

Polimorfismo dei geni KIR: come studiarlo e perché.

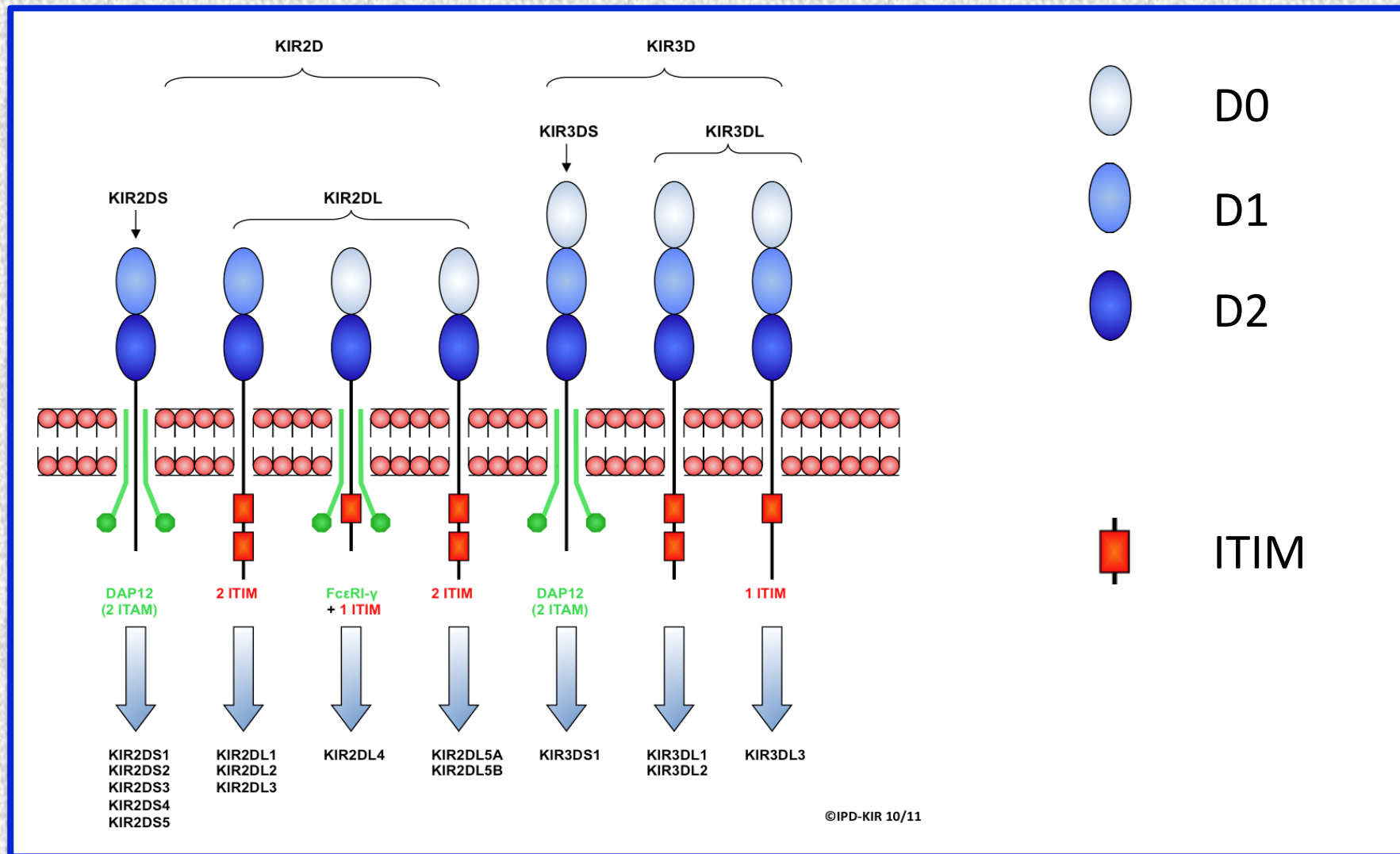
Michela Falco

Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale
Istituto Giannina Gaslini, Genova
michelaemma.falco@gmail.com



Summer School AIBT 2016
Pesaro

KIR (Killer Ig-like Receptor)



Variabilità dei geni KIR

```
graph LR; A[Variabilità dei geni KIR] --> B[Variabilità allostipica]; A --> C[Variabilità allelica];
```

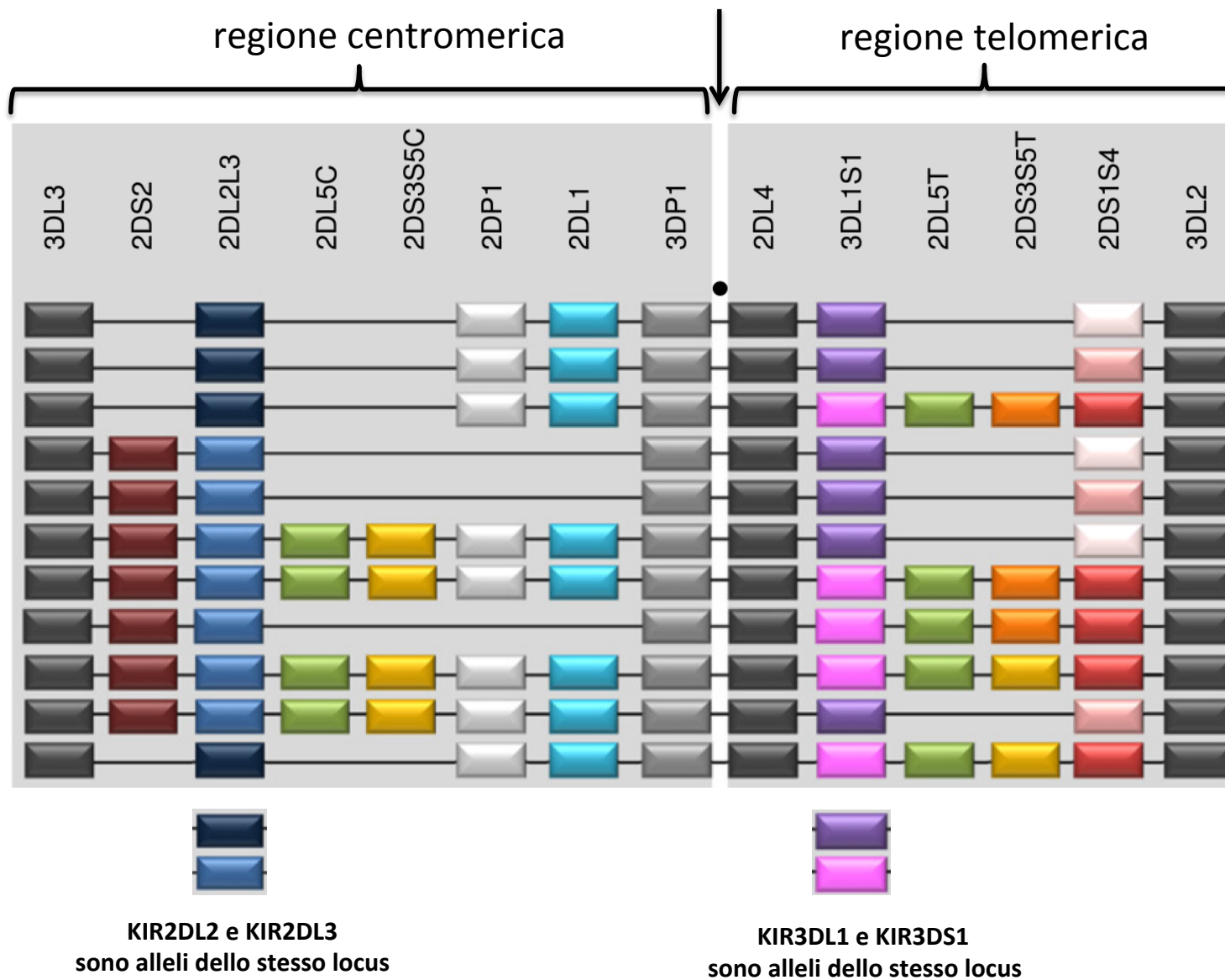
Variabilità allostipica

- ★ non tutti gli allostipi KIR sono composti dagli stessi geni
- ★ il numero di geni KIR presente su un allostipo è variabile

