

Uloga gena KIR u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Burek Kamenarić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:618081>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MARIJA BUREK KAMENARI

**ULOGA GENA KIR U
TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH
MATEMATIČNIH STANICA**

DOKTORSKI RAD

ZAGREB, 2014



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

MARIJA BUREK KAMENARI

**THE ROLE OF KIR GENES IN
HEMATOPOIETIC STEM CELL
TRANSPLANTATION**

DOCTORAL THESIS

ZAGREB, 2014

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Kliničkim jedinicama za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju pri Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pod vodstvom doc. dr. sc. Renate Žunec, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

ZAHVALE...

Ovu stranicu iskoristiti da se zahvalim svima koji su uz mene svojom stručnošću, prijateljstvom, nesebičnošću i ljubavi pomogli u izradi ovog doktorskog rada...

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Renati Žunec na pruženoj slobodi tijekom izrade rada, na pruženom strpljenju i svim stručnim i prijateljskim savjetima koje mi je pružala tijekom izvedbe, pisanja rada i mog napredovanja.

Iskrenu zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Zorani Grubi na nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade ovog rada, na uloženom trudu i vremenu, pažljivom čitanju teksta i svim korisnim kritikama.

Hvala Vam objema što ste mi otvorile vrata i omogućile ulazak u uduševan svijet imunogenetike.

Veliko hvala dugujem svim svojim kolegicama i kolegama iz Kliničkih jedinica za tipizaciju tkiva pri KBC-u Zagreb, ponajprije za njihovo prijateljstvo i moralnu podršku. Hvala na svim podijeljenim iskustvima, razumijevanju i pruženoj pomoći uvijek kada je to bilo potrebno.

Zahvaljujem svim suradnicima Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i djelatnicima Zavoda za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb na ustupljenim kliničkim podacima potrebnim za ovo istraživanje.

Naposljetku, hvala mojim obiteljima bez kojih bi ovaj rad teško bilo napisati:

- mojim dragim roditeljima Josipu i Zlati, sestrama Emini i Aniti te baki Mariji hvala na bezuvjetnoj ljubavi, ponosu, svakom odricanju i uvijek neupitno pruženoj potpori.
- suprugu Mariu hvala na podršci, strpljenju i razumijevanju, a mom sinu Ivoru hvala na svakom podarenom osmjehu, poljupcu i dječjoj razigranosti zbog kojih svaki uloženi trud vrijedi mnogostruko više.

Marija Burek Kamenari

ULOGA GENA KIR U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA

MARIJA BUREK KAMENARI

Klini ki bolni ki centar Zagreb

Receptori prirodnoubila kih stanica sli ni imunoglobulinu (engl. killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR) su obitelj inhibicijskih i aktivacijskih receptora ispoljenih na prirodnoubila kim stanicama (NK), a osnovna funkcija im je regulacija aktivnosti stanica NK. Receptori KIR imaju utjecaj na tijek i ishod transplantacije te su odgovorni za stvaranje aloreaktivnih stanica NK prilikom transplantacije krvotvornih mati nih stanica (TKMS). Kako bi se istražila uloga receptora KIR u imunologiji transplantacijske reakcije, provedeno je temeljno istraživanje polimorfizama i u estalosti gena, genotipova i haplotipova KIR na reprezentativnom uzorku hrvatske populacije (N=125). Retrogradnom analizom 111 bolesnika lije enih TKMS od srodnog i nesrodnog davatelja, istražen je utjecaj gena KIR na imbenike ishoda TKMS: preživljavanje, GvHD i postizanje punog kimerizma. Dobiveni rezultati ukazuju da ligandi HLA-C skupine C1 i C2 primatelja kao i genotip KIR primatelja i davatelja imaju pozitivan u inak na preživljavanje i pojavu GvHD-a, dok na postizanje punog kimerizma nemaju nikakav u inak.

(161 stranica, 56 slika, 16 tablica, 206 literaturnih navoda, 5 priloga, jezik izvornika-hrvatski)

Klju ne rije i: geni KIR, stanice NK, hrvatska populacija, transplantacija krvotvornih mati nih stanica, GvHD, preživljavanje, kimerizam.

Mentor: doc. dr. sc. Renata Žunec

Ocjenjiva i: izv. prof. dr. sc. Zorana Grubi

izv. prof.dr. sc. Vesna Benkovi

doc. dr. sc. Alenka Gagro

THE ROLE OF KIR GENES IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

MARIJA BUREK KAMENARI

University Hospital Center Zagreb

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are family of inhibitory and activatory receptors expressed on natural killer cells (NK) with the basic role of regulation the NK cell activity. KIRs have influence on the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) outcome and are responsible for generating alloreactive NK cells. To explore the KIR gene role in HSCT, we performed the basic investigation of gene polymorphisms and KIR gene, haplotype and genotype frequencies in the group of healthy unrelated individuals (N=125) that represents the Croatian population and serve as a control group in the further studies. The role of KIR genes in HSCT in terms of disease free survival, the intensity of GvHD and chimerism was evaluated by retrograde analyses of 111 patients and their related and unrelated donors. The results showed that the HLA-C ligands and the donor-recipient KIR genotypes have major influence on the survival and GvHD effect, while there is no effect on achieving full chimerism after HSCT.

(161 pages, 56 figures, 16 tables, 206 references, 5 supplement, original in Croatian)

Keywords: KIR genes, NK cells, Croatian population, Haematopoietic stem cell transplantation, GvHD, survival, chimerism

Supervisor: assistant professor Renata Žunec

Reviewers: associate professor Zorana Grubi

associate professor Vesna Benkovi

assistant professor Alenka Gagro

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CILJ I SVRHA RADA	2
2. LITERATURNI PREGLED	
2.1. BIOLOGIJA STANICA NK.....	3
2.1.1. FUNKCIJA STANICA NK	4
2.1.2. RECEPTORI STANICA NK.....	6
2.1.2.1. Integralni membranski proteini s imunoglobulinskim (Ig) domenama – imunoglobulinska superporodica (IgSF).....	7
2.1.2.2. Integralni membranski proteini s lektinskim domenama.....	7
2.1.3. EDUKACIJA STANICA NK.....	8
2.2. RECEPTORI PRIRODNOUBILA KIH STANICA SLI NI IMUNOGLOBULINU - KIR.....	10
2.2.1. STRUKTURA RECEPTORA KIR	12
2.2.1.1. Izvanstani na regija	12
2.2.1.2. Transmembranska regija.....	12
2.2.1.3. Citoplazmatska regija.....	13
2.2.2. NAZIVLJE GENA KIR.....	15
2.2.3. STRUKTURA GENA KIR.....	18
2.2.3.1. Geni KIR2D tipa I.....	20
2.2.3.2. Geni KIR2D tipa II	20
2.2.3.3. Geni KIR3D	20
2.2.4. HAPLOTIPOVI KIR	21
2.2.5. LIGANDI RECEPTORA KIR.....	23
2.2.5.1. HLA-C	23
2.2.5.2. HLA-Bw4	25
2.2.5.3. HLA-A	26
2.2.5.4. HLA-G	26
2.3. ULOGA GENA KIR U TRANSPLANTACIJI.....	28

2.3.1. ALOREAKTIVNE STANICE NK.....	28
2.3.2. MODELI NASTANKA ALOREAKTIVNIH STANICA NK.....	30
2.3.2.1. Model „ligand-ligand nepodudarnost”.....	30
2.3.2.2. Model „KIR-ligand nepodudarnost”.....	32
2.3.2.3. Model „haplotip KIR nepodudarnost“.....	33
2.3.3. GENI KIR U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA.....	34
2.3.3.1. Geni KIR i transplantacija bubrega.....	34
2.3.3.2. Geni KIR i transplantacija jetre.....	35
2.4. POVEZANOST GENA KIR S BOLESTIMA.....	36
2.4.1. GENI KIR I AUTOIMUNE BOLESTI.....	36
2.4.2. GENI KIR I INFEKCIJE.....	36
2.5. KIR I TRUDNO A.....	37
2.6. EVOLUCIJA GENA KIR ME U VRSTAMA.....	38
2.7. POPULACIJSKA BIOLOGIJA GENA KIR.....	39
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE	
3.1. ISPITANICI.....	40
3.1.1. ZDRAVI ISPITANICI.....	40
3.1.2. PAROVI PRIMATELJ-DAVATELJ U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA.....	40
3.2. MATERIJAL.....	41
3.3. METODE.....	41
3.3.1. IZOLACIJA DNA.....	41
3.3.2. ODRE IVANJE GENA KIR.....	42
3.3.2.1. Metoda PCR-SSP.....	43
3.3.2.1.1. Umnažanje gena KIR metodom PCR-SSP.....	44
3.3.2.1.2. Elektroforeza produkata PCR.....	44
3.3.2.1.3 Interpretacija rezultata.....	44
3.3.2.2. Metoda PCR-SSO.....	47
3.3.2.2.1. Umnažanje gena KIR metodom PCR-SSO.....	48
3.3.2.2.2. Hibridizacija umnožene DNA metodom PCR-SSO.....	48
3.3.2.2.3. O itavanje rezultata u Luminex aparatu i analiza podataka.....	49
3.3.3. STATISTI KA OBRADA PODATAKA.....	51

4. REZULTATI

4.1. RAZNOVRSNOST I U ESTALOST GENA, HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI.....	55
4.1.1. U ESTALOST GENA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI	55
4.1.2. U ESTALOST HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI	56
4.1.3. NERAVNOTEŽA UDRUŽIVANJA GENA KIR.....	59
4.1.4. USPOREDBA U ESTALOSTI GENA KIR S U ESTALOSTIMA U DRUGIM POPULACIJAMA. GENETSKA UDALJENOST	61
4.1.4. KORELACIJA PRISUTNOSTI GENA ZA AKTIVACIJSKE I INHIBICIJSKE RECEPTORE KIR I PRISUTNOSTI PRIPADAJU IH LIGANADA HLA	63
4.2. RAZNOVRSNOST I U ESTALOST GENA, HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA	66
4.2.1. U ESTALOST GENA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH SRODNOM I NESRODNOM TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA. USPOREDBA S U ESTALOSTIMA GENA KIR KONTROLNE SKUPINE.....	66
4.2.2. U ESTALOST LIGANADA HLA - USPOREDBA S KONTROLNOM SKUPINOM.....	68
4.2.3. U ESTALOST HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH SRODNOM I NESRODNOM TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA. USPOREDBA S U ESTALOSTIMA HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR KONTROLNE SKUPINE	69
4.3. ANALIZA ULOGE GENA KIR U SRODNOJ I NESRODNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA.....	71
4.3.1. ANALIZA ULOGE GENA KIR U SRODNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA	72
4.3.1.1. Usporedba u estalosti gena, haplotipova i genotipova KIR bolesnika lije enih srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja .	72
4.3.1.2. Analiza utjecaja KIR liganada HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „ligand-ligand nepodudarnost”	73

4.3.1.3. Analiza utjecaja parova receptor KIR/ligand HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „KIR-ligand nepodudarnost“	77
4.3.1.4. Analiza utjecaja genotipa KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „haplotip KIR nepodudarnost“	81
4.3.1.5. Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma.	84
4.3.2. ANALIZA ULOGE GENA KIR U NESRODNOJ TRANSPLANTACIJI	
KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA	91
4.3.2.1. Usporedba u estalosti gena, haplotipova i genotipova KIR bolesnika lije enih nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja	91
4.3.2.2. Analiza utjecaja KIR liganada HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „ligand-ligand nepodudarnost“	93
4.3.2.3. Analiza utjecaja parova receptor KIR/ligand HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „KIR-ligand nepodudarnost“	96
4.3.2.4. Analiza utjecaja genotipa KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „haplotip KIR nepodudarnost“	99
4.3.2.5. Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma.	102
5. RASPRAVA.....	1078
6. ZAKLJU AK	1234
7. POPIS LITERATURE	126
8. PRILOZI.....	1467
9. ŽIVOTOPIS	161

1. UVOD

Od prve uspješne transplantacije 1959.godine (1) do danas, iako još s brojnim rizicima i komplikacijama, transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) postala je standardna metoda liječenja velikog broja malignih i nemalignih bolesti krvotvornog sustava. Metoda TKMS radi se s osnovnom namjerom da presadak preuzme funkciju hematopoeze u primatelju kojemu je koštana srž nepopravljivo oštećena (2). Primatelj tako postaje kimer jer nakon prihvatanja presatka ima krvotvorne stanice davateljeva podrijetla (3). Uspješnost TKMS ovisna je o različitim kliničkim i genetičkim čimbenicima, a trenutno jedina imunološka barijera koja se uzima u obzir je glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigen, HLA) (4). Transplantacijska imunologija tradicionalno je usmjerena na stečenu imunost i reakcije limfocita T i B. Međutim, zadnjih dvadesetak godina intenzivnije se proučava urođena imunost. Uzrok tome je prepoznavanje njene presudne važnosti u obrani organizma, ali i veliki napredak u fenotipskoj i funkcionalnoj karakterizaciji različitih tipova stanica koje su dio urođene imunosti. Napredak u razumijevanju različitih stanica urođene imunosti odnosi se na otkrivanje i molekularnu karakterizaciju brojnih površinskih receptora koji imaju ključnu ulogu u funkciji stanica te identifikaciju gena koji kodiraju te receptore (5). Najveća pažnja usmjerena je na prirodnooblikovane stanice (stanice NK) i njihove receptore. Stanice NK dugo su smatrane homogenima, no istraživanja su pokazala njihovu raznolikost kao i to da na površini sadrže različite kombinacije receptora koji omogućuju interakciju s ostalim stanicama u tijelu i određuju jesu li te stanice zdrave ili inficirane. Pokazalo se da su stanice NK kontrolirane interakcijom receptora KIR i liganada HLA važan faktor u uspješnosti TKMS. Iako je antitumorska aktivnost stanica NK dugo poznata, tek u kasnim 90-tim započela su istraživanja utjecaja receptora KIR i njihovih liganada HLA na tijek i ishod liječenja TKMS (4). Uočeno je da stanice NK davatelja nakon TKMS smanjuju pojavu povrata bolesti kao i da uzrokuju snažan učinak presatka protiv tumora (engl. Graft-versus-Leukemia, GvL). Poznato je također da nepodudarnost receptora KIR i liganada HLA primatelja i davatelja dovodi do nastanka aloreaktivnih stanica NK koje su upravo te koje imaju pozitivan učinak na kliničke ishoda TKMS. Najznanija komplikacija liječenja TKMS i najčešći uzrok smrtnosti nakon transplantacije je pojava reakcije presatka protiv primatelja (engl. Graft-versus-Host Disease, GvHD). Prepoznato je da se radi o imunološkoj reakciji u kojoj imunokompetentni limfociti T koji se nalaze u presatku prepoznaju antigene tkivne snošljivosti predobitnih stanica kao tuđi i započnu imunološku reakciju (6). Smatra se da upravo stanice NK i njihovi receptori KIR značajno pridonose smanjenju pojave GvHD-a nakon TKMS. Klinički dokazi prikazani su kroz brojna istraživanja, ali s vrlo raznolikim i

nejedinstvenim rezultatima. Iz tog razloga, to na uloga i mehanizam djelovanja receptora KIR u TKMS još uvijek nisu sasvim jasni.

1.1. CILJ I SVRHA RADA

Svrha ovog rada je istražiti raznovrsnost gena KIR u hrvatskoj populaciji te ispitati na koji način se može primjeniti u postupcima liječenja i poboljšanju ishoda parametara TKMS. Rad se bazira na hipotezi da me udjelovanje receptora KIR davatelja i odgovaraju ih liganada HLA primatelja ima pozitivan učinak na tijek i ishod TKMS – preživljavanje, pojavu GvHD-a i postizanje punog kimerizma.

Prema našim saznanjima, nijedno istraživanje gena KIR u hrvatskoj populaciji do sada nije provedeno. Stoga je prvi cilj ovoga rada po prvi puta istražiti raznovrsnost, učestalost i neravnotežu udruživanja gena KIR na reprezentativnom uzorku hrvatske populacije (N=125) te odrediti raznovrsnost haplotipova i genotipova KIR. Nadalje, dobivene rezultate o genima KIR u hrvatskoj populaciji usporediti s rezultatima u drugim populacijama i rasama te utvrditi sličnosti, odnosno razlike.

Ova skupina ispitanika koristit će se dalje kao kontrolna skupina za istraživanje raznovrsnosti i učestalosti gena, haplotipova i genotipova KIR kod bolesnika liječenih TKMS (N=111). Nadalje, skupina od 111 bolesnika podijelit će se u dvije skupine - ispitanici liječeni TKMS od srodnog davatelja (N=55) i ispitanici liječeni TKMS od nesrodnog davatelja (N=56) nakon čega će biti provedena analiza utjecaja gena KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i postizanje punog kimerizma nakon TKMS.

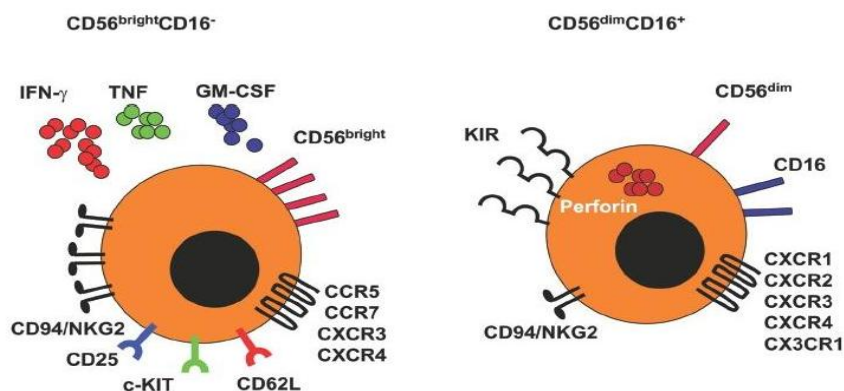
Za određivanje gena KIR koristit će se metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih primera po etnicima za određenu sekvencu DNA (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Priming, PCR-SSP) i metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih oligonukleotidnih proba (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe, PCR-SSO). Analiza učinka gena KIR na ishod TKMS provest će se prema tri postojeća modela u literaturi: „ligand-ligand nepodudarnost“, „KIR-ligand nepodudarnost“ i „haplotip KIR nepodudarnost“.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. BIOLOGIJA STANICA NK

Stanice NK prvi put su otkrivene 1975. godine u eksperimentu na *in vitro* uzgojenim leukemijskim stanicama miša (7). Uklanjanjem populacije limfocita T i B iz eksperimenta, još uvijek je postojala populacija stanica sposobna za citotoksi no ubijanje leukemijskih stanica bez prethodne senzibilizacije. Ta populacija limfocita postala je poznata kao stanice NK. Naziv NK vezan je uz njihovo funkcijsko obilježje, a potječe od engleskog naziva *natural killer*, što označuje prirodnu sposobnost stanica, to jest, označuje sposobnost stanica NK da ubiju ciljane stanice u izravnom dodiru, bez prethodne senzibilizacije (2).

Stanice NK su bijele krvne stanice, populacija granularnih limfocita koji primarno nastaju u koštanoj srži i dijele zajedničku progenitorsku stanicu s limfocitima T (8). Za sazrijevanje zahtijevaju mikrookolinu koštane srži koja je glavni izvor citokina koji omogućuju diferencijaciju i izvor stromalnih stanica koje sudjeluju u sazrijevanju stanica NK (9, 10). Iako se dugo smatralo da stanice NK nastaju samo u koštanoj srži, danas se zna da tamo započinje njihova inicijalna faza razvoja u CD34⁺ stanice, a daljnja diferencijacija i sazrijevanje događaju se u limfnim prostorima i tonzilama (11). Nalaze se u svim perifernim limfnim organima, slezeni, a u krvi čine oko 5-20% od svih cirkulirajućih limfocita. U znatno većem postotku zastupljene su u jetri (50%) te placenti za vrijeme trudnoće gdje imaju posebnu ulogu. Stanice NK pojavljuju se vrlo rano tijekom ontogeneze i u fetusu se otkrivaju već u osmom tjednu gestacije (12).



Slika 1. Podjela humanih stanica NK u dvije osnovne subpopulacije na temelju gustoće površinskog staninog antigena CD56 i CD16. CD56^{bright}CD16⁻ - sadrže malu količinu receptora CD16 i proizvode veliku količinu citokina (IFN- γ , TNF, GM-CSF); CD56^{dim}CD16⁺ - citotoksične stanice koje liziraju ciljane stanice i sadrže veliku količinu CD16 receptora. To su ujedno i stanice koje ispoljavaju receptore KIR na svojoj površini. (Slika preuzeta iz reference 14)

Stanice NK se fenotipski razlikuju od drugih limfocita prema prisutnosti površinskog stani nog antigena CD56 (neuralna adhezijska molekula N-CAM), a u odsutnosti površinskog stani nog antigena CD3 (2, 9, 13). Definirane su dvije različite subpopulacije stanica NK na temelju gustoće površinskog stani nog antigena CD56 i CD16 (slika 1). Većina stanica NK (90%) su CD56^{dim} i sadrže veliku količinu receptora CD16 (CD16⁺), dok je manji dio (10%) CD56^{bright} i CD16⁻ (14). Te dvije subpopulacije stanica NK funkcionalno su različite: CD56^{bright} su imunoregulatorne stanice koje proizvode veliku količinu citokina, dok su CD56^{dim} citotoksične stanice čija je osnovna funkcija liziranje ciljnih stanica.

2.1.1. FUNKCIJA STANICA NK

Stanice NK čine prvu crtu obrane protiv virusnih, bakterijskih i parazitskih infekcija, a ujedno su i važna poveznica za aktivaciju specifične imunosti (15). Imaju utjecaj na odbacivanje ili prihvatanje alogenog tkiva kod TKMS kao i sposobnost liziranja tumorskih stanica bez prepoznavanja specifičnog antigena te se zbog toga očekuje potencijalno veliki značaj u klinici koja imunoterapiji tumora (9, 16). Funkcija i način djelovanja stanica NK su različiti:

1) Direktna stanica na citotoksičnost

Stanice NK svoju ciljnu stanicu prepoznaju i liziraju u vrlo kratkom vremenu (nekoliko sati), za razliku od limfocita T kojima za sazrijevanje i razvoj u inkovitog citotoksičnog djelovanja treba i nekoliko dana. Razlog je taj što stanice NK u krvi cirkuliraju u stanju djelomične aktiviranosti i mogu odmah odgovoriti na infekciju (17). Međudjelovanje receptora na površini stanice NK s proteinima na površini ciljne stanice sudjeluje u procesima aktivacije stanica NK tj. u „donošenju odluke“ treba li ubiti ciljnu stanicu (18). U kontaktu stanice NK sa zdravom ciljnom stanicom prevladavaju inhibicijski signali zbog čega ne dolazi do procesa širenja stanice NK preko površine ciljne stanice i u konačnici ne dolazi do liziranja ciljne stanice. Ukoliko je ciljna stanica bolesna ili kancerogena, kontaktira s velikim brojem aktivatora na površini stanice NK koja se onda počinje širiti preko cijele ciljne stanice i neprestano "lupa" aktivacijske i inhibicijske signale s kontaktne površine. U slučaju dominacije aktivacijskog signala, stanica NK produžuje vrijeme kontakta i u konačnici ubija ciljnu stanicu. Lizirajuća stanica posreduje topljivi limfocitni – perforin, koji se luči iz granula citoplazme stanica NK u prostor između stanica. Perforin nakon oslobađanja stvara transmembranske pore u membrani napadnute stanice čime je omogućeno ubacivanje sadržaja

lizosoma u napadnutu stanicu (kaspaze, inhibitor nekroze tumora alfa (TNF- α), limfotoksin, granzimi) što uzrokuje programiranu staničnu smrt (apoptozu).

2) Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

Stanice NK imaju važnu ulogu u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima - ADCC (engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) (2). U tom procesu, da bi se ciljane stanice razorile, moraju se prvo obložiti specifičnim protutijelima. Efektorske stanice preko svojih receptora za ulomak Fc-protutijela prepoznaju i razaraju ciljane stanice koje su prethodno obložene specifičnim protutijelima. Stanice NK prepoznaju ulomak Fc-protutijela pomoću receptora Fc γ RIII (CD16), nakon čega se aktivacijski signal prenosi u stanicu NK gdje se potiču efektivne funkcije, kao što su liza i stvaranje citokina.

3) Sekrecija citokina

Važna funkcija stanica NK je proizvodnja niza imunoregulatornih citokina kao što su interferon- γ (IFN- γ), različiti interleukini, inhibitor tumorske nekroze- α (TNF- α), inhibitor poticanja rasta kolonija granulocitnih makrofaga (GM-CSF), transformirajući inhibitor rasta (TGF- β) (9, 19) i drugi. Proizvodnja IFN- γ u stanicama NK pokazala se kao ključna za uspješno uklanjanje i virusnih i bakterijskih infekcija. Citokini imaju važnu ulogu u aktivaciji stanica NK jer signaliziraju prisutnost patogena u stanici.

4) Regulatorna funkcija

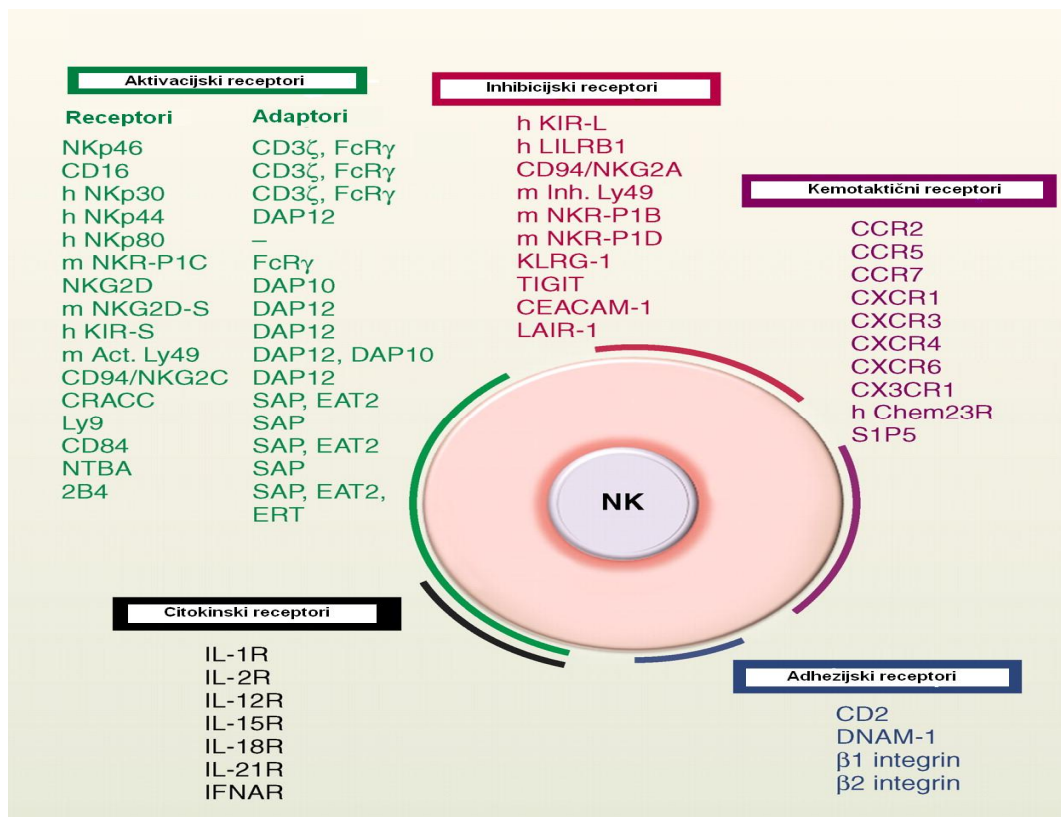
Osim navedenih efektivnih funkcija stanica NK, one imaju i regulatornu funkciju. Stanice NK interagiraju s dendritičkim stanicama (antigen-predstavljajuće stanice) ovisno o potrebi aktivacije stečene imunosti. Većinu infekcija urođena imunost uspijeva sama riješiti, bez potrebe aktiviranja stečene imunosti. U slučajevima nedostatnosti urođene imunosti, dendritičke stanice migriraju s mjesta infekcije u sekundarna limfna tkiva gdje aktiviraju stanice stečene imunosti - limfocite T i limfocite B. Interakcija stanica NK s dendritičkim stanicama u *in vitro* uvjetima može dovesti do nekoliko različitih ishoda: aktivacije stanica NK, aktivacije dendritičkih stanica ili ubijanja dendritičkih stanica stanicama NK. Ono što se vjerojatno događa u organizmu (*in vivo*) tijekom svladavanja infekcije, je da stanice NK ubijaju dendritičke stanice sprječavajući i njihovu migraciju i aktivaciju stečene imunosti. U suprotnom, kada urođena imunost ne uspijeva savladati infekciju, stanice NK potiču sazrijevanje dendritičkih stanica i njihovu migraciju u limfna tkiva u kojima aktiviraju stečenu imunost (17).

Stanice NK važni su faktori i u trudno i (20). One su prevladavaju i limfociti u decidui tijekom prvog i drugog tromjese ja. Smatra se da je važnost u njihovom izlu ivanju IFN- koji utje e na pregradnju krvnih žila i tkiva maternice prilikom implantacije i razvijanja ploda u trudno i.

Podru je intenzivnih znanstvenih istraživanja u zadnje vrijeme je uloga aloreaktivnih stanica NK u transplantaciji koštane srži. Ova uloga stanica NK biti e detaljnije obra ena u ovom radu.

2.1.2. RECEPTORI STANICA NK

Karakteristika stanica NK veliki je broj i raznolikost receptora na površini stanice (slika 2). Za razliku od limfocita T i B, stanice NK nemaju specifi ne klonotipske receptore za prepoznavanje antigena, ali imaju sposobnost prepoznavanja vlastitih klasi nih i neklasi nih molekula HLA razreda I pomo u jedinstvenih stani nih receptora koji mogu inhibirati ili aktivirati stanicu NK (2, 17).



