

POLIMORFISMUL GENETIC AL RECEPTORILOR KIR LA PACIENȚI CU MIELOM MULTIPLU

Genetic polymorphism of KIR receptors in multiple myeloma patients

Dr. Cristina Banu¹, Asist. Univ. Dr. Ana Moise², Prof. Dr. Constantin Virgiliu Arion³,
Conf. Dr. Daniel Coriu⁴, Dr. Alina Tănase⁴, Dr. Carmen Călugăroiu⁵,
Conf. Dr. Ileana Constantinescu²

¹Institutul Național de Expertiză Medicală și Recuperare a Capacității de Muncă, București

²Centrul de Imunogenetică și Virusologie, Institutul Clinic Fundeni, București

³Clinica de Pediatrie, Institutul Clinic Fundeni, București

⁴Centrul de Hematologie și Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București

⁵Departamentul de Hemobiologie și Conservare Grefon Medular, Institutul Clinic Fundeni,
București

REZUMAT

Introducere: receptorii KIR (Killer cell Ig-like receptors) joacă un rol major în ceea ce privește reglarea activității celulelor NK și de aici rezidă importanța lor în evoluția multor boli (boli autoimune, cancere, transplant). Studiul nostru este centrat în principal pe analiza genotipului KIR la pacienți cu mielom multiplu și impactul acestuia asupra evoluției bolii și a răspunsului la tratament.

Material și metode: studiul a fost efectuat pe 80 de pacienți diagnosticați cu mielom multiplu în Clinica de Hematologie a Institutului Clinic Fundeni, între anii 2007-2011. Ca lot control a fost utilizat un număr de 50 de persoane, donatori de sânge sănătoși. Genotiparea genelor receptorilor KIR s-a realizat prin metode de biologie moleculară (metoda SSP).

Rezultate: genotipul AA are o frecvență mai mare în lotul martor (42% vs. 33,75%), în timp ce genotipul BB este mai frecvent în rândul pacienților cu mielom multiplu (10% vs. 4%) și se asociază cu forme de boală agresive.

Concluzii: analiza genotipului KIR poate fi luată în considerare ca factor prognostic de evoluție a mielomului multiplu, alături de alți parametri genetici deja consacrați cum sunt del13q14, t(4;14) sau t(11;14).

Cuvinte cheie: mielom multiplu, gene KIR, receptori ai celulei NK

ABSTRACT

Introduction: KIR receptors (killer cell Ig-like receptors) play a major role in the regulation of NK cell activity and hence their importance in development of many diseases (autoimmune diseases, cancers, transplantation). The aim of our study is KIR genotype analysis in patients with multiple myeloma and its impact on disease progression and response to treatment.

Material and methods: the study was performed on 80 patients with multiple myeloma diagnosed in Center of Hematology, Fundeni Clinical Institute, between 2007-2011. As a control group were used 50 healthy blood donors. KIR genotyping was performed by molecular biology methods (SSP method).

Results: the AA genotype has a higher frequency in the control group (42% vs. 33.75%), while BB genotype is more common among patients with multiple myeloma (10% vs. 4%) and it is associated with aggressive forms of disease.

Conclusions: KIR genotype analysis may be considered as a prognostic factor in the outcome in multiple myeloma patients, among other genetic parameters already consecrated as del13q14, t(4,14) or t(11, 14).

Key words: multiple myeloma, KIR genes, NK cell receptors

Adresa de corespondență:

Dr. Cristina Banu, Institutul Național de Expertiză Medicală și Recuperare a Capacității de Muncă, Șos. Panduri Nr. 22, București
e-mail: krsbanu@yahoo.com

INTRODUCERE

Celulele natural killer (NK), componente ale sistemului imun înăscut, reprezintă prima linie de apărare împotriva infecțiilor și tumorilor prin citotoxicitate directă, dar și modulând un răspuns imun existent prin secreția de factori solubili cum sunt citokinele. Funcțiile efectoare ale celulelor NK sunt reglate prin intermediul unui repertoriu complex de molecule exprimate pe suprafața lor, receptori specifici pentru moleculele HLA clasa I.