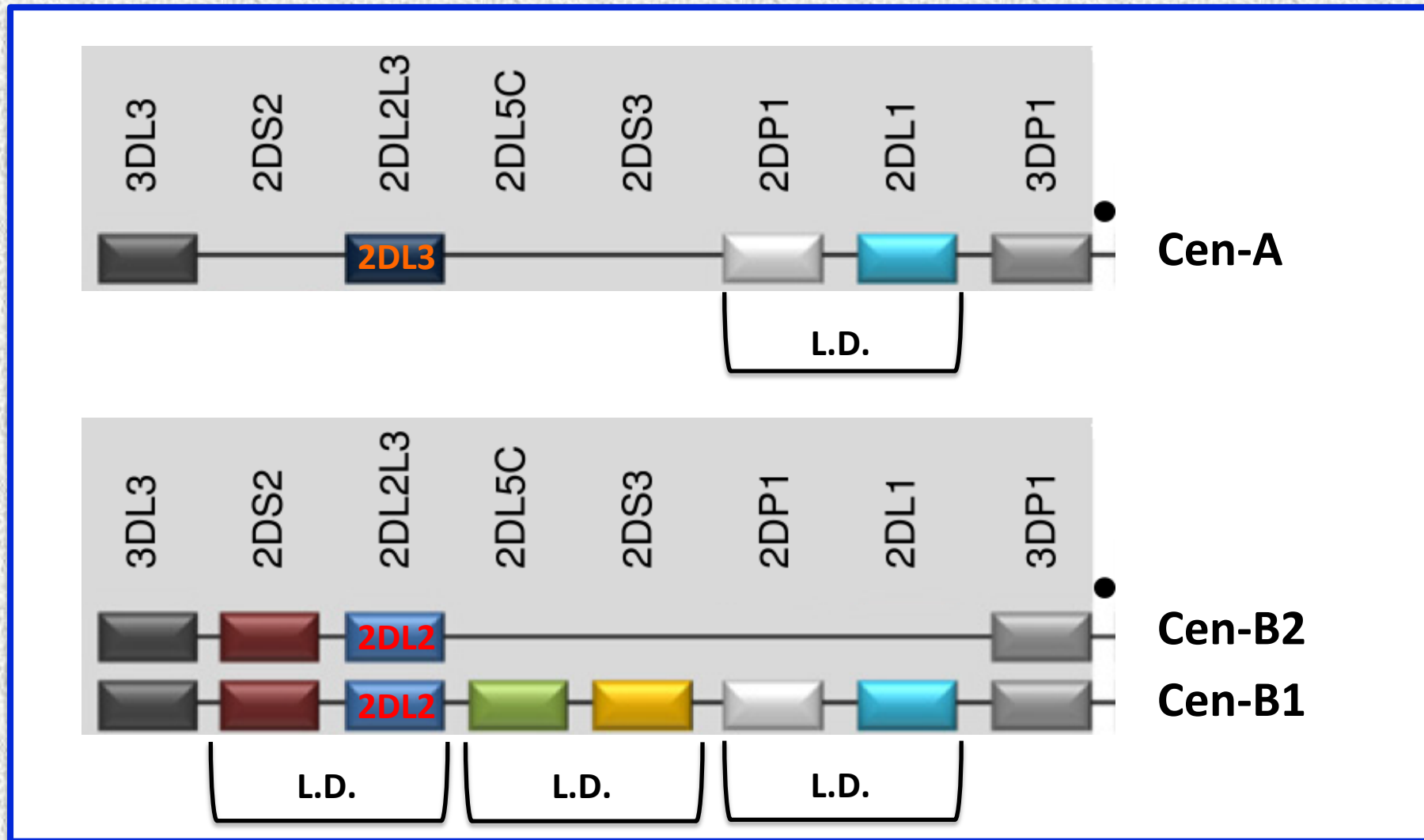
Variabilità allelica

- ★ i geni KIR sono polimorfici

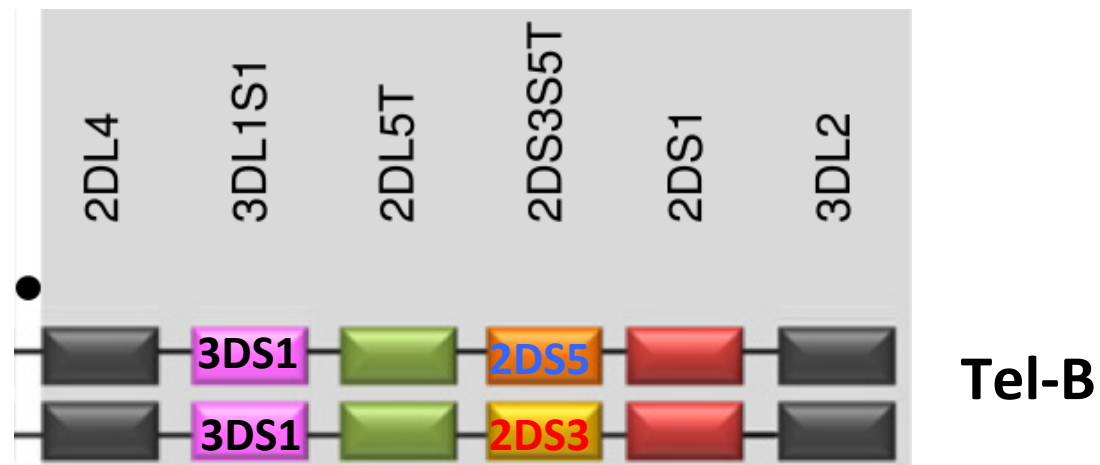
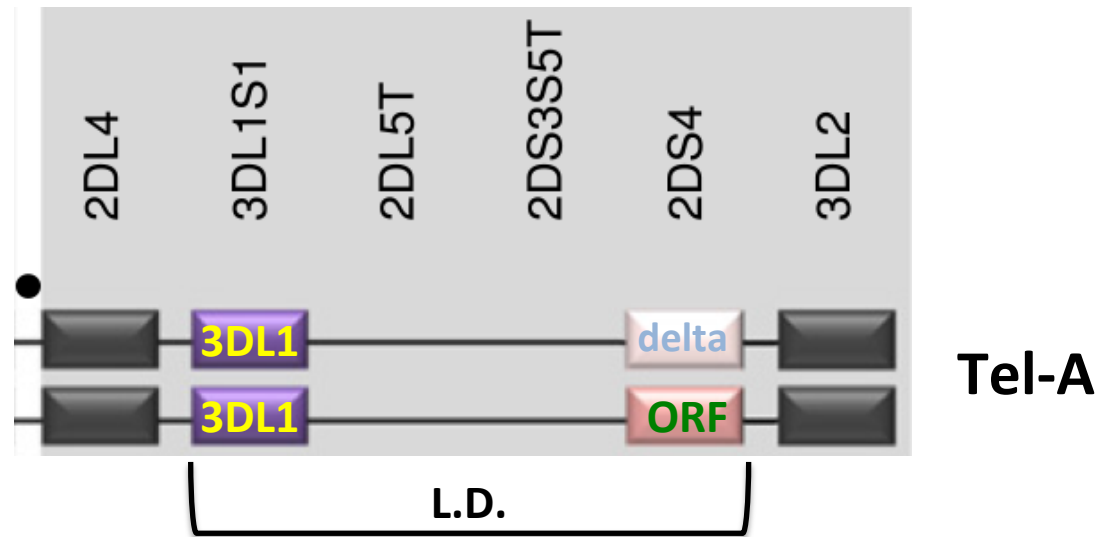
Variabilità aplo tipica



