in relazione alla presenza (rosso) o assenza (blu) del gene KIR2DS3.

I risultati dell'analisi dello stesso gene KIR2DS3 in presenza o meno del rispettivo ligando HLA-C1 sul donatore sono illustrati nelle figura 29 e 30.

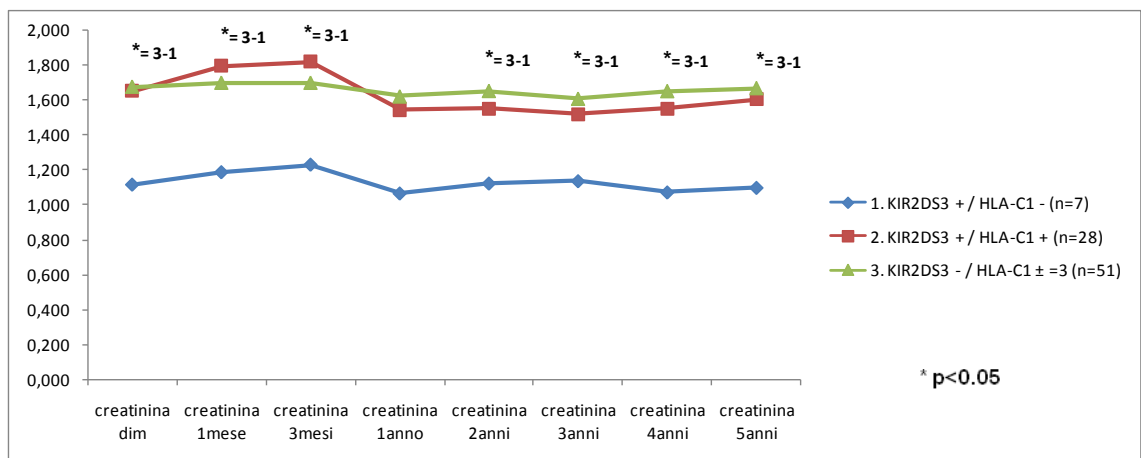


Figura 29: Grafico dell'andamento della creatinina a tempi diversi in relazione alla presenza (rosso) o assenza (blu) del ligando HLA-C1 in presenza di KIR2DS3. In verde è indicato l'andamento della creatinina dei pazienti negativi per KIR2DS3.

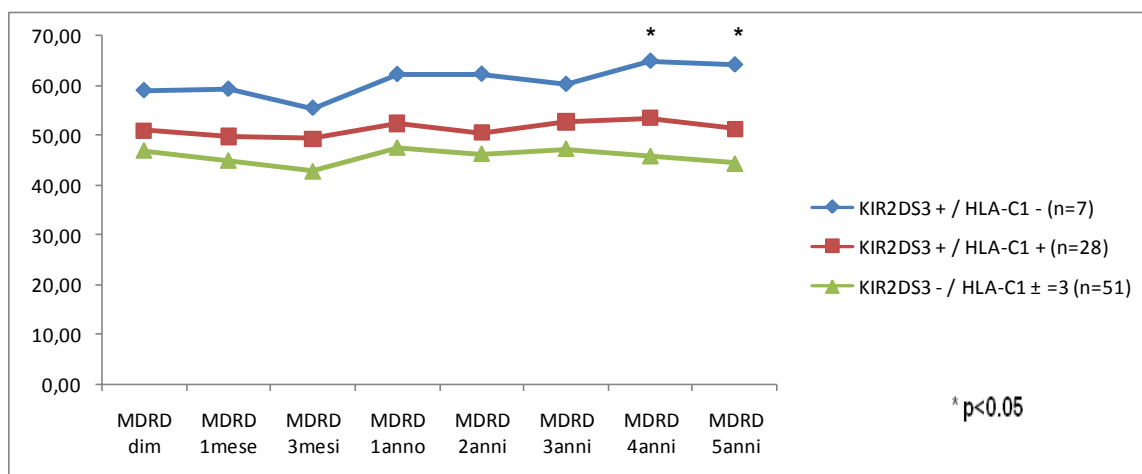


Figura 30: Grafico dell'andamento dell'MDRD a tempi diversi in relazione alla presenza (rosso) o assenza (blu) del ligando HLA-C1 di KIR2DS3. In verde è indicato l'andamento dell' MDRD dei pazienti negativi per KIR2DS3.