La om, receptorii KIR (Killer cell Ig-like receptors) joacă un rol major în ceea ce privește reglarea activității celulelor NK și a unor celule T. Marea diversitate a KIR contribuie la generarea unui repertoriu deosebit de variat al celulelor NK și astfel se explică importanța celulelor NK și a receptorilor lor în evoluția multor boli (mai ales boli autoimune, cancere), în transplant, sarcină sau în controlul unor infecții virale (1-4).

Receptorii KIR sunt membri ai superfamiliei imunoglobulinelor, iar genele codante sunt localizate pe brațul lung al cromozomului 19q13.4 la nivelul cluster-ului receptorilor leucocitari (LRC-leukocyte receptor cluster). Până în prezent au fost identificate 14 gene exprimate și 2 pseudogene. În general, structura receptorului constă în 2 sau 3 domenii extracelulare (2D sau 3D), o porțiune transmembranară și o coadă intracitoplasmatică care poate fi scurtă (S-short) sau lungă (L-long). Cea mai utilizată nomenclatură este cea bazată pe această structură (ex. KIR2DL1 sau KIR2DS4).

Activarea receptorilor KIR cu domeniu intracelular lung exercită un efect inhibitor asupra funcțiilor celulei NK (excepție 2DL4, care are acțiune stimuloare), pe când cei cu domeniu intracelular scurt transmit semnale activatoare prin intermediul unei alte molecule, DAP-12 (Fig. 1).

Pe un cromozom genele sunt așezate în ordine, una după alta, și în acest context se descriu două haplotipuri posibile (A și B). Haplotipul A conține 7 loci: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS4. Cea mai relevantă distincție între haplotipul A și B este numărul receptorilor activatori prezenți. Haplotipul A conține doar o genă KIR stimuloare (2DS4), în timp ce haplotipul B prezintă diverse combinații ale 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 și 2DS4. Pe de altă parte, gena 2DS4 prezintă o alelă nulă cu o frecvență în populație de circa 84%. Astfel, unii indivizi, homozigoți pentru haplotipul A, pot să nu exprime nici un receptor KIR activator (5-8). La populația caucazoidă, cele două haplotipuri sunt distribuite relativ egal.

În ceea ce privește liganzii receptorilor KIR, aceștia sunt bine definiți în câteva cazuri.

KIR 2DL1 se leagă la un subset de molecule HLA-C care prezintă aminoacidul lizină în poziția 80 a lanțului greu (HLA-C^{Lys80} sau HLA-C2).

KIR 2DL2 și KIR 2DL3 recunosc celelalte alotipuri HLA-C cu asparagină în poziția 80 (HLA-C^{Asn80} sau HLA-C1).

KIR 3DL1 are ca ligand alotipuri HLA-Bw4, care reprezintă aproape o treime din alelele HLA-B.