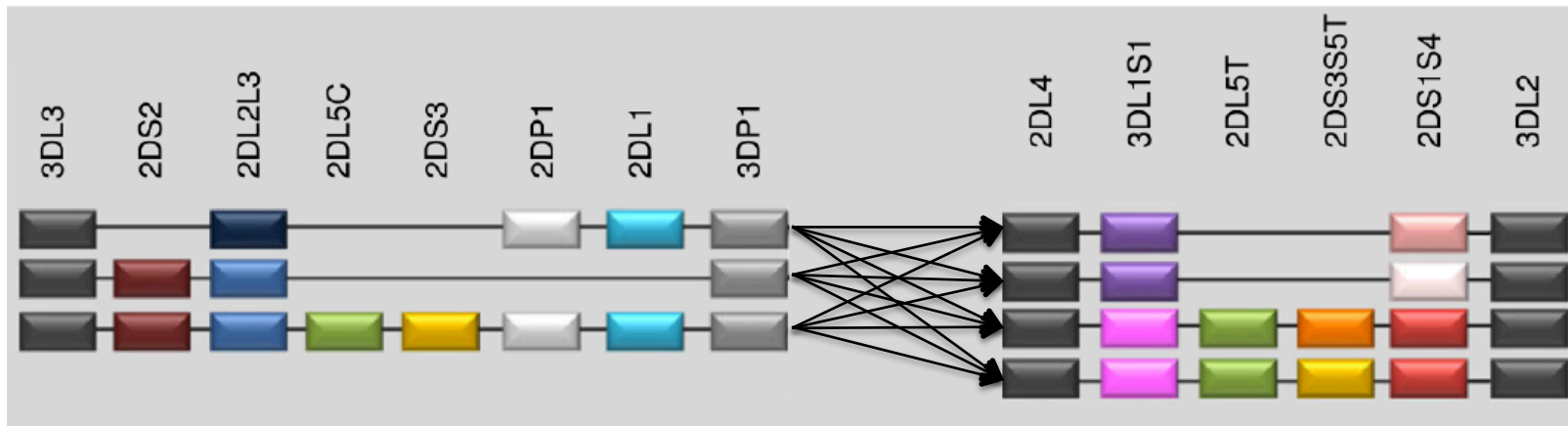
Variabilità delle regioni centromeriche



Variabilità delle regioni telomeriche



Analisi degli aplotipi KIR



*W. Jiang et al. Genome Res. 2012
modificato*

Cen-A + Tel-A

Aplotipo A

Cen-A + Tel-B

Cen-B + Tel-A

Cen-B + Tel-B

Aplotipo B

Analisi dei genotipi

B content value

Cen-A/Cen-A	Tel-A/Tel-A	A/A	0
Cen-A/Cen-B	Tel-A/Tel-A	A/B	1
Cen-A/Cen-A	Tel-A/Tel-B	A/B	1
Cen-A/Cen-A	Tel-B/Tel-B	B/B	2
Cen-B/Cen-B	Tel-A/Tel-A	B/B	2
Cen-A/Cen-B	Tel-B/Tel-B	B/B	3
Cen-B/Cen-B	Tel-A/Tel-B	B/B	3
Cen-B/Cen-B	Tel-B/Tel-B	B/B	4
Cen-A/Cen-B	Tel-A/Tel-B	A/B o B/B	2

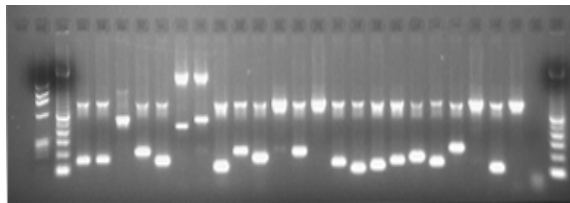
B/X

Analisi dei genotipi

Estrazione DNA
(sangue, cellule, saliva ...)

SSP-PCR

Risoluzione bande PCR
su gel di agarosio

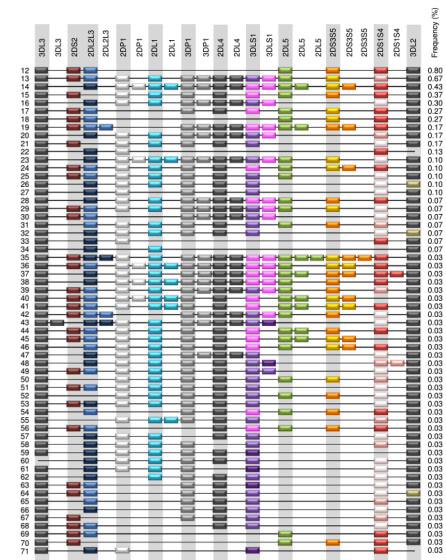
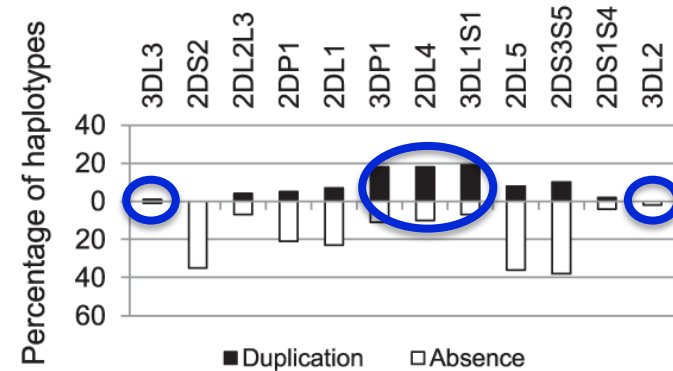


control band
KIR specific band

Interpretazione dei risultati

Protocollo semplice e veloce
Relativamente economico

Copy Number Variation



W. Jiang et al.
Genome Res. 2012

Protocollo più costoso, più lungo
Ci permette d'identificare aplotipi poco frequenti

Variabilità allelica

Allele Information									
KIR Alleles:									753
KIR Alleles									
Gene	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	
Alleles	48	30	55	52	48	16	22	15	
Proteins	28	13	31	28	20	8	8	6	
Nulls	1	0	1	0	0	0	0	1	
Gene	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	
Alleles	31	18	110	30	112	111	28	27	
Proteins	14	12	66	17	82	57	0	0	
Nulls	0	0	2	1	1	0	0	0	

Non potendo determinare l'allele di tutti i geni KIR presenti nei genomi in esame cosa possiamo analizzare per meglio caratterizzare il campione che stiamo studiando?

- ★ Polimorfismi rilevanti per l'espressione del recettore in membrana
 - recettori trattenuti nel citoplasma
 - recettori "secreti"
 - alleli Null
- ★ Polimorfismi rilevanti per il riconoscimento del ligando
- ★ Polimorfismi rilevanti per la trasduzione del segnale

Variabilità allelica e riconoscimento del ligando

KIR2DL1 e **KIR2DL2/L3** codificano per recettori con struttura simile.

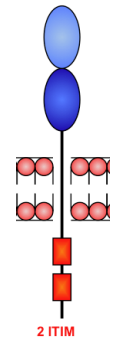
KIR2DL1 e **KIR2DL2/L3** codificano per recettori inibitori che riconoscono molecole HLA-C.

★ **KIR2DL1**

HLA-C^{Lys80} C2 high

★ **KIR2DL2/L3**

HLA-C^{Asn80} C1 high
 HLA-B*46:01, -B*73:01 (C1^{pos})
 HLA-C^{Lys80} C2 low

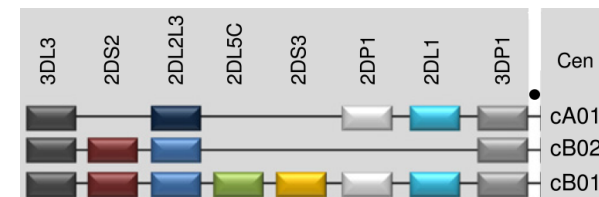


I geni **KIR2DL1** e **KIR2DL2/L3** sono presenti nelle regioni centromeriche.

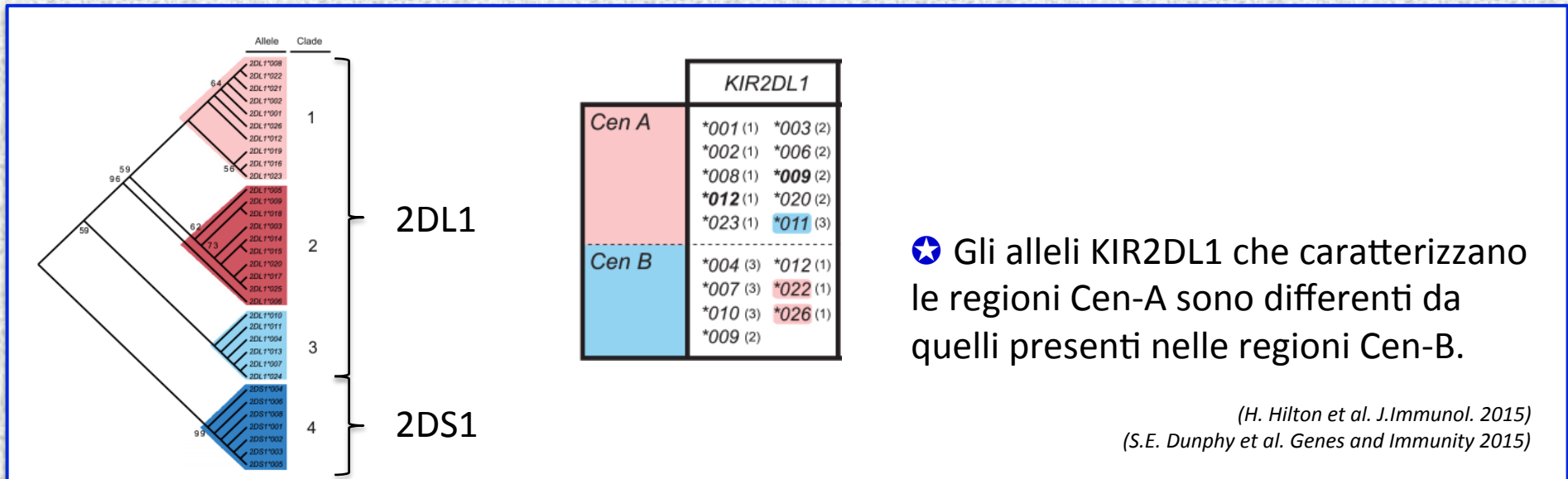
★ **KIR2DL1** nei Cen-A e nei Cen-B1

★ **KIR2DL3** nei Cen-A

★ **KIR2DL2** nei Cen-B (sia Cen-B1 che Cen-B2)



Rilevanza della variabilità allelica KIR2DL1



★ Gli alleli KIR2DL1 che caratterizzano le regioni Cen-A sono differenti da quelli presenti nelle regioni Cen-B.