Come visibile dai grafici delle figure 29 e 30, in presenza del gene KIR2DS3, la presenza del gene per il ligando corrispondente influisce sull'andamento della creatinina e dell'MDRD in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$).

Si è poi andato a valutare il Rischio Relativo (RR) che i diversi KIR hanno di influenzare un andamento migliorativo o peggiorativo della creatinina a 5 anni rispetto alla media/mediana dell'intera popolazione.

I risultati emersi sono riportati in tabella 7, i dati statisticamente significativi sono evidenziati in grassetto.

KIR	RR sCr > mediana a 5aa (KIR-/KIR+)	RR sCr > mediana a 5aa Ligando (-/+)
2DL1	2.1765 (1.7788 - 2.6631)	1.1773 (0.7462 - 1.8574)
2DL2	1.1553 (0.7800 - 1.7112)	0.9336 (0.5083 - 1.7149)
2DL3	0.9027 (0.4763 - 1.7109)	1.1911 (0.7699 - 1.8428)
2DL4		
2DL5	1.3463 (0.9164 - 1.9781)	
2DS1	1.1871 (0.7992 - 1.7633)	1.3667 (0.7436 - 2.5119)
2DS2	1.1950 (0.7994 - 1.7861)	0.7895 (0.4130 - 1.5091)
2DS3	1.4539 (0.9383 - 2.2529)	0.4800 (0.1310 - 1.7585)
2DS4	1.2960 (0.6159 - 2.7271)	
2DS5	0.9396 (0.6287 - 1.4042)	
3DS1	1.1871 (0.7992 - 1.7633)	1.2353 (0.6517 - 2.3414)
3DL1	1.2960 (0.6159 - 2.7271)	1.2793 (0.8552 - 1.9137)
3DL2		0.6609 (0.4529–0.9643)
3DL3		
2DP1	2.1765 (1.7788 - 2.6631)	
3DP1		

Tabella 7: Rischio Relativo (RR) di avere una creatinina sierica (sCr) maggiore del valore mediano di creatinina a 5 anni dal trapianto.

Come mostrato in tabella 7 i pazienti che non hanno il KIR2DL1, associato in linkage disequilibrium al KIR2DP1, hanno un rischio relativo 2 volte maggiore, rispetto a chi lo possiede, di avere una creatinina plasmatica superiore alla mediana della popolazione con un CI al 95% 1.7788 - 2.6631.

Nella seconda colonna invece sono riportati i rischi relativi di avere una creatinina plasmatica superiore alla mediana della popolazione quando, in presenza del KIR, è assente o presente il rispettivo ligando. L'unico risultato emerso con significatività statistica riguarda il KIR3DL2. In assenza del ligando HLA-A3 o HLA-A11 o di entrambi, il rischio relativo è pari a 0.6609 CI 95% 0.4529–0.9643.

L'analisi dei restanti KIR e rispettivi ligandi HLA, degli aplotipi e del numero di KIR attivatori e inibitori su entrambe le casistiche non ha prodotto risultati statisticamente significativi (dati non mostrati).

8. DISCUSSIONE

Il presente studio ha valutato la modulazione dell'alloreattività NK operata dal sistema immunogenetico KIR nel trapianto renale al fine di trovare eventuali correlazioni tra l'incidenza di rigetto acuto o di una riduzione della funzione renale e la presenza di determinati alleli KIR nel ricevente o nel donatore.

Le cellule NK fanno parte dell'immunità innata e rappresentano una popolazione linfocitaria implicata nella difesa da cellule tumorali, infettate da virus o provenienti da tessuti allogenici.

Fra i vari recettori espressi sulla superficie delle NK, i KIR sono responsabili del legame con gli antigeni HLA di classe I e regolano l'alloreattività NK attraverso il bilanciamento di segnali inibitori ed attivatori. La citotossicità delle cellule NK è infatti scatenata da un'alterata o assente espressione delle molecole HLA di classe I sulle cellule bersaglio, come proposto dall'ipotesi del "missing self" [Ljunggren HG et al., 1990].