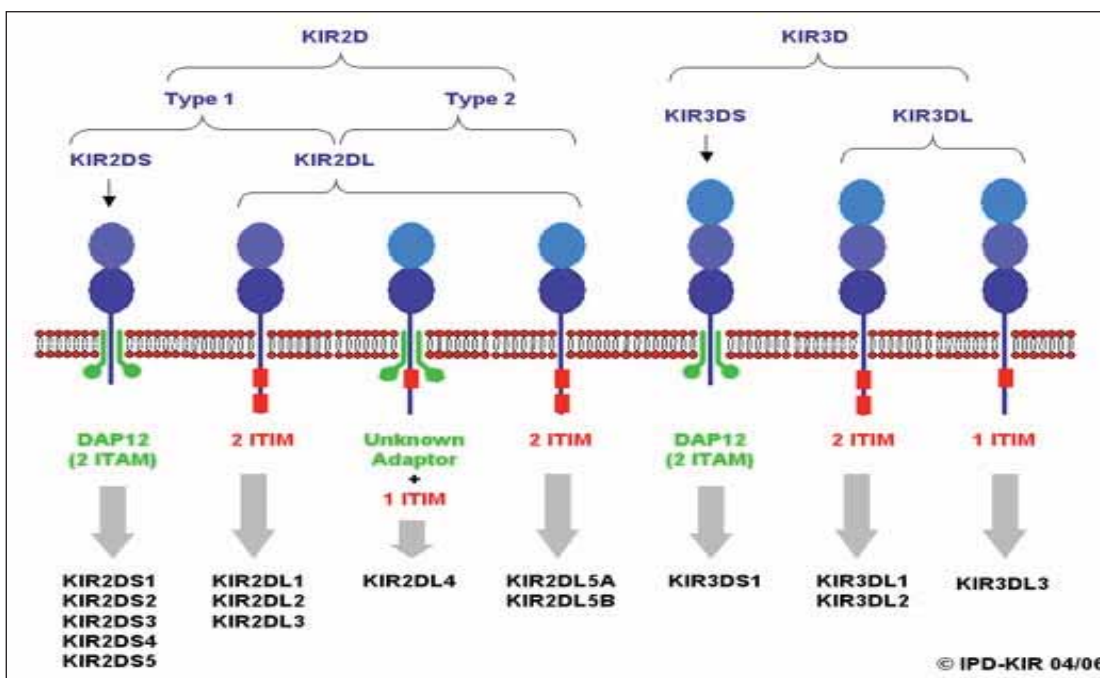


FIGURA 1. Structura și nomenclatura KIR (A.P. Williams, KIR and Their Role in Disease, Southampton, Marea Britanie, 2006)

KIR 3DL2 se leagă la HLA-A3 și HLA-A11.

KIR 2DL4 interacționează probabil cu moleculele HLA-G, dar rolul fiziologic al acestei interacțiuni rămâne neclar.

Specificitățile receptorilor KIR activatori nu sunt încă foarte bine definite din cauza afinității mult mai reduse față de antigenele HLA de clasa I. Pe baza similitudinii structurale, se presupune că KIR 2DS1 și 2DS2 ar avea aceeași liganzi ca și KIR 2DL1, respectiv 2DL2. La ceilalți receptori, nespecificați, liganzii specifici nu au fost identificați încă (1,2).

Diversitatea genotipurilor KIR se complică mai mult la nivel funcțional din cauza liganzilor HLA. Locusul Complexului Major de Histocompatibilitate, din care fac parte genele HLA de clasa I, este localizat pe cromozomul 6 și, astfel, în cursul meiozei, genele KIR și genele HLA segregă independent. Prin urmare, este posibil ca unui individ care are un anumit receptor KIR să-i lipsească ligandul HLA corespunzător, receptorul KIR fiind astfel nefuncțional (9).

Echilibrul între semnalele activatoare și cele inhibitoare este crucial în reglarea funcțiilor celulelor natural-killer și absența expresiei moleculelor HLA de clasa I poate crește susceptibilitatea de citoliză mediată NK, a unei potențiale celule țintă (10,11).

Studiul nostru este centrat în principal pe analiza genotipului KIR la pacienți cu mielom multiplu și pe impactul acestuia asupra evoluției bolii și a răspunsului la tratament.

MATERIAL ȘI METODĂ

În studiu au fost incluși 80 de pacienți (F/B: 39/41) diagnosticați cu mielom multiplu și tratați în Clinica de Hematologie a Institutului Clinic Fundeni între anii 2007-2011. Ca lot control a fost utilizat un număr de 50 de persoane, donatori de sânge sănătoși. Media de vârstă a pacienților a fost de 59 de ani (36-79 ani), iar cea a donatorilor – 32 de ani (19-45 ani).

Majoritatea pacienților se aflau în stadii avansate de boală (Tabelul 1), iar din punct de vedere al tipului de imunoglobulină, mai mult de jumătate erau forme clinice cu secreție de IgG (Tabelul 2).

TABELUL 1. Distribuția pacienților în funcție de stadiul bolii

Stadiul bolii	Lot pacienți (n = 80)	Frecvență
Stadiul II A	30	37,5%
Stadiul II B	4	5 %
Stadiul III A	33	41,25%
Stadiul III B	14	17,5%

TABELUL 2. Distribuția pacienților în funcție de tipul imunoglobulinei secretate

Tipul bolii	Lot pacienți (n = 80)	Frecvență
IgG	46	57,5%
IgA	23	28,75%
Micromolecular k	5	6,25%
Micromolecular λ	3	3,75%
Nesecretor	3	3,75%

Genotiparea KIR

ADN-ul a fost obținut din sânge total recoltat pe EDTA utilizând QIAmp DNA Mini Kit.