Slika 2. Receptori prirodnoobila kih stanica (stanice NK). (Slika preuzeta iz reference 25)

Stanice NK izražavaju različite kombinacije receptora na svojoj staničnoj membrani koji se strukturno mogu podijeliti u dvije glavne skupine (10):

- 1) Tip 1 – integralni membranski proteini s imunoglobulinskim (Ig) domenama
- 2) Tip 2 – integralni membranski proteini s lektinskim domenama

Efektivna funkcija svakog receptora određena je građom transmembranske regije i citoplazmatskog repa. Općenito, inhibicijski receptori u citoplazmatskom repu sadrže sekvencu ITIM (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) koja smanjuje i blokira aktivaciju stanica NK. Aktivacijski receptori pak nemaju ITIM sekvencu, već se vežu za molekule adaptore koje imaju sekvenciju ITAM (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) što dovodi do aktivacije stanica NK.

2.1.2.1. INTEGRALNI MEMBRANSKI PROTEINI S IMUNOGLOBULINSKIM (IG) DOMENAMA – IMUNOGLOBULINSKA SUPERPORODICA (IgSF)

Glavni receptori stanica NK u ljudi pripadaju skupini receptora s imunoglobulinskim domenama, a kodirani su genima smještenim na kromosomu 19q13.4 unutar sustava leukocitnih receptora (engl. leukocyte receptor complex, LRC). Od ukupno 45 gena regije LRC, 30 ih se može grupirati u nekoliko porodica na temelju genske organizacije, filogenije i strukture (21). Dvije glavne porodice su: receptori prirodno ubijajućih stanica slični imunoglobulinu - KIR (engl. killer cell immunoglobulin-like receptor) i leukocitni receptori slični imunoglobulinu - LILR (engl. leukocyte immunoglobulin like receptor). Ovoj IgSF-skupini još pripada porodica leukocitno-vezanih inhibicijskih receptora – LAIR (engl. leukocyte-associated inhibitory receptor), Fc γ R i prirodno-citotoksični receptor NKp46.

2.1.2.2. INTEGRALNI MEMBRANSKI PROTEINI S LEKTINSKIM DOMENAMA

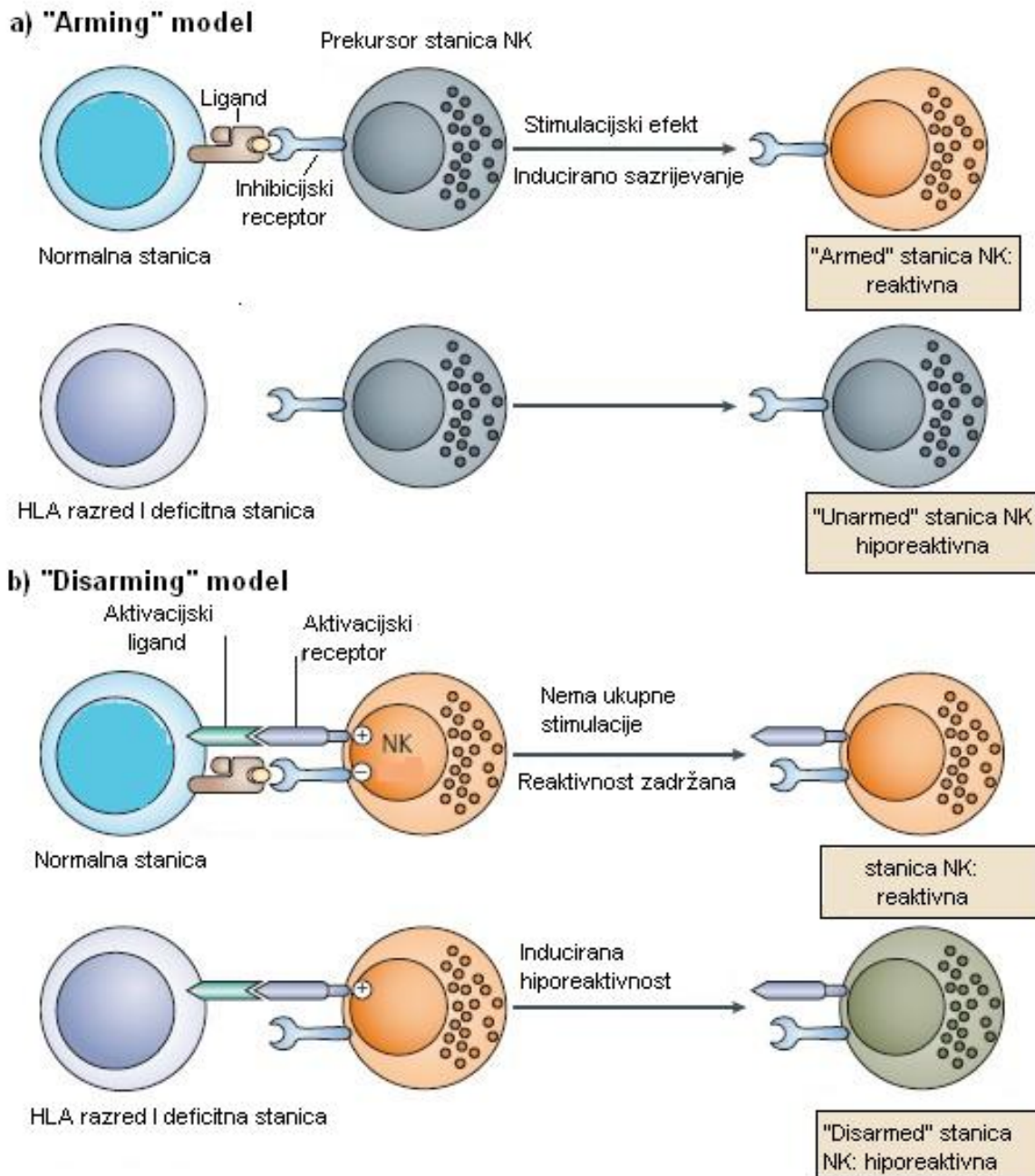
Druga glavna skupina receptora stanica NK kodirana je genima sustava NKC (engl. natural killer complex) smještenog na kromosomu 12p13.1 koji kodiraju integralne membranske proteine s izvanstaničnim domenama nalik C-tipu lektina (21). Geni sustava NKC imaju sličnu genomsku strukturu i organizirani su u nekoliko porodica. Kod ljudi, najznanija je porodica NKG2 (prema novoj nomenklaturi KLR porodica – killer cell lectine-like receptor (subfamily C and K); www.genenames.org) koju čine geni NKG2A/NKG2B, NKG2C, NKG2E/NKG2H, NKG2F i NKG2D. Receptori se na stanici izražavaju kao heterodimeri sastavljeni od molekule CD94 (KLRD1) kovalentno vezane

disulfidnom vezom na glikoproteinske lance kodirane genima porodice NKG2 (osim lanca NKG2D). Receptor CD94/NKG2A ima inhibicijski u inak dok ostali receptori imaju aktivacijski u inak. Ligandi ovih receptora su molekule HLA-E, neklaasi ne molekule HLA razreda I (9). Ovoj skupini receptora pripadaju još dvije porodice gena: porodica Ly49 u kojoj je kod ljudi prisutan samo gen KLRA1 (poznat i kao Ly49L) i porodica KLRB u ljudi tako er s prisutnim samo jednim genom - KLRB1A (ili NKRP1A) (21).

2.1.3. EDUKACIJA STANICA NK

Funkcija stanica NK kontrolirana je inhibicijskim i aktivacijskim receptorima na površini stanice koji najvećim dijelom prepoznaju vlastite molekule HLA razreda I. Za razliku od limfocita T i B za njihovu aktivaciju je dovoljna jedna veza antigen – receptor, specifičnost stanice NK za ciljnu stanicu određena je spektrom aktivacijskih i inhibicijskih receptora izraženih na površini svake stanice NK. To znači da aktivacija stanica NK ovisi o kombinaciji liganada na ciljnoj stanici i o vrsti prisutnih aktivacijskih i inhibicijskih receptora na stanici NK specifičnih za te ligande (22). Kada stanica NK veže jednom svoj ligand, stvara aktivacijski ili inhibicijski signal, ovisno o omjeru svojih inhibicijskih i aktivacijskih receptora na površini. U normalnom fiziološkom stanju, broj inhibicijskih receptora kao i njihovih liganada bude uglavnom uvijek veći od omjera aktivacijskih receptora i njihovih liganada, čime se sprječava uništavanje vlastitih zdravih stanica. Zbog toga se dugo vremena smatralo da stanice NK moraju uvijek imati izražen barem jedan inhibicijski receptor koji prepoznaje vlastite molekule HLA. Međutim, otkrićem stanica NK koje nemaju inhibicijske receptore (CD56^{dim} NKG2A⁻KIR⁻) hipoteza se pokazala netočno te se započelo s istraživanjima mehanizama koji omogućavaju stanicama NK ispravno razlikovanje vlastitih zdravih stanica od transformiranih stanica (23, 24). Postoji nekoliko različitih modela nastanka tolerancije stanica NK na vlastito, ali danas se najvjerojatnijim smatra tzv. „arming and licensing“ odnosno „disarming and unlicensing“ model (slika 3) (22). Kod „arming“ modela, interakcija nezrelih stanica NK u koštanoj srži i molekula HLA razreda I na okolnim vlastitim zdravim stanicama stvara pozitivan signal za funkcionalno sazrijevanje („arming“) stanica NK i „dozvolu“ za ubijanje stanica koje nemaju izražene molekule HLA. Stanice NK koje nemaju interakciju s molekulama HLA razreda I ostaju inaktivne i ne mogu napasti ciljnu stanicu. Kod „disarming“ modela, samo one stanice NK koje imaju uravnotežen omjer aktivacijskih i inhibicijskih receptora prilikom sazrijevanja, zadržavaju mogućnost

reaktivnosti, sve ostale su „disarmed“ i ostaju hiporeaktivne. Nadalje, sa sigurnoš u se zna da promjena reaktivnosti stanice NK ne mijenja ispoljavanje stani nih receptora (25).



Slika 3. Usporedba „arming“ i „disarming“ modela edukacije stanica NK. a) „arming“ model - interakcija molekule HLA razreda I (ligand) i receptora na prekursorskoj stanici NK stvara pozitivan signal za sazrijevanje stanice NK. Stanica koja nema interakciju s molekulom HLA razreda I ostaje hiporeaktivna. b) „disarming“ model - stanice NK izražavaju mnogo aktivacijskih i inhibicijskih receptora, ali samo one koje imaju uravnotežen omjer tih receptora postaju reaktivne. Ostale stanice kod kojih postoji neravnoteža signala ostaju hiporeaktivne. (Slika preuzeta iz reference 22)

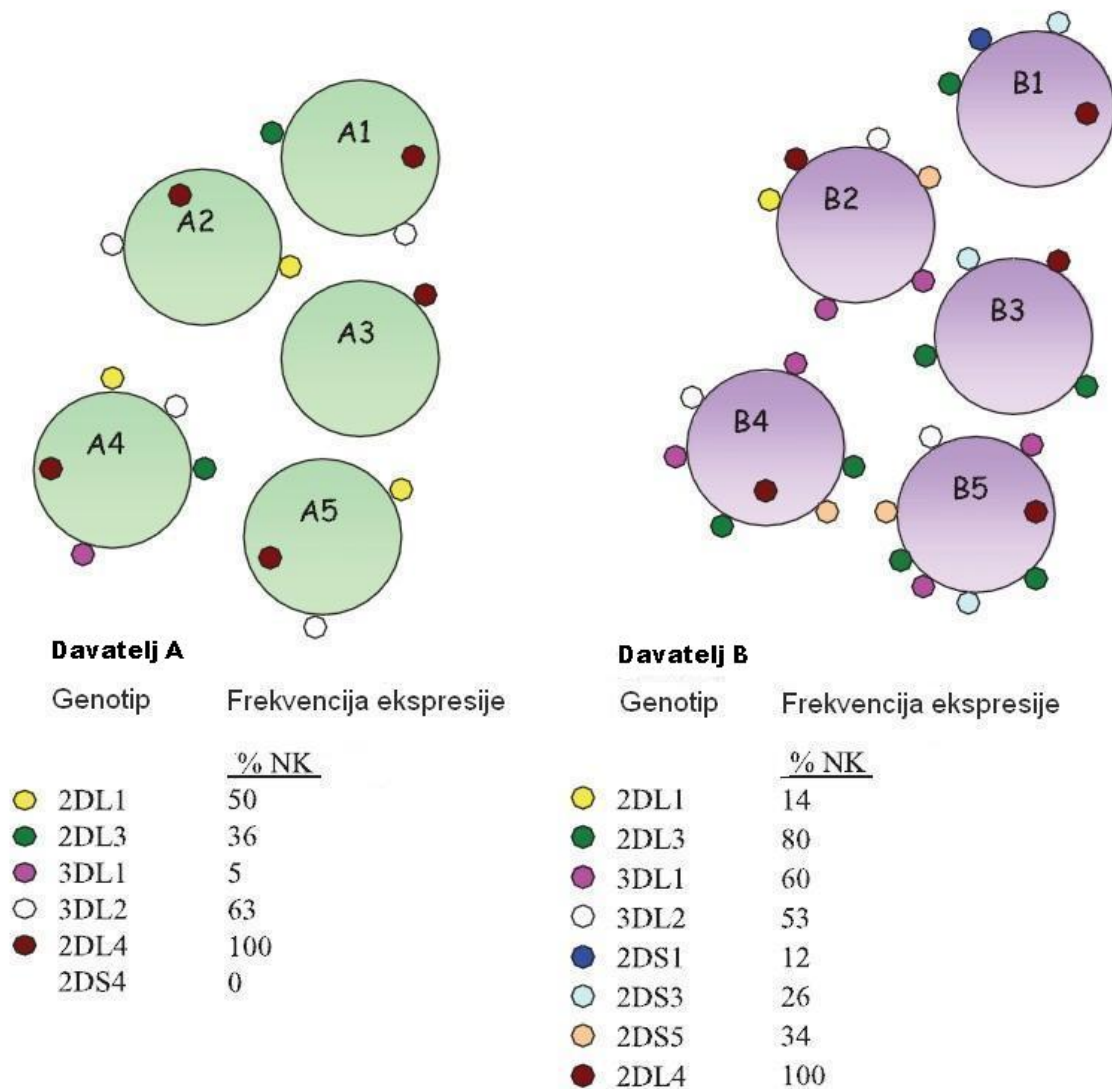
Kod zdravih ljudi, subpopulacija stanica NK CD56^{dim} NKG2A⁻KIR⁻ ini 20% od ukupnih stanica NK u perifernoj krvi (26). Studija je pokazala da su ove stanice hiporeaktivne prema stanicama koje nemaju izražene molekule HLA razreda I te da su one zapravo razvojno nezrele stanice.

2.2. RECEPTORI PRIRODNOUBILA KIH STANICA SLI NI IMUNOGLOBULINU - KIR

Receptori KIR transmembranski su glikoproteini tipa I i pripadaju imunoglobulinskoj superporodici (IgSF). Originalno pronađeni na stanicama NK, nalaze se i na manjoj subpopulaciji T stanica (CD4⁺CD28⁻ citotoksične T stanice) (27). Receptori KIR u pravilu funkcioniraju kao membranski stanici receptori, ali neki (KIR2DS4 i KIR2DL4) postoje i u solubilnoj formi kao posljedica nastanka preranog stop kodona u samom genu (15). Receptor KIR2DL4 može ponekad biti ispoljen na površini stanice, ali dominantno postoji u solubilnoj formi u endosomu unutar stanice. Solubilna forma receptora KIR2DS4 nema transmembransku i citoplazmatsku regiju i nefunkcionalna je, a kodira je gen *KIR2DS4* (*KIR2DS4*003*) s delecijom 22pb dugog fragmenta u egzonu 5 što za posljedicu ima pomak u okviru itanja (28). Geni KIR na stanicama NK ispoljavaju se nasumično pa osoba može imati klonove stanica NK s različitim kombinacijama receptora KIR (slika 4) (23, 29). Svaki klon stanica NK ispoljava samo dio gena KIR od cjelokupnog broja gena KIR prisutnih u genomu jedne osobe. Izuzetak je gen *KIR2DL4* koji je ispoljen na svim stanicama NK. Jedna od važnih karakteristika regije KIR je prisutnost i različiti broj kopija pojedinačnih gena unutar genotipa KIR osobe. Za sada nije dokazano da broj kopija gena KIR u genotipu utječe na edukaciju i zastupljenost receptora KIR na stanicama NK (30).

Stanice NK u svom razvoju najprije ispoljavaju receptore CD94/NKG2A, a transkripcija i ispoljavanje gena KIR započinje tek u kasnoj fazi razvoja stanica NK (31). Kada stanice NK tijekom razvoja ustale uzorak ispoljavanja gena KIR, on ostaje nepromijenjen tijekom stanici dioba. Transkripcija gena KIR kontrolirana je na razini cijelog lokusa KIR organiziranog pomoću gena okvira itanja, pri čemu se gen *KIR2DL4*, kao centralni gen okvira itanja, prvi prepisuje, a potom slijede ostali geni KIR (32). Kontrola ispoljavanja gena KIR djelomično je određena metilacijom DNA. Intergenske regije koje sadrže promotore su male (~2kb) i visoko homologne. Ispoljeni geni KIR imaju hipometilirane promotore, dok su promotori utišanih gena hipermetilirani (33). Sve stanice

NK ispoljavaju receptore KIR2DL4, odre en broj njih KIR3DL2, a samo mali dio ispoljava gene okvira itanja KIR3DL3. Razlog su varijacije sekvenci promotora koje utje u na afinitet vezanja transkripcijskih faktora. Faktori koji reguliraju ovakav jedinstveni na in ispoljavanja gena kod ljudi još nisu u potpunosti jasni. Smatra se da je tolerancija glavna pokreta ka sila, a molekule HLA razreda I, kao ligandi, glavni faktori edukacije stanica NK.



Slika 4. Klonalno ispoljavanje receptora KIR na stanicama NK. Prikazane su stanice NK osobe A (A1-A5) i osobe B (B1-B5) s razli itim uzorcima ispoljenih receptora KIR. Osoba A ima jednostavan genotip KIR i ispoljene samo inhibicijske receptore. Nasuprot tome, osoba B ima više gena i ispoljene inhibicijske i aktivacijske receptore u razli itim kombinacijama. Frekvencija stanica NK koje imaju izražene pojedina ne gene KIR zna ajno varira. Na primjer, gen KIR2DL1 kod osobe A izražen je na 50% stanica NK dok je kod osobe B izražen na samo 14% stanica NK. (Slika preuzeta iz reference 23)

2.2.1. STRUKTURA RECEPTORA KIR

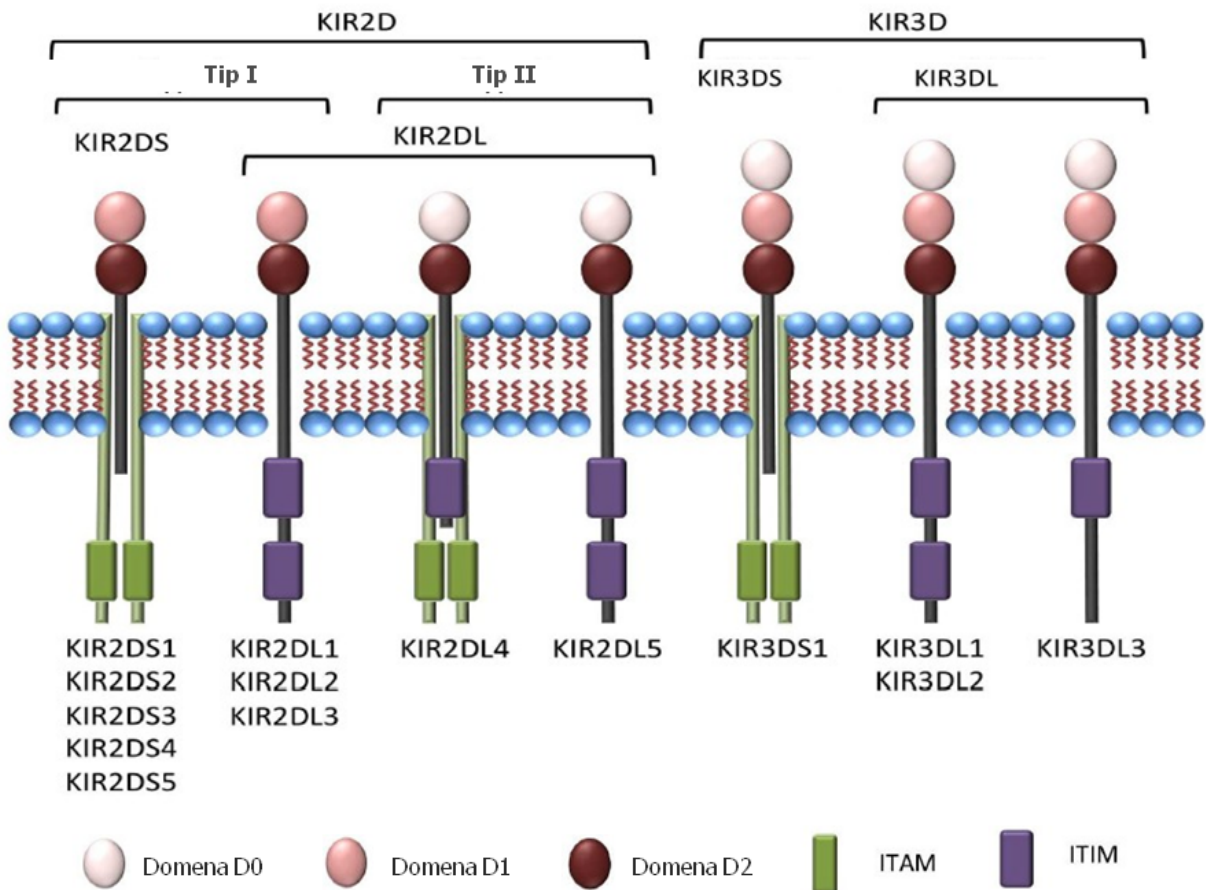
Osnovna građa proteina KIR sastoji se od tri regije: izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske (slika 5). Svaka od njih ima određene karakteristike bitne za funkciju receptora.

2.2.1.1. Izvanstanična regija

Izvanstanična regija sastoji se od dvije ili tri imunoglobulinske domene koje postoje u tri različite strukture, D0, D1 i D2, ovisno o tipu receptora KIR. Receptori tipa KIR3D sadrže sve tri imunoglobulinske domene – D0 udaljeno od membrane, D1 u sredini i D2 bliže membrani. Receptori tipa KIR2D postoje u dvije različite skupine od kojih jedna ima dvije imunoglobulinske domene: D1 i D2, dok druga skupina ima imunoglobulinske domene: D0 i D2, što je posljedica razlike u strukturi gena za ove receptore. Izvanstanična regija odgovorna je za prepoznavanje i vezanje liganada. Kristalna struktura gena KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3 pokazala je da su domene D1 i D2 međusobno položene u V-obliku te da kut koji formiraju značajno varira među ovim KIR receptorima ($66^\circ - 81^\circ$) što utječe na afinitet receptora za vezanje liganada (34).

2.2.1.2. Transmembranska regija

Velike 20-tak aminokiselina, transmembranska regija prvi je faktor odgovoran za stvaranje aktivacijskog ili inhibicijskog signala u stanici NK. Svi aktivacijski receptori KIR u ovoj regiji sadrže bazične aminokiseline koje su kritične za vezanje adaptorskih molekula DAP12 ili FcRI-2 koje ITAM-sekvence u suradnji s citoplazmatskom domenom tvore aktivacijski signal. Položaj i vrsta bazičnih aminokiselina razlikuje se između subgrupa aktivacijskih receptora KIR i određuje njihove međusobne specifičnosti. Iako postoje raznovrsne substitucije transmembranskih aminokiselina kod nekih alela KIR, to su obično konzervativne substitucije sličnih hidrofobnih aminokiselina. U svakom slučaju, bazične aminokiseline receptora KIR odgovarajućim aminokiselinama u pomoćnom proteinu međusobno komplementiraju i osiguravaju membransku stabilnost i ispoljavanje na površini stanice. Transmembranska regija inhibicijskih receptora sadrži aminokiseline koje su prilično konzervirane, a dokazano je da čak i najmanja promjena u aminokiselinskim skupinama može utjecati na inhibicijsku funkciju receptora (34).



Legenda: ITAM - engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; ITIM - engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; KIR - receptori prirodnoobitavajih stanica sli ni imunoglobulinu (engl. killer cell immunoglobuline like receptor)

Slika 5. Shematski prikaz strukture proteina KIR i njihove glavne strukturne razlike.

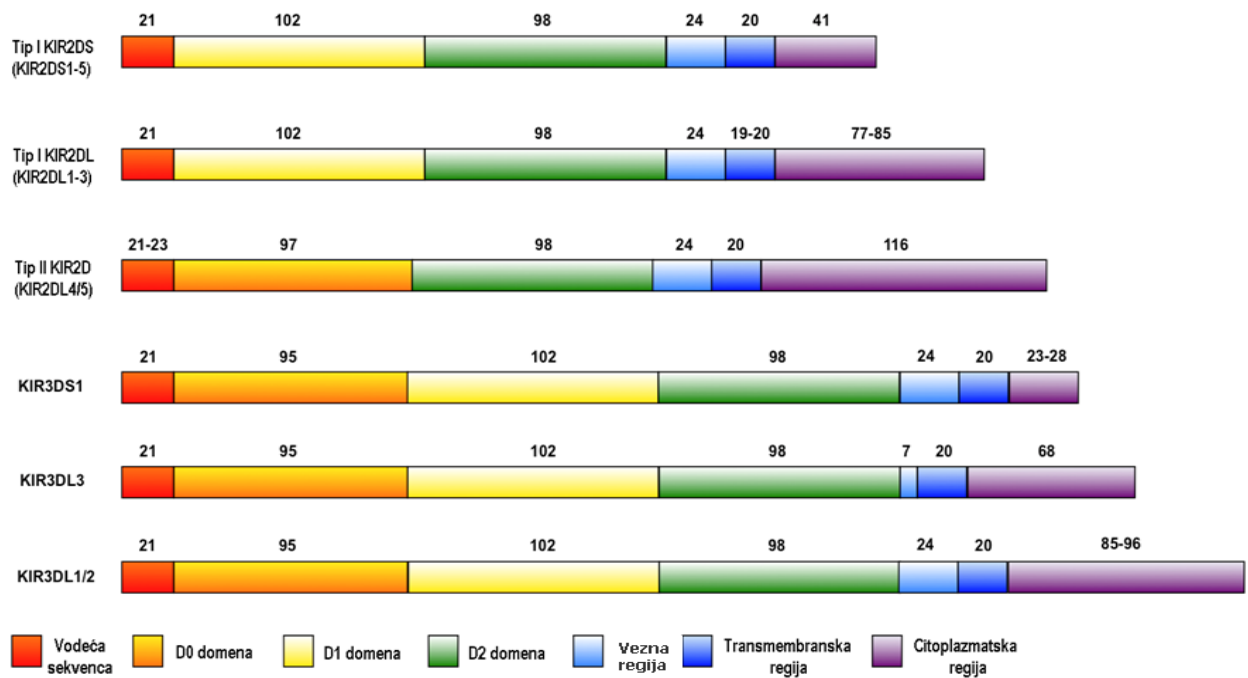
Imunoglobulinske domene prikazane su bijelim, rožim i sme im krugovima. Receptori s aktivacijskom funkcijom i njihove ITAM-sekvence prikazani su zelenom bojom, dok su inhibicijski receptori i njihove ITIM-sekvence prikazani ljubi astom bojom. (Slika preuzeta iz reference 35)

2.2.1.3. Citoplazmatska regija

Dužina citoplazmatske regije glavni je i odgovorni faktor za vrstu signala koji e receptor stvarati u stanici NK. Receptori KIR s dugom citoplazmatskom regijom stvaraju inhibicijski signal, dok oni s kratkom citoplazmatskom regijom stvaraju aktivacijski signal. Dužina citoplazmatske regije inhibicijskih receptora varira, ali uvijek sadrži jednu ili dvije ITIM-sekvence koje su neophodne za inhibicijsku funkciju (36). Prilikom vezanja liganda HLA razreda I, tirozin u ITIM-sekvenci fosforilizira se kinazama familije Src ime se privla e inhibicijske fosfataze SHP-1 i SHP-2. Vezanje fosfataza ko i signalne puteve koji bi doveli

do aktivacije stanice NK. U suprotnom slučaju, defosforilizacija tirozina dovodi do stvaranja aktivacijskog signala. Kod aktivacijskih receptora, citoplazmatska regija završava prije prve ITIM-sekvence pa receptori s takvom kratkom citoplazmatskom regijom nemaju ITIM-sekvencu. Oni umjesto toga imaju pozitivno nabijeni lizinski ostatak u transmembranskoj regiji na koji se vežu adaptorske molekule DAP-12. Molekula DAP-12 fosforilira se na ITAM-sekvencama i privlači tirozin-kinaze koje defosforilizacijom tirozina ostvaruju aktivacijski signal (2).

Veličina proteina KIR varira i može sadržavati 306-456 aminokiselina (37). Razlika ovisi prvenstveno o broju prisutnih Ig-domena (dvije ili tri) i dužini citoplazmatske regije (slika 6). Vodeći peptid ima 21 aminokiselinu osim proteina KIR2DL4 koji je veći i ima 23 aminokiseline. Najkraća Ig-domena je D0 veći i ima 96 aminokiselina, D1 je najduža sa 102 aminokiseline i D2 je dužine 98 aminokiselina. Ig-domene veznim dijelom veći i ima 24 aminokiseline (ili 7 aminokiselina kod proteina KIR3DL3) povezane su s 20 aminokiselina dugom transmembranskom regijom (kod proteina KIR2DL1/2 19 aminokiselina). Najveća varijacija u veličini pokazuje citoplazmatska regija s rasponom od 23-96 aminokiselina.