(H. Hilton et al. J.Immunol. 2015)
(S.E. Dunphy et al. Genes and Immunity 2015)

Gli alleli **KIR2DL1** codificano per recettori che riconoscono **HLA-C^{Lys 80} (C2)** [aa 44 Metionina (M)]

Gli alleli **KIR2DL1** che caratterizzano le regioni Cen-A codificano per recettori

- ★ hanno maggior affinità per il loro ligando
- ★ trasducono meglio il segnale inibitorio
- ★ hanno una più alta espressione in membrana

(H. Hilton et al. J.Immunol. 2015)

(R. Bari et al. Blood 2009)

(S.E. Dunphy et al. Genes and Immunity 2015)

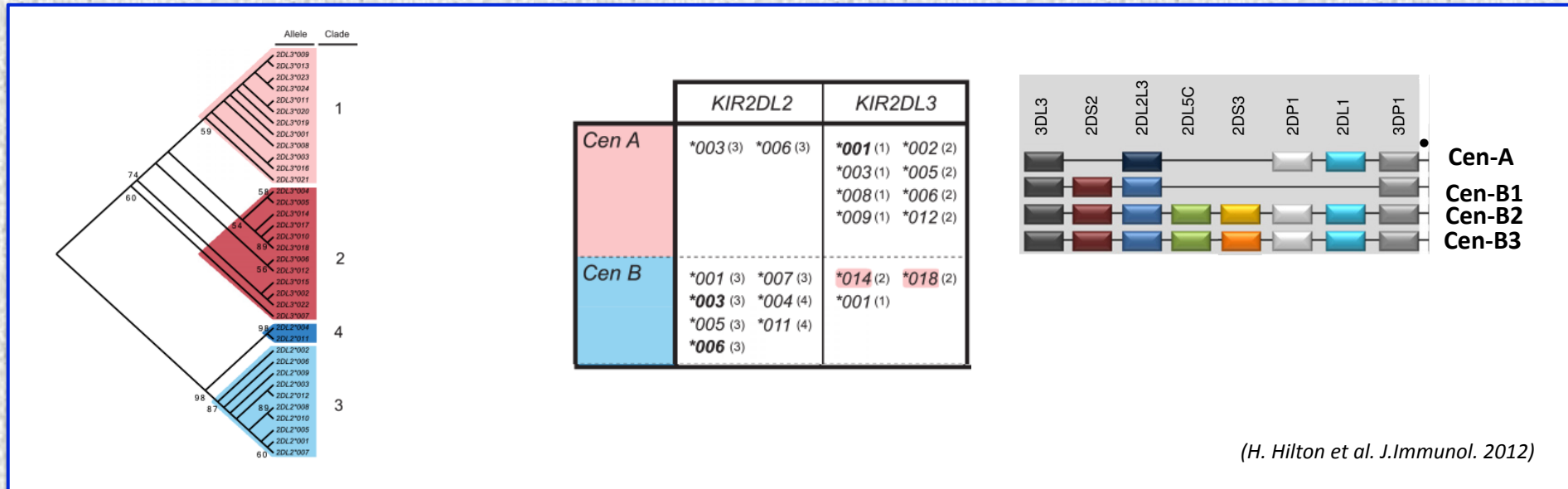
KIR2DL1*022 riconosce (molto probabilmente) **HLA-C^{Asn 80} (C1)** [aa 44 Lisina (K)]

KIR2DL1*013N

KIR2DL1*026 recettore espresso in membrana ma che manca della regione citoplasmatica (non trasduce segnale inibitorio)

(H. Hilton et al. PloS Genet. 2015)

Rilevanza della variabilità allelica KIR2DL2/L3



(H. Hilton et al. J.Immunol. 2012)

Gli alleli **KIR2DL2/L3** codificano per recettori che riconoscono **HLA-C^{Asn80} (C1)** [aa 44 Lisina (K)]

I recettori **KIR2DL2** hanno una migliore affinità per il ligando dei recettori KIR2DL3.

(A.K. Moesta et al. J.Immunol. 2008)

(H. Hilton et al. J.Immunol. 2015)

KIR2DL2*004 codifica per un recettore che viene trattenuto nel citoplasma.

(C.J.VandenBussche et al. J. immunol.. 2006)

KIR2DL3*005 codifica per un recettore “forte”.

(W.R. Frazier et al. J. Immunol. 2013)

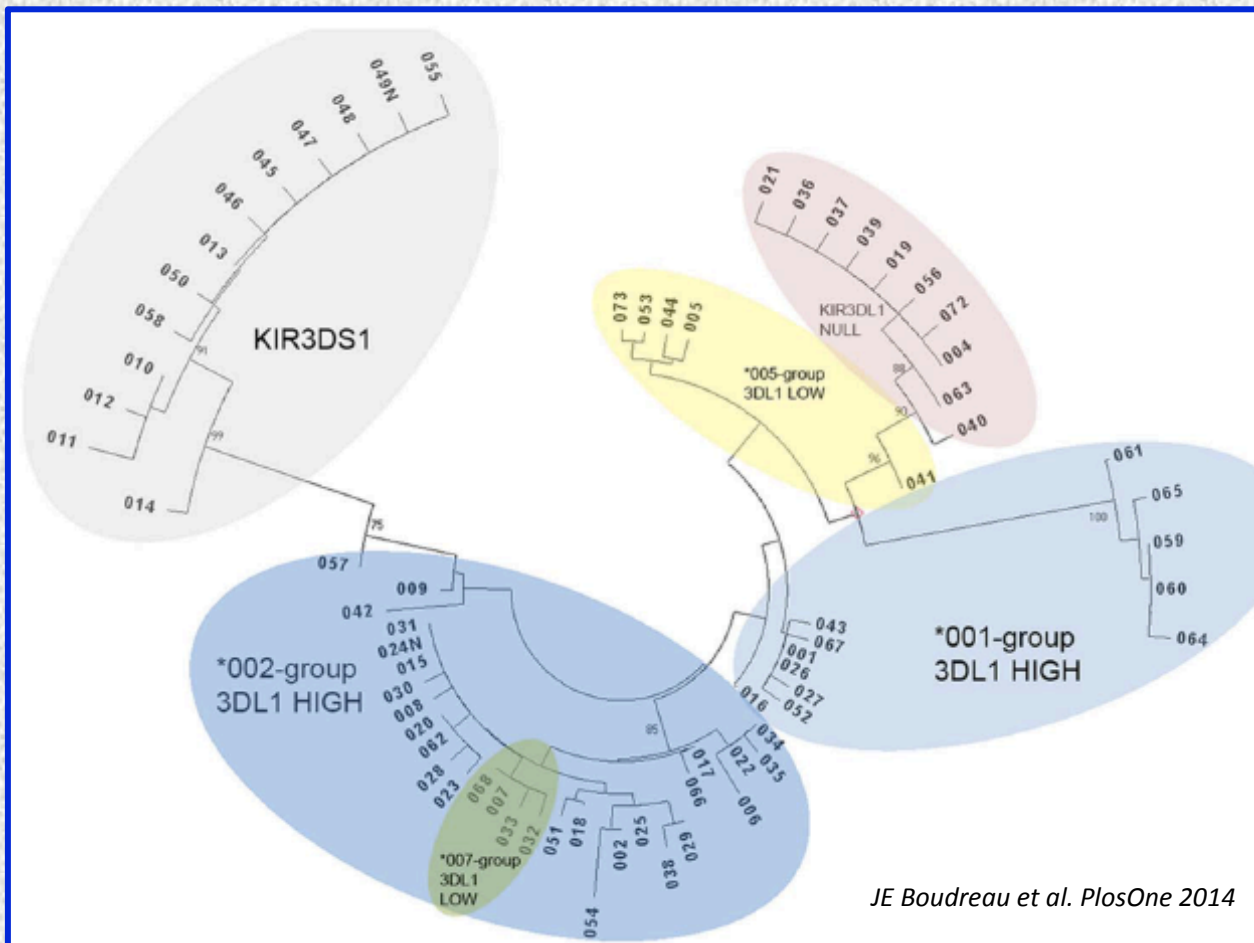
(R.Bari et al. www. Nature.com/scientificreports 2016)