Genele KIR au fost analizate tot prin metoda SSP-PCR, cu ajutorul kitului KIR Genotyping SSP Kit (PEL-FREEZ, Dynal Biotech), care include receptorii inhibitori 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, receptorii activatori 2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1 și pseudo-genele 2DP1 și 3DP1 (neexprimate). La tehnica SSP, amplificarea se face cu primeri specifici pentru fiecare genă, iar ampliconii sunt vizualizați după electroforeză în gel de agaroză prin examinarea acestuia în lumină ultravioletă.

REZULTATE

Analiza distribuției genelor KIR în cele 2 loturi (pacienți și control) arată că cele mai frecvente sunt genele inhibitoare 3 DL2, 2DL1, 3DL1, 2DL3 și gena activatoare 2DS4. Celelalte tipuri de gene se regăsesc doar la circa jumătate din cazuri (Tabelul 3).

TABELUL 3. Frecvența (%) genelor KIR în populația română

Gene KIR		Lot pacienți (n = 80)	Lot control (n = 50)
Inhibitoare	2DL1	93,75	98
	2DL2	52,5	52
	2DL3	80	72
	3DL1	86,25	90
	3DL2	100	100
Activatoare	2DS1	48,75	44
	2DS2	48,75	48
	2DS3	40	34
	2DS4	80	96
	3DS1	45	38

De altfel, această distribuție este în concordanță cu alte date raportate în literatură (12-16). Nu se observă diferențe semnificative ale frecvenței între cele două loturi luate în studiu, exceptând gena 2DS4, care este mai frecventă în lotul de control (96%) vs. 80% în cazul pacienților. Gena 2DS4 este gena KIR caracteristică haplotipului A și, de altfel, analizând frecvența genotipurilor, se observă că ge-

notipul AA are o frecvență mai mare în lotul martor, în timp ce genotipul BB este mai frecvent în rândul pacienților cu mielom multiplu (Tabelul 4).

TABELUL 4. Frecvența (%) genotipurilor KIR

Genotip KIR	Lot pacienți (n = 80)	Lot control (n = 50)
AA	27 (33,75%)	21 (42%)
AB	45 (56,25%)	27 (54%)
BB	8 (10%)	2 (4%)

Așa cum am amintit în introducere, genotipul BB este caracterizat de prezența mai multor gene KIR stimulative, ceea ce ar induce o activitate mai intensă, antitumorală și antivirală, a celulelor NK. Prin urmare, ne așteptăm ca acest genotip să fie protectiv contra neoplaziilor. Analizând haplotipurile B ale pacienților cu mielom multiplu, se observă că, dintre genele stimulative, predomină 2DS1 și 2DS2 care coexistă cu genele inhibitoare 2DL1 și 2DL2 și sunt competitive pentru aceiași liganzi. Cum afinitatea receptor-ligand este mai mare în cazul genelor inhibitoare, per total rezultă un status inhibitor al celulei NK.

De altfel, numai la 5 (62,5%) dintre cei 8 pacienți cu genotip BB s-a obținut remisiune parțială (3 pacienți) sau remisiune totală (2 pacienți) după chimioterapie, dar aceste răspunsuri terapeutice au fost de scurtă durată, 2 dintre pacienți prezentând recădere de boală, rapid, la 3 luni de la întreruperea tratamentului. Mai mult, unul dintre acești pacienți a fost supus în continuare unei proceduri de auto-transplant de celule stem dar, la examenul de control efectuat la 6 luni posttransplant, s-a constatat recidiva bolii.

În rândul pacienților cu genotip AA sau AB, proporția celor la care s-a obținut remisiune completă sau parțială după chimioterapie a fost mult mai mare comparativ cu genotipul BB, de 92,6% (25/27) și respectiv 88,8% (40/45) (Tabelul 5).

TABELUL 5. Răspunsul la chimioterapie în funcție de genotipul KIR

Răspunsul la tratament	Genotip AA (n = 27)	Genotip AB (n = 45)	Genotip BB (n = 8)
Remisiune parțială	17 (62,96%)	24 (53,33%)	2 (25%)
Remisiune completă	8 (29,63%)	16 (35,55%)	3 (37,5%)
Chimioresistență	2 (7,41%)	5 (1,12%)	3 (37,5%)
Recădere după chimioterapie	3 (11%)	10 (22%)	2 (25%)

Un răspuns favorabil s-a observat și în cazul pacienților cu astfel de genotip care au fost transplantați, cu o frecvență a recidivei de boală, la 6 luni posttransplant de 25%, iar la un an de 37,5% în cazul genotipului AB (Tabelul 6).