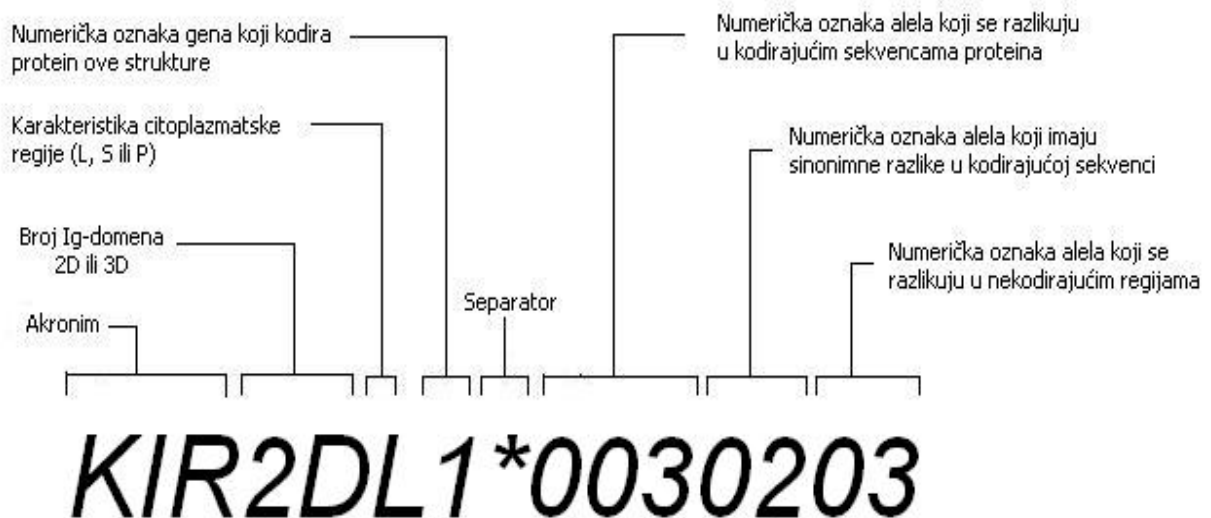


Slika 6. Strukturne regije proteina KIR i njihove prosječne dužine. (Slika preuzeta iz reference 37, www.ebi.ac.uk/ipd/kir/)

2.2.2. NAZIVLJE GENA KIR

Na simpoziju Svjetske zdravstvene organizacije - WHO (engl. World Health Organization) održanom u Kanadi 2002. godine, Povjerenstvo za nazivlje sustava HLA (engl. Nomenclature Committee for Factors of the HLA System) predložilo je osnivanje Povjerenstva za standardizaciju nazivlja gena KIR (38). Tako je osnovan i za imenovanje gena KIR postao odgovoran HUGO Genome Nomenclature Committee (HGNC) (www.genenames.org) koji je definirao i imenovao 17 gena KIR prikazanih u tablici 1.

Nazivlje gena KIR bazira se na strukturi molekula koje kodiraju ti geni (slika 7). Ime započinje akronimom KIR koji označava pripadnost skupini. Iza akronima slijede oznake 2D ili 3D što označava broj Ig-domena u izvanstaničnoj regiji. U nastavku slijedi oznaka L/S/P koja označava dužinu citoplazmatske regije – L (engl. long) za receptore s dugom citoplazmatskom domenom; S (engl. short) za receptore s kratkom citoplazmatskom domenom i P za pseudogene. Zadnja znamenka predstavlja numeričku oznaku gena koji kodira protein te strukture. I geni i proteini tako imaju istu oznaku, s tim da, u skladu sa standardima genskog nazivlja, ime gena i alela piše se ukošenim oblikom pisanja (*italic*), a ime proteina normalnim oblikom pisanja.



Slika 7. Primjer značenja imena gena KIR

Tablica 1. Nazivlje gena i proteina KIR prema HUGO Genome Nomenclature Committee (HGNC) (www.genenames.org)

Oznaka gena	Oznaka proteina	Opis
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 1
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 2
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 3
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 4
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 5A
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, dugi citoplazmatski rep, 5B
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, kratki citoplazmatski rep, 1
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, kratki citoplazmatski rep, 2
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, kratki citoplazmatski rep, 3
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, kratki citoplazmatski rep, 4
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, kratki citoplazmatski rep, 5
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, dvije domene, pseudogen 1
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, tri domene, dugi citoplazmatski rep, 1
<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, tri domene, dugi citoplazmatski rep, 2
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, tri domene, dugi citoplazmatski rep, 3
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, tri domene, kratki citoplazmatski rep, 1
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	Receptor prirodnoubilačkih stanica sličan imunoglobulinu, tri domene, pseudogen 1

Aleli se označavaju tako da nakon imena gena slijedi separator (*) za daljnjih sedam numeričkih znamenki koje predstavljaju razlike u sekvencama kodirajućim i nekodirajućim regijama u alelima (slika 7).

Prijedlog nazivanja haplotipova bazira se na sastavu gena KIR. Ime bi započinjalo oznakom 'KH-' nakon čega bi slijedila troznamenka numerička oznaka haplotipa te na kraju slovo A ili B, što bi označavalo osnovni haplotip (primjer: KH-001A ili KH-022B). Kako bi oznaka haplotipa bila još informativnija, prijedlog je da se u nastavku ispiše binarni niz od 17 znamenki (primjer: KH-001A-11100010011011011) koji bi označavao prisutnost (1) odnosno odsutnost (0) svakog poznatog gena KIR u haplotipu. Redoslijed gena u haplotipu odgovarao bi redoslijedu gena u genomu.

Prijedlog je da se isti način nazivanja primjeni i za genotip KIR. Oznaka genotipa započinjala bi oznakom 'KG-' nakon čega bi slijedio četveroznamenasti broj te binarni niz od 17 znamenki analogan onom u haplotipu (primjer: KG-0202-1110101101101111). Ovakav način označavanja haplotipova i genotipova KIR još nije implementiran u primjenu.

U suradnji s Europskim institutom za bioinformatiku stvorena je KIR baza podataka sa svim nukleotidnim i proteinskim sekvencama za sve otkrivene alele KIR, Immuno Polymorphism Database – IPD (37). Do danas, 678 nukleotidnih sekvenci gena KIR koje kodiraju 343 različita proteina KIR pohranjeno je u bazu podataka IPD-KIR (verzija 2.5.0, listopad 2013.), centralnu bazu za sekvence gena KIR kod ljudi (tablica 2). Baza IPD-KIR dostupna je na stranici www.ebi.ac.uk/ipd/kir/.

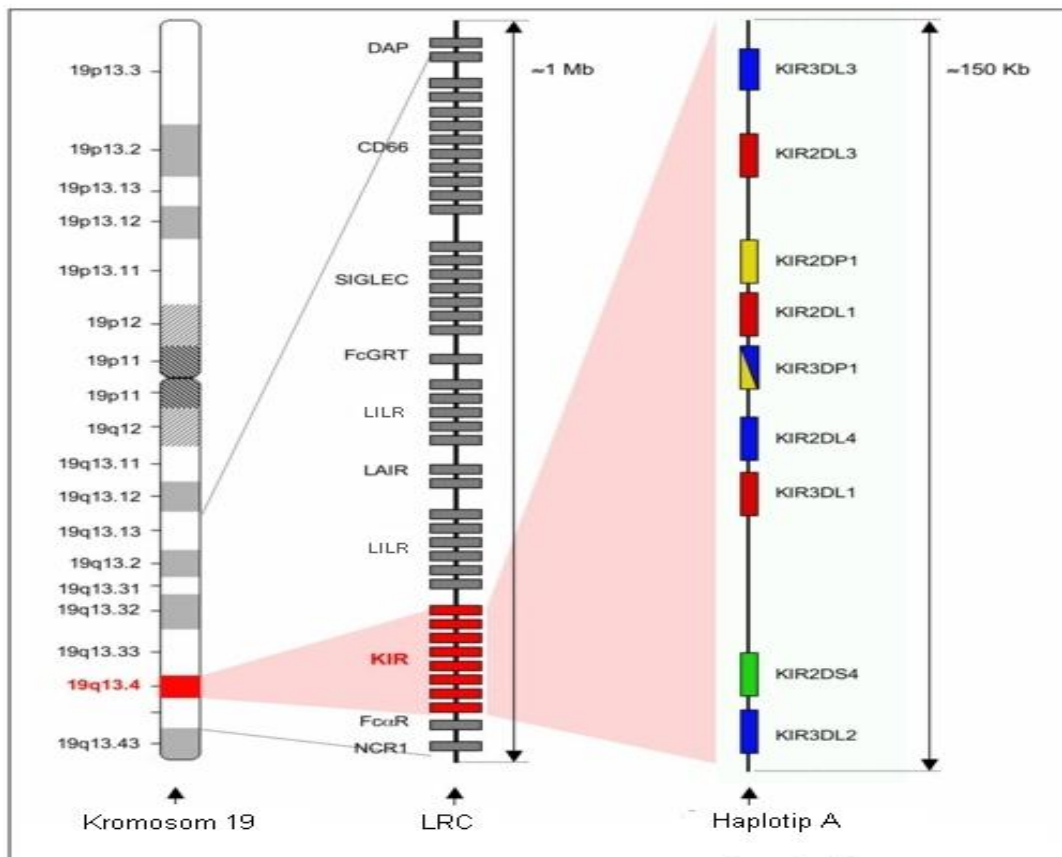
Tablica 2. Broj i karakteristike alela KIR

Aleli KIR								
Ukupan broj alela KIR								678
Geni	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Aleli	44	29	44	51	43	15	22	15
Proteini	24	12	23	27	18	7	8	6
Nul aleli	2	0	1	0	0	0	0	1
Geni	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Aleli	30	18	92	16	86	108	28	27
Proteini	13	12	62	13	62	56	0	0
Nul aleli	0	0	1	1	1	0	0	0

Precizan broj gena KIR dugo nije bio određen zbog postojanja pseudogena i zbog toga što neki geni koji su smatrani zasebnima to zapravo nisu bili, već se radilo o alelima istog gena. U bazi IPD-KIR unutar ove regije opisuje se 15 gena KIR i 2 pseudogena KIR. Međutim, najnovije spoznaje pokazuju da postoji 13 gena i dva pseudogena KIR pri čemu su geni *KIR2DL2* i *KIR2DL3* te geni *KIR3DL1* i *KIR3DS1* (prikazani u tablici 1 i 2 kao zasebni geni) zapravo aleli gena *KIR2DL2L3* odnosno *KIR3DL1S1* (39, 40).

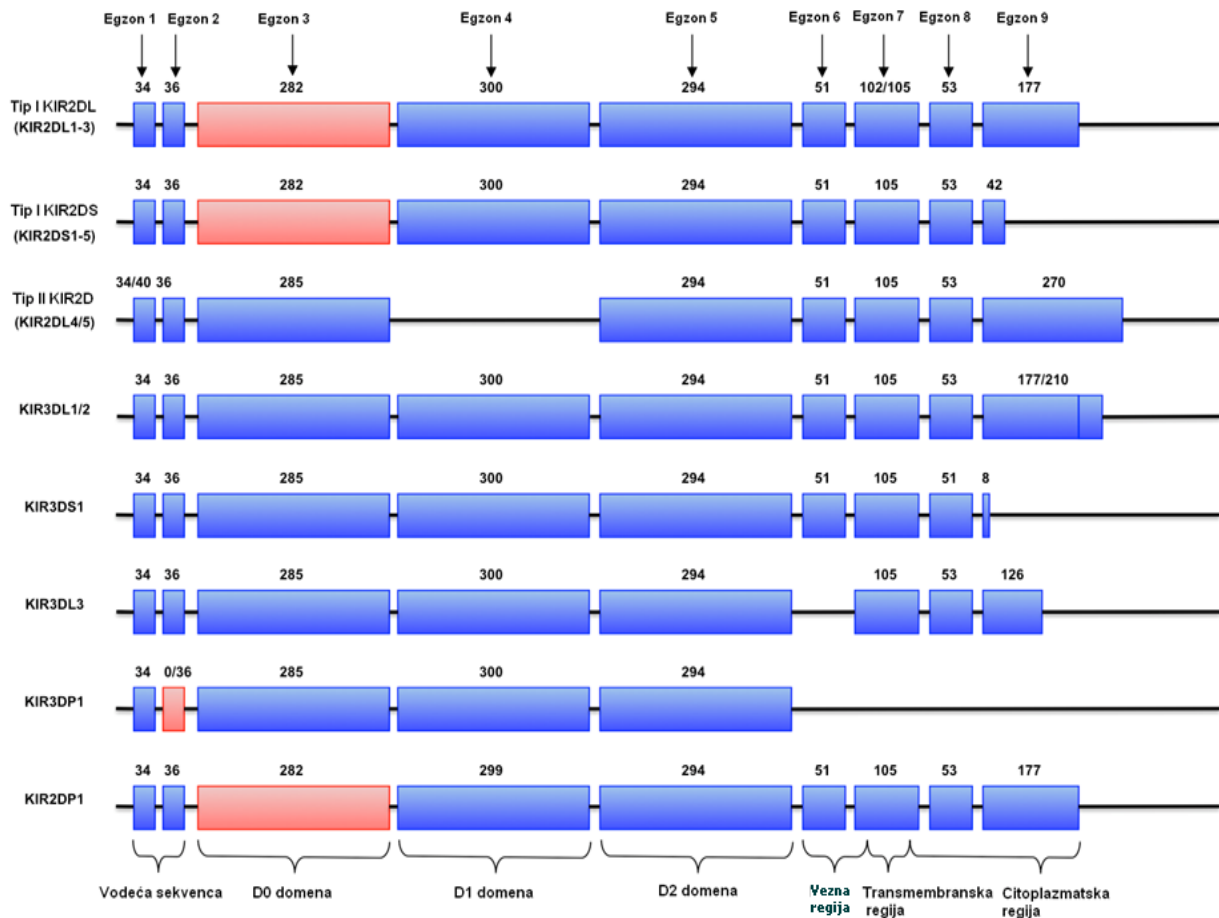
2.2.3. STRUKTURA GENA KIR

Receptori KIR kodirani su porodicom gena koja se nalazi na kromosomu 19q13.4, unutar sustava leukocitnih receptora - LRC (engl. Leukocyte Receptor Cluster) gdje zauzimaju regiju od 150 kb (slika 8). LRC sustav veličine je 1 mb i vrlo veliki i gusti sustav imunoloških gena koji kodiraju molekule s različitim imunoglobulinskim domenama. Ti geni, osim receptora KIR, uključuju receptore LILR, LAIR, Fc γ -receptor, prirodno citotoksični receptor 1 (NCR1) te gene za transmembranske adaptore DAP10 i DAP12 (41).



Slika 8. Mapa sustava leukocitnih receptora LRC i primjer jednog od mogućih haplotipova KIR. (Slika preuzeta iz reference 37, www.ebi.ac.uk/ipd/kir/)

Geni KIR variraju u dužini od 4-16 kb i mogu sadržavati 4-9 egzona. Organizacija egzon-intron struktura uglavnom prati osnovni raspored: vodeća sekvenca kodirana je s prva dva egzona, imunoglobulinske domene (D0, D1 i D2) kodirane su egzonima 3-5, vezna regija i transmembranska regija kodirane su pojedinačno egzonima 6 i 7 i citoplazmatska regija je kodirana s posljednja dva egzona 8 i 9 (slika 9).



Slika 9. Organizacija gena KIR. Geni KIR koji imaju sličnu strukturnu organizaciju prikazani su kao grupa, dok su oni s određenim posebnostima prikazani zasebno. Kodirane regije egzona prikazane su kao plavi kvadrati, a njihova veličina u bazama prikazana je brojevima iznad kvadrata. Pseudoegzon 3 i deletirani egzon 2 prikazani su crvenom bojom. (Slika preuzeta iz reference 37, www.ebi.ac.uk/ipd/kir/)

Geni KIR međusobno su identični 80-90%, dok se aleli jednog gena KIR međusobno razlikuju najviše 2% (43). Na osnovu strukturnih obilježja podijeljeni su u tri skupine: KIR2D tipa I, KIR2D tipa II i KIR3D geni.

2.2.3.1. Geni KIR2D tipa I

Geni KIR2D tipa I kodiraju proteine s dvije izvanstani ne imunoglobulinske domene, D1 i D2. Sadrže osam egzona i pseudoegzon 3. Pseudoegzon 3 u ovoj skupini je inaktiviran što je posljedica nukleotidne supstitucije na mjestu izrezivanja intron 2-egzon 3 gdje postoji karakteristična delecija tri bazna para. Ovoj grupi pripadaju geni *KIR2DL1-3*, geni *KIR2DS1-5* te pseudogen *KIR2DP1*. Geni *KIR2DL1-3* razlikuju se od gena *KIR2DS1-5* po dužini kodirajuće regije egzona 9 koja kodira citoplazmatski rep. Također, geni *KIR2DL1* i *KIR2DL2* dijele zajedničku deleciju u egzonu 7 što ih razlikuje od svih ostalih gena KIR, a rezultat je kraća sekvenca egzona 7. Pseudogen *KIR2DP1* razlikuje se od gena *KIR2DL1-3* po kraćoj sekvenci egzona 4 zbog delecije jednog baznog para što za posljedicu ima prijevremeni STOP kodon.

2.2.3.2. Geni KIR2D tipa II

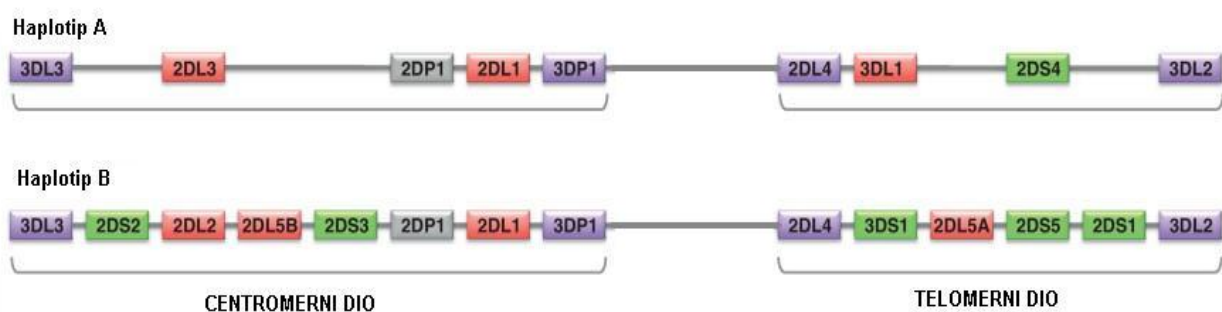
Geni KIR2D tipa II kodiraju proteine s dvije izvanstani ne imunoglobulinske domene, D0 i D2. Ovoj grupi pripadaju geni *KIR2DL4* i *KIR2DL5*. Karakteristika ove grupe je kompletna delecija regije koja odgovara egzonu 4. Nadalje, za razliku od gena KIR2D tipa I koji imaju netranslatirani pseudoegzon 3, geni KIR2D tipa II imaju translatirani egzon 3. Unutar ove skupine, gen *KIR2DL4* se razlikuje od gena *KIR2DL5*, kao i od ostalih gena KIR po dužini svojeg egzona 1. Kod gena *KIR2DL4*, egzon 1 je 6 nukleotida duži i ima inicijacijski kodon potpuno različit od ostalih gena KIR.

2.2.3.3. Geni KIR3D

Geni KIR3D kodiraju proteine s tri izvanstani ne imunoglobulinske domene, D0, D1 i D2. Ovoj skupini pripadaju geni *KIR3DL1-3*, *KIR3DS1* i pseudogen *KIR3DP1*. Geni imaju devet egzona, a međusobno se razlikuju u dužini regije egzona 9 koja kodira citoplazmatski rep. Gen *KIR3DL2*, od svih gena KIR, ima najdužu nukleotidnu sekvencu od 16256 pb. Gen *KIR3DS1* razlikuje se od gena *KIR3DL1* i *KIR3DL2* po kraćoj sekvenci egzona 8, a gen *KIR3DL3* razlikuje se od svih ostalih gena KIR po kompletnoj deleciji egzona 6. Najveća strukturna razlika u odnosu na sve gene KIR postoji kod pseudogena *KIR3DP1* koji uopće nema egzone 6-9, a ponekad ni egzon 2.

2.2.4. HAPLOTIPOVI KIR

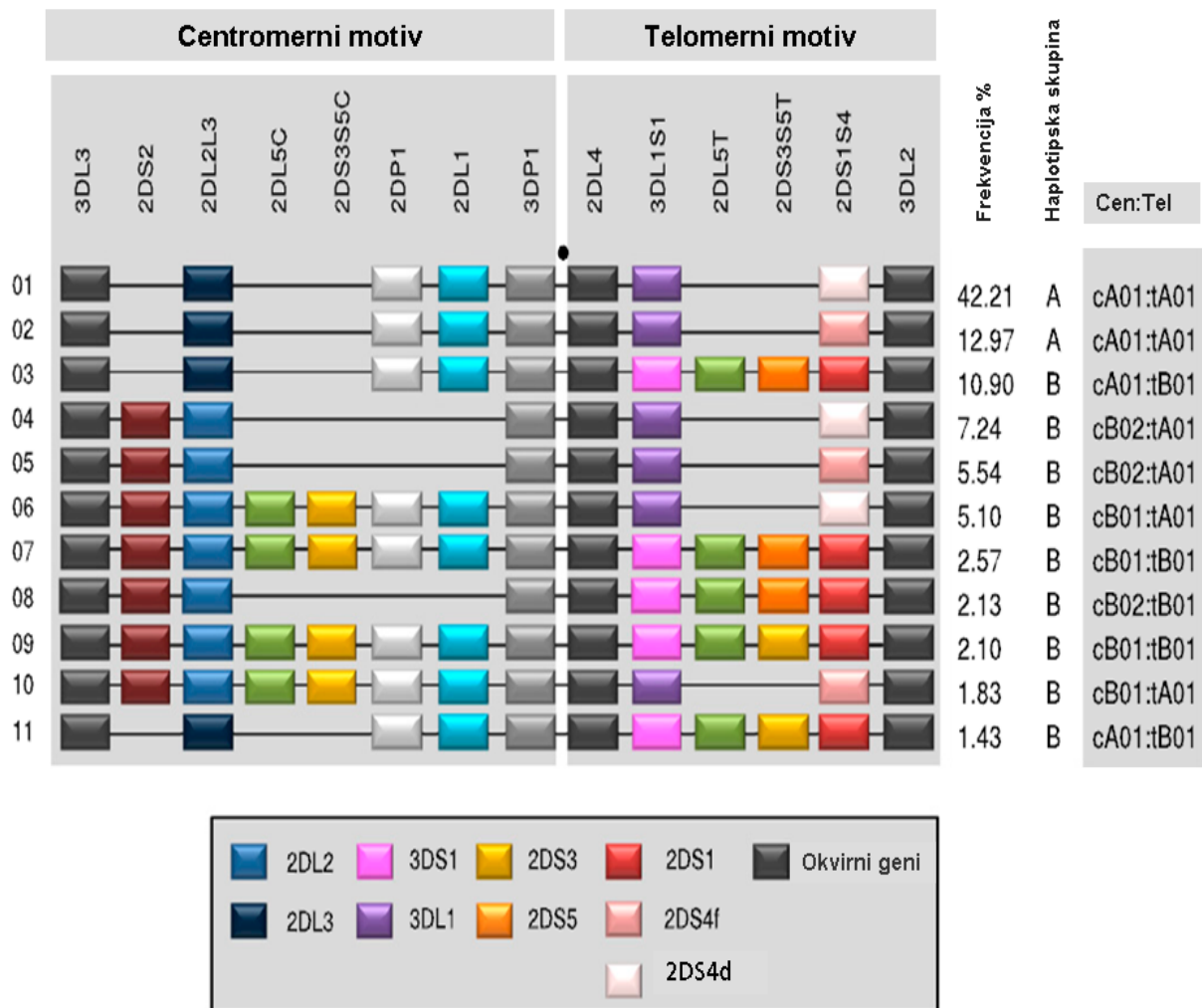
Geni KIR usko su vezani i nasljeđuju se kao haplotip. Zbog diploidnosti kod ljudi, obično postoje dvije kopije autosomalnih gena, po jedan na svakom homolognom kromosomu. Ipak, u slučaju gena KIR to pravilo ne vrijedi; broj i tip gena KIR razlikuju se između dva kromosoma (44). Geni KIR organizirani su na kromosomu u dva osnovna haplotipa koji pokazuju izrazitu raznolikost u broju i vrsti prisutnih gena KIR, a nazvani su haplotip A i haplotip B (slika 10) (37, 41). Četiri gena KIR (*KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR3DP1*) prisutna su u svakom haplotipu i nazivaju se geni okvira (geni okvira), dok je prisutnost preostalih gena KIR različita, ovisno o haplotipu. Svi geni KIR organizirani su na kromosomu po principu glava-rep i međusobno su razdvojeni odsječkom DNA od 2,4 kb. Izuzetak čini odsječak DNA od 14 kb koji razdvaja gene *KIR3DP1* i *KIR2DL4*. Ovaj odsječak zapravo dijeli haplotip na centromerni i telomerni dio (44). Centromerni dio haplotipa omeđen je genom *KIR3DL3* na 5' kraju i genom *KIR3DP1* na 3' kraju, dok je telomerni dio omeđen genima *KIR2DL4* na 5' kraju i *KIR3DL2* na 3' kraju. Geni *KIR2DL2* i *KIR2DL3* segregiraju kao dva alela jednog lokusa (*KIR2DL2L3*) u centromernom dijelu haplotipa. Slično, *KIR3DL1* i *KIR3DS1* ponašaju se kao aleli jednog lokusa (*KIR3DL1S1*) u telomernom dijelu haplotipa. Gotovo svi haplotipovi sadrže ova dva lokusa pa teoretski svatko u svom KIR genomu ima *KIR2DL2* ili *KIR2DL3* odnosno *KIR3DL1* ili *KIR3DS1* gen. Geni *KIR2DL1-3* i *KIR2DS2* specifični su za centromerni dio haplotipa, dok su geni *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR2DS1* i *KIR2DS4* specifični za telomerni dio haplotipa. Tri gena, *KIR2DL5*, *KIR2DS3* i *KIR2DS5* mogu se naći i u centromernom i u telomernom dijelu haplotipa.



Slika 10. Shematski prikaz dva osnovna haplotipa KIR – haplotip A i haplotip B

Haplotip A je nepromijenljiv haplotip i sastoji se od 9 gena KIR: *KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2*. Kodira predominantno inhibicijske receptore

KIR, a jedini gen za aktivacijski receptor je *KIR2DS4*. Haplotip B značajno varira u sastavu gena i određen je prisutnošću u različitim kombinacijama gena *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR2DL2*, *KIR2DL5* i *KIR3DS1* koji nisu dio haplotipa A. Time haplotip B kodira značajno više aktivacijskih receptora KIR u odnosu na haplotip A. S obzirom na izrazitu raznovrsnost gena KIR i recipročne rekombinacije unutar kompleksa KIR, unutar populacija postoji veliki broj različitih genotipova. Svaka osoba može se na osnovu prisutnih gena KIR svrstati u jednu od tri grupe genotipova KIR: genotip AA - homozigot za haplotip A, genotip BB - homozigot za haplotip B i genotip AB - heterozigot s haplotipom A i haplotipom B (45).



Slika 11. Shematski prikaz naju estalijih haplotipova KIR. Na slici je prikazano 11 haplotipova prisutnih kod 94.0% bijele populacije. Haplotipovi su prikazani prema sastavnim motivima centromerne i telomerne regije (Cen:Tel). Boja kvadratića označava prisutnost određenog gena KIR, a redoslijed gena u haplotipu određen je metodom sekvenciranja. Geni *KIR2DS3* i *KIR2DS5* (*KIR2DS3S5*) mogu biti prisutni i u centromernoj (C) i u telomernoj regiji (T). Geni *KIR2DS1* i *KIR2DS4* prikazani su zajedno zbog jednostavnosti. (Slika preuzeta iz reference 47)

Recipročna rekombinacija između gena *KIR3DP1* i *KIR2DL4* kombinira i miješa centromerne (c) i telomerne (t) motive gena KIR haplotipa A (tA i cA) i haplotipa B (tB i cB) stvarajući različite kombinacije gena u haplotipovima. Do danas je prijavljeno 37 definiranih haplotipova KIR na razini alela određenih metodom sekvenciranja (46), odnosno 71 haplotip određen segregacijskom analizom obitelji (47). Uočeno je da su na razini gena svi haplotipovi kombinacija 10 centromernih i 10 telomernih motiva gena KIR (44). Najustaliji haplotipovi KIR u populacijama prikazani su na slici 11, gdje se može vidjeti da su svi kombinacija tri centromerna (cA01, cB01 i cB02) i dva telomerna (tA01 i tB01) motiva gena KIR.

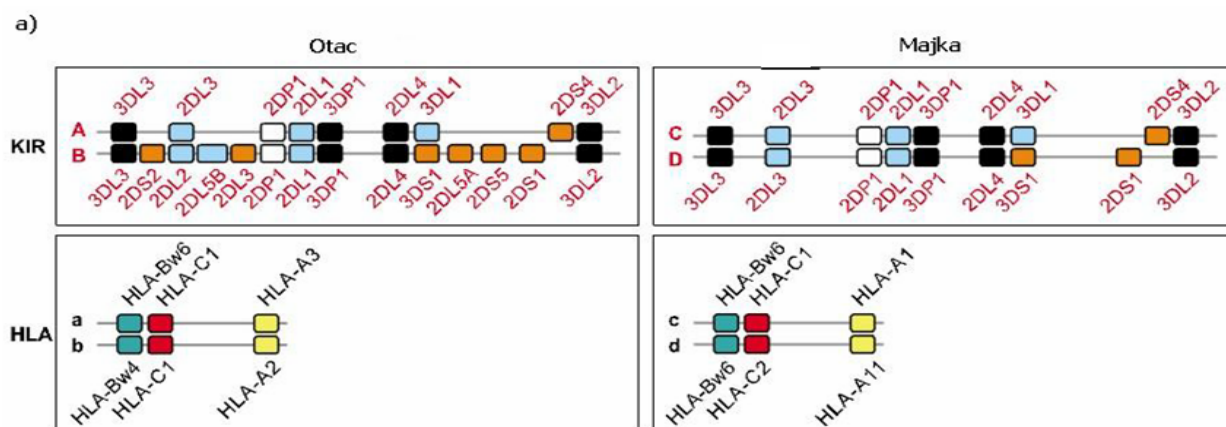
Nasljeđivanje majčinog i očevog KIR haplotipa dodatno stvara različite kombinacije gena i genotipova KIR među ljudima (slika 12). Do danas (01.05.2014.) je u populacijskim studijama među 16988 ispitanika iz 143 populacije pronađeno 492 različita genotipova KIR na osnovi prisutnosti/odsutnosti pojedinog gena KIR (42; www.allelefrequencies.net).

2.2.5. LIGANDI RECEPTORA KIR

Za razumjevanje uloge receptora KIR, potrebno je znati s kojim molekulama stupaju u interakciju. Do danas svi poznati ligandi receptora KIR su molekule HLA razreda I lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-G (slika 13). Ligandi za sve receptore KIR još uvijek nisu poznati.