Il ruolo dell'immunità innata e, in particolare, l'effetto dell'alloreattività NK è stato ampiamente studiato in campo ematologico, tanto da rappresentare un fattore predittivo sull'incidenza di ricadute, rigetto e GVHD nel trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Diversa è la situazione per ciò che riguarda il trapianto di organi solidi. Ancora poco si conosce sul ruolo delle cellule NK in quest'ambito, anche se sono sempre più numerose le segnalazioni emergenti in letteratura.

8.1 Geni KIR e rigetto acuto

Nel trapianto di fegato, si sono ottenuti risultati promettenti sull'interazione fra i recettori KIR e i principali ligandi HLA. In uno studio di 34 pazienti sottoposti a trapianto di fegato è stata dimostrata una possibile correlazione tra gli episodi di rigetto nel primo periodo post-trapianto e la differenza tra geni KIR nella coppia ricevente-donatore indicando un possibile ruolo di queste cellule nell'eziopatogenesi del rigetto [Bishara A et al., 2001].

In un'altra valutazione di 31 pazienti è stata identificata una alloreattività delle cellule natural killer quando le cellule del donatore risultavano omozigoti per un antigene del locus HLA-C che non era condiviso con quelli del ricevente [Oertel M et al., 2001].

Altri lavori presenti in letteratura, come già descritto, hanno confermato l'importanza di una risposta immunitaria NK mediata nel trapianto cardiaco su modello animale. Uno studio sul trapianto di cuore in topi CD28^{-/-}H-2b ha mostrato la presenza di tolleranza nei confronti dei cuori aploidici (H-2b/d) anche in assenza di immunosoppressione, mentre in caso di organi completamente mismatch (H-2d) si è dimostrato il verificarsi di rigetto. In seguito a deplezione di cellule NK negli stessi topi CD28^{-/-}H-2b si è invece riscontrata tolleranza sia ai cuori provenienti da topi H-2b/d che da quelli H-2d, confermando l'importante ruolo svolto da queste cellule nel trapianto.

Lo stato dell'arte sul trapianto di rene vede pubblicati pochi lavori con risultati talvolta contrastanti. Hien Tran et al. hanno eseguito un'analisi per verificare la compatibilità fra recettori KIR ed i ligandi HLA, esaminando in particolare l'effetto del mismatch recettore/ligando sulla sopravvivenza del graft [Tran TH et al., 2005]. Il tasso di sopravvivenza del trapianto dopo 10 anni di follow-up non ha mostrato variazioni legate al grado di compatibilità KIR/HLA e anche l'analisi multivariata ha confermato l'assenza di un effetto negativo sull'esito del trapianto renale. Un fattore limitante di questo studio è stato sicuramente rappresentato dall'assenza di un esame diretto dei genotipi KIR sia sul donatore che sul ricevente, dal momento che gli autori hanno infatti eseguito solo un'analisi statistica dell'incompatibilità fra KIR del ricevente e rispettivi ligandi HLA del donatore.

Un altro studio di Kunert et al., eseguito su un campione di pazienti con caratteristiche simili in termini di età, numero di trapianti, graft da donatore vivente o cadavere, tempo di ischemia e HLA mismatches, si proponeva di verificare se alcune combinazioni fra recettori KIR del ricevente e ligandi HLA del donatore potessero causare un aumento della citotossicità NK responsabile del rigetto acuto [Kunert K et al., 2007]. L'analisi dei matches

per i ligandi KIR ha messo in evidenza come alcune interazioni KIR/HLA possano influenzare l'esito del trapianto nel breve termine: nei soggetti con funzione renale stabile è stato infatti osservato un maggior numero di matches per i recettori KIR2DL2 e KIR2DS2, così come un più alto numero di mismatches per KIR2DL3. La tipizzazione dei geni KIR di tutti i riceventi non ha mostrato una correlazione fra uno specifico allotipo KIR e l'incidenza di rigetto, ma l'analisi dei singoli geni KIR ha evidenziato risultati interessanti. È stata infatti stimata una maggior frequenza dei recettori KIR2DL2 e KIR2DS2 nei pazienti con funzione renale stabile, mentre i soggetti con rigetto acuto hanno presentato una minor frequenza del gene KIR2DL1.