TABELUL 6. Frecvența recăderilor de boală posttransplant autolog de celule stem, în funcție de genotipul KIR (N=25)

	Genotip AA (n = 8)	Genotip AB (n = 16)	Genotip BB (n = 1)
Recădere la 6 luni posttransplant autolog	2 (25%)	4 (25%)	1 (100%)
Recădere la 1 an posttransplant autolog	2 (25%)	6 (37,5%)	0

CONCLUZII

În ciuda dezvoltării rapide și continue a unor noi agenți terapeutici, mielomul multiplu rămâne o afecțiune incurabilă cu evoluție fatală la majoritatea pacienților, în special la cei cu forme avansate de boală. Tradițional, factorii de prognostic se referă la indexul de proliferare a celulelor mielomatoase (Ki-67), la masa tumorală (stadiul bolii, procentul plasmocitelor în sângele periferic și măduva osoasă) sau la statusul pacientului (hemoglobină, creatinină, albuminemie). Cel mai important marker prognostic este β 2-microglobulina. În prezent, din ce în ce mai mult, se pune accent pe depistarea unor factorii genetici ca factori prognostici (17,18).

În studiul nostru, deși analiza individuală a genelor KIR nu a arătat diferențe semnificative între lotul de pacienți și lotul martor, exceptând gena 2DS4, care a fost mai frecventă la lotul de control, analiza combinației de gene de pe fiecare cromozom (haplotipul KIR) și determinarea genotipului, au arătat că genotipul KIR BB este mai frecvent la pacienții cu mielom multiplu și prezența lui se asociază cu forme de boală agresive, cu răspuns slab și nesușinit la chimioterapie, cu recăderi rapide chiar după transplantul autolog de celule stem hematopoietice.

BIBLIOGRAFIE

1. Williams A.P., Bateman A.R., Khakoo S.I. – KIR and Their Role in Disease. *Molecular Interventions*, 2005; 5 (4):226-240
2. Santos P. – NK Receptors and infection. *Mini-school Immunology of Communicable Diseases*, 2009
3. Rajagopalan S., Long E.O. – Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease, *Journal of Experimental Medicine*, 2005; 201 (7):1025-1029
4. Amanda K., Purdy and Kerry S. Campbell – Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR), *Cancer Biol Ther*. 2009 December; 8(23):13-22
5. Borrego F., Kabat J., Kim DK et al. – Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*. 2002; 38(9):637-660
6. Carrington M., Norman P. – The KIR gene cluster, online books, may 2003
7. Shilling H.G., Guethlein L.A., Cheng N.W. et al. – Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *Journal of Immunology*, 2002; 168:2307-2315
8. Hsu K.C., Liu X.R., Selvakumar A. et al. – Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *Immunology*, 2002; 169:5118-5129
9. Khakoo S.I., Thio C.L., Martin M.P. – HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*, 2004; 305:872-874
10. Hsu K.C., Keever-Taylor C.A., Wilton A. et al. – Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*, 2005; 105:4878-4884
11. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E. et al. – Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002; 295:2097-2100
12. Naumova E., Mihaylova A., Stoitchov K. et al. – Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother*, 2005; 54:172-178
13. Middleton D., Vilchez J.R., Cabrera T. et al. – Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens*. 2007; 69(3):220-226
14. Velickovic M., Velickovic Z., Dunckley H. – Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Pacific Islands populations. *Immunogenetics*. 2006; 58(7):523-532
15. Niokou D., Spyropoulou-Vlachou M., Darlamitsou A., Stavropoulos-Giokas C. – Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Hum Immunol*. 2003; 64(12):1167-76
16. Flores A.C., Marcos C.Y., Paladino N., et al. – KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasic and Amerindian populations. *Tissue Antigens*. 2007; 69(6):568-576
17. Gabriel I.H., Sergeant R., Szydlo R., et al. – Interaction between *KIR3DS1* and *HLA-Bw4* predicts for progression-free survival after autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma *Blood*, 2010; 116(12):2033-2039
18. Bergsagel P.L. – Prognostic Factors in Multiple Myeloma: It's in the Genes *Clin Cancer Res* 2003;9:533-534.