Rilevanza della variabilità allelica KIR3DL1

- ★ gene KIR con elevato grado di polimorfismo
- ★ unico gene KIR caratterizzato da alleli che codificano sia per recettori inibitori che attivatori

KIR3DL1 telomeri di tipo A

KIR3DS1 telomeri di tipo B



differente
livello d'espressione

ALTO

BASSO

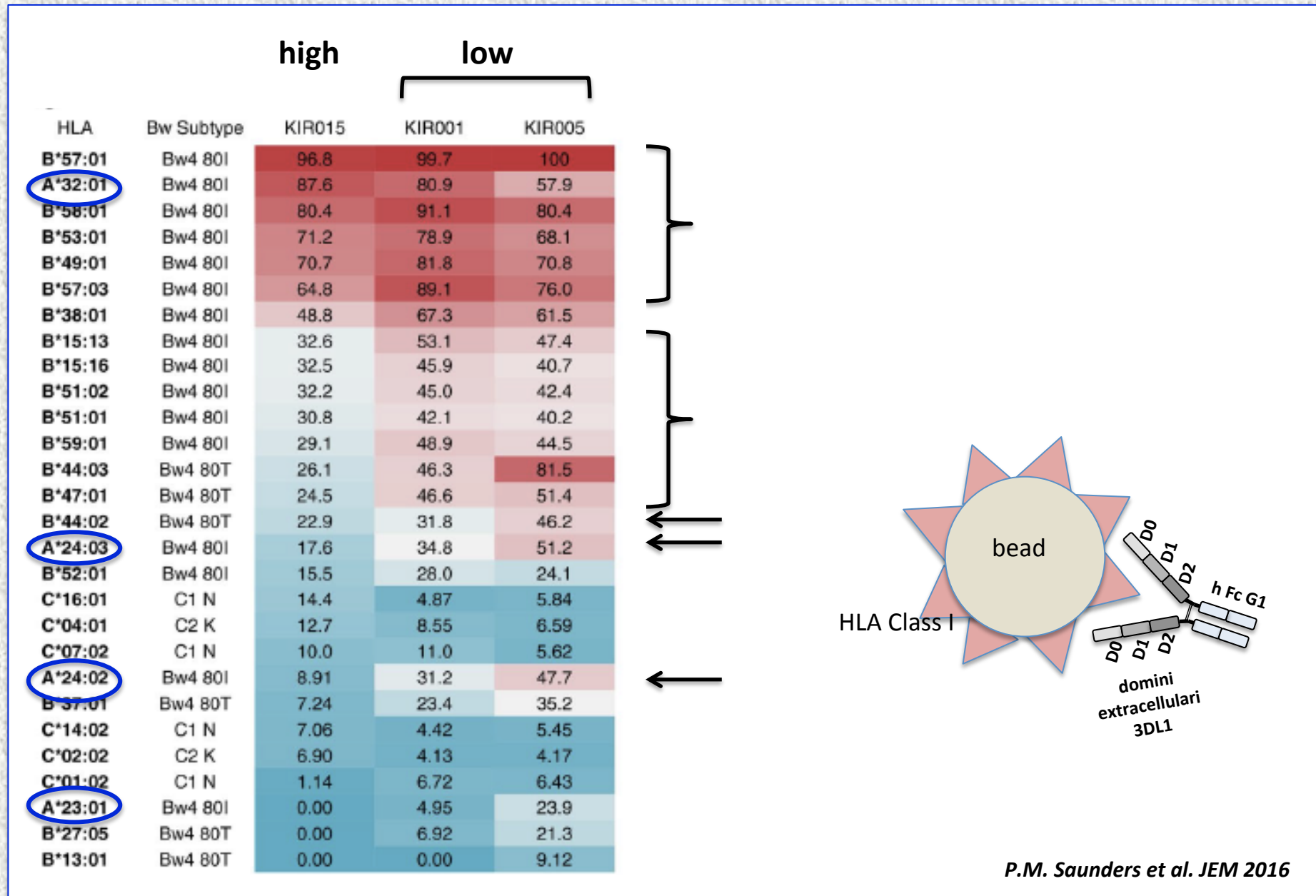
Polimorfismo alle
posizioni:
2, 47, 54, 182 e 283
D0, D1 e D2

NO

NON espressi
in membrana

Dimorfismo 86

Rilevanza della variabilità allelica KIR3DL1



Perché studiare il polimorfismo dei geni KIR?

- ★ Ricerca di base
- ★ Analisi del donatore di cellule staminali ematopoietiche per trapianto aploidentico
- ★ KIR e malattie (infezioni virali, malattia autoimmuni, ...)
- ★ KIR e gravidanza
- ★ ...

Analisi del donatore di cellule staminali ematopoietiche per trapianto aploidentico

Criteri di selezione del donatore

- ★ Presenza di alloreattività NK
- ★ Dimensione della popolazione NK alloreattiva
- ★ Valore del B content
- ★ Presenza di KIR2DS1 “educato e utile”
- ★ Numero assoluto di cellule NK (e linfociti T gamma/delta)
- ★ Espressione (sulle cellule NK) di recettori attivatori
(es: NKp46, NKG2C)
- ★ Attività antileucemica delle cellule NK

Analisi molecolare dei geni KIR nel donatore aploidentico

- ★ presenza/assenza di **alloreattività NK** (analisi **KIR/KIR-L MM** in GvHD)
 - analisi degli alleli HLA di classe I classico nel donatore e nel ricevente
 - analisi del gene KIR “utile” per la presenza di una pop. NK alloreattiva

- ★ determinazione del valore del **B content**
 - analisi di tutti i geni KIR (SSP-PCR)
 - analisi dei geni presenti nella regione Cen e Tel dei genotipi KIR

- ★ presenza/assenza di “**KIR2DS1 educato e utile**”
 - analisi della presenza del gene KIR2DS1 nel donatore
 - analisi degli alleli HLA-C del donatore e del ricevente

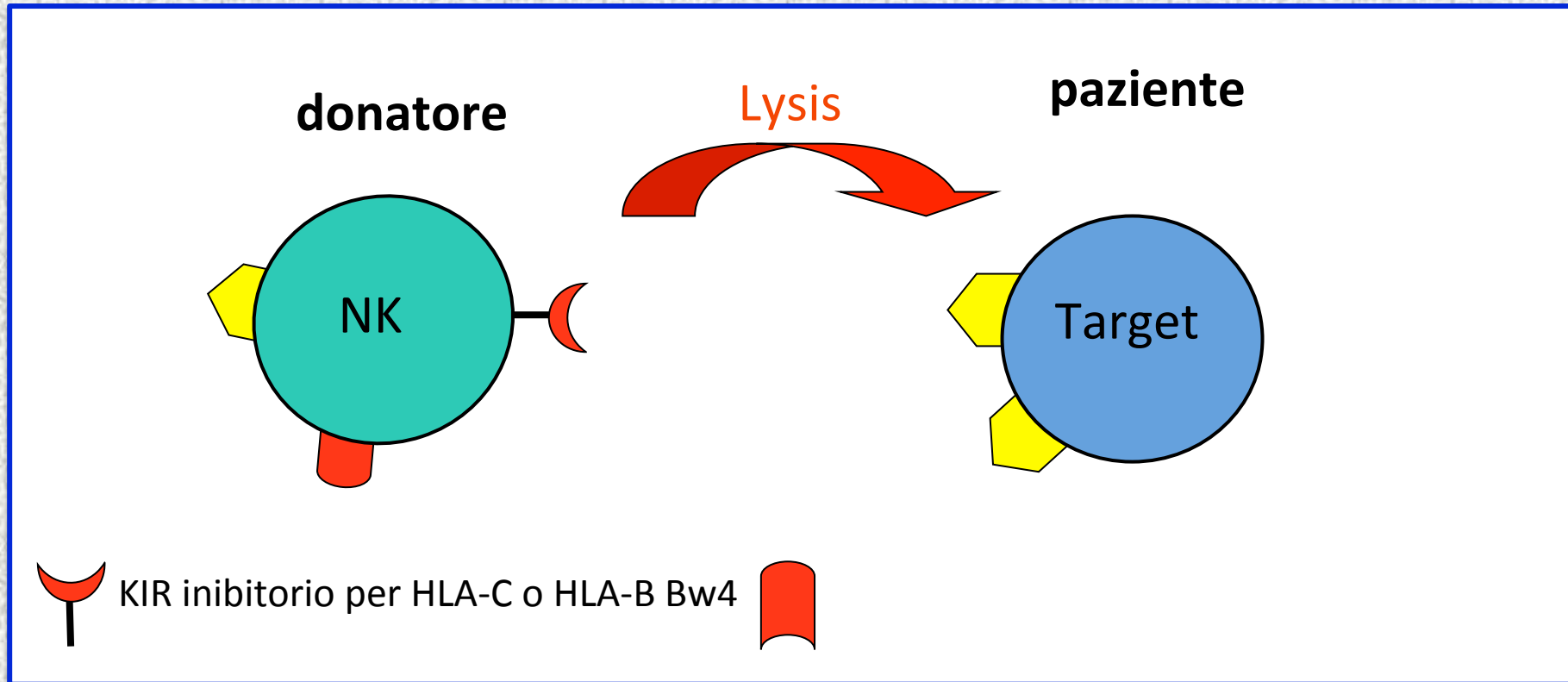
Repertorio KIR

- ★ determinato dal genotipo KIR
- ★ distribuito in maniera clonale (KIR differenti sono espressi da una % diversa di cellule NK e possono, o no, essere presenti sulla stessa cellula insieme ad altri KIR o a CD94/NKG2A)
- ★ nonostante i geni KIR e HLA siano su cromosomi differenti le molecole HLA di classe I classica influenzano l'espressione dei recettori KIR (educazione delle cellule NK)