I primi risultati emersi dal nostro studio mostrano, come nei lavori fin qui riportati, il coinvolgimento di alcuni recettori KIR nello sviluppo di rigetto acuto dopo trapianto di rene. I dati ottenuti hanno evidenziato differenze statisticamente significative per quanto riguarda la frequenza di due specifici geni KIR, tanto da far ipotizzare una non casualità di tale distribuzione.

Nei pazienti con rigetto acuto è stata infatti rilevata una maggior frequenza del gene KIR2DS1 rispetto ai riceventi con funzione stabile del graft con una $p=0.02$ ed un odds ratio di 2.613 (95% CI = 1.140 - 5.993). Anche i risultati riguardanti la distribuzione del gene KIR3DS1 hanno mostrato una maggior frequenza di questo gene nei riceventi che hanno presentato episodi di rigetto acuto con risultati prossimi alla significatività statistica $p=0.05$, odds ratio=2.190 (95% CI = 0.966 - 4.966).

Già nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) si è riscontrato come questi due geni presenti nel DNA del donatore siano associati allo sviluppo di GVHD acuta e ad una minor sopravvivenza, individuando in essi due fattori di rischio indipendenti a prognosi sfavorevole nell'outcome a breve termine del HSCT [Giebel S et al., 2009]. Sulla base delle attuali conoscenze, il significato di questi due geni, o meglio dei recettori per i quali essi codificano, è analogo. Si tratta infatti di due recettori con funzione attivatoria, che dunque potrebbero predisporre

ad una più forte attivazione della citotossicità NK nei confronti dell'organo trapiantato.

8.2 Geni KIR e outcome a lungo termine

Mentre vi è in letteratura un certo numero di studi che hanno analizzato il ruolo dei KIR nel rigetto acuto dopo trapianto di rene, la funzione di potenziali KIR nel lungo termine è stata analizzata in un unico lavoro di Cirocco et al. che, in coppie di fratelli HLA identici, mostra associazione tra l'assenza di KIR2DL2 e KIR2DS2 e una scarsa funzione renale [Cirocco RE et al., 2007]. Il presente studio che considera una più ampia popolazione non conferma questo dato, ma evidenzia una correlazione del KIR2DS3 e della coppia KIR2DS3-HLA-C1 con la funzione renale. Il gene che codifica per KIR2DS3 è un gene per un recettore attivatore, cioè che promuove l'attività citotossica delle cellule NK. Nella nostra popolazione i pazienti che possiedono il KIR2DS3 attivatore presentano un andamento funzionale del trapianto migliore nel tempo sia considerando il valore di creatinina che quello dell'MDRD. Tuttavia, la presenza del rispettivo ligando HLA-C1 nel donatore costituisce all'opposto un elemento di peggioramento, portando perciò ad un'inversione dell'effetto della sola presenza di KIR2DS3.

Alcuni studi condotti sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche hanno riportato una correlazione tra la presenza di questo gene, KIR2DS3, nel DNA del donatore e lo sviluppo nel ricevente di GVHD cronica [Giebel S et al., 2009; Zhao XY et al., 2007]. Essi suggeriscono l'ipotesi che la presenza di questo gene per un recettore attivatore, contemporaneamente alla sua assenza nel ricevente, aumenti l'alloreattività NK e dei linfociti T derivanti dal donatore. D'altro canto esistono lavori, in linea con i nostri risultati, che invece mostrano una associazione tra la presenza del gene KIR2DS3 e un potenziale effetto protettivo nei confronti della GVHD cronica o della leucemia mieloide acuta, mostrando una sopravvivenza a lungo termine maggiore rispetto a chi non lo possiede [McQueen KL et al., 2007; Shamsavar F et al., 2010]. Poiché ancora poco si conosce della

funzione di questo gene non è possibile una chiara interpretazione di questa associazione. Occorre comunque ricordare che i KIR sono espressi clonalmente sulle cellule NK in modo stocastico in modo che ogni clone delle cellule NK esprime solo una parte dei KIR del proprio genoma. Pertanto, una frazione consistente di cellule NK di un paziente potrebbe non esprimere il KIR2DS3 anche se il gene corrispondente è presente [Wauquier N et al., 2010].