2.2.5.1. HLA-C

Molekule HLA-C su najdominantniji ligandi za većinu broja receptora KIR. Sve molekule HLA-C u lancu $\alpha 1$ sadrže aminokiselinu valin (V) na poziciji 76, dok je pozicija 80 dimorfna i može sadržavati asparagin (N) ili lizin (K). Na osnovu vrste aminokiseline na poziciji 80, molekule lokusa HLA-C podijeljene su u dvije skupine liganada za receptore KIR: skupina C1 i skupina C2. Gotovo polovica gena HLA-C (C*02/04/05/06/12:42/15/16:02/17) ima lizin na poziciji 80 (K80, konvencionalno nazvan C2 epitop) i pripada skupini C2, dok ostali (C*01/03/07/08/12/13/14/15:07/16:01) imaju asparagin (N80, konvencionalno nazvan C1 epitop) i pripadaju skupini C1 (44). Pozicija 44 u D1 domeni receptora KIR raspoznaje navedene epitope molekula HLA-C i odgovorna je za jačinu interakcije receptor-ligand (48). Molekule HLA-C skupine C2 prirodni su ligandi za receptor KIR2DL1. Receptori KIR2DL2 i



c)

Haplotipovi	Moguće kombinacije inhibicijski KIR-HLA		Aktivacijski KIR	
	Broj	Tip	Broj	Tip
ABab (otac)	3	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1; 3DL2-A3	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
CDcd (majka)	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
ACac	2	2DL3-C1; 3DL2-A3	1	2DS4
BCac	2	2DL2/3-C1; 3DL2-A3	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	1	2DS4
BCbc	2	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACac	2	2DL3-C1; 3DL2-A3	1	2DS4
BDac	2	2DL2/3-C1; 3DL2-A3	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ADbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ACad	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	1	2DS4
BCad	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACbd	4	3DL1-Bw4; 2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	1	2DS4
BCbd	4	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ADad	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDad	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ADbd	4	3DL1-Bw4; 2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDbd	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1

Slika 12. Primjer mogu ih kombinacija roditeljskog naslje ivanja haplotipova KIR i gena HLA. a) varijacije haplotipova KIR (ozna eni A,B,C,D) i HLA (ozna eni a,b,c,d) kod roditelja; b) etiri mogu e kombinacije gameta oba roditelja i 16 mogu ih kombinacija haplotipova KIR i HLA kod potomaka; c) nasumi no spajanje gameta stvara potomke s jednom od 16 mogu ih kombinacija maj inog i o evog haplotipa KIR i HLA što stvara raznolikost u broju i tipu KIR-HLA interakcija (inhibicija ili aktivacija). (Slika preuzeta iz reference 44)

KIR2DL3 vežu molekule HLA-C skupine C1, iako ostvaruju vezu i s nekim molekulama iz skupine C2 (C*05:01 i C*02:02). Također, molekule HLA-B46 i B73 koje obje imaju valin (V) na poziciji 76 i asparagin (N) na poziciji 80, mogu i su ligandi za receptor KIR2DL2 i KIR2DL3. Receptor KIR2DL3 slabije i specifičnije veže ligande HLA-C u odnosu na KIR2DL2, što ovisi o raznovrsnosti aminokiselina na poziciji 16 u domeni D1 i poziciji 148 u domeni D2 receptora KIR (49). Inhibicijski signal stvoren interakcijom KIR2DL2/3-C1 slabiji je od inhibicijskog signala kompleksa KIR2DL1-C2.

Aktivacijski receptor KIR2DS1 koji je građen od Ig-domena sliče an inhibicijskom receptoru KIR2DL1, također veže molekule skupine C2, ali sa znatno manjim afinitetom. Aktivacijski receptor KIR2DS2 je također građen od Ig-domena nalik inhibicijskom receptoru KIR2DL2, ali nema afinitet za vezanje molekula skupine C1 (50).

Receptor KIR2DS4 najstariji je i najzastupljeniji aktivacijski receptor i ima specifičan afinitet samo za određene molekule HLA-C skupine C1 (HLA-C*01:02, C*14:02 i C*16:01) i C2 (HLA-C*02:02, C*04:01 i C*05:01) (51).

2.2.5.2. HLA-Bw4

Skupina molekula HLA-A i HLA-B koje nose epitop Bw4 ligandi su za receptor KIR3DL1. Specifičnost molekula koje imaju epitop Bw4 razlikuje se od molekula s epitopom Bw6 zbog sastava aminokiselina na pozicijama 77-83 u lancu 1. Epitop Bw6 nalazi se samo na molekulama HLA-B dok se epitop Bw4 nalazi na 40% molekula HLA-B i na nekim molekulama HLA-A (HLA-A23, A24, A25 i A32). Molekule s epitopom Bw6 na poziciji 80 imaju aminokiselinu asparagin (N) i ne vežu se na KIR3DL1 dok molekule s epitopom Bw4 na poziciji 80 imaju izoleucin (I) ili treonin (T) i vežu receptor KIR3DL1 (52). Aminokiselina na poziciji 83, arginin, esencijalna je za vezanje receptora KIR3DL1 (33). Izuzetak je produkt alela *KIR3DL1*004* koji se protein ne ispoljava na površini stanica pa predstavlja nevezujući i receptor KIR3DL1 (53). Molekule HLA-A25 i HLA-B13 čine izuzetak među ligandima HLA-Bw4 jer, iako imaju epitop Bw4, ne vežu se s receptorom KIR3DL1 (31, 54).

Ligandi za aktivacijski receptor KIR3DS1, iako dijeli 95% strukturne sličnosti s receptorom KIR3DL1, još nisu sa sigurnošću utvrđeni. Zadnje genetske i funkcionalne studije pokazuju da su molekule HLA-Bw4 s izoleucinom na poziciji 80 potencijalni ligandi za ovaj receptor, međutim direktna interakcija receptora KIR3DS1 i HLA-Bw4 još nije dokazana (55).

2.2.5.3. HLA-A

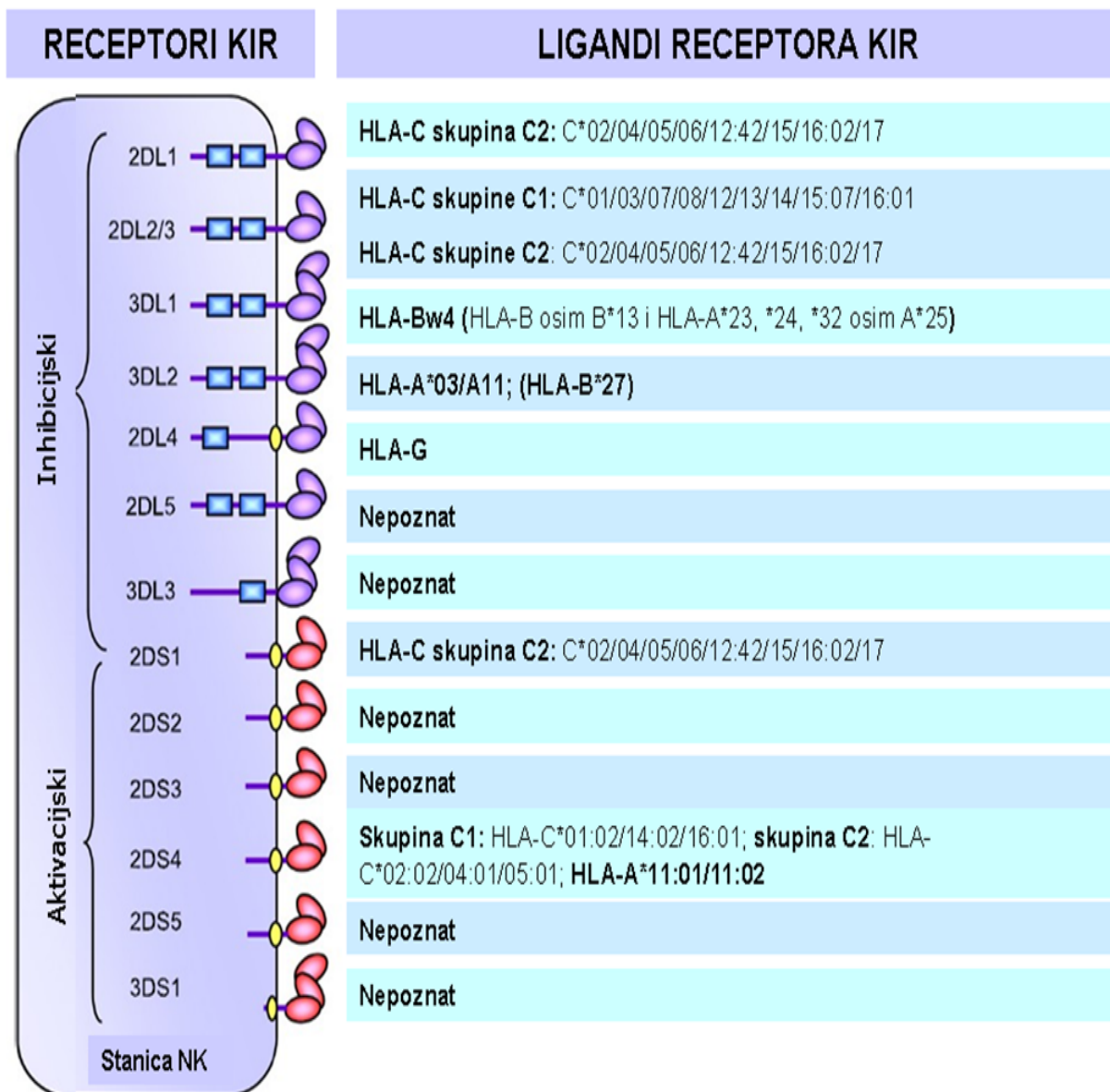
Molekule HLA-A3 i A11 ligandi su za receptor KIR3DL2, pri čemu je veza izrazito osjetljiva i ovisi o jačini interakcije receptora s aminokiselinama na poziciji 7 i 8 u ligandu (56). U *in vitro* studijama dokazano je da su ove molekule ligandi za KIR3DL2 samo u slučaju kada imaju vezane peptide Epstein-Barr virusa (57). Iz tog razloga postoje kontroverze treba li molekule HLA-A3 i A11 smatrati ligandima za receptore KIR u kliničkom pogledu kod TKMS.

Za receptor KIR2DS4 dokazano je da također veže neke molekule HLA-A, to nije HLA-A*11:01 i A*11:02 (51).

2.2.5.4. HLA-G

Receptor KIR2DL4 kao ligande prepoznaje neklasikalne molekule HLA razreda I, HLA-G. Ove interakcije izrazito su važne za vrijeme trudnoće gdje receptor KIR2DL4 veže molekule HLA-G na stanicama trofoblasta čime se potiče vaskularizacija decidue i razvoj placente koja će opskrbiti fetus sa svim potrebnim nutrijentima i kisikom (58). Receptor KIR2DL4 neobičan je i potpuno različit receptor u odnosu na sve ostale receptore KIR u pogledu strukture, izražavanja, pozicije u stanici i načina signaliziranja. Iako ima dugi citoplazmatski rep tipičan za inhibicijske receptore KIR, KIR2DL4 ima aktivacijski učinak na stanicu NK i to u sekrecijskom smjeru, a ne citotoksičnom (59). Produkt gena KIR2DL4 ne izražava se na površini stanice već ostaje u solubilnom obliku u endosomu unutar stanice.

Ligandi specifični za receptore KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 i KIR2DL5 još uvijek su nepoznati.



Slika 13. Receptori KIR i njihovi ligandi. (Slika preuzeta iz reference 44)

2.3. ULOGA GENA KIR U TRANSPLANTACIJI

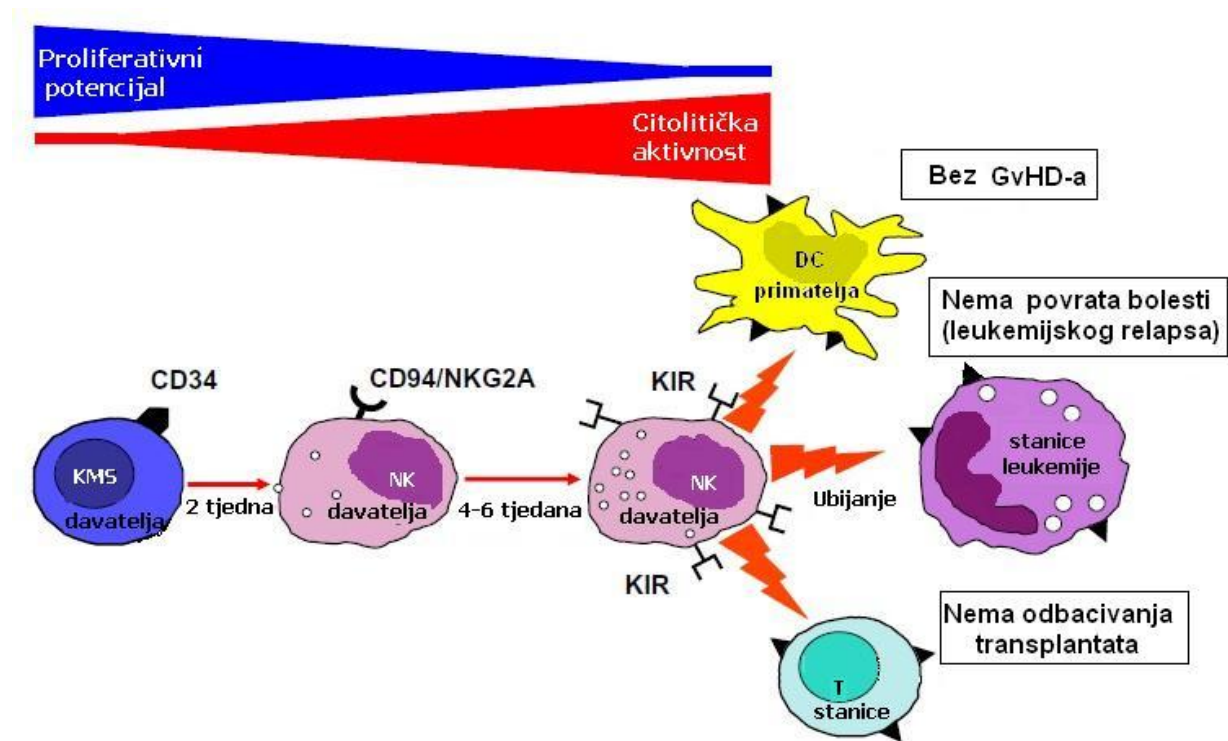
Geni KIR kao važni regulatori prirodne imunosti imaju značajan doprinos uspjehu TKMS. Raznovrsnost haplotipova s obzirom na sastav gena KIR kao i značajna raznovrsnost alela potaknuo je brojna istraživanja o utjecaju gena KIR na ishod TKMS. Poznavaju i mehanizam kako interakcija molekula KIR i HLA određuje funkciju stanica NK, istraživanja su se usmjerila na kombinaciju genotipa KIR/HLA u davatelju i primatelju i mogući utjecaj na ishod transplantacije. „The International Histocompatibility Working Group (IHWG) in Hematopoietic Cell Transplantation” 2002. godine postavila je smjernice za istraživanje uloge gena KIR i interakcija KIR/HLA na ishod transplantacije (60). Za valjanu studiju potrebno je određivanje gena HLA-A, -B i -C primatelja i davatelja visokom rezolucijom na četiri znamenke (npr. HLA-A*11:01; B*07:02; C*01:02) te određivanje genotipa KIR davatelja na razini gena ili alela. Genotipizacija mora uključivati tipizaciju svih poznatih aktivacijskih (*KIR2DS1-5*, *KIR3DS1*) i inhibicijskih (*KIR2DL1-3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*) gena KIR kao i gene okvira tipiziranja (*KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR2DL4*). Određivanje pseudogena nije obvezatno.

Analiza rezultata različitih do danas objavljenih studija o utjecaju KIR/HLA (ne)podudarnosti između primatelja i davatelja na ishod TKMS vrlo je raznolika, od jako pozitivnog u inka do nikakvog ili čak negativnog u inka (tablica 1 pregled rezultata iz literature prikazan je u Prilogu 1). Razlog je vjerojatno nejedinstven način određivanja KIR (ne)podudarnosti, stupanj bolesti i različiti transplantacijski protokoli između centrima. Najveći i pozitivan u inak i dosljedni rezultati dobiveni su u slučaju dijagnoze akutne mijeloidne leukemije (AML) i u slučajevima haploidentne TKMS.

2.3.1. ALOREAKTIVNE STANICE NK

Glavne odrednice aloreaktivnosti stanica NK su interakcije inhibicijskih receptora (KIR i CD94/NKG2A) s molekulama HLA. Ovisno o raznovrsnosti gena HLA i KIR, osobe se međusobno razlikuju po broju funkcionalnih parova inhibicijski KIR/HLA kojih može biti od 1-4 (*KIR2DL1-C2*, *KIR2DL2/3-C1*, *KIR3DL1-Bw4* i *KIR3DL2-A3/A11*). Kod osoba sa samo jednim funkcionalnim parom KIR/HLA, veći dio stanica NK ima izražene CD94/NKG2A receptore čiji su ligandi molekule HLA-E. Nakon TKMS, takve stanice NK davatelja će u istom omjeru biti inhibirane molekulama HLA-E primatelja (61). To znači da

ja ina aloreaktivnosti stanica NK ovisi isključivo o receptorima KIR i da se stanice NK postaju aloreaktivne protiv svake alogene stanice koja nema odgovarajući HLA ligand za inhibicijski receptor KIR. U alogenoj TKMS, davateljeve stanice NK koje postaju aloreaktivne u primatelju, utječu na ishod transplantacije direktnim antitumorskim učinkom, ublažavanjem nastanka GvHD-a te smanjenjem pojave odbacivanja presatka i boljim preživljenjem (slika 14) (62, 63).



Legenda: DC-dendriti ke stanice; GvHD-reakcija presatka protiv primatelja; KIR-receptori prirodnoobila kih stanica sli ni imunoglobulinu; KMS-krvotvorne mati ne stanice; NK-prirodnoubila ke stanice.

Slika 14. Nastanak aloreaktivnih stanica NK i njihova uloga u transplantaciji krvotvornih mati nih stanica. (Slika preuzeta iz reference 63)

Osnovno pitanje bilo je kako to da aloreaktivne stanice NK imaju tako pozitivan učinak i zašto ne izazivaju reakciju GvHD. Eksperimenti na miševima dokazali su da stanice NK dominantno napadaju samo stanice krvotvornog sustava doma ina, ali ne i ostala tkiva kao što to čine limfociti T (64). Stanice NK ne mogu napasti normalne mirujuće stanice i iz tog razloga ne sudjeluju direktno u nastanku GvHD-a. Također, stanice NK eliminiraju limfocite T i granulocite primatelja čime doprinose smanjenju intenziteta GvHD-a i bolje prihvaćanju transplantata. Ujedno imaju i sposobnost ubijanja dendritičkih stanica koje su

inicijatori GvHD-a uzrokovanog limfocitima T. Ipak, u nekim slučajevima, stanice NK mogu indirektno pridonijeti pojačanju intenziteta GvHD-a sekrecijom inflamatornih citokina, poznatom kao „citokinska oluja“ (65). Ono što je najvažniji učinak aloreaktivnih stanica NK u primatelju je snažan antitumorski učinak (GvL efekt). Stanice NK eliminiraju tumorske stanice prvenstveno direktnom citotoksičnom aktivnošću, a mogu potpomo i indirektno sekrecijom imunosupresivnih citokina (65). Nadalje, sekrecijom faktora rasta potiču razvoj matičnih stanica davatelja i brže obnavljanje krvotvornog sustava, a ujedno i regeneraciju ostalog oštećenog tkiva. Boljem preživljenju doprinosi i snažna antivirusna funkcija stanica NK, naročito u kontroli infekcija citomegalovirusom (CMV) i respiratornih virusnih infekcija (66).

2.3.2. MODELI NASTANKA ALOREAKTIVNIH STANICA NK

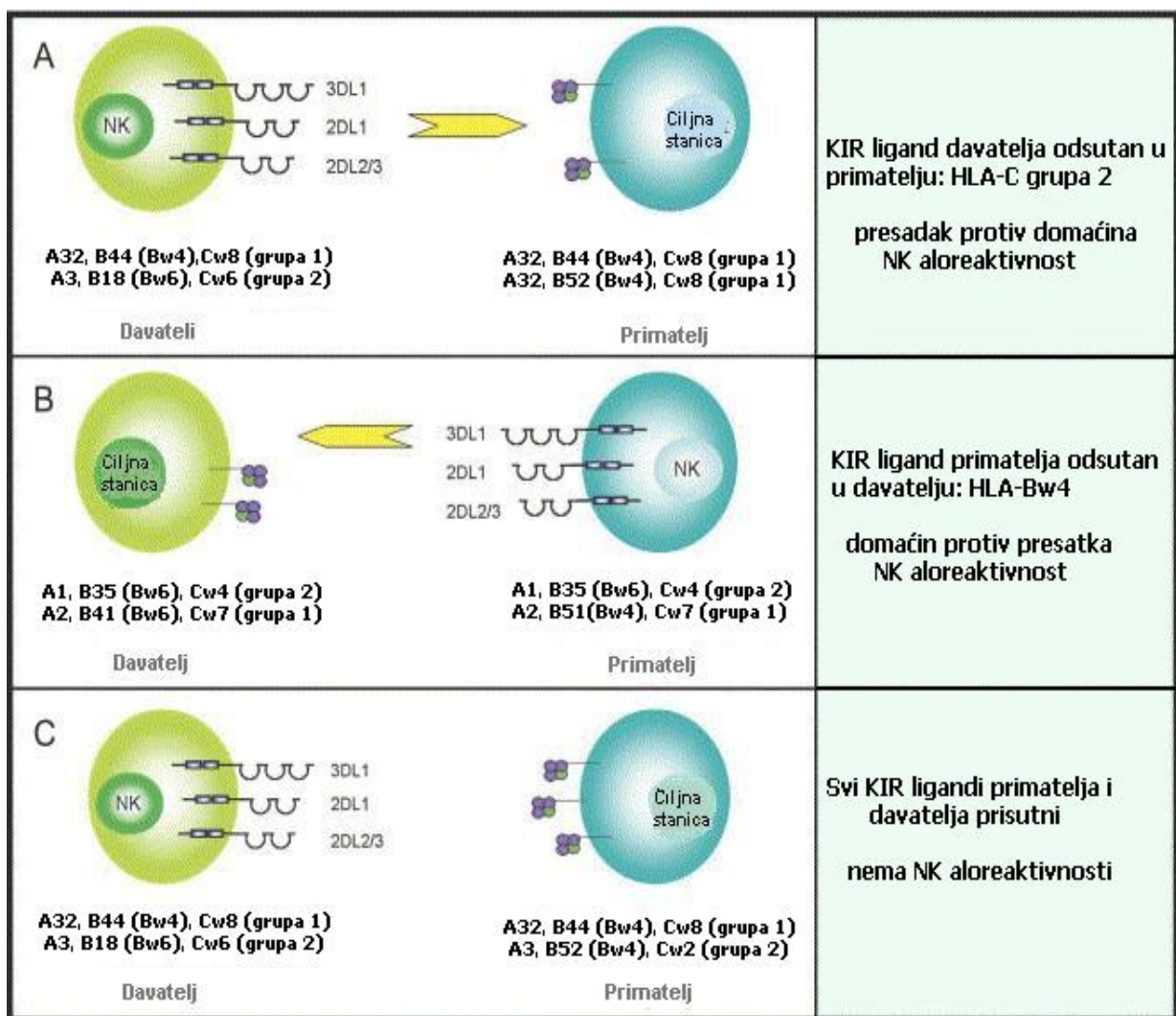
Stanice NK su prva populacija limfocita koja se javlja obnavljanjem krvotvornog sustava primatelja nakon TKMS. Prve zrele stanice NK nastale iz transplantiranih matičnih stanica davatelja javljaju se 4-6 tjedana nakon TKMS i regeneriraju davateljev sastav receptora KIR. Nakon šest mjeseci sastav receptora KIR primatelja u potpunosti je isti kao i kod davatelja. Aloreaktivne stanice NK mogu se otkriti već 6.-7. tjedan nakon TKMS, a mogu biti prisutne i godinu dana nakon TKMS-a, u nekim slučajevima i nakon 5 godina (64). Iako se prisutnost aloreaktivnih stanica NK može predvidjeti analizom gena KIR davatelja i gena HLA razreda I primatelja i davatelja, stvaran broj aloreaktivnih stanica može se odrediti fluorocitometrijskim metodama (31). Većina studija o utjecaju aloreaktivnosti stanica NK na ishod TKMS temelji se na prisutnosti gena KIR i liganada HLA. Međutim, samo mali broj studija je i fenotipski (receptori prisutni na površini stanice NK) dokazao aloreaktivne stanice NK. Naime, postojanje gena KIR ne znači da će i odgovarajući receptor KIR biti ispoljen na površini stanice (67). Usporedba gena KIR određenih genotipizacijom i receptora KIR određenih fenotipizacijom (proto na citometriji), pokazuje razliku od čak 25%.

Kretanjem od hipoteze da za nastanak aloreaktivnih stanica NK mora postojati receptor KIR-ligand HLA nepodudarnost, postoje tri modela nastanka aloreaktivnih stanica NK.

2.3.2.1. MODEL „LIGAND-LIGAND NEPODUDARNOST”

Ovaj model (engl. „KIR ligand mismatch”) bazira se na usporedbi samo gena HLA primatelja i davatelja (usporedba ligand-ligand) bez potrebe određivanja gena KIR (68).

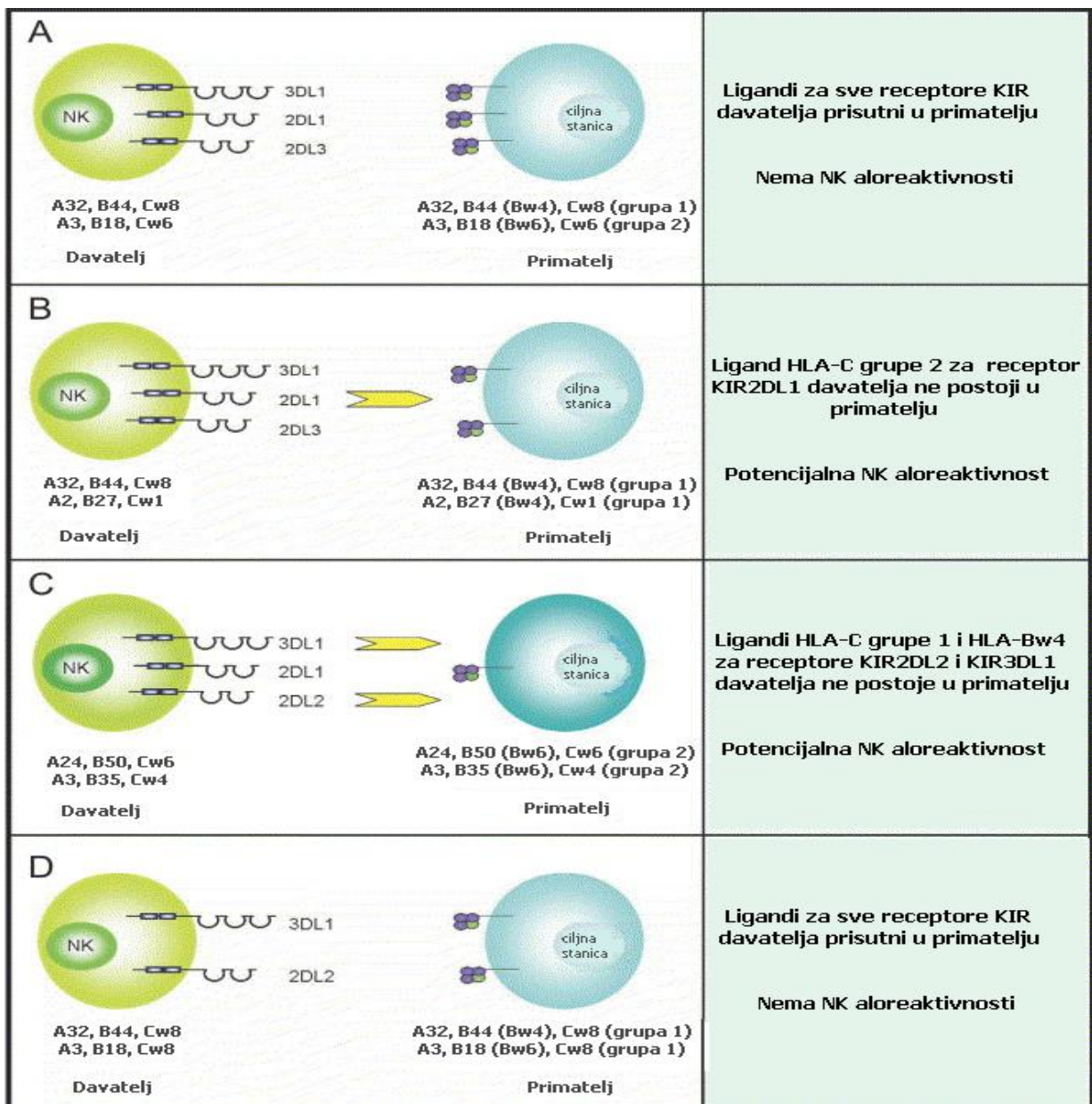
Analizom genotipa HLA davatelja i primatelja, može se predvidjeti stupanj aloreaktivnosti stanica NK. Potrebno je da barem neki od liganada HLA davatelja (grupa C1, grupa C2, HLA-Bw4 ili HLA-A3/A11) ne postoji u primatelju ili obrnuto (slika 15). Uz pretpostavku da svaka osoba ima izražene inhibicijske receptore KIR za vlastite ligande HLA, zbog nepodudarnosti u ligandima HLA davatelja i primatelja, zaključuje se da će nakon TKMS neka populacija stanica NK davatelja postati aloreaktivna u primatelju. Na stranicama www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ dostupan je alat „Ligand Calculator“ pomoću kojeg se određuje (ne)postojanje nepodudarnosti liganada primatelja i liganada davatelja i smjer djelovanja aloreaktivnih stanica NK.