per ottenere la tolleranza:

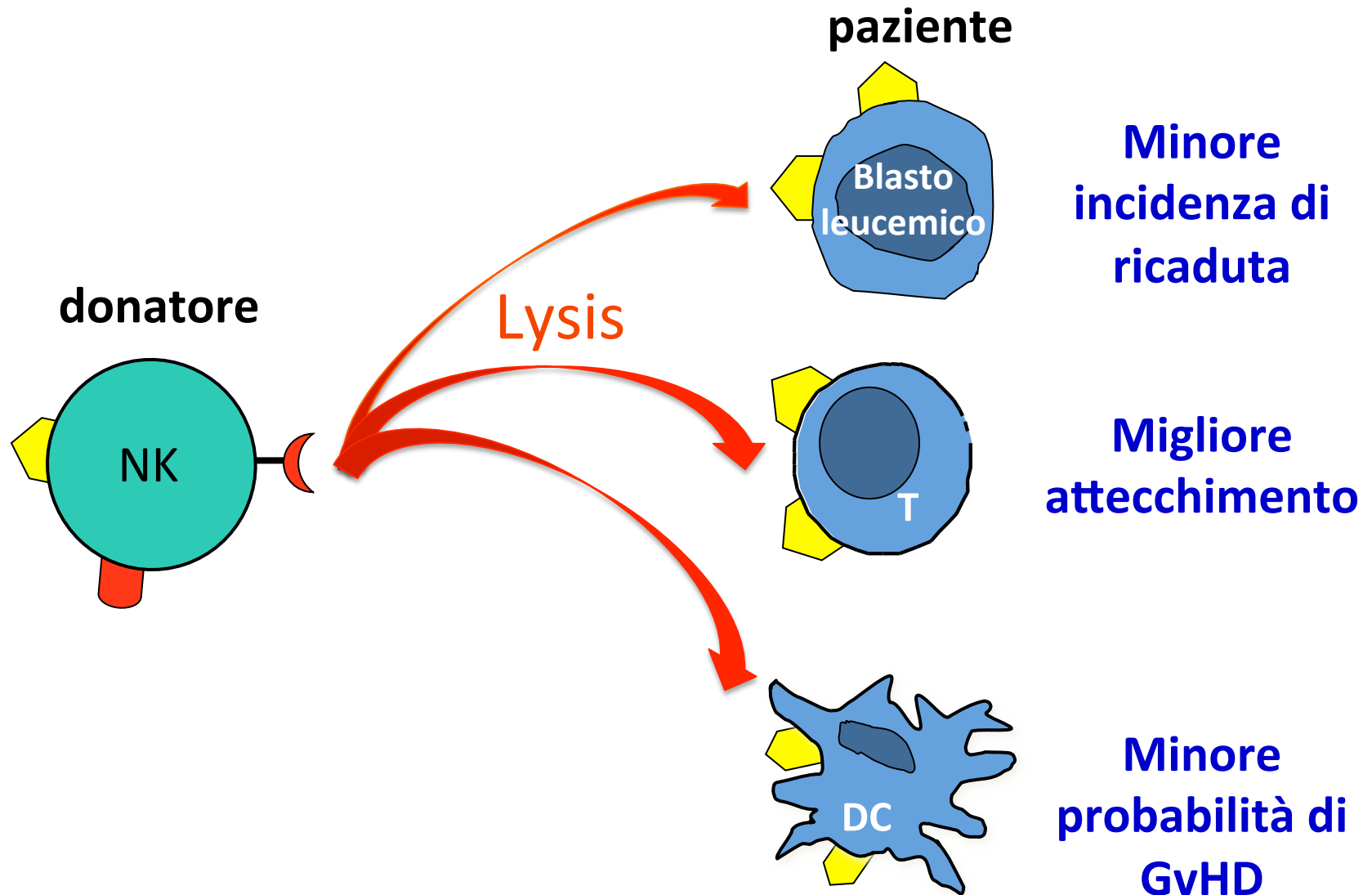
- ★ ogni cellula NK deve esprimere almeno un recettore inibitorio (KIR o CD94/NKG2A) in grado di riconoscere una delle molecole HLA "self".
- ★ le cellule NK che non esprimono recettori inibitori per l' HLA "self" sono iporesponsive.

POPOLAZIONE NK ALLOREATTIVA



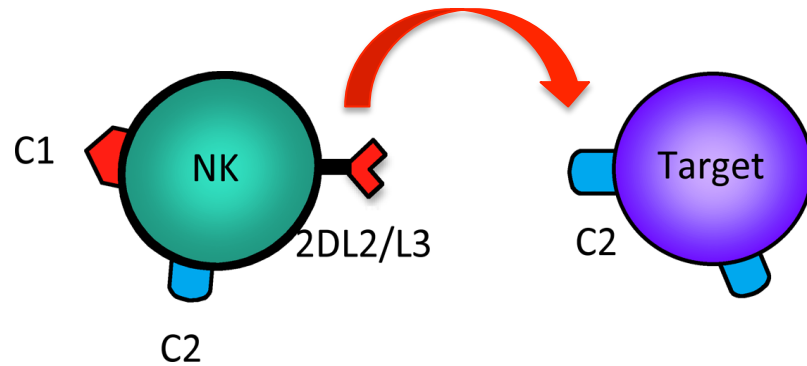
La **popolazione NK alloreattiva** è costituita da cellule NK che esprimono, sulla loro superficie, unicamente recettori KIR inibitori che riconoscono KIR-L presenti nel donatore (educazione dei KIR) e non nel ricevente.

POPOLAZIONE NK ALLOREATTIVA



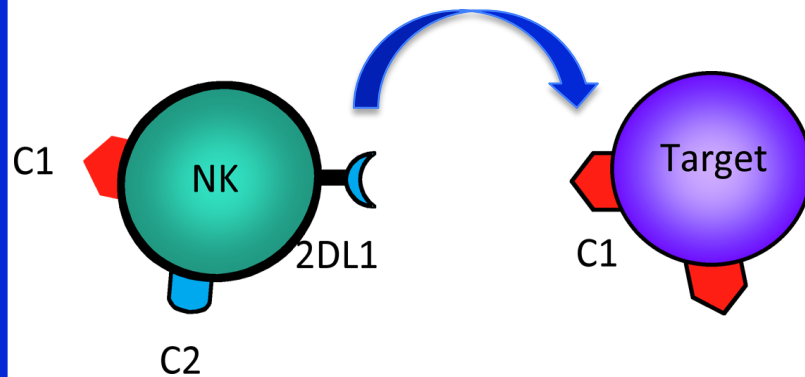
donatore

ricevente



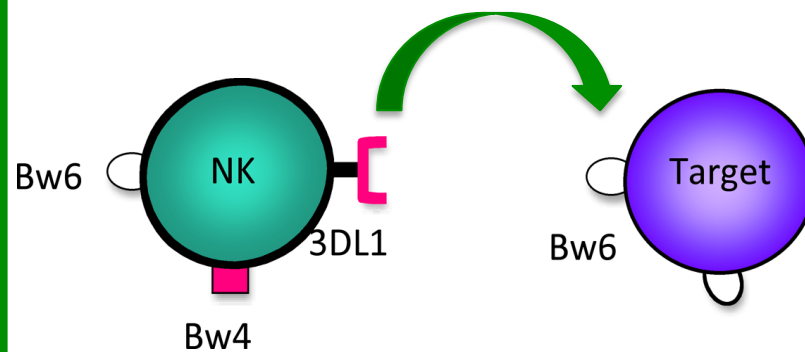
Alloreattività C1

recettore	ligando
2DL2/L3	HLA-C^{Asn 80} (C1) alta affinità HLA-C^{Lys 80} (C2) bassa affinità