Sulla base delle attuali conoscenze, si è voluto verificare se la presenza dei ligandi HLA di classe I potessero influenzare l'andamento della funzione renale. Dai nostri dati emerge come per il gene KIR2DS3, la presenza del ligando HLA-C1 ribalti il risultato ottenuto considerando la sola associazione tra KIR e funzione renale. Infatti i pazienti positivi per il KIR2DS3 e che hanno ricevuto reni da donatori positivi per l'HLA-C1 mostrano un andamento della creatinina a lungo termine peggiore rispetto ai trapiantati negativi per KIR2DS3 o positivi per il KIR2DS3, ma che hanno ricevuto un rene negativo per l'HLA-C1. Questi risultati, pur tenendo conto della limitata numerosità della popolazione in esame, suggeriscono come la presenza del ligando sia necessaria all'attivazione del recettore e della sua relativa funzione. Nello specifico, l'attività di KIR2DS3, in associazione con il ligando HLA-C1, potrebbe favorire lo stato di attivazione citotossica e citolitica delle cellule NK del ricevente e partecipare al processo fisiopatologico di distruzione delle cellule allogeniche.

L'analisi condotta sulla popolazione in base al peggioramento o meno della funzione renale a lungo termine dal trapianto ha evidenziato come l'assenza del gene KIR2DL1 sia fortemente associata ad un aumento del 20% del valore di creatinina a 5 anni. Il dato è poi ulteriormente confermato dall'analisi dei rischi relativi che riporta una probabilità due volte superiore di avere un valore di creatinina superiore alla mediana a 5 anni in assenza del gene. Il recettore KIR2DL1 ha una funzione inibitoria e l'associazione tra l'assenza del gene e un peggioramento della funzione renale avallerebbe l'ipotesi che la citotossicità NK sia in questi pazienti

meno inibita. In uno studio del 2007 condotto su una popolazione di trapiantati renali, Kunert K et al. hanno riportato un'associazione tra la presenza dello stesso gene, KIR2DL1, e l'assenza di rigetto acuto, ancor più laddove fosse presente il rispettivo ligando HLA-C2, confermando dunque un ruolo di questo recettore nell'outcome del trapianto di rene, anche se nel breve termine [Kunert K et al., 2007].

Un ultimo risultato interessante, ottenuto nel presente studio, riguarda la presenza del ligando HLA-A3/A11 in associazione alla presenza del KIR3DL2. Quest'ultimo è un cosiddetto "gene struttura" poiché presente in tutti gli alplotipi KIR, con una funzione principalmente inibitoria della citotossicità NK. Dai nostri dati la presenza di un rene negativo per l'HLA-A3/A11, rispetto ad uno positivo ha un rischio relativo di avere una creatinina sierica superiore alla mediana a 5 anni dal trapianto pari a 0.6609 (CI 95%: 0.4529–0.9643). Si potrebbe dunque ipotizzare un effetto protettivo dato dall'assenza di questo ligando.

La specificità di tali ligandi per il KIR3DL2 è piuttosto assodata [Hansasuta P et al., 2004, Dohring et al., 1996; Pende et al., 1996]. Uno studio recente ha però dimostrato come una specificità dell'HLA-A11 (HLA-A*1102) sia capace di legare ad alta affinità anche il KIR2DS4 che condivide con il KIR3DL2 un motivo prolina-valina in posizione 71-72, questo poiché il gene che codifica per KIR2DS4 ha acquisito la sequenza codificante per il motivo prolina-valina in posizione 71-72 tramite una conversione genetica avvenuta tra i geni ancestrali per KIR3DL2 e KIR2DS4 prima della separazione tra antenati di uomo e scimpanzé [Benton MJ e Donoghue PC, 2007]. Non è da escludere dunque un effetto di questo ligando a favore di una attivazione citotossica delle cellule NK tramite il legame con il recettore attivatore KIR2DS4.