Slika 15. Shematski prikaz nastanka aloreaktivnih stanica NK modelom „ligand-ligand nepodudarnost“. (Slika preuzeta iz reference 68)

2.3.2.2. MODEL „KIR-LIGAND NEPODUDARNOST”

Drugi pristup predviđa nastanak aloreaktivnih stanica NK je usporedba genotipa KIR davatelja i genotipa HLA primatelja (receptor–ligand) (68). U ovom modelu (engl. „missing KIR ligand“) pretpostavka je da je za nastanak aloreaktivnih stanica NK dovoljan jedan inhibicijski receptor KIR davatelja koji nema odgovarajuće i ligande HLA u primatelju (slika 16). Receptori KIR davatelja određuju se KIR genotipizacijom.

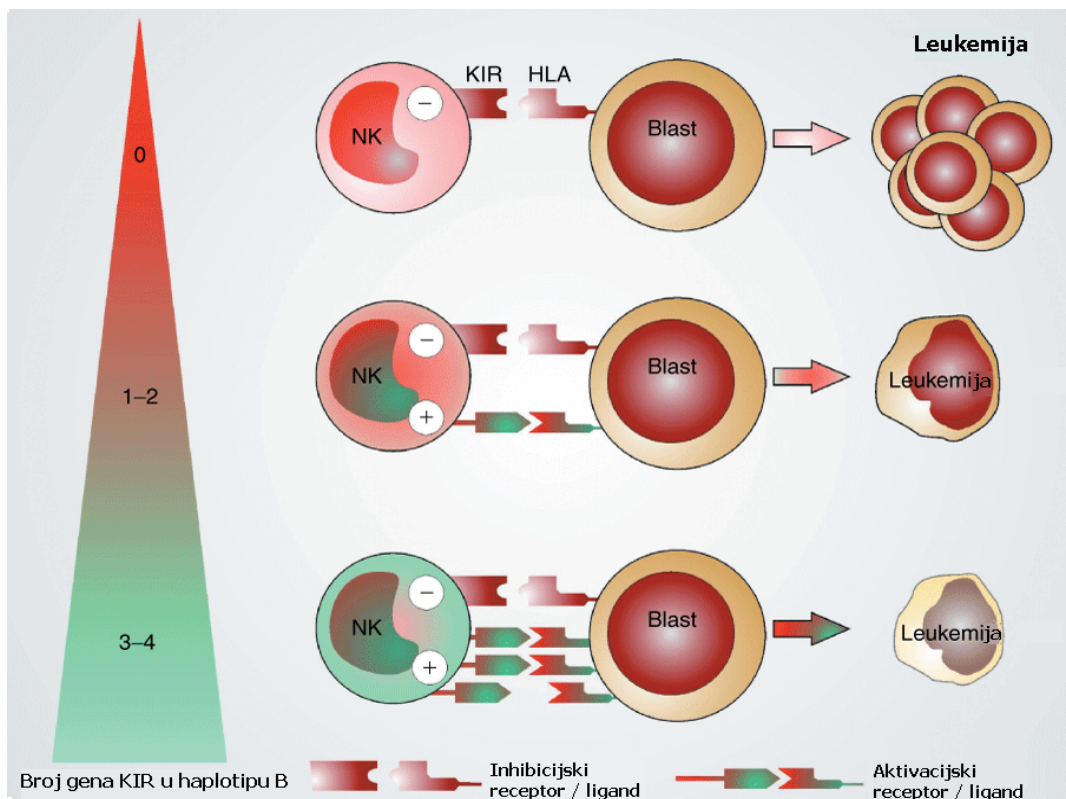


Slika 16. Shematski prikaz nastanka aloreaktivnih stanica NK modelom „KIR-ligand nepodudarnost”. (Slika preuzeta iz reference 68)

Model „KIR-ligand nepodudarnost“ bolji je prognosti ki model jer u slu aju HLA podudarnih parova primatelj – davatelj, prema modelu „ligand–ligand nepodudarnost“ zaklju ak bi bio da ne e nastati aloreaktivne stanice NK. Me utim, uzme li se u obzir nezavisna segregacija gena HLA i gena KIR, primatelj i davatelj podudarni u genima HLA nisu uvijek podudarni u genima KIR te stoga imaju razli ite receptore KIR o kojima ovisi aloreaktivnost stanica NK.

2.3.2.3. MODEL „HAPLOTIP KIR NEPODUDARNOST“

Posljednji i vjerojatno najbolji model nastanka aloreaktivnih stanica NK (engl. „KIR haplotype mismatch“) temelji se na kombinaciji haplotipova A i B davatelja i primatelja i broja aktivacijskih receptora KIR u haplotipu. Pretpostavka je da stanice NK koje imaju samo inhibicijske receptore KIR nisu sposobne postiti antitumorski u inak u odnosu na stanice NK koje imaju i aktivacijske receptore KIR (69). Što je broj aktivacijskih receptora ve i, ja i je antitumorski u inak (slika 17).



Slika 17. Shematski prikaz nastanka i djelovanja aloreaktivnih stanica NK modelom „haplotip KIR nepodudarnost“. (Slika preuzeta iz reference 69)

Prema studiji Cooley i suradnika, bolesnici s AML-om koji su primili transplantat od davatelja genotipa KIR Bx imali su znatno bolje preživljenje i smanjen povrat bolesti (70).

Zbog snažne neravnoteže udruživanja (engl. linkage disequilibrium, LD) gena KIR u haplotipu, jako je teško razlučiti da li neki KIR haplotip B-specifični gen KIR zasebno ima posebni utjecaj na ishod TKMS. Na temelju navedene studije (70), razvijen je jednostavan program naziva „Donor KIR B-content group calculator“ koji se koristi za izbor najboljeg davatelja na temelju sastava gena KIR u haplotipu B, u onim slučajevima kada postoji više HLA podudarnih davatelja. Program je dostupan na stranicama www.ebi.ac.uk/ipd/kir/.

2.3.3. GENI KIR U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA

U transplantaciji solidnih organa, odbacivanje presatka još je uvijek jedan od najvećih uzroka smrtnosti bolesnika nakon transplantacije. Smatra se da aloreaktivnost stanica NK primatelja sudjeluje u imunološkoj reakciji protiv presatka, a to je mehanizam koji je još uvijek kontroverzan. Stanice NK mogu reagirati protiv presatka na dva načina: 1) ako presadak ne sadrži iste molekule HLA kao primatelj, receptori KIR stanica NK primatelja ne mogu prepoznati odgovarajuće ligande, aktiviraju se stanice NK koje mogu lizirati stanice presatka; 2) upalni procesi uzrokovani samim operativnim postupkom transplantacije induciraju izražavanje molekula stresa na stanicama presatka koje prepoznaju aktivacijski receptori KIR i aktiviraju stanicu NK za napad (71). S druge pak strane, stanice NK mogu inducirati i toleranciju na presadak sposobnošću u eliminiranju dendritičkih stanica i time limitiraju i T-staničnu aloreaktivnost.

2.3.3.1. GENI KIR I TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Još uvijek nije u potpunosti jasno imaju li aloreaktivne stanice NK utjecaja na ishod transplantacije bubrega, a nekoliko istraživanja dalo je različite rezultate. Jedan od prvih radova pokazao je da je povećana citotoksičnost stanica NK nakon transplantacije bubrega povezana s većim brojem aktivacijskih receptora KIR u primatelja (72), dok druga istraživanja pokazuju da je veći broj inhibicijskih receptora KIR kod primatelja povezan s zaštitnom ulogom protiv akutnog odbacivanja presatka (73). U studiji Nowak-a i suradnika, prisutnost aktivacijskog receptora KIR2DS5 u primatelja povezana je sa zaštitom presatka od odbacivanja (74). Pozitivan utjecaj KIR-ligand podudarnosti i 25% manja smrtnost u 10-

godišnjem preživljenju bubrega dokazana je studijom van Bergen-a i suradnika (75). Prema njihovom istraživanju, postojanje jedne ili više KIR-ligand nepodudarnosti smanjuje preživljenje presatka u jednakom omjeru kao i HLA-A ili HLA-B nepodudarnost primatelja i davatelja. Tako u slučaju da postoji više HLA identiteta davatelja bubrega, trebalo bi odabrati onog s najmanje KIR-ligand nepodudarnosti. Ipak, jedna od najvećih studija Tran-a i suradnika na uzorku od 2757 transplantiranih bolesnika nije potvrdila niti jedan od rezultata prethodno navedenih studija (76). U dodatnoj analizi 608 primatelja bubrega, rezultati su ponovno bili negativni (77). Istraživanje nije dokazalo postojanje utjecaja KIR-ligand nepodudarnosti na uspjeh transplantacije bubrega i ova grupa autora ne podržava primjenu receptora KIR u odabiru davatelja bubrega.

2.3.3.2. GENI KIR I TRANSPLANTACIJA JETRE

S obzirom da je akutno odbacivanje jetre nakon transplantacije još uvijek veliki klinički problem, istraživanja su se usmjerila i na mogući pozitivan utjecaj gena KIR. Istraživanje Hanvesakul-a i suradnika o utjecaju receptora KIR i liganada HLA-C skupine C1 i C2 davatelja na akutno odbacivanje jetre pokazalo je statistički značajan utjecaj liganada skupine C2 u smislu manjeg odbacivanja presatka i boljeg preživljavanja (78). Istraživanje Fosby-a i suradnika bilo je usmjereno na genotip KIR primatelja, ali nije pokazalo nikakav značajniji utjecaj na odbacivanje jetre (79). Zna se da su geni KIR, reguliraju i aktivnost stanica NK, uključujući u antivirusnu imunološku reakciju u jetri. Rad Askar-a i suradnika usmjerio se na istraživanje utjecaja raznovrsnosti gena KIR na učinkovitost antivirusne terapije (peginterferon i ribavirin, Peg/RBV) kod HCV pozitivnih primatelja gdje su rezultati pokazali da odsutnost gena KIR2DS2 i/ili KIR2DL2 značajno smanjuje uspješnost terapije (80).

2.4. POVEZANOST GENA KIR S BOLESTIMA

Izuzetna genska, fenotipska i funkcionalna raznolikost receptora KIR koja na različitim razinama utječe na funkciju stanica NK može biti jedan od čimbenika za razvoj bolesti (81). Brojna genetska istraživanja povezuju kombinacije receptora KIR i molekula HLA s pojavom određene bolesti, navode i patogene kao glavnu pokretačku snagu evolucije gena KIR (82). Na stranicama www.allelefrequencys.net osnovana je baza naziva „KIR and Diseases Database (KDDB)“ koja pohranjuje sve objavljene podatke o povezanosti gena, alela, genotipova i/ili haplotipova KIR s različitim bolestima (83).

2.4.1. GENI KIR I AUTOIMUNE BOLESTI

Zbog povezanosti autoimunih bolesti s genima sustava HLA, kompleksi koje receptori KIR tvore s molekulama HLA dodatno pojačavaju u inak na samu bolest (84). Stanice NK su često prisutne upravo u tkivima podložnim autoimunim poremećajima kao što su mišići, sinovija, gušterača i mozak (85). Povezanost stanica NK s pojavom autoimunih bolesti usmjerena je na aktivacijske receptore KIR i haplotip B. Na primjer, dokazana je povezanost psorijaze vulgaris s prisutnošću molekula KIR2DS1 i HLA-C*06 (86). U slučaju ulceroznog kolitisa, kombinacija KIR2DL3 i skupine HLA-C1 ima zaštitnu ulogu, dok prisutnost receptora KIR2DL2/2DS2 povećava rizik bolesti (87). Također, KIR2DL2 u haplotipu B povezan je s nekoliko autoimunih bolesti, između ostalog, s dijabetesom tipa I i psorijaznim artritisom (83). Različiti oblici uvećanja povezani su s prisutnošću većeg broja aktivacijskih receptora KIR u odnosu na parove inhibicijski receptor KIR-ligand HLA (44).

2.4.2. GENI KIR I INFEKCIJE

Brojne su studije koje proučavaju različite vrste virusa i infekcija te pokušavaju utvrditi povezanost s određenim receptorima KIR i njihovim interakcijama s odgovarajućim ligandima (83). Sprječavanje izražavanja molekula HLA na površini stanice mehanizam je bijega virusa od citotoksičnih stanica T. Međutim, takve stanice bez molekula HLA na površini postaju meta stanica NK jer više ne sadrže ligande za inhibicijske receptore KIR i ne mogu potaknuti inhibicijski signal. Istraživanja povezanosti receptora KIR i virusa HIV-a pokazala su pozitivan učinak receptora KIR3DL1 i KIR3DS1 u smanjenju progresije bolesti, manjem nakupljanju virusa i pojačanoj zaštiti od infekcije oportunističkim uzročnicima

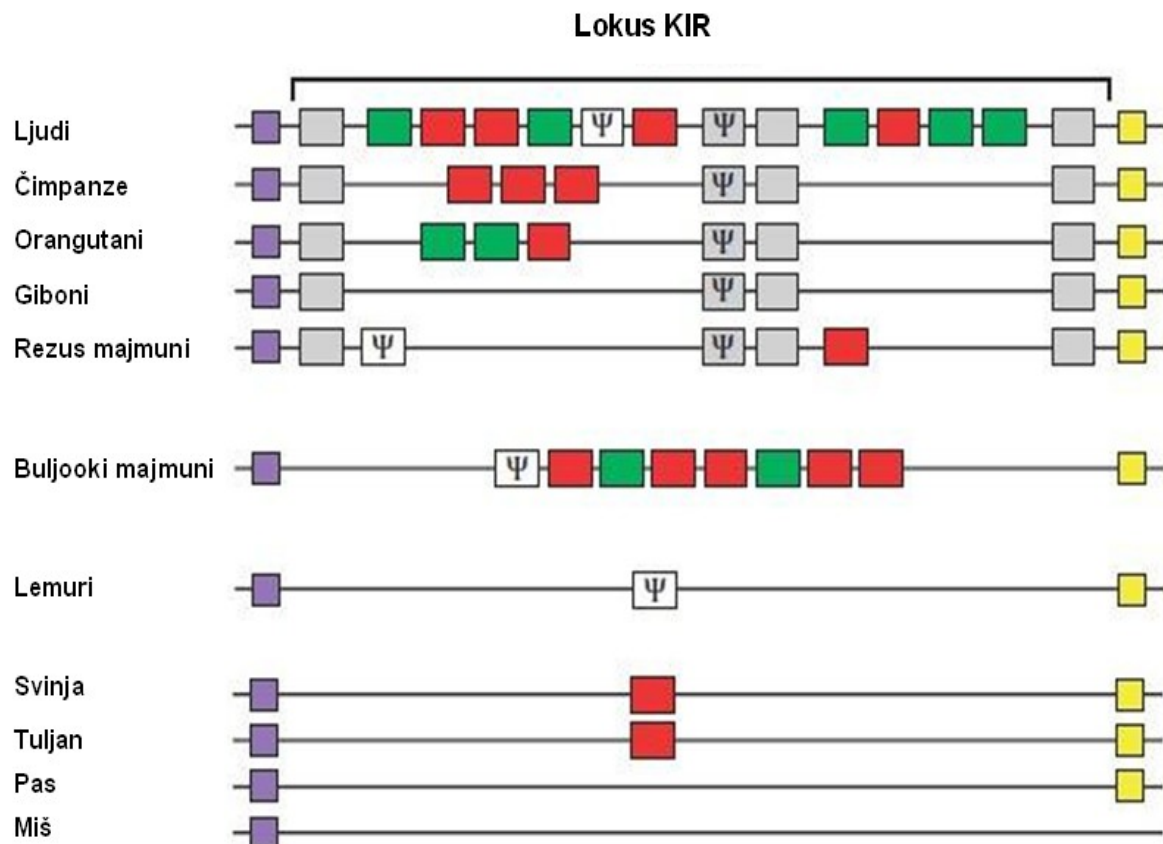
osoba zaraženih virusom (91). Kombinacija inhibicijskog receptora KIR3DL1 s molekulom HLA-B*57 ima snažan zaštitni učinak. Iako nije sa sigurnošću utvrđen ligand za aktivacijski receptor KIR3DS1, istraživanja pokazuju izraženiji zaštitni učinak kada je receptor KIR3DS1 u kombinaciji s molekulama HLA-Bw4 koje na poziciji 80 imaju aminokiselinu izoleucin (I). Zaštitna uloga receptora KIR2DL3 i liganada skupine HLA-C1 dokazana je kod osoba zaraženih virusom hepatitisa C (HCV) s akutnom infekcijom, dok je kod kroničnog oblika infekcije HCV-om značajan utjecaj receptora KIR2DL2 (92). U slučaju CMV-a, infekcije nakon transplantacije znatno su smanjene što je više aktivacijskih receptora KIR prisutno.

2.5. KIR I TRUDNOŠĆA

Stanice NK imaju važnu ulogu u formiranju placente i održavanju trudnoće, a čine 50-90% svih leukocita u decidui dok limfocita T i B gotovo ih nema (93). Smatra se da su poremećaji u trudnoći poput preeklampsije, pobačaja ili zastoja u rastu fetusa povezani s interakcijom receptora KIR i molekula HLA-C (94). Istraživanje Hiby-a i suradnika pokazalo je povećan rizik za preeklampsiju kod majki koje su homozigoti za KIR haplotip A, a rizik je još povećan ukoliko fetus sadrži molekule HLA-C skupine C2 naslijeđene od oca, a sama majka ih nema (95). Dodatnim istraživanjem potvrdili su da KIR haplotip B majke djeluje zaštitno, naročito ako sadrži receptor KIR2DS1 (96). Najnovije istraživanje Hiby-a i suradnika odnosi se na povezanost gena KIR majke s porođajnom težinom djeteta (97). U radu navode da majke kod kojih prevladavaju inhibicijski geni KIR rode djecu s malom porođajnom težinom dok majke koje imaju veći broj aktivacijskih gena KIR rode djecu s velikom porođajnom težinom. Istraživanje Witt-a i suradnika usmjereno je na raznovrsnost gena KIR i utjecaj na spontane pobačaje, pri čemu su dokazali da sastav gena KIR majke nema utjecaja na pobačaj (20). Rad Faridi-a i suradnika o povezanosti gena KIR i spontanih pobačaja ukazao je na 4 puta veći rizik ukoliko je majka genotipa BB, odnosno zaštitni učinak inhibicijskog receptora KIR2DL1 (123). U najnovijem istraživanju Wang-a i suradnika dokazali su povezanost spontanih pobačaja sa smanjenim brojem stanica NK i receptora KIR za ligande HLA-C (KIR2DL1/2DS1 i KIR2DL2/3) u decidui tijekom prvog tromjesječja (124). Rezultate smatraju dovoljno značajnima te bi se geni KIR mogli koristiti kao dijagnostička metoda u patogenezi bolesti.

2.6. EVOLUCIJA GENA KIR ME U VRSTAMA

Usporedba gena KIR kod različitih vrsta sisavaca pokazala je da nemaju svi raznolikost karakterističnu za gene KIR kod ljudi (slika 18) (125). Na primjer, kod psa i mačke lokus KIR je potpuno deletiran, dok kod miša neki geni KIR nisu uopće unutar LRC regije već na kromosomu X. Do danas, raznolika obitelj gena KIR pronađena je samo u primata i goveda. Razilaženje obitelji gena KIR primata i goveda dogodila se prije 135 milijuna godina. Smatra se da je izvorni gen KIR duplikacijom stvorio dva gena: KIR3DL i KIR3DX. Iz gena KIR3DL razvila se u primata loza KIR, dok je iz gena KIR3DX nastala loza KIR kod goveda.



Slika 18. Shematski prikaz lokusa KIR me u različitim vrstama. Prikazani su reprezentativni haplotipovi KIR za svaku vrstu. Geni su označeni bojama: sivo-okvirni (LILR); crveni- geni za inhibicijske receptore KIR; zeleni- geni za aktivacijske receptore KIR; bijeli (Ψ)- pseudogeni; žuti- geni za Fc receptor. (Slika preuzeta iz reference 82)

impanze, kao vrsta najbliža ljudima, imaju 14 gena KIR pri čemu su samo KIR3DL3, KIR2DL4, KIR2DL5 i KIR2DS4 ortolozi (homologni geni koji dijele istu funkciju u različitim organizmima) (126). Ostalih 10 gena smješteno je samo u centromernoj regiji, dok je telomerna regija gotovo prazna.

Istraživanja ostalih skupina primata dokazala su postojanje neortoloških gena KIR kod gorila (82), orangutana (127), rezus majmuna (128), Bonobo impanza (129) i babuna (130).

2.7. POPULACIJSKA BIOLOGIJA GENA KIR

Populacijska istraživanja značajna su za otkrivanje porijekla i razilaženja gena KIR (125). Do danas, u stalnost gena KIR određena je u više od 200 populacija (www.allelefrequencies.net). Mehanizmi stvaranja raznolikosti genotipova i haplotipova KIR su asimetrična rekombinacija između homolognih intergenskih regija koja stvara duplikacije i delecije gena kao i recipročna rekombinacija između centromerne i telomerne regije haplotipa KIR (između gena KIR3DP1 i KIR2DL4) (82). Navedeni mehanizmi stvaranja novih gena i gubitak starih razlog su izrazito brze evolucije obitelji gena KIR.

Podjela gena KIR u dva osnovna KIR haplotipa (haplotip A i haplotip B) na osnovu njihovih gradivnih elemenata centromerne i telomerne regije karakteristična je samo kod ljudi. Kombinacije KIR haplotipova A i B prisutne su u svim ispitivanim populacijama.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Plan istraživanja odobren je od strane Etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.1. ZDRAVI ISPITANICI

Za provođenje populacijskog dijela istraživanja raznovrsnosti i određivanja učestalosti gena, genotipova i haplotipova KIR u hrvatskoj populaciji, analizirani su uzorci 125 zdravih, nesrodnih ispitanika. Svi ispitanici su stanovnici grada Zagreba, ali porijeklom iz svih regija Hrvatske te time predstavljaju reprezentativan uzorak. Velicina uzorka određena je temeljem poznate raznovrsnosti gena KIR te temeljem broja ispitanika koji se koristio u istraživanjima raznovrsnosti gena KIR u drugim populacijama (88, 89, 90). Velicina uzorka također je dodatno određena upotrebom statističkog kalkulatora: Statistics calculators (verzija 3.0) - A priori sample size calculator for Student t-test (131). Minimalna velicina uzorka od 102 ispitanika potrebna je za snagu testa 0,80, velicina uinka 0,50 (Cohenov d) i razinu statističke značajnosti $p = 0,05$.

3.1.2. PAROVI PRIMATELJ-DAVATELJ U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Za ispitivanje podudarnosti gena/genotipova KIR primatelja i davatelja, mećuodnosa receptora KIR davatelja i HLA liganda primatelja te povezanosti gena KIR s krajnjim pokazateljima ishoda TKMS (preživljavanje, pojava GvHD-a i postizanje punog kimerizma), provedeno je ispitivanje na uzorku od 111 parova ispitanika koji su bili liječnici TKMS i njihovih davatelja. U 55 parova primatelj i davatelj bili su srodne osobe, dok je u preostalim 56 slučajeva davatelj bio dobrovoljni nesrodni davatelj iz hrvatskog Registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (RDDKMS) ili Svjetskog registra (engl. Bone Marrow Donors Worldwide, BMDW). U istraživanje su uključeni bolesnici koji su se liječili u Klinici za hematologiju i Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu 2009.-2011.g., uz period praćenja pokazatelja ishoda TKMS najmanje 2 godine. Svi ispitanici bili su podvrgnuti postupku kondicioniranja prije TKMS. Dio ispitanika je bio podvrgnut

kondicioniranju smanjenog intenziteta, poznatog i kao nemijeloablativno kondicioniranje. Bolesnici su primali dnevnu dozu 30 mg/m² fludarabina 4-6 dana, 3,2 mg/kg IV busulfana kroz 2-3 dana i 5 mg/kg antitimocitnog globulina (ATG) ukupno kroz 2 dana (132). Drugi dio ispitanika bio je podvrgnut mijeloablativnom kondicioniranju primanjem kombinacije busulfana, ciklofosfamida i ATG-a (133). Bolesnici su primali dnevnu dozu 4x0,8 mg/kg Busilvexa 4 dana, 60 mg/kg ciklofosfamida kroz 2 dana i 1,5 mg/kg anti-timocitnog globulina (ATG) ukupno kroz 11 sati. Prevencija GvHD-a provedena je primjenom ciklosporina A (CSA) u slu aju srodne TKMS, a kod nesrodne TKMS primjenom CSA u kombinaciji s mikofenolat mofetilom (MMF) (134). Bolesnici su primili transplantat krvotvornih mati nih stanica iz koštane srži ili krvotvornih mati nih stanica iz periferne krvi davatelja, mobiliziranih granulocitnim faktorom rasta stimulacije kolonija (GCFS). Svim parovima primatelj-davatelj odre eni su aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 visokom rezolucijom prema standardima Europske federacije za imunogenetiku (EFI). Tako er, svim bolesnicima u ispitivanoj skupini pra en je stupanj kimerizma s po etkom uzimanja prvog uzorka u prosjeku 30 dana nakon TKMS.

3.2. MATERIJAL

Materijal potreban za ovaj rad je krv ispitanika s antikoagulansom EDTA iz koje se izolirala DNA za odre ivanje gena KIR. Skupina zdravih ispitanika dala je krv dobrovoljno za potrebe znanstvenih istraživanja. Krvni uzorci parova ispitanika primatelj-davatelj sakupljani su prilikom obrade (tipizacije HLA) u Klini koj jedinici za tipizaciju tkiva i kimerizam Klini kog bolni kog centra Zagreb. Svakom primatelju i davatelju u sklopu traženja bilo srodnog davatelja unutar obitelji, bilo nesrodnog davatelja u RDDKMS ili Svjetskom Registru uzet je uzorak periferne krvi radi odre ivanja alela HLA. Iz tog uzorka izdvojeno je 2ml krvi u svrhu odre ivanja gena KIR.

3.3. METODE

3.3.1. IZOLACIJA DNA

Iz 2 ml uzorka periferne krvi ispitanika izolirana je DNA pomo u komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njema ka). Metoda se temelji na

uporabi kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNA (slika 19). Stanice se liziraju inkubacijom uzorka krvi s puferom za lizu i proteinazom K. Dodavanjem etanola lizatu, DNA se veže za silikatnu membranu u odgovarajućoj NucleoSpin® Blood kolumni. Vežanje DNA je reverzibilno i specifično za nukleinske kiseline. Naredna dva ispiranja DNA s puferima za ispiranje uklanjaju neistovremeno istu DNA se na kraju eluira s membrane elucijskim puferom.

Izolacija DNK metodom NucleoSpin Blood



Slika 19 . Shematski prikaz postupka izolacije DNA metodom Nucleospin.

3.3.2. ODREĐIVANJE GENA KIR

Za određivanje gena KIR korištene su dvije metode: metoda lanane reakcije polimerazom primjenom specifičnih po etnicima za određenu sekvencu DNA (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Priming, PCR-SSP) i metoda lanane reakcije polimerazom primjenom specifičnih oligonukleotidnih proba (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe, PCR-SSO).

3.3.2.1. METODA PCR-SSP

Za određivanje gena KIR metodom PCR-SSP korišteni su komercijalni *OlerupSSPTMKIR Genotyping* testovi (Qiagen Vertriebs GmbH, Vienna, Austria). Specifičnosti i veličine PCR produkata prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Specifičnosti i veličine produkata PCR korištenih u određivanju gena KIR testom *OlerupSSPTMKIR Genotyping*

Kombinacija početnica	Veličina specifičnog PCR produkta (pb)	Veličina kontrolne PCR vrpce (pb)	Geni KIR	Umnoženi aleli KIR
1	145	800	2DL1	001-025
2	150	1070	2DL2	0010101-010
3	100 520	1070	2DL3	0010101-017
4	200	1070	2DL4	00101-022
5	155	1070	2DL5A, 2DL5B	0010101-00105, 0050101-005010104, 01201-01202, 014-015 0020101-004, 00601-011, 01301-01303, 016
6	1650	430	2DL5A	0010101-00105, 0050101-005010104, 01201-01202, 014-015
7	1650	515	2DL5B	0020101-004, 00601-011, 01301-01303, 016
8	100	1070	2DS1	001-008
9	205	1070	2DS2	0010101-008
10	130	1070	2DS3	00101-005
11	215	1070	2DS4	0010101-00104, 01101-01102, 014, 015
12	200	1070	2DS4	0030101-0030104, 0040101-0040102, 0060101-0060102, 007-010, 012, 013
13	110	1070	2DS5	001-011
14	135	1070	3DL1	0010101-002, 00401-00403, 0050101-009, 01501-044, 051-054, 056, 057, 059-068, 072-073
15	200	1070	3DL2	0010101-062
16	115	1070	3DL3	00101-036, 041-055
17	130	1070	3DS1	010-014, 045-049N, 050, 055, 058
18	165	1070	2DP1	00101-010
19	125	1070	3DP1	001-010
20	235	1070	3DP1	0030101-0030402, 004-010
21	145	1070	2DS1	001
22	95	1070	2DS1	0020101-008
23	210	1070	3DL1	00401-00403, 019, 021, 036, 037, 039, 056, 072
24	-	-	-	Negativna kontrola

Legenda: pb-parova baza

3.3.2.1.1. Umnažanje gena KIR metodom PCR-SSP

Svaki *OlerupSSPTMKIR Genotyping* test sastoji se od 23+1 reakcije (reakcija 24 je negativna kontrola). Preporučena koncentracija DNA za ovaj test je 30 ng/μl. Umnažanje DNA radilo se prema protokolu proizvođača testova. Ukupni volumen reakcije PCR iznosio je 10 μl (4,9 μl H₂O, 0,1 μl polimeraze Taq koncentracije 5 U/μl (Applied Biosystems), 3 μl reakcijskog pufera i 2 μl uzorka DNA). Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena KIR testom *OlerupSSPTMKIR Genotyping*

Uvjeti reakcije PCR	
1	94°C - 2' } 1 ciklus
2	94°C - 10" 65°C - 60" } 10 ciklusa
3	94°C - 10" 61°C - 50" 72°C - 30" } 20 ciklusa
4	4°C - ∞

3.3.2.1.2. Elektroforeza produkata PCR

Provjera umnoženih produkata PCR radila je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu obojenom etidij bromidom koristeći 1xTBE pufer. Dokumentacija gela radila je pomoću UV G:BOX Syngene kamere s tamnom komorom.

3.3.2.1.3 Interpretacija rezultata

Analiza reakcija (umnoženih vrpca PCR) na fotografiranom gelu (slika 20) radi se pomoću tablice za interpretaciju koja se dobije uz test za određivanje gena KIR (tablica 5).