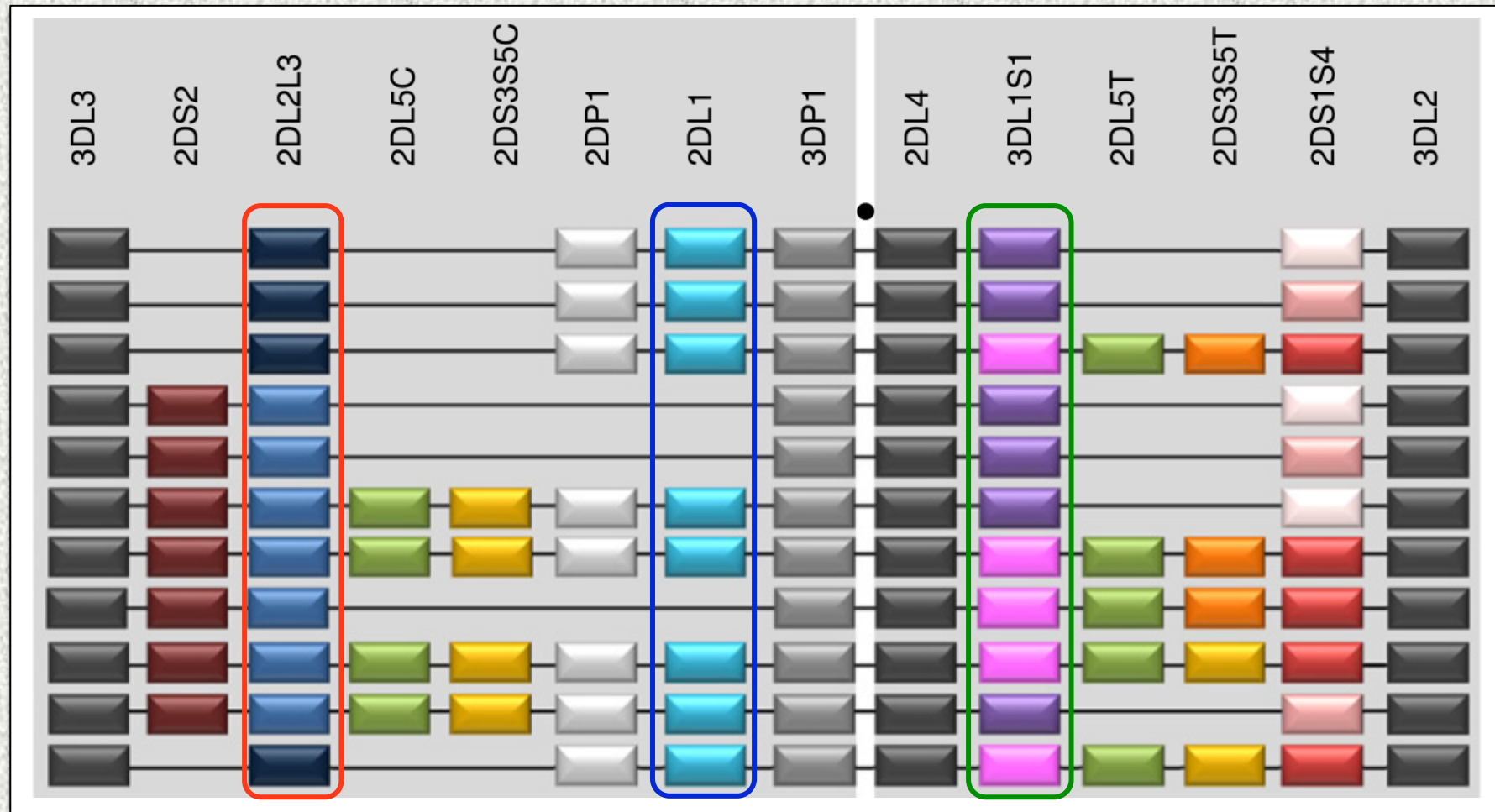
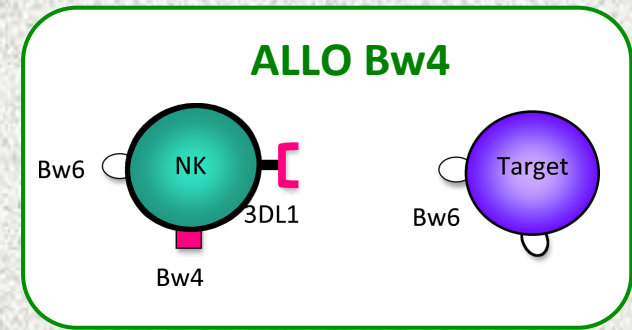
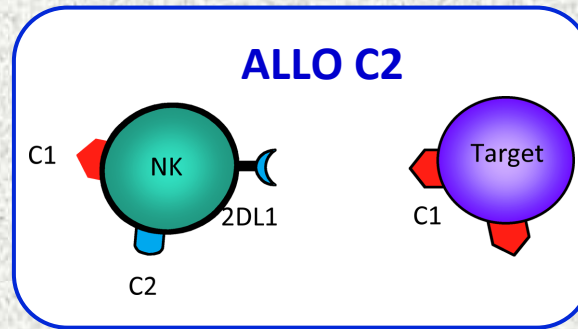
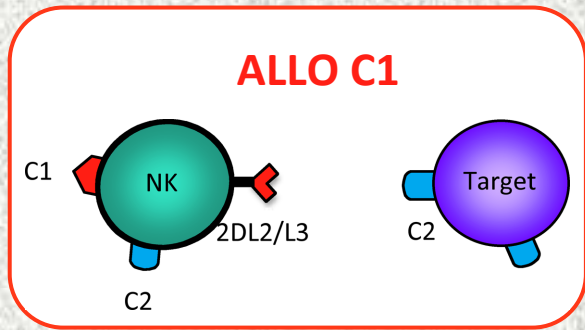
Alloreattività C2

recettore	ligando
2DL1	HLA-C^{Lys 80} (C2) alta affinità



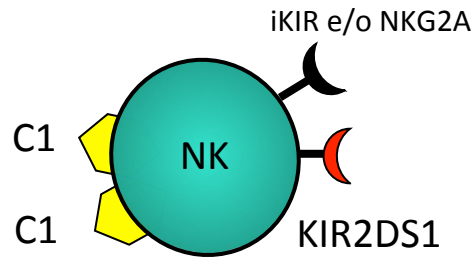
Alloreattività Bw4

recettore	ligando
3DL1	HLA-B e HLA-A (Bw4)