Il ruolo dell'interazione KIR3DL2 - HLA-A3/A11 in vivo resta ancora dibattuto [Hansasuta P et al., 2004, Valiante N et al., 1997; Dohring C et al., 1996; Pende D et al., 1996].

Diversi studi hanno dimostrato come le cellule NK, durante la loro maturazione, vadano incontro ad un processo di "educazione" da parte dei relativi MHC di classe I self per diventare funzionalmente competenti

[Anfossi N et al., 2006; Fernandez NC et al., 2005; Kim S et al., 2005; Kim S et al., 2008; Yu J et al.; 2007], mentre in assenza di KIR inibitori o in presenza di KIR inibitori, ma in assenza dei relativi ligandi, le cellule siano iporesponsive. Fauriat et al., in un lavoro del 2008, hanno studiato l'alloreattività delle cellule NK non solo dal punto di vista genotipico, ma anche fenotipico. Dai loro risultati è emerso come cellule NK positive al solo KIR3DL2, anche in presenza del rispettivo ligando HLA-A3/A11 risultassero iporesponsive. Questa osservazione suggerisce che probabilmente nessun peptide nel donatore fosse presente a livelli sufficienti a "educare" le cellule NK e renderle funzionali. Gli autori considerano comunque l'interazione KIR3DL2 - HLA-A3/A11, a livello della cellula target, di tipo inibitorio.

I risultati del presente studio potrebbero far supporre che le cellule NK del paziente che ha ricevuto un trapianto da un donatore che non esprime l'HLA-A3/A11 si trovino ad uno stadio maturativo inferiore e siano quindi funzionalmente iporesponsive o comunque meno reattive nei confronti degli antigeni non self.

Esistono poi anche altri lavori in letteratura che mostrano come l'assenza del ligando per alcuni KIR (tra cui il KIR3DL2) sia associata ad una più elevata sopravvivenza a lungo termine, ad un minor rischio di recidiva o ad un maggior effetto antileucemico nel lungo termine, nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche in pazienti HLA identici [Clausen J et al., 2007; Beelen DW et al., 2005; Ruggeri L et al, 2002]. Anche i nostri risultati mostrano come un incompatibilità KIR-ligando per quel che riguarda il KIR3DL2-HLA-A3/A11 sia a favore di una miglior creatinina sierica a lungo termine.

9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il presente lavoro è tra i primi a porre in correlazione l'immunità innata con l'outcome del trapianto di rene a breve e a lungo termine, da sempre considerati principalmente pertinenti all'immunità cellulo-mediata e ai meccanismi di riconoscimento HLA.

È indubbio che le ultime evidenze scientifiche mettono sempre più in risalto dei punti di contatto tra le diverse fasi della risposta immunitaria. Nel nostro lavoro sembra essere presente un ruolo dei geni KIR nel trapianto renale. Nonostante la numerosità del campione in studio sia limitata e non sufficiente a porre conferme che possano essere considerate certe, appare evidente una associazione tra i geni che codificano per il KIR2DS1 e il KIR3DS1 e la presenza di rigetto acuto.

Nel lungo termine, seppur in maniera più sfumata, si riscontra l'esistenza di una correlazione tra la presenza del KIR2DS3 e del rispettivo ligando HLA-C1 e l'apparente svantaggio nei confronti della funzione renale, così come per l'assenza del gene inibitore KIR2DL1 e un peggior andamento funzionale. Infine anche l'assenza dell'HLA-A3/A11 sembra dare una migliore creatinina sierica a 5 dal trapianto.

Occorre ricordare che i geni KIR presentano una notevole diversità di sequenza [Garcia et al., 2003], per KIR2DS3 sono stati descritti 13 alleli (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>), così come per il KIR3DL2 ne sono noti almeno 22 [Sivori S et al., 2010]. Questo può influenzarne l'espressione, il legame con il rispettivo ligando, la citolisi, e la secrezione di citochine, come già descritto per altri KIR [Yawata et al. 2006, Wauquier N et al., 2010].

Pertanto il sistema immunogenetico KIR resta un campo di indagine affascinante, in cui è ipotizzabile un ruolo a tuttora però ancora non del tutto chiarito e data la sua complessità da approfondire e valutare soprattutto su grandi numeri.