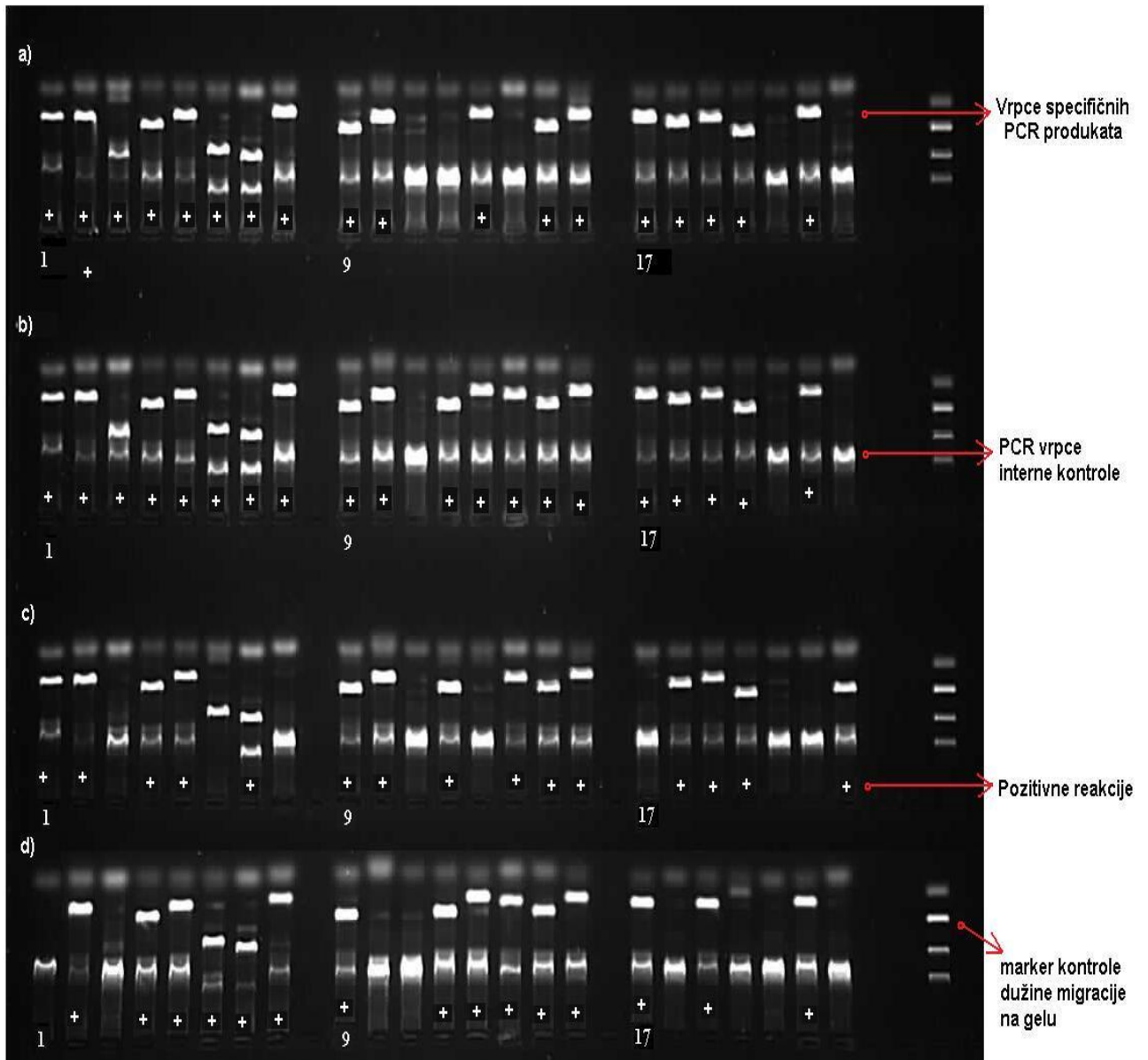
Tablica 5. Tablica za interpretaciju reakcija na gelu i određivanje gena KIR testom OlerupSSP™ KIR Genotyping

Broj reakcije	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Aleli KIR																								
2DL1*001-025	1																							
2DL2*0010101-010		2																						
2DL3*0010101-017			3																					
2DL4*00101-022				4																				
2DL5A*0010101-00105, 0050101-005010104, 01201- 01202, 014-015					5	6																		
2DL5B*0020101-004, 00601- 011, 01301-01303, 016					5		7																	
2DS1*001								8													21			
2DS1*0020101-008								8														22		
2DS2*0010101-008									9															
2DS3*00101-005										10														
2DS4*0010101-00104, 01101- 01102, 014, 015											11													
2DS4*0030101-0030104, 0040101-0040102, 0060101- 0060102, 007-010, 012, 013												12												
2DS5*001-011													13											
3DL1*0010101-003, 0050101- 009, 01501-018, 020, 022-035, 038, 040-044, 051-054, 057, 059-068, 073														14										
3DL1*00401-00403, 019, 021, 036, 037, 039, 056, 072														14									23	
3DL2*0010101-062															15									
3DL3*00101-055																16								
3DS1*010-014, 045-049N, 050, 055, 058																	17							
2DP1*00101-010																		18						
3DP1*001-002																			19					
3DP1*0030101-0030402																			19	20				
3DP1*004, 005-010																			19	?				
Veličina specifičnog PCR produkta	145	150	100	200	155	1650	1650	100	205	130	215	200	110	135	200	115	130	165	125	235	145	95	210	
			520																					
Broj reakcije	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Negativna kontrola

Prema veličini specifičnih produkata PCR, reakcija na gelu označava se kao pozitivna (PCR produkt prisutan) ili negativna (PCR produkt odsutan). Pozitivna reakcija na gelu (označena znakom + na slici 19) mora sadržavati internu kontrolnu vrpku i vrpku specifičnog PCR

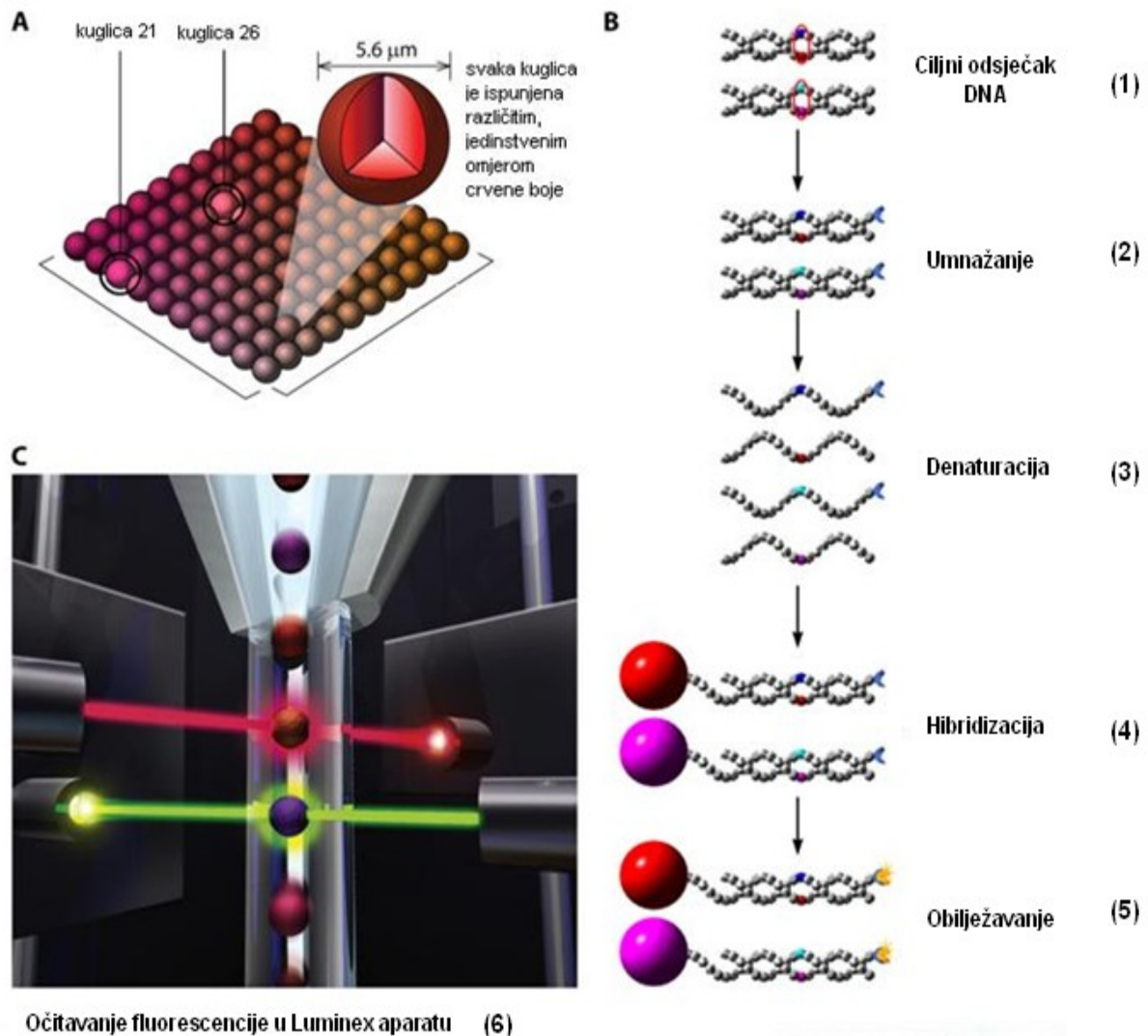
produkta. Prema tablici i specifičnosti reakcija koje su određene kao pozitivne određuje se genotip KIR ispitanika.



Slika 20. Fotografija agaroznog gela s rezultatima reakcija umnažanja gena KIR testom *OlerupSSPTMKIR Genotyping*. Prikazane su PCR reakcije 4 različita ispitanika (a, b, c, d). Pozitivne reakcije označene su znakom plus (+). Reakcije koje imaju samo PCR vrpce interne kontrole smatrane su negativnima. Marker kontrole dužine migracije na gelu nalazi se uz svaki test kako bi se olakšalo određivanje dužine specifičnog PCR produkta prilikom interpretacije rezultata.

3.3.2.2. METODA PCR-SSO

Druga metoda korištena za određivanje gena KIR je metoda PCR-SSO uz korištenje testova *Gen-Probe Lifecodes KIR typing kit* (Gen-Probe Inc, Stamford, USA) i Luminex aparata (Luminex corporation, Austin, Tx, USA). Metoda se temelji na hibridizaciji biotinom označenih produkata amplifikacije na specifične oligonukleotidne probe (SSO) koje su vezane na površini mikrosfera (slika 21).



Slika 21. Shematski prikaz metode PCR-SSO korištenjem Luminex aparata. A) prikaz mikrosfera (kuglica); B) prikaz postupaka metode PCR-SSO po koracima; C) prikaz očitavanja u Luminex aparatu

3.3.2.2.1. Umnažanje gena KIR metodom PCR-SSO

Preporučena koncentracija DNA za navedeni test je 50 ng/μl. Umnažanje DNA izvodi se prema protokolu proizvođača testova, a produkt umnažanja su dvostruke i jednostruke molekule DNA koje nakon denaturacije sudjeluju u hibridizacijskoj reakciji. Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosi 20 μl (11,8 μl H₂O, 0,2 μl polimeraze Taq koncentracije 5 U/μl (Applied Biosystems), 6 μl reakcijskog pufera i 2 μl uzorka DNA). Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena KIR testom *Gen-Probe Lifecodes KIR typing kit*

	Uvjeti reakcije PCR	
1	95°C - 2' } }	1 ciklus
2	94°C - 30" 59°C - 90" 72°C - 30" } }	40 ciklusa
3	72°C - 15' } }	1 ciklus
4	4°C - ∞	

3.3.2.2.2. Hibridizacija umnožene DNA metodom PCR-SSO

U postupku hibridizacije, specifično umnoženi slijedovi DNA inkubiraju se s 20 mikrosfera koje imaju pojedinačno jedinstvenu fluorescenciju i na površini vezane specifične KIR SSO probe. Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosi 20 μl (5 μl PCR produkta i 15 μl otopine mikrosfera). Proces hibridizacije odvija se 20 minuta na 56°C. Odmah po završetku, hibridizacijskoj reakciji dodaje se 170 μl pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje (170 μl pufera za razrješenje i 0.85 μl streptavidina, SA-

PE (R-fikoeritrin)). Streptavidin se veže na biotinilizirane dijelove DNA produkta PCR koji su nakon hibridizacije specifično vezani s probama na određenim mikrosferama. Detekcija vezanosti produkta PCR na probe očitava se dalje u Luminex aparatu.

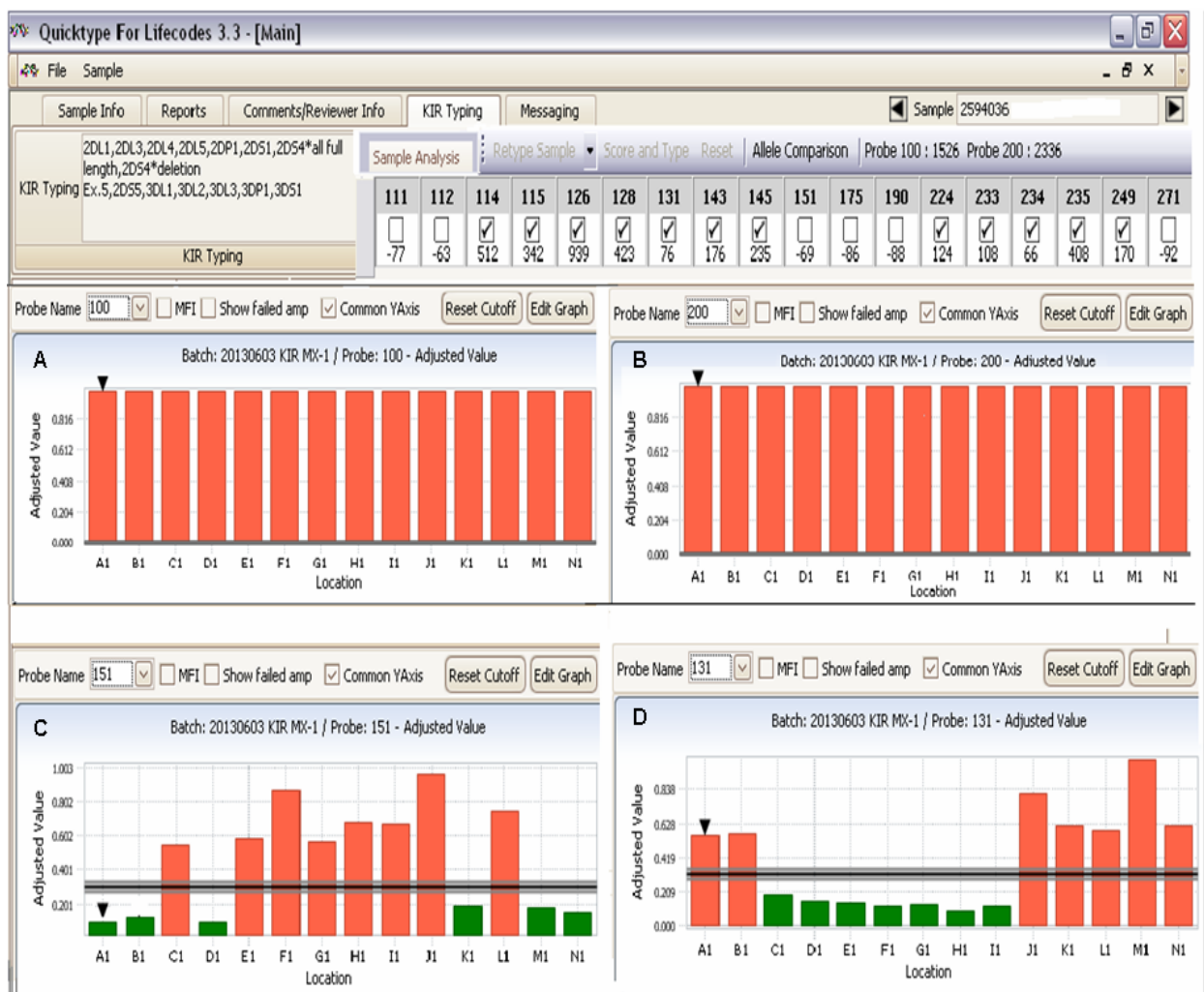
3.3.2.2.3. Očitavanje rezultata u Luminex aparatu i analiza podataka

Luminex aparat detektira i fluorescenciju pomoću dva lasera i moguće je razlikovati kombinaciju proba s pozitivnim signalom na osnovu njihove vezanosti s mikrosferama te kvantificirati i relativnu količinu amplifikata koji je hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom. Vrijednosti očitavanja, adrese proba i mikrosfera prema kojoj program određuje prisutnost ili odsutnost određenog gena KIR prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Radni list očitavanja rezultata hibridizacije programom Quicktype for lifecodes rađene testom *Gen-Probe Lifecodes KIR typing kit* (LOT: 03119E).

PROBA	NAJVEĆA NEGATIVNA VRIJEDNOST	NAJMANJA POZITIVNA VRIJEDNOST	LOKUS
100		290	3DP1
111	0.090	0.110	2DS2
112	0.260	0.315	2DS3
114	0.180	0.220	2DS5
115	0.104	0.127	2DP1
126	0.100	0.120	3DS1
128	0.090	0.110	3DL1
131	0.286	0.349	2DS1
143	0.281	0.344	2DL1
145	0.180	0.220	2DS4*cijeli egzon 4
151	0.273	0.333	2DL2*001-3/5
175	0.270	0.330	2DS4*cijeli egzon 5
190	0.090	0.110	3DS1*049N
200		383	3DL3
224	0.187	0.228	3DL2
233	0.326	0.398	2DL4
234	0.180	0.220	2DS4*deletiran egzon 5
235	0.080	0.100	2DL3
249	0.270	0.330	2DL5
271	0.135	0.165	2DL2*004

Analiza pozitivnih i negativnih rezultata hibridizacije i određivanje genotipa KIR svakog pojedinog ispitanika provodi se analitičkim programom Quicktype for lifecodes (verzija 3.3). Probe s adresama 100 i 200 su unutarnje pozitivne kontrole (geni KIR3DP1 i KIR3DL3 koji su uvijek prisutni u genotipu) i njihove vrijednosti ne smiju biti negativne da bi program ušao u analizu. Izražavanjem vrijednosti optične fluorescencije za svaku od 20 mikrosfera, prisutnost gena KIR označava se kao „pozitivna“ mikrosfera, odnosno „negativna“ mikrosfera ako gen nije prisutan. Grafički prikaz analize rezultata hibridizacije optičnih u Luminex-u prikazan je na slici 22.



Slika 22. Primjer grafičkog izgleda analize rezultata hibridizacije optičnih aparatom Luminex. Probe 100 (A) i 200 (B) su unutarnja kontrola i pozitivne su kod svih 14 ispitivanih uzoraka. Reakcije na svim ostalim mikrosferama razlikuju se za svaki pojedini uzorak. Navedeni su primjeri za mikrosfere 151 (C) i 131 (D). Mikrosfera 151 na uzorku A1 je negativna, dok je mikrosfera 131 pozitivna.

3.3.3. STATISTI KA OBRADA PODATAKA

Analiza podataka populacijskog dijela istraživanja provedena je deskriptivnom statistikom. Uo ene u estalosti (CF_i) gena KIR u ispitivanom uzorku odre ene su direktnim brojanjem na principu prisutnosti odnosno odsutnosti gena. O ekivana u estalost (GF_i) gena KIR u populaciji odre ena je prema Bernstein formuli koja se temelji na Hardy-Weinberg ravnoteži (135):

$$GF_i = 1 - (1 - CF_i)$$

$GF_i = o$ ekivana u estalost gena
 $CF_i = uo$ ena u estalost gena

Vrijednosti neravnoteže udruživanja gena KIR izra unate su upotrebom Cramerove V statistike (koriste i program MASSKIRAnalyzer) bazirane na kontingencijskoj tablici prisutnosti /odsutnosti gena (136),

		Alel / lokus i	
		Prisutan	Odsutan
Alel / lokus j	Prisutan	a	b
	Odsutan	c	d

a prema formuli:

$$Wn^* = (ad-bc) / \sqrt{((a+b)(c+d)(a+c)(b+d))}$$

Statisti ka zna ajnost vrijednosti LD-a odre ena je 2 testom s Yates-ovom korekcijom. Razina statisti ke zna ajnosti bila je: $P = 0,05$.

Haplotipovi KIR A i B određeni su dedukcijskom metodom na principu prisutnosti/odsutnosti gena KIR. Haplotip A određen je prema sadržaju uvijek istih gena: KIR3DL3-KIR2DL3-KIR2DL1-KIR2DP1-KIR3DP1-KIR2DL4-KIR3DL1-KIR2DS4-KIR3DL2. Ako su bili prisutni neki od preostalih gena: KIR2DL2, KIR2DL5, KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, haplotip je određen kao B.

Na temelju definiranog haplotipa, određeni su genotipovi KIR: AA, AB i BB. Ispitanici koji imaju samo gene haplotipa A smatraju se homozigotima za taj haplotip i određeni im je genotip AA. Ukoliko ispitanik u genotipu nema prisutan neki od gena: KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 i KIR2DS4, smatra se homozigotom za haplotip B, odnosno ima genotip BB. Ispitanici koji imaju svih 9 gena haplotipa A i neke od gena specifičnih za haplotip B smatraju se heterozigotima i određeni im je genotip AB. Genotipovi su određeni i numerirani prema prijavljenim genotipovima iz populacijskih istraživanja u AFND bazi podataka (42).

Učestalost haplotipa A (p_A) i haplotipa B (q_B) određena je prema formuli:

$$p_A = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2N} \qquad q_B = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2N}$$

pri čemu je n_{AA} , n_{AB} i n_{BB} broj ispitanika s AA, AB i BB genotipom, a N je ukupan broj ispitanika (110).

Usporedbe učestalosti gena KIR hrvatske populacije s 35 drugih populacija učinjena je Nei-ovom metodom koristeći Mega 4 program, verzija 4.0 (137). Populacije su odabrane na način da budu zastupljeni svi kontinenti (Europa, Azija, Afrika, Amerika i Australija), a prema dostupnosti objavljenih istraživačkih radova ili prema podacima u AFND bazi. Na temelju opaženih učestalosti gena KIR u svakoj od odabranih populacija kreirana je dvodimenzionalna klaster mapa pomoću programa MASSKIRAnalyzer.

Povezanost gena za receptore KIR i gena za poznate liganade HLA određena je testom: Pearsonov koeficijent korelacije (<http://www.socscistatistics.com>). Vrijednost korelacije $R = 1$ znači potpuno pozitivnu korelaciju, $R = 0$ znači da nema korelacije dok vrijednost korelacije $R = -1$ znači potpuno negativnu korelaciju. Pearson-ova statistika značajnost korelacije je $P < 0,05$.

Usporedba uestalosti gena KIR između dvije ispitivane skupine (kontrolna skupina – bolesnici, bolesnici-davatelji) rađena je χ^2 testom s Yates-ovom korekcijom (GraphPad software, QuickCalcs; www.graphpad.com). Prihvaćena razina statističke značajnosti je $P < 0,05$.

Analiza utjecaja gena KIR na ishod TKMS rađena je na nekoliko razina. Prvo je skupina od 111 bolesnika podijeljena u dvije skupine prema vrsti TKMS (srodna (N=55) i nesrodna (N=56)). Za svaku skupinu analizirani su različiti pokazatelji korelacije: broj gena KIR primatelja i davatelja; podudarnost gena, genotipa i haplotipa KIR primatelja i davatelja; podudarnost receptora KIR i liganada HLA između primatelja i davatelja.

Nakon toga slijedila je analiza utjecaja receptora KIR i njihovih liganada na ishod TKMS (preživljavanje, pojava GvHD-a, vrijeme postizanja punog kimerizma). Analiza je rađena za svaki par primatelj-davatelj u dva smjera: presađak protiv primatelja (engl. graft versus host, GvH) i primatelj protiv presatka (engl. host versus graft, HvG). Aloreaktivnost stanica NK predviđena je na temelju odnosa receptora KIR i liganada HLA primatelja i davatelja.

Analiza je provedena pomoću 3 različita, neovisna modela:

- 1) model „ligand-ligand nepodudarnost“ (engl. „KIR ligand mismatch“)
- 2) model „KIR–ligand nepodudarnost“ (engl. „missing KIR ligand“)
- 3) model „haplotip KIR nepodudarnost“ (engl. „KIR haplotype mismatch“)

Za model „ligand-ligand nepodudarnost“, postojanje liganada HLA (molekule HLA-C grupe C1 i C2, HLA-Bw4 i HLA-A3/A11) u davatelju, a koji nisu prisutni u primatelju znači

aloreaktivnost u smjeru GvH, odnosno postojanje liganada HLA u primatelju koje davatelj nema zna i aloreaktivnost u smjeru HvG.

U slučaju modela „KIR–ligand nepodudarnost“, prisutnost inhibicijskih receptora KIR (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1 i KIR3DL2) u davatelju i odsutnost odgovarajućeg liganda (HLA-C skupina C2, HLA-C skupina C1, HLA-Bw4 i HLA-A3/A11) u primatelju zna i aloreaktivnost u smjeru GvH. Obrnuto, prisutnost receptora KIR u primatelju za koji ne postoji odgovarajući ligand HLA u davatelju zna i aloreaktivnost u smjeru HvG. Aloreaktivnost je prikazana kroz broj postojećih parova iKIR/HLA (mogući broj parova 1-4) u svakom ispitaniku. Što je broj prisutnih parova iKIR/HLA manji, smatra se da je aloreaktivnost stanica NK veća.

Za model „haplotip KIR nepodudarnost“, aloreaktivnost stanica NK određena je usporedbom genotipova KIR (AA, AB ili BB) primatelja i davatelja, te prema broju aktivacijskih gena KIR. Svaki par primatelj-davatelj svrstan je prema genotipu u jednu od 4 moguće kombinacije: AA/AA, AA/Bx, Bx/AA i Bx/Bx.

Analiza utjecaja gena KIR na preživljavanje bolesnika, pojavu GvHD-a i vrijeme potrebno za postizanje punog kimerizma nakon TKMS provedena je uporabom Kaplan-Meierove analize koja uključuje izračun omjera rizika (engl. hazard ratio, HR) uz interval pouzdanosti (engl. confidence interval, CI) 95% i statističku značajnost (P) log-rank testom (MedCalc, verzija 13.1.0.0.)

Preživljavanje je mjereno od dana TKMS do dana smrti ili zadnjeg dana praćenja bolesnika.

Granica do koje se GvHD klasificira kao akutni oblik je unutar 100 dana od dana TKMS, a nakon toga smatra se kroničnim.

Postizanje punog kimerizma je vrijeme od dana TKMS do trenutka kada je u analizi krvi primatelja zabilježeno postojanje samo stanica davatelja.

4. REZULTATI

4.1. RAZNOVRSNOST I U ESTALOST GENA, HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI

4.1.1. U ESTALOST GENA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI

Analiza u estalosti gena KIR provedena je na uzorku hrvatske populacije (N=125). Broj ispitanika kod kojih je dokazana prisutnost pojedinog gena KIR (= broj prisutnih gena) te u estalost prikazana je u tablici 8.

Tablica 8. U estalost gena KIR u hrvatskoj populaciji (N=125)

Geni KIR	Broj prisutnih gena	U estalost %	Uo ena u estalost (Cfi)	O ekivana u estalost (Gfi)
<i>2DL4</i>	125	100	1	1
<i>3DL2</i>	125	100	1	1
<i>3DL3</i>	125	100	1	1
<i>3DL1</i>	120	96,0	0,960	0,800
<i>2DL1</i>	119	95,2	0,952	0,790
<i>2DL3</i>	119	95,2	0,952	0,790
<i>2DL2</i>	68	54,4	0,544	0,330
<i>2DL5A/B</i>	61	48,8	0,488	0,290
<i>2DS4</i>	121	96,8	0,968	0,822
<i>2DS2</i>	68	54,4	0,544	0,330
<i>3DS1</i>	41	32,8	0,328	0,180
<i>2DS1</i>	41	32,8	0,328	0,180
<i>2DS3</i>	41	32,8	0,328	0,180
<i>2DS5</i>	28	22,4	0,224	0,120
<i>3DPI</i>	125	100	1	1
<i>2DPI</i>	120	96,0	0,960	0,800

Ukupno 16 gena KIR pronađeno je u ispitivanom uzorku. Geni okvira itanja (*KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR3DP1*) prisutni su kod svih ispitanika te je njihova uestalost 100%. U skupini gena za inhibicijske receptore KIR, najuestaliji je gen *KIR3DL1* (96,0%), a slijede ga geni *KIR2DL1* (95,2%) i *KIR2DL3* (95,2%). Geni *KIR2DL2* i *KIR2DL5* prisutni su kod znatno manjeg broja ispitanika i imaju uestalost od 54,4% odnosno 48,8%. Najuestaliji gen za aktivacijske receptore KIR je gen *KIR2DS4* (96,8%), slijedi *KIR2DS2* (54,4%), zatim geni *KIR2DS1*, *KIR2DS3* i *KIR3DS1* (32,8%) dok je najmanje zastupljen gen *KIR2DS5* (22,4%). Pseudogen *KIR2DP1* ima uestalost od 96,0%.

S obzirom da raznovrsnost gena *KIR3DL1* i *KIR2DS4* obuhvaća alele koji se ispoljavaju na stanicama, ali i alele koji se ne ispoljavaju na površini stanice, izražena je uestalost tih alela u skupini ispitanika s obzirom da korištena metoda određivanja gena KIR omogućuje njihovo razlikovanje. Aleli gena *KIR3DL1* koji se ispoljavaju na stanicama (*KIR3DL1*eks* = *3DL1*001-002*, **005-009*, **015-044*, **056*, **057*) prisutni su kod 66,4% ispitanika, dok je alel *KIR3DL1*004* koji se nikad ne ispoljava na površini stanice prisutan kod 33,6% ispitanika. Gen *KIR2DS4* može imati alele potpune DNA sekvence (*KIR2DS4*f* (engl. full) = *2DS4*001-002*) kao i alele s deletiranim sekvencama (*KIR2DS4*d* (engl. deletion) = *2DS4*003-009*) koje ne ispoljavaju receptor KIR na površini stanice. Aleli gena *KIR2DS4*f* imaju uestalost od 42,4% u odnosu na 83,2% uestalosti deletiranog gena *KIR2DS4*d*. S obzirom na prisutnost određenih alela gena *KIR2DS4*, ispitanici se mogu podijeliti u 4 podskupine: 1) ispitanici koji imaju samo *KIR2DS4*f* grupu alela (13,6%); 2) ispitanici samo s *KIR2DS4*d* grupom alela (56,8%); 3) ispitanici s obje grupe alela (26,4%); 4) ispitanici bez gena *KIR2DS4* (3,2%).