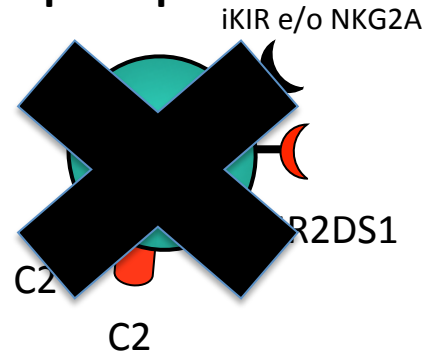


Alloreattività "non classica": KIR2DS1 educato e utile

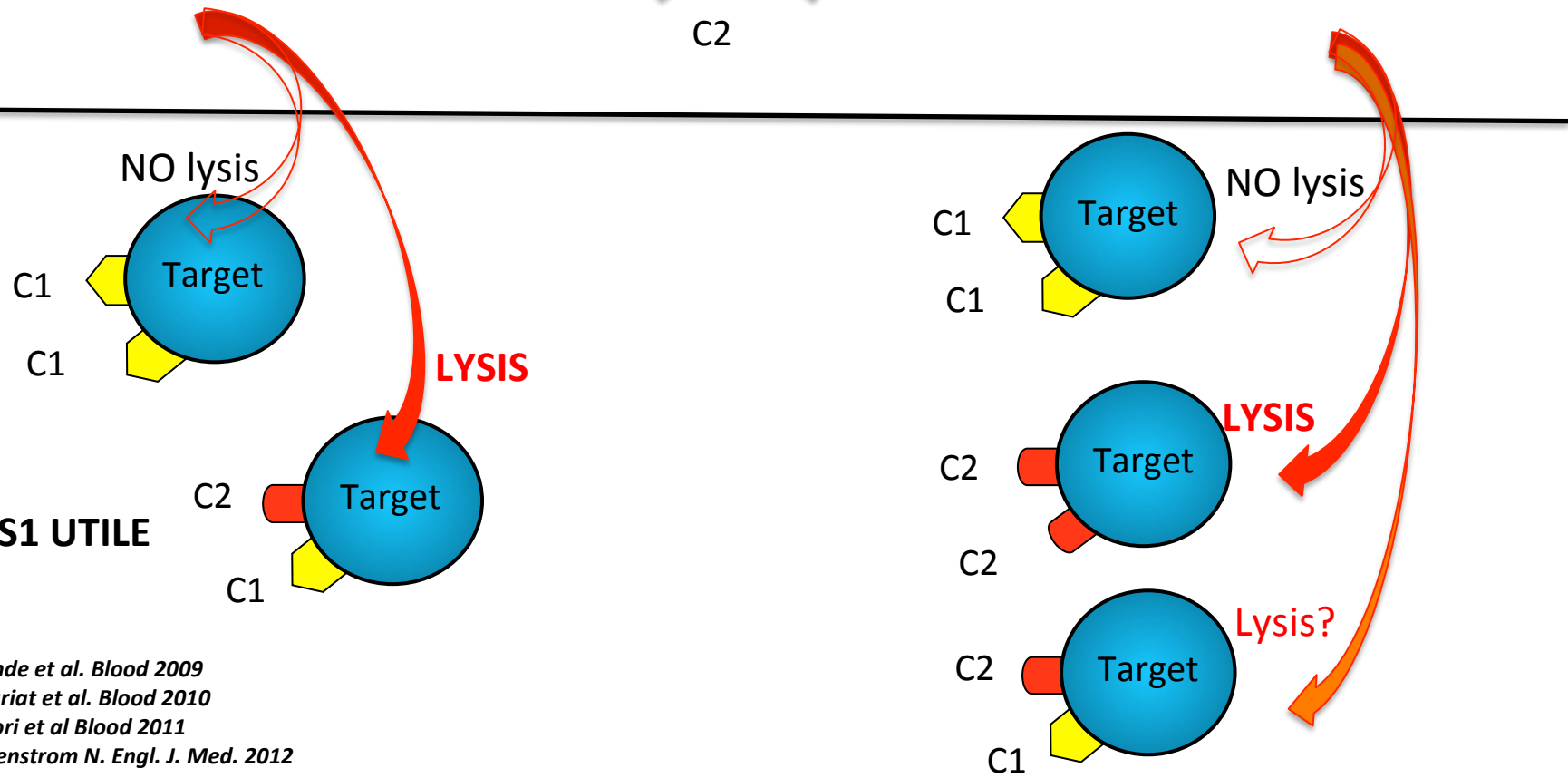
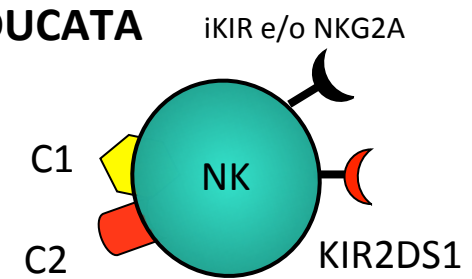
2DS1 EDUCATO



iporesponsiva



EDUCATA

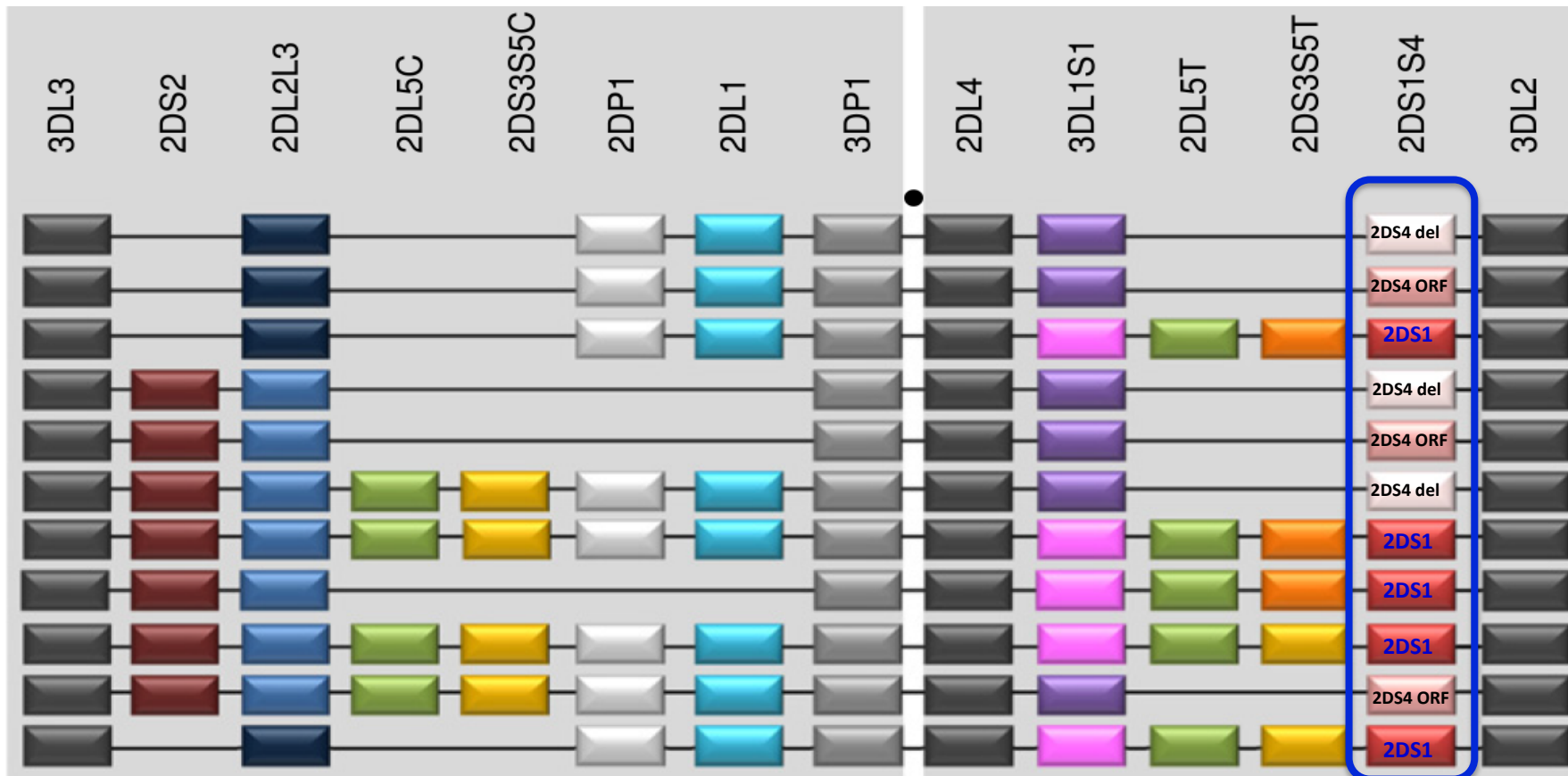


2DS1 UTILE

D. Pende et al. Blood 2009
 C. Fauriat et al. Blood 2010
 S. Sivori et al Blood 2011
 JM. Venstrom N. Engl. J. Med. 2012

Donatore: HLA-C1,HLA-Cx + KIR2DS1 positivo

Ricevente: HLA-C2,HLA-Cx



Analisi del donatore di cellule staminali ematopoietiche per trapianto aploidentico

Criteria di selezione del donatore

- ★ **Presenza di alloreattività NK**
- ★ Dimensione della popolazione NK alloreattiva
- ★ **Valore del B content**
- ★ **Presenza di KIR2DS1 “educato e utile”**
- ★ Numero assoluto di cellule NK (e linfociti T gamma/delta)
- ★ Attività antileucemica delle cellule NK

Grazie a...

Istituto G. Gaslini (GE)

Maria Bono
Claudia Alicata

Cristina Bottino

IRCCS AOU San Martino-IST (GE)

Raffaella Meazza
Paolo Canevali
Fabrizio Loiacono

Daniela Pende
Cristina Mingari

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (RM)

Lorenzo Moretta

DIMES Università degli Studi di GE

Alessandro Moretta

Policlinico Tor Vergata (RM)

Manuela Testi
Marco Andreani

E. O. Ospedali Galliera (GE)

Lucia Garbarino

IRCCS S. Matteo (PV)

Annamaria Pasi

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (RM)

Daria Pagliara
Barbarella Lucarelli
Letizia Brescia Pomponia

Alice Bertaina
Franco Locatelli

IRCCS S. Matteo (PV)

Tommaso Mina
Laura Rubert
Chiara Cugno

Marco Zecca



... e a tutti voi per l'attenzione.