10. BIBLIOGRAFIA

- ✚ Abbas A. K, Lichtman A. H, et al. *Immunologia cellulare e molecolare*. Piccin Nuova Libreria S.P.A 2002.
- ✚ Anfossi N., P. Andre, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006, 25: 331–342.
- ✚ Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood* 2005; 105:2594–600.
- ✚ Beilke JN, Gill RG. *Frontiers in nephrology: the varied faces of natural killer cells in transplantation--contributions to both allograft immunity and tolerance*. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Aug;18(8):2262-7.
- ✚ Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. *Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation*. *Curr Opin Oncol*. 2010 Mar;22(2):130-7.
- ✚ Benton MJ, and Donoghue PC. *Paleontological evidence to date the tree of life*. *Mol. Biol. Evol*. 2007, 24:26–53.
- ✚ Bishara A, Brautbar C, Eid A, Sherman L, Safadi R. *Killer inhibitory receptor mismatching and liver transplantation outcome*. *Transplant Proc*. 2001 Sep;33(6):2908.
- ✚ Carrington M and Norman P. *The KIR gene Cluster*. 2003
- ✚ Cecka JM. *Transplant Proc* 1991; 23:1263 Cecka JM. *Early rejection: determining the fate of renal transplants*. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1263-4.

- ✚ Cirocco RE, Mathew JM, Burke GW 3rd, Esquenazi V, Miller J. Killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms in HLA-identical kidney transplant recipients: lack of 2DL2 and 2DS2 may be associated with poor graft function. *Tissue Antigens*. 2007, 69(1): 123-4.
- ✚ Clausen J, Wolf D, Petzer AL, Gunsilius E, Schumacher P, Kircher B, Gastl G, Nachbaur D. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jun;148(3):520-8.
- ✚ Cook MA, Moss PAH, Briggs DC: The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. *Eur J Immunogen* 2003, 30: 213-221.
- ✚ Cooper MA, Fehniger TA and Caligiuri MA. The biology of human natural killer –cells subsets. *Trends in immunology*. 2001; 22(11):633-640.
- ✚ Coulson MT, Jablonski P, Howden BO, Thomson NM, Stein AN. Beyond operational tolerance: effect of ischemic injury on development of chronic damage in renal grafts. *Transplantation* 80: 353–361, 2005
- ✚ Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 2000, 56: 313-326.
- ✚ Divate SA. Acute renal allograft rejection: progress in understanding cellular and molecular mechanisms. *Journal of Postgraduate Medicine* 2000; 46:293-6.

- ✚ Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, and Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J. Immunol.* 1996, 156: 3098–3101.
- ✚ Faure M, Long EO. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol.* 2002;168:6208-6214.
- ✚ Fauriat C, Andersson S, Björklund AT, Carlsten M, Schaffer M, Björkström NK, Baumann BC, Michaëlsson J, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Estimation of the size of the alloreactive NK cell repertoire: studies in individuals homozygous for the group A KIR haplotype. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):6010-9.
- ✚ Fernandez N. C., E. Treiner, R. E. Vance, A. M. Jamieson, S. Lemieux, and D. H. Raulet. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 2005, 105: 4416–4423.
- ✚ Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 2006;203:1033–1043.
- ✚ Garcia CA, Robinson J, Guethlein LA, Parham P, Madrigal JA, Marsh SG (2003) Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics* 55(4):227–239.
- ✚ Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Holowiecki J, Holowiecka-Goral A, Markiewicz M, Kopera M, Karolczyk A, Kyrz-Krzemien S, Kusnierczyk P. Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2009 Oct;83(4):343-56. Epub 2009 Jun 2.
- ✚ Gomez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction

with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens* 2000, 19: 184-193.

- ✚ Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, Rowland-Jones S, Braud VM. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol.* 2004 Jun;34(6):1673-9.
- ✚ Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002;190:40-52
- ✚ Joseph JT, Kingsmore DB, Junor BJR, et al. The impact of late acute rejection after cadaveric kidney transplantation. *Clinical transplantation* 2001;15:221-227.
- ✚ Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clinical Biochemistry* 2001;34:29-34.
- ✚ Kim, S., J. B. Sunwoo, L. Yang, T. Choi, Y. J. Song, A. R. French, A. Vlahiotis, J. F. Piccirillo, M. Cella, M. Colonna, et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105: 3053–3058.
- ✚ Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen, and W. M. Yokoyama. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005, 436: 709–713.
- ✚ Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation.* 2007 Dec 15;84(11):1527-33.