4.1.2. U ESTALOST HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U HRVATSKOJ POPULACIJI

Za svakog ispitanika određeni su haplotipovi KIR prema prisutnosti/odsutnosti odgovarajućih kombinacija gena KIR. Uestalost haplotipa A u hrvatskoj populaciji iznosi 62,0% ($p_A = 0,620$), dok je uestalost haplotipa B 38,0% ($q_B = 0,380$).

Na temelju prisutnih haplotipova, u ispitivanom uzorku hrvatske populacije određeno je ukupno 23 različita genotipova KIR. Uestalost genotipa skupine AA iznosi 33,6%, skupine genotipova AB 56,8% dok je uestalost skupine genotipova BB svega 9,6%. Uestalost već u od 1% ima ukupno 10 genotipova pronađenih kod 89,6% ispitanika.

Preostalih 13 genotipova pojavljuju se samo jednom (<1%). Raznolikost genotipova KIR u hrvatskoj populaciji, identifikacijski broj genotipova (prema AFND bazi, 42) te njihove uestalosti prikazane su u tablici 9.

Naju estaliji genotip (33,6%) sadrži gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1*, *KIR3DP1* što odgovara genotipu AA1. To je ujedno i jedini genotip skupine AA u ispitivanom uzorku.

Genotipovi skupine AB sadrže 10-16 gena KIR, dok genotipovi skupine BB sadrže 8-15 gena KIR. Me u genotipovima skupine AB u slijedu po uestalosti su genotipovi AB5 (14,4%), AB4 (12,8%), AB2 (8,0%), AB7 (6,4%). Genotip koji sadrži svih 16 gena KIR, AB6, ima u estalost od 4,8% kao i genotip AB3. Genotip AB8 prisutan je kod samo dva ispitanika (1,6%) dok je od preostalih 5 genotipova ove skupine svaki prisutan kod samo jednog ispitanika (0,8%).

Me u genotipovima skupine BB, genotipovi BB71 i BB72 prisutni su kod dva ispitanika svaki (1,6%), dok je preostalih 8 genotipova iz te skupine prona eno kod po jednog ispitanika.

Svi genotipovi definirani u ovoj kontrolnoj skupini su ve prona eni u drugim ispitivanim populacijama i prijavljeni u AFND bazu podataka.

Tablica 9. U estalost genotipova KIR u hrvatskoj populaciji (N=125)

KIR 3DL 1	KIR 2DL 1	KIR 2DL 3	KIR 2DS 4	KIR 2DL 2	KIR 2DL 5	KIR 3DS 1	KIR 2DS 1	KIR 2DS 2	KIR 2DS 3	KIR 2DS 5	KIR 2DL 4	KIR 3DL 2	KIR 3DL 3	KIR 2DP 1	KIR 3DP 1	Genotip grupa / ID*	Broj ispitanika	U estalost %
Red	Red	Red	Green	White	White	White	White	White	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AA / 1	42	33,6
Red	Red	Red	Green	White	Red	Green	Green	White	White	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 2	10	8,0
Red	Red	Red	Green	Red	White	White	White	Green	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 3	6	4,8
Red	Red	Red	Green	Red	Red	White	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 4	16	12,8
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 5	18	14,4
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 6	6	4,8
Red	Red	Red	Green	White	Red	White	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 7	8	6,4
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 8	2	1,6
Red	Red	Red	Green	Red	Red	White	White	Green	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 13	1	0,8
Red	Red	Red	Green	White	White	Green	White	White	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 14	1	0,8
Red	Red	Red	Green	White	White	White	White	Green	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 15	1	0,8
Red	Red	Red	Green	White	Red	White	White	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 35	1	0,8
Red	Red	Red	Green	White	Red	White	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 36	1	0,8
White	Red	Red	White	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 68	1	0,8
White	Red	Red	White	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 70	1	0,8
Red	Red	White	Green	Red	Red	White	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 71	2	1,6
Red	White	White	Green	Red	White	White	White	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 72	2	1,6
White	White	White	White	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 74	1	0,8
Red	White	White	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 76	1	0,8
White	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 87	1	0,8
White	Red	Red	White	Red	Red	Green	Green	Green	Green	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 159	1	0,8
Red	White	Red	Green	Red	White	White	White	Green	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 240	1	0,8
Red	White	Red	Green	Red	White	White	Green	Green	White	White	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 391	1	0,8

Legenda: redosljed gena KIR u tablici u skladu je s redosljedom u AFND bazi podataka. Definiranim genotipovima dodijeljeni su odgovaraju i AFND identifikacijski brojevi (ID*). ■ Geni za inhibicijske receptore KIR ■ Geni za aktivacijske receptore KIR ■ Pseudogeni KIR Gen KIR nije prisutan

4.1.3. NERAVNOTEŽA UDRUŽIVANJA GENA KIR

Za 12 gena KIR, LD je izra unat odre ivanjem prisutnosti ili odsutnosti parova gena KIR. Vrijednosti LD-a za gene okvira itanja (KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 i KIR3DP1) nisu izra unate s obzirom da su prisutni u svim genotipovima i nalaze se u uravnoteženom odnosu sa svim ostalim genima KIR. Dobivene vrijednosti LD-a i statisti ka zna ajnost povezanosti gena KIR prikazane su u tablici 10. Ve ina gena KIR ne nalazi se u LD-u ili je on tek slabo pozitivan. Iz tablice 10 je vidljivo da 14 parova gena KIR ima pozitivan i statisti ki zna ajan LD.

Vrlo snažno udruživanje prisutno je izme u 4 para gena KIR (LD:0,8907-1) :

KIR2DS2 : KIR2DL2

KIR2DS1 : KIR3DS1

KIR2DP1 : KIR2DL1

KIR2DS4 : KIR3DL1

Slabiji, ali ipak zna ajan pozitivan LD postoji kod preostalih 10 parova (LD : 0,5577-0,7684):

KIR2DS5 : KIR2DS1

KIR2DS1 : KIR2DL5

KIR2DS5 : KIR3DS1

KIR2DL3 : KIR2DL1

KIR2DP1 : KIR2DL3

KIR2DS3 : KIR2DS2

KIR2DS3 : KIR2DL5

KIR2DS3 : KIR2DL2

KIR3DS1 : KIR2DL5

KIR2DS5 : KIR2DL5

Tako er je uo en snažan negativan, statisti ki zna ajan LD izme u nekoliko parova gena KIR (LD: -0,2597 do -0,2970):

KIR3DS1 : KIR3DL1

KIR3DS1: KIR2DS4

KIR2DS1 : KIR3DL1

KIR2DS1 : KIR2DS4

KIR2DS5: KIR3DL1

Kada se usporede izra unate vrijednosti udruživanja gena KIR s pozicijama u centromernoj i telomernoj regiji haplotipa, može se zaklju iti da je LD snažan izme u gena KIR centromerne regije (*KIR3DL3, KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL2, KIR2DL5B, KIR2DS3 i KIR2DL1*) kao i izme u gena KIR telomerne regije (*KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DL5A, KIR2DS5, KIR2DS1, KIR2DS4 i KIR3DL2*), dok je LD izme u gena centromerne i gena telomerne regije vrlo slab. Zapravo možemo govoriti o snažnom LD izme u gena KIR koji pripadaju haplotipu A, odnosno gena KIR koji pripadaju haplotipu B.

Tablica 10. Analiza neravnoteže udruživanja (LD) gena KIR u hrvatskoj populaciji (N=125)

Geni KIR	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
3DL1	#															
2DL1	0,14474 NS	#														
2DL3	0,14474 NS	0,64972 <0,001	#													
2DS4	0,89075 <0,001	0,17147 NS	0,17147 NS	#												
2DL2	0,18906 NS	0,20799 NS	0,20799 NS	0,16841 NS	#											
2DL5	-0,2117 NS	0,06793 NS	0,08248 NS	0,18857 NS	0,47212 <0,001	#										
3DS1	0,29703 <0,005	0,00519 NS	0,00519 NS	0,26458 <0,025	0,18648 NS	0,67819 <0,001	#									
2DS1	0,29164 <0,01	0,08117 NS	0,00129 NS	0,25977 <0,025	0,16671 NS	0,65728 <0,001	0,9085 <0,001	#								
2DS2	0,18906 NS	0,20799 NS	0,20799 NS	0,16841 NS	1 <0,001	0,47212 <0,001	0,18648 NS	0,16671 NS	#							
2DS3	0,12162 NS	0,15561 NS	0,00519 NS	-0,0693 NS	0,56725 <0,001	0,7127 <0,001	0,26191 <0,01	0,21176 <0,05	0,56725 <0,001	#						
2DS5	0,28153 <0,01	0,05799 NS	0,05799 NS	-0,2289 NS	0,07241 NS	0,55778 <0,001	0,74137 <0,001	0,7684 <0,001	0,07241 NS	0,04258 NS	#					
2DP1	0,16629 NS	0,90907 <0,001	0,71803 <0,001	0,19452 NS	0,18906 NS	0,03438 NS	0,03397 NS	0,03024 NS	0,18906 NS	0,14144 NS	0,08542 NS	NA NS	NA NS	NA NS	#	

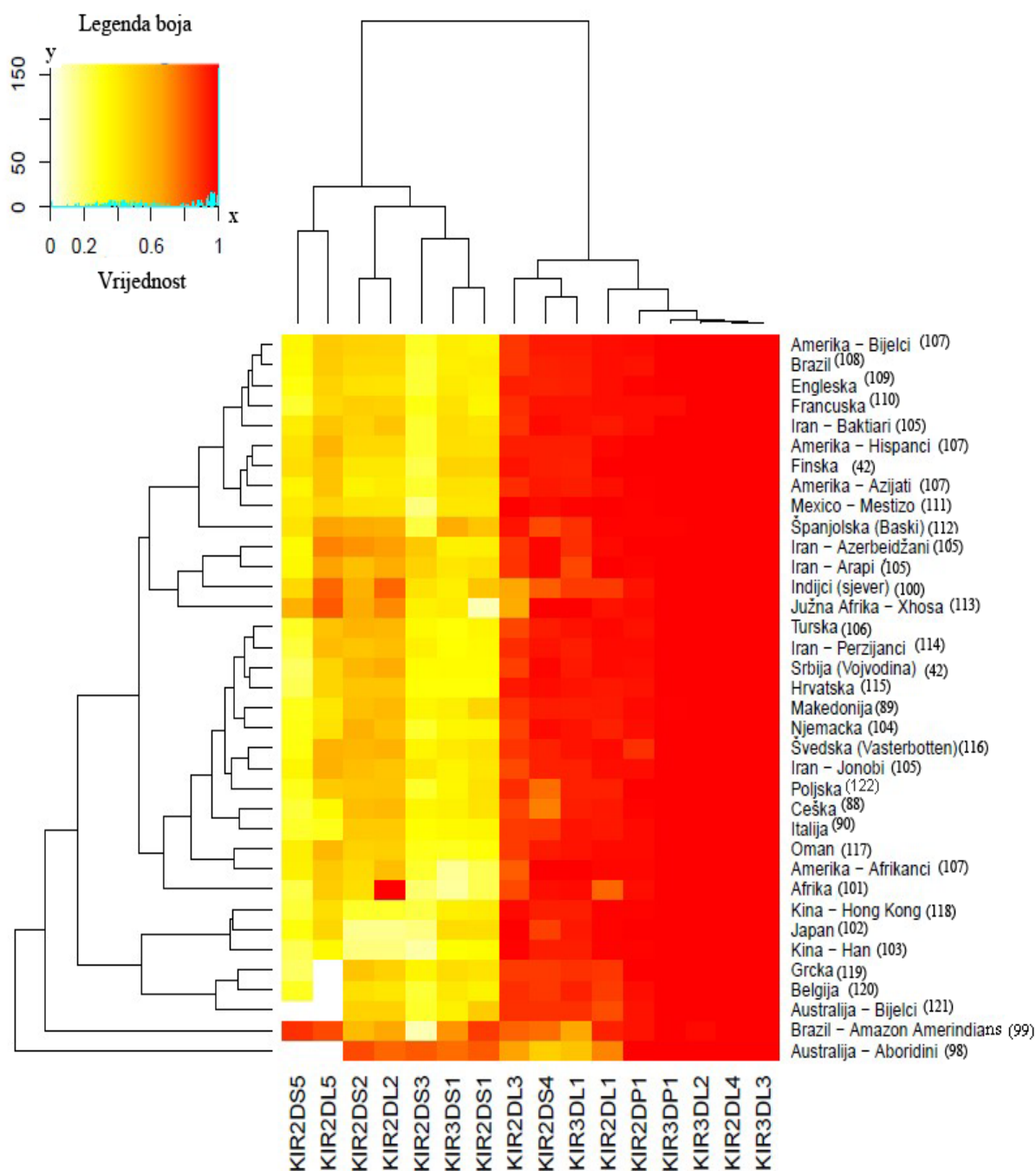
Legenda: boje označavaju snagu LD-a : crvena – vrlo snažan; narančasta – srednje snažan; siva – slab; bijela – nisu u LD-u; NS – nije statistički značajno

4.1.4. USPOREDBA U ESTALOSTI GENA KIR S U ESTALOSTIMA U DRUGIM POPULACIJAMA. GENETSKA UDALJENOST

Usporedba u estalosti gena KIR u hrvatskoj populaciji s u estalostima u 35 drugih populacija prikazane su na slici 23. Dvodimenzionalna klaster mapa, bazirana na opaženim u estalostima gena KIR unutar navedenih populacija, u prvoj dimenziji (os X) jasno dijeli gene KIR u dva klastera. Geni desnog klastera pripadaju haplotipu A, dok geni lijevog klastera pripadaju haplotipu B. Ovakva podjela odgovara prethodno navedenim snažnim vrijednostima LD-a gena KIR unutar centromerne odnosno telomerne regije haplotipova, a vrlo slabog LD-a između ove dvije regije. Iz mape je također vidljivo da svi geni klastera haplotipa A imaju značajno veće u estalost u populacijama u odnosu na gene klastera haplotipa B.

U drugoj dimenziji (os y) populacije su podijeljene u 3 velika klastera na temelju međusobnih sličnosti/razlika u vrijednostima u estalosti gena KIR. Zanimljivo je da se dva od tri klastera odnose na samo dvije populacije: jedan klaster između Australijski Aboridžini (98), a drugi Amazonski Amerindijanci (99). Razlog odskakanja ove dvije populacije je manja u estalost gena haplotipa A, a značajno visoka u estalost gena haplotipa B (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* i *KIR3DS1*) koja je uglavnom veća od 80% dok je u većini drugih populacija taj raspon između 35-55%. Treći klaster je podijeljen na jedan manji i jedan veći klaster, a razlika je također u omjeru u estalosti gena KIR haplotipa B. Manji klaster između populacije Japana (102) i Kine (103, 118) gdje je u estalost navedenih gena za aktivacijske receptore KIR u rasponu od samo 10-20%. Veći klaster između ostale populacije, podijeljene opet u dva manja klastera gdje su razlike u estalostima gena za aktivacijske i inhibicijske receptore KIR znatno manje.

U estalost gena KIR određena za hrvatsku populaciju ne odstupa od vrijednosti u estalosti gena KIR u susjednim populacijama. Genetska udaljenost populacije Hrvatske na temelju u estalosti gena KIR najmanja je s populacijama Srbije (42), Irana (105) i Turske (106) te s populacijama Makedonije (89) i Njemačke (104). Značajne razlike postoje u usporedbi sa udaljenim populacijama.



Legenda: na temelju u estalosti, geni KIR su grupirani u hijerarhijske klastere na osi x, a populacije na osi y su grupirane na temelju sli njih vrijednosti u estalosti gena KIR. Raznolikost u u estalostima gena KIR prikazana je skalom boja 0-1 koja odgovara vrijednostima u estalosti gena KIR u danoj populaciji. Bijelo su geni koji za danu populaciju nisu određeni. Uz ime svake populaciju je broj koji označava redni broj istraživačkog rada u popisu literature ove doktorske disertacije.

Slika 23. Usporedba u estalosti gena KIR u hrvatskoj populaciji s u estalostima u drugim populacijama. Dvodimenzionalna klaster mapa

4.1.4. KORELACIJA PRISUTNOSTI GENA ZA AKTIVACIJSKE I INHIBICIJSKE RECEPTORE KIR I PRISUTNOSTI PRIPADAJU IH LIGANADA HLA

Svi ispitanici zdrave kontrolne skupine tipizirani su za alele lokusa HLA-A, -B i -C na temelju gena je izra unata u estalost liganada HLA. Na temelju odre enih alela HLA-C i njihovoj epitopskoj pripadnosti grupi C1 ili C2, svaki ispitanik je definiran kao C1/C2 heterozigot ili homozigot C1/C1 odnosno C2/C2. U estalost alela grupe C1 u ispitivanoj skupini je 59,0%, dok je u estalost alela grupe C2 41,0%. Ve ina ispitanika su heterozigoti, C1/C2 (52,0%), dok ostali pripadaju skupini C1/C1 (33,6%) ili C2/C2 (14,4%). U estalost alela skupine HLA-Bw4 u ispitivanoj skupini iznosi 51,2%. U estalost alela HLA-A3 iznosi 11,2%, a alela HLA-A11 5,2%.

Korelacija prisutnosti gena za receptore KIR i prisutnosti njihovih poznatih liganada HLA prikazana je u tablici 11. Geni za receptore KIR s najve im brojem prisutnih liganada su *KIR2DL3* (C1+C2(C*02:02; C*05:01), 87,2%) i *KIR2DL1* (C2, 64,8%). Oni ujedno imaju i jedini statisti ki zna ajnu pozitivnu korelaciju KIR/HLA ($R=0,26$, $P=0,006$, $P=0,019$). Pozitivna korelacija ($R=0,31$) postoji i za gen *KIR3DL2* i pripadaju e ligande HLA-A3/A11. Uo eno je da *KIR3DL2*, koji kao gen okvira itanja ima u estalost od 100% u populaciji, u kombinaciji je s HLA-A3/A11 u samo 31,2% slu ajeva. Ostali parovi KIR/HLA u tablici su u negativnoj korelaciji koja je najizraženija kod para *KIR2DS1/C2* ($R= -0,37$). Gledaju i ukupnu korelaciju ispitivanih parova KIR/HLA ($R= -0,13$), može se zaklju iti da je povezanost gena KIR i gena HLA vrlo slaba.

S obzirom na inhibicijske receptore KIR (iKIR) i njihove poznate ligande HLA, broj takvih parova iKIR/HLA kod svake osobe može biti u rasponu od jedan do etiri. Najve i broj ispitanika sadrži tri para iKIR/HLA (44,8%), dok najmanji broj ispitanika ima samo jedan par iKIR/HLA (4,8%). Broj i vrsta kombinacija inhibicijskih receptora KIR i liganada HLA u ispitivanoj skupini navedeni su u tablici 12.

Tablica 11. Korelacija prisutnosti gena KIR i u estalosti gena njihovih poznatih liganada HLA za funkcionalno dokazane parove KIR/HLA.

KIR / HLA	KIR3DL2 A*03/A*11	KIR3DL1*eks Bw4	KIR2DL2 C1 + C2(C*02:02; C*05:01)	KIR2DL3 C1 + C2 (C*02:02; C*05:01)	KIR2DL1 C2	KIR2DS1 C2	KIR2DS4*f A*11; C1 (C*01, *14, *16); C2 (C*02, *04, *05)
+/+	39 (31,2%)	65 (52,0%)	62 (49,6%)	109 (87,2%)	81 (64,8%)	25 (20,0%)	33 (26,4%)
+/-	86 (68,8%)	18 (14,4%)	5 (4,0%)	10 (8,0%)	38 (30,4%)	16 (12,8%)	20 (16,0%)
-/+	0 (0%)	35 (28,0%)	54 (43,2%)	5 (4,0%)	2 (1,6%)	58 (46,4%)	45 (36,0%)
-/-	0 (0%)	7 (5,6%)	4 (3,2%)	1 (0,8%)	4 (3,2%)	26 (20,8%)	27 (21,6%)
R	0,31	- 0,03	- 0,15	0,26	0,26	- 0,37	- 0,27
P	0,054	0,818	0,2406	0,006	0,019	0,068	0,1418

Legenda: U tablici je prikazan broj parova KIR/HLA za svaku od etiri navedene kombinacije (+/+, +/-, -/+ i -/-) te njihov postotak. Na temelju prisutnosti gena KIR i gena HLA provedena je analiza korelacije (R) za svaki par KIR/HLA i statistička značajnost (P) povezanosti gena KIR i gena HLA. R = Pearson-ov koeficijent korelacije; P = Pearson-ova statistička značajnost korelacije

Tablica 12. Broj i kombinacije inhibicijskih receptora KIR i liganada HLA u ispitanika reprezentativne skupine hrvatske populacije (N=125)

Broj parova iKIR/HLA	Kombinacije: receptor KIR/ligand HLA	Broj ispitanika/(%)
1	2DL1+C2 2DL3+C1 2DL2/3+C1	6 (4,8%)
2	2DL1+C2 3DL1+Bw4 2DL2/3+C1 3DL1+Bw4 2DL1+C2 2DL2/3+C1 2DL3+C1 3DL1+Bw4 2DL2/3+C1 3DL2+A3/11 2DL2+C1 3DL1+Bw4 2DL1+C2 2DL3+C1 2DL3+C1 3DL2+A3/11 2DL2+C1 3DL2+A3/11 2DL1+C2 3DL2+A3/11	51 (40,8%)
3	2DL1+C2 2DL2/3+C1 3DL1+Bw4 2DL1+C2 2DL3+C1 3DL1+Bw4 2DL3+C1 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL3+C1 3DL2+A3/11 2DL2/3+C1 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL2+C1 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL3+C2* 3DL1+Bw4	56 (44,8%)
4	2DL1+C2 2DL3+C1 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL2/3+C1 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL3+C2* 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11 2DL1+C2 2DL2/3+C2* 3DL1+Bw4 3DL2+A3/11	12 (9,91%)

Legenda: iKIR – inhibicijski KIR; C2* - HLA-C*02:02 i C*05:01

4.2. RAZNOVRSNOST I U ESTALOST GENA, HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA

4.2.1. U ESTALOST GENA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH SRODNOM I NESRODNOM TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA. USPOREDBA S U ESTALOSTIMA GENA KIR KONTROLNE SKUPINE

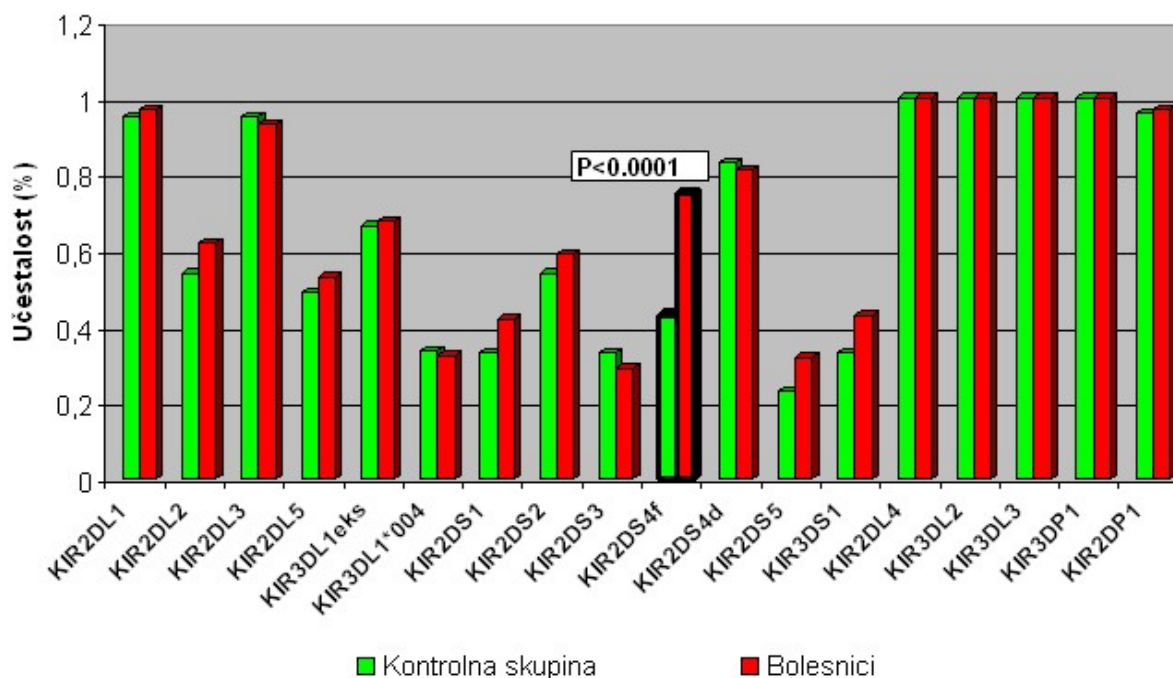
Analiza u estalosti gena KIR (tablica 13) provedena je na uzorku od 111 bolesnika oboljelih od malignih bolesti krvotvornog sustava koji su lije eni TKMS-om.

Tablica 13. U estalost gena KIR u bolesnika lije enih transplantacijom krvotvornih mati nih stanica od srodnog ili nesrodnog davatelja (N=111)

Geni KIR	Broj prisutnih gena	U estalost %	Opažena u estalost (Cfi)	O ekivana u estalost (Gfi)
<i>2DL4</i>	111	100	1	1
<i>3DL2</i>	111	100	1	1
<i>3DL3</i>	111	100	1	1
<i>2DL1</i>	107	96,4	0,964	0,810
<i>2DL3</i>	103	92,8	0,928	0,730
<i>3DL1</i>	102	91,8	0,918	0,720
<i>2DL2</i>	69	62,1	0,621	0,390
<i>2DL5A/B</i>	59	53,1	0,531	0,320
<i>2DS4</i>	104	93,7	0,937	0,750
<i>2DS2</i>	65	58,5	0,585	0,360
<i>3DS1</i>	48	43,2	0,432	0,250
<i>2DS1</i>	47	42,3	0,423	0,240
<i>2DS5</i>	35	31,5	0,315	0,170
<i>2DS3</i>	32	28,8	0,288	0,160
<i>3DPI</i>	111	100	1	1
<i>2DPI</i>	107	96,4	0,964	0,810

Kao i u kontrolnoj skupini, u ispitivanoj skupini bolesnika pronađeno je ukupno 16 gena KIR, a geni okvira itanja prisutni su kod svih ispitanika. Najuestaliji inhibicijski gen je KIR2DL1 (96,4%), a aktivacijski KIR2DS4 (93,7%). Aleli gena *KIR2DS4*f* imaju u estalost od 74,8%, a u estalost deletiranog gena *KIR2DS4*d* iznosi 81,1%. S obzirom na prisutnost određenih alela gena *KIR2DS4*, ispitivana skupina bolesnika također je podijeljena u 4 podskupine: 1) ispitanici koji imaju samo *KIR2DS4*f* grupu alela (12,6%); 2) ispitanici samo s *KIR2DS4*d* grupom alela (18,9%); 3) ispitanici s obje grupe alela (62,2%); 4) ispitanici bez gena *KIR2DS4* (7,2%). Aleli gena *KIR3DL1* koji se ispoljavaju na stanicama (*KIR3DL1*eks* = *3DL1*001-002, *005-009, *015-044, *056, *057*) prisutni su kod 67,6% bolesnika, dok je alel *KIR3DL1*004* koji se nikad ne izražava na površini stanice prisutan kod 32,4% bolesnika.

Usporedba u estalosti gena KIR u ispitivanoj skupini bolesnika s kontrolnom skupinom (slika 24) daje približno iste vrijednosti u estalosti za većinu gena KIR. Nešto veća u estalost aktivacijskih gena *KIR2DS1*, *KIR2DS5* i *KIR3DS1* postoji u skupini bolesnika, ali razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nije statistički značajna ($P=0,1399$; $P=0,1404$; $P=0,1078$). Jedina statistički značajna razlika ($P<0,0001$) postoji za gen *KIR2DS4*f* koji je u znatno većem postotku (74,8%) prisutan u ispitivanoj skupini bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (42,4%).



Slika 24. Grafički prikaz usporedbe u estalosti gena KIR u bolesnika liječenih srodnom i nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica s u estalostima u kontrolnoj skupini

4.2.2. U ESTALOST LIGANADA HLA - USPOREDBA S KONTROLNOM SKUPINOM

Svim bolesnicima iz ispitivane skupine izra unata je u estalost liganada HLA na temelju tipizacijom odre enih alela HLA-A, -B i -C. Analiza u estalosti liganada HLA u skupini bolesnika ne pokazuje statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedba u estalosti liganada HLA u skupini bolesnika s kontrolnom skupinom kao i omjer homozigota C1/C1 i C2/C2 odnosno heterozigota C1/C2 prikazana je u tablici 14.

Tablica 14. Usporedba u estalosti liganada HLA u skupini bolesnika s kontrolnom skupinom

KIR ligandi	U estalost u skupini bolesnika (N=111) (%)	U estalost u kontrolnoj skupini (N=125) (%)	Statisti ka zna ajnost (P)
HLA-A3	7,6	11,2	0,186
HLA-A11	9,0	5,2	0,131
HLA-Bw4	43,3	51,2	0,093
HLA-C grupa C1	55,0	59,0	0,129
HLA-C grupa C2	45,0	41,0	0,890
C1/C1	32,4	33,6	0,891
C1/C2	45,1	52,0	0,299
C2/C2	22,5	14,4	0,131

4.2.3. U ESTALOST HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR U BOLESNIKA LIJE ENIH SRODNOM I NESRODNOM TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA. USPOREDBA S U ESTALOSTIMA HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA KIR KONTROLNE SKUPINE

Prema prisutnosti/odsutnosti gena KIR u ispitivanoj skupini bolesnika, izra unata u estalost haplotipa A iznosi 54,1% ($p_A = 0,541$), dok je u estalost haplotipa B 45,9% ($q_B = 0,459$). Ne postoji statisti ki zna ajna razlika u estalosti haplotipova KIR izme u kontrolne skupine i skupine bolesnika.

U ispitivanom uzorku bolesnika odre eno je ukupno 25 razli itih genotipova KIR. U estalost genotipova skupine AA iznosi 24,3%, genotipova skupine AB 58,5% dok je u estalost genotipova skupine BB 17,2%. Za nijednu skupinu genotipova ne postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kontrolne skupine i skupine bolesnika.

U estalost ve u od 1% ima 16 genotipova prona enih kod 91,9% ispitanika. Preostalih 9 genotipova pojavljuju se samo jednom (<1%). Jedan od genotipova skupine BB prona en u ispitivanom uzorku je novootkriveni genotip koji do sada nije prijavljen u AFND bazu podataka. Nakon prijave dodijeljen mu je identifikacijski broj BB/546.

Raznolikost genotipova KIR kod bolesnika lije enih TKMS-om, klasifikacija genotipova u grupe s identifikacijskim brojem (prema AFND bazi, 42) te njihove u estalosti prikazane su u tablici 15. U odnosu na kontrolnu skupinu, 8 razli itih genotipova (2 AB i 6 BB) odre enih u kontrolnoj skupini nije prona eno u skupini bolesnika, dok je 10 genotipova (1 AA, 2 AB i 7 BB) odre eno u skupini bolesnika, ali ne i u kontrolnoj skupini.

Tablica 15. U estalost genotipova KIR u bolesnika lije enih transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=111)

KIR 3DL 1	KIR 2DL 1	KIR 2DL 3	KIR 2DS 4	KIR 2DL 2	KIR 2DL 5	KIR 3DS 1	KIR 2DS 1	KIR 2DS 2	KIR 2DS 3	KIR 2DS 5	KIR 2DL 4	KIR 3DL 2	KIR 3DL 3	KIR 2DP 1	KIR 3DP 1	Genotip grupa / ID*	Broj ispitanika	U estalost %
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	AA / 1	27	24,3
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	AA / 156	1	0,9
Red	Red	Red	Green		Red	Green	Green			Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 2	7	6,3
Red	Red	Red	Green	Red				Green			Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 3	11	9,9
Red	Red	Red	Green		Red				Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 4	17	15,3
Red	Red	Red	Green		Red				Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 5	9	8,1
Red	Red	Red	Green			Green	Green			Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 6	6	5,4
Red	Red	Red	Green						Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 7	6	5,4
Red	Red	Red	Green		Red			Green			Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 8	2	1,8
Red	Red	Red	Green	Red					Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 13	2	1,8
Red	Red	Red	Green			Green					Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 14	1	0,9
Red	Red	Red	Green						Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 15	2	1,8
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green			Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 18	1	0,9
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 31	1	0,9
Red	Red	Red	Green	Red		Green	Green	Green		Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 68	2	1,8
Red	Red	Red	Green		Red						Red	Red	Red	Grey	Grey	AB / 69	2	1,8
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 70	2	1,8
Red	Red	Red	Green	Red					Green		Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 71	2	1,8
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 72	3	2,7
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 73	2	1,8
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 90	1	0,9
Red	Red	Red	Green	Red		Green	Green			Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 167	1	0,9
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 188	1	0,9
Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green		Green	Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 392	1	0,9
Red	Red	Red	Green								Red	Red	Red	Grey	Grey	BB / 546 [#]	1	0,9

Legenda: redosljed gena KIR u tablici u skladu je s redosljedom u AFND bazi podataka. Definiranim genotipovima dodijeljeni su odgovaraju i AFND identifikacijski brojevi (ID*). ■ Geni za inhibicijske receptore KIR ■ Geni za aktivacijske receptore KIR ■ Pseudogeni KIR ■ Gen KIR nije prisutan. [#] Novi genotip.

4.3. ANALIZA ULOGE GENA KIR U SRODNOJ I NESRODNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA

Op e i klini ke karakteristike bolesnika lije enih TKMS od srodnog ili nesrodnog davatelja prikazane su u tablici 16. Kako bi se ispitaio utjecaj podudarnosti gena/genotipova KIR primatelja i davatelja kao i kombinacije receptor KIR/ligand HLA na parametre ishoda TKMS, provedena je analiza gena KIR i liganada HLA bolesnika i njihovih davatelja.

Tablica 16. Klini ke i op e karakteristike skupine ispitanika lije enih srodnom ili nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja.

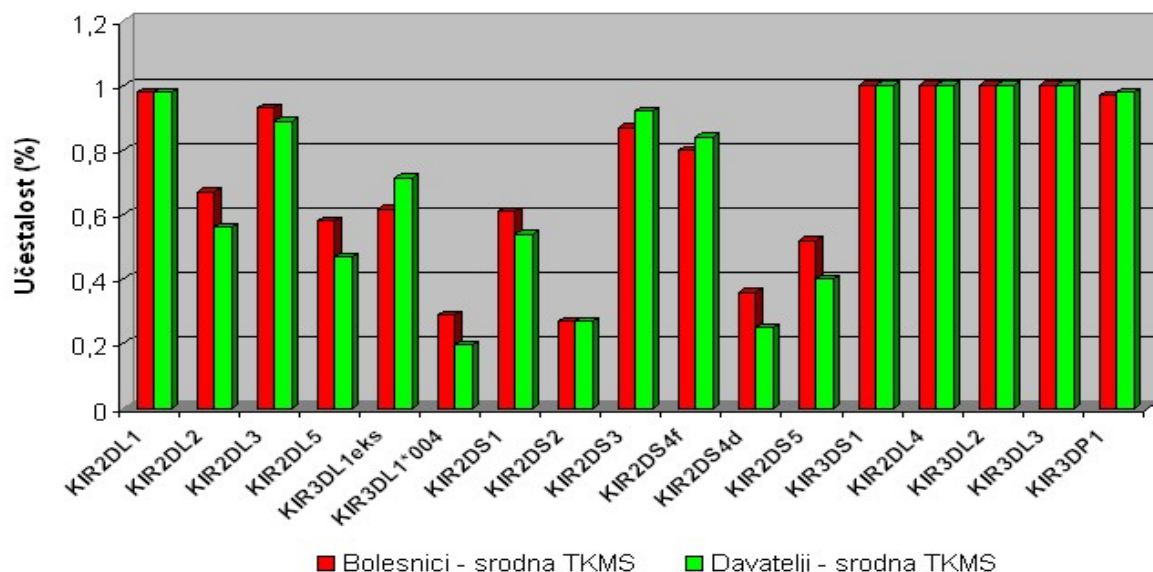
Karakteristike ispitivane skupine bolesnika	Srodna TKMS	Nesrodna TKMS
Broj bolesnika	55	56
Dob bolesnika: godine, medijan (raspon)	27 (1-61)	40 (1-61)
Dob davatelja: godine, medijan (raspon)	30 (1-69)	31,5 (1-52)
Spol - bolesnik/davatelj: broj (%)		
Ž/Ž	7 (12,7)	11 (19,6)
Ž/M	13 (23,6)	12 (21,5)
M/Ž	15 (27,3)	15 (26,8)
M/M	20 (36,4)	18 (32,1)
Dijagnoza: broj (%)		
Akutna mijeloi na leukemija (AML)	17 (30,9)	24 (42,8)
Kroni na mijeloi na leukemija (CML)	3 (5,4)	3 (5,4)
Mijelodisplastini sindrom (MDS)	4 (7,3)	3 (5,4)
Akutna limfati na leukemija (ALL)	17 (30,9)	11 (19,6)
Kroni na limfati na leukemija (CLL)	1 (1,8)	3 (5,4)
Non-Hodgkin limfom (NHL)	4 (7,3)	5 (8,9)
Hodgkinov limfom (HL)	5 (9,1)	2 (3,6)
Ostalo	4 (7,3)	5 (8,9)
Protokol kondicioniranja: broj (%)		
Mijeloablativno	40 (72,7)	28 (50)
Nemijeloablativno	15 (27,3)	28 (50)
Izvor krvotvornih mati nih stanica: broj (%)		
Koštana srž	28 (51,0)	13 (23,2)
Periferna krv	27 (49,0)	43 (76,8)
Podudarnost gena HLA: broj (%)		
HLA 10/10	55 (100)	38 (67,8)
HLA 9/10	0 (0)	17 (30,4)
HLA 8/10	0 (0)	1 (1,8)
Vrijeme pra enja: dani, medijan (raspon)	735 (60-1490)	260 (30-1305)

4.3.1. ANALIZA ULOGE GENA KIR U SRODNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA

Od ukupno 55 bolesnika lije enih srodnom TKMS, 36 (65,5%) ih je bilo živih na kraju perioda pra enja, a 19 (34,5%) je preminulo (9 relaps; 10 posttransplantacijske komplikacije). U ispitivanoj skupini, GvHD se razvio kod 26 (47,3%) bolesnika od ega je 21 bolesnik imao akutni GvHD, a 5 bolesnika kroni ni GvHD. Puni kimerizam postignut je kod 44 bolesnika dok kod 11 bolesnika nije nikad postignut. Prosjek postizanja punog kimerizma bio je 33 dana. Na osnovu gena KIR odre enih u genotipu svakog ispitanika, pretpostavljeno je i postojanje odgovaraju ih receptora KIR na površini stanica NK koji ostvaruju interakciju s pripadaju im ligandima. U analizu o utjecaju receptora KIR na ishod TKMS uzeti su u obzir oni za koje su sa sigurnoš u dokazani ligandi HLA: KIR2DL1 + molekule HLA-C skupine C2; KIR2DL2 / KIR2DL3 + molekule HLA-C skupine C1 i C*02:02, C*05:01 iz skupine C2; KIR3DL1 + HLA-Bw4 i KIR3DL2 + HLA-A3/A11.

4.3.1.1. Usporedba u estalosti gena, haplotipova i genotipova KIR bolesnika lije enih srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja

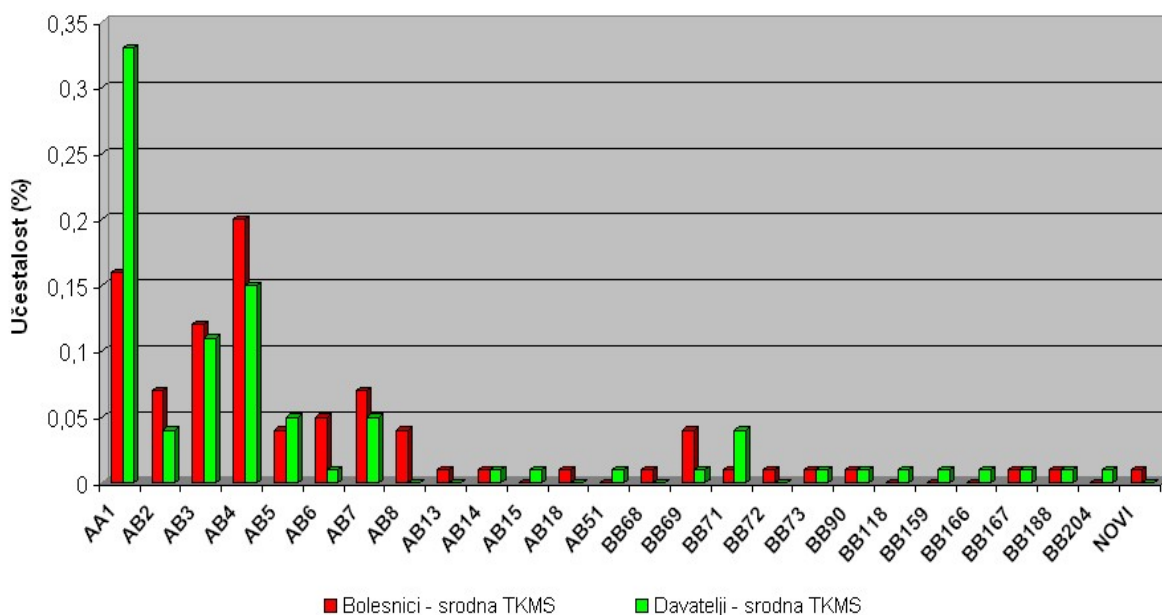
Usporedba u estalosti gena KIR bolesnika lije enih srodnom TKMS i njihovih davatelja (slika 25) nije pokazala statisti ki zna ajnu razliku za nijedan gen KIR.



Slika 25. Grafi ki prikaz usporedbe u estalosti gena KIR u bolesnika lije enih srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja (N=55)

U estalost haplotipa A kod bolesnika iznosi 49,0% dok je u estalost haplotipa B 51,0%. Kod davatelja, u estalost haplotipa A (56,3%) ve a je od u estalosti haplotipa B (43,6%). Razlika izme u u estalosti haplotipa A i haplotipa B bolesnika i davatelja ne pokazuje statisti ki zna ajnu razliku.

U skupini bolesnika lije enih srodnom TKMS, 28 (51,0%) parova ima isti genotip KIR dok se preostalih 27 (49,0%) parova razlikuje u genotipu KIR. Usporedba u estalosti genotipova bolesnika i davatelja pokazuje ve u razliku za genotipove skupine AA (16,3% naspram 32,7%, $P=0,0752$), manju za genotipove skupine AB (65,4% naspram 47,2%, $P=0,0831$) i gotovo nikakvu za genotipove skupine BB (18,3% naspram 20,0%, $P=1,000$). Od ukupno 26 razli itih genotipova prona enih kod bolesnika i njihovih davatelja (slika 26), 6 genotipova (3 AB i 3 BB) postoji samo kod bolesnika, dok je kod davatelja jedinstveno tako er 6 genotipova (2 AB i 4 BB).

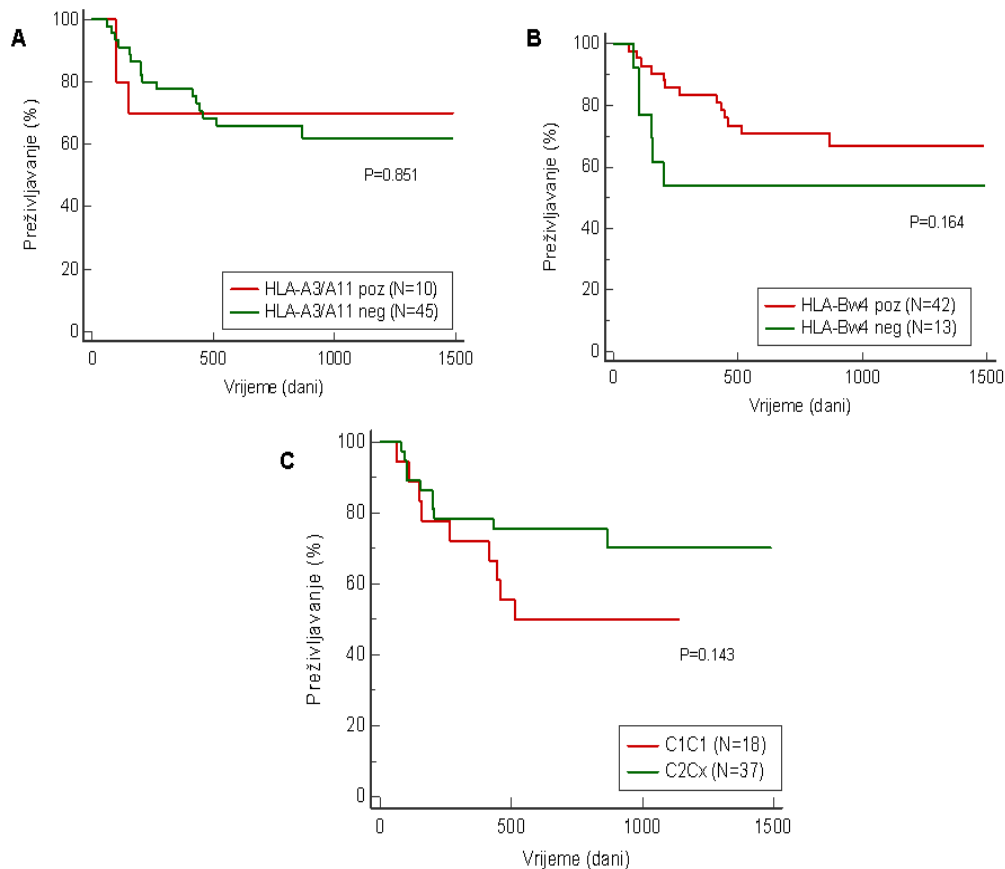


Slika 26. Grafi ki prikaz usporedbe genotipova KIR u bolesnika lije enih srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (TKMS) i njihovih davatelja (N=55)

4.3.1.2. Analiza utjecaja KIR liganada HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „ligand-ligand nepodudarnost”

Analiziran je utjecaj etiri osnovne skupine liganada HLA (molekule HLA-C skupine C1, molekule HLA-C skupine C2, HLA-Bw4 i HLA-A3/A11). Ispitivana skupina bolesnika

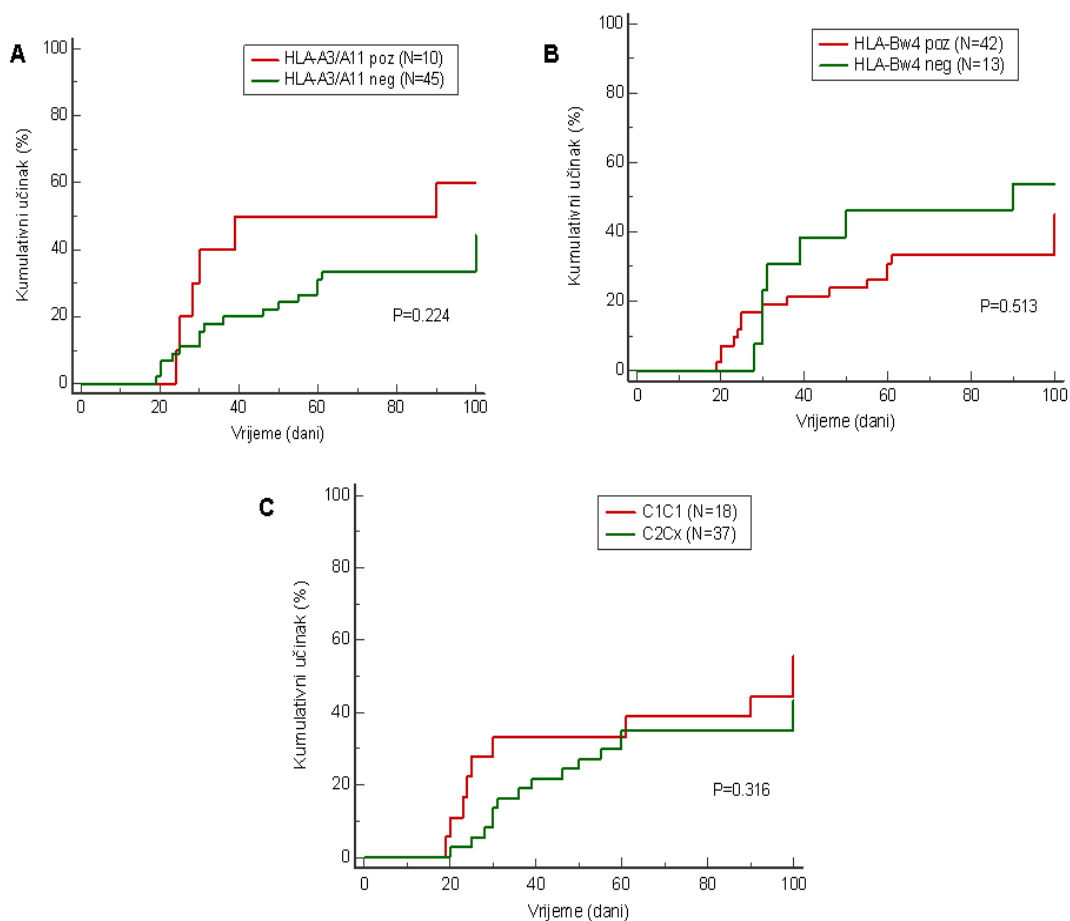
grupirana je prema prisutnosti/odsutnosti poznatih skupina liganada HLA za inhibicijske receptore KIR. Prisutnost ili odsutnost svake od četiri skupine liganada HLA zasebno nije pokazala statistički značajan utjecaj na preživljavanje bolesnika (slika 27). Ligandi HLA-A3/A11 ne pokazuju gotovo nikakvu razliku u preživljavanju kada su prisutni odnosno kada nisu. Za ligande HLA-Bw4 postoji razlika i bolje preživljavanje bolesnika koji su HLA-Bw4 pozitivni (medijan: 1110 dana; HR=1,95, CI:0,6227-6,1349) u odnosu na HLA-Bw4 negativne bolesnike (medijan: 863 dana; HR=0,51, CI: 0,1630 – 1,6059, P=0,164). Također, lošije preživljavanje je uočeno kod prisustva liganada skupine C1 u slučaju kada je bolesnik bio homozigot C1C1 (medijan: 735 dana; HR=0,51, CI: 0,1972-1,3602) u odnosu na bolesnike koji su imali i ligande skupine C2 (medijan: 1134 dana; HR=1,93, CI: 0,7352-5,0712, P=0,143).



Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

Slika 27. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) s obzirom na skupinu liganada HLA

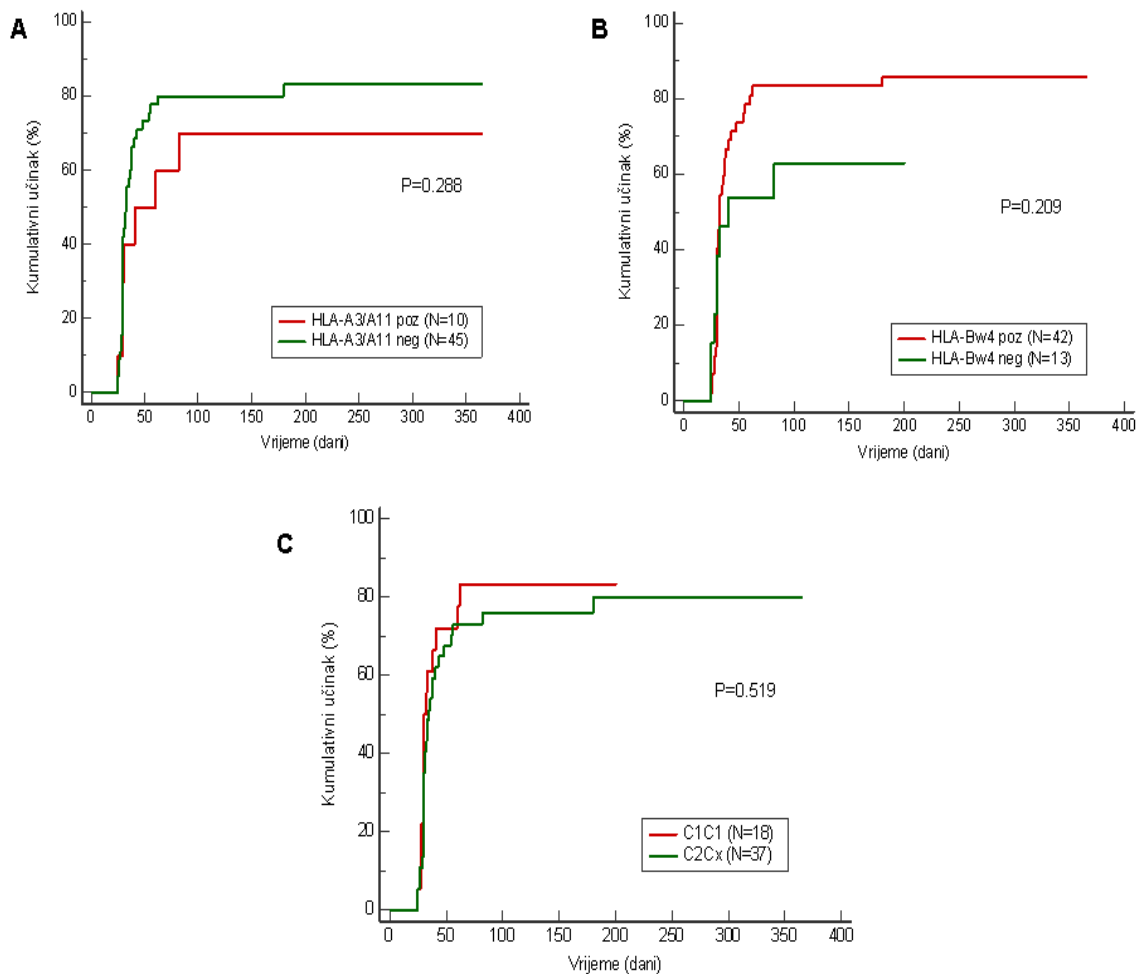
Rezultati analize utjecaja liganada HLA na pojavu GvHD-a pokazuju da ovi imbenici nisu statistički značajno povezani (slika 28). Utjecaj liganada HLA-A3/A11 pokazuje najveći razliku i smanjenu pojavu GvHD-a kod bolesnika koji su negativni za ovaj ligand (HR=1,7; CI: 0,5858 - 5,1130; P=0,224). Utjecaj liganada HLA-Bw4 je slabiji, postoji smanjena vjerojatnost pojave GvHD-a u bolesnika koji su pozitivni za ligand HLA-Bw4 (HR=1,3; CI:0,5225 - 3,3699; P=0,807). Neznatno veća pojava GvHD-a imaju ligandi skupine C1 i C2. Ono što se može vidjeti je neznatno veća pojava GvHD-a u slučaju primatelja homozigota C1C1 u odnosu na primatelje koji su C2Cx (HR=0,7; CI:0,2905 - 1,5641; P=0,316).



Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

Slika 28. Utjecaj liganada HLA na pojavu GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55)

Analiza utjecaja liganada HLA na vrijeme postizanja punog kimerizma pokazala je da nijedan od ispitivanih parametara nema statistički značajan utjecaj (slika 29). Ipak, određena razlika i bolje postizanje punog kimerizma postoji kod bolesnika koji su HLA-A3/A11 negativni (HR=1,5; CI:0,7428 - 3,0764; P=0,288) te bolesnika koji su HLA-Bw4 pozitivni (HR=1,6; CI:0,8082 - 3,1069; P=0,209). U slučaju liganada skupine C1 i C2 postoji tek neznatna razlika i bolji ishod u slučaju homozigota C1C1 (HR=1,5; CI:0,6393 - 3,4421; P=0,519).



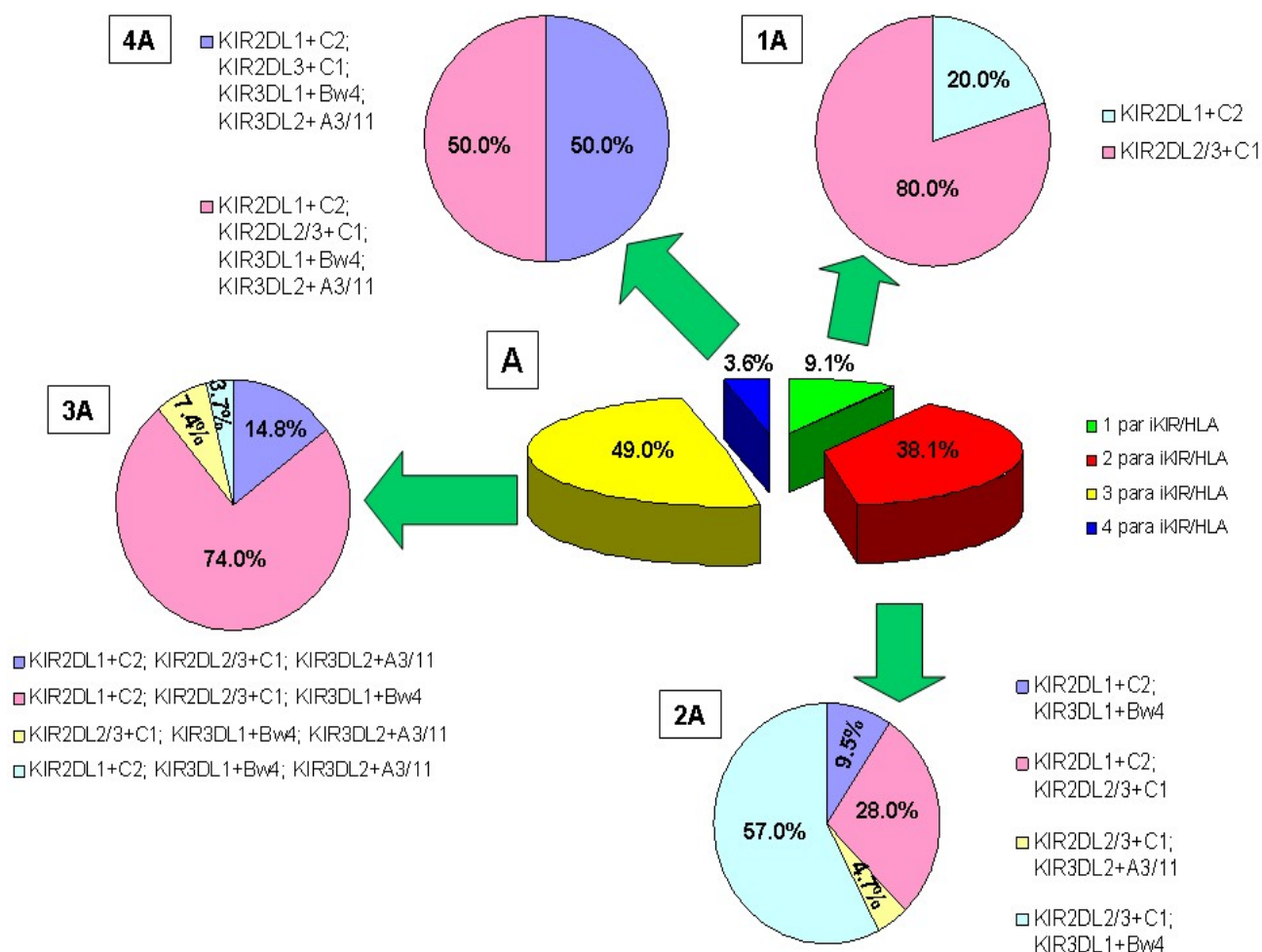
Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

Slika 29. Utjecaj liganada HLA na vrijeme postizanja punog kimerizma kod bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55)

S obzirom da su u srodnoj TKMS svi parovi bolesnik-davatelj identični u genima HLA, u estalosti liganada HLA za receptore KIR iste su kod bolesnika i kod davatelja. Tako je u estalost gena HLA-