- ✚ Levy GA. Progress in Transplantation. Ther Drug Monit. 2010 Jun;32(3):246-9.
- ✚ Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. Transplantation. 1993 Aug;56(2):307-15.
- ✚ Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing self". MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 1990; 11: 237.
- ✚ Matas AJ, Humar A, Payne WD, Gillingham KJ, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS. Decreased acute rejection in kidney transplant recipients is associated with decreased chronic rejection. Ann Surg. 1999 Oct;230(4):493-8; discussion 498-500.
- ✚ Matas AJ. Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. Transplantation Proceedings 1998;30:1766-1768.
- ✚ Matas AJ. Risk factors for chronic rejection-a clinical perspective. Transplant Immunol 1998; 6:1-11.
- ✚ McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. Hum Immunol. 2007 May;68(5):309-23. Epub 2007 Mar 12.
- ✚ Moretta L. and Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. Current Opinion in Immunology. 2004; 16:626-633.
- ✚ Nong T, Saito K, Blair L, Tarsitani C, Lee JH. KIR genotyping by reverse sequence-specific oligonucleotide methodology. Tissue Antigens, 2007, 69(1): 92-5.
- ✚ Oertel M, Kohlhaw K, Diepolder HM, Schroder S, Schwarz R, Tannapfel A, Mossner J, Hauss J, Berr F. Alloreactivity of natural

killer cells in allogeneic liver transplantation. *Transplantation*. 2001;72(1):116-22.

- ✚ Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di Donato C, Accame L, Bottino C, Moretta A, and Moretta L. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J. Exp. Med.* 1996, 184: 505–518.
- ✚ Ponticelli C. Renal transplantation strengths and shortcomings. *Journal of Nephrology* 2001;14:S1-S6.
- ✚ Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*.1990; 76(12):2421-2438.
- ✚ Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097–100.
- ✚ Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, Bensussan A, Viola A, Moretta L, Moretta A. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood*. 2010 Sep 9;116(10):1637-47.
- ✚ Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens*. 1996;48:285-294.
- ✚ Shahsavari F, Tajik N, Entezami KZ et al. KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. *Iran J Immunol*. 2010; 7(1):8-17.

- ✚ Tran TH, Mytilineos J, Scherer S, Laux G, Middleton D, Opelz G. Analysis of KIR ligand incompatibility in human renal transplantation. *Transplantation*. 2005; 80(8): 1121-1123.
- ✚ Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, Rose HS, Colvin RB, Russell PS, Madsen JC. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3424-30.
- ✚ Uhrberg M, Parham P, Wernet P: Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002, 54: 221-229.
- ✚ Uhrberg M, Parham P, Wernet P: Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002, 54: 221-229.
- ✚ Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier L, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997, 7: 753-763.
- ✚ Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, and Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997, 7: 739–751.
- ✚ Vilches C, Parham P. Do NK cell receptors and alloreactivity affect solid organ transplantation? *Transplant Immunology* 2006, 17: 27-30.
- ✚ Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in

- Ebola virus infection. *Immunogenetics*. 2010 Dec;62(11-12):767-71.
- ✚ Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT: Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 1999, 68: 1784-1789.
 - ✚ Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006, 203(3):633–645.
 - ✚ Yu, J., G. Heller, J. Chewning, S. Kim, W. M. Yokoyama, and K. C. Hsu. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J. Immunol*. 2007, 179: 5977–5989.
 - ✚ Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 1998;188:2375–2380.
 - ✚ Zand MS. Immunosuppression and Immune Monitoring After Renal. *Seminars in Dialysis* 2005; 6,511-19.
 - ✚ Zhao XY, Huang XJ, Liu KY, Xu LP, Liu DH. Prognosis after unmanipulated HLA-haploidentical blood and marrow transplantation is correlated to the numbers of KIR ligands in recipients. *Eur J Haematol*. 2007 Apr;78(4):338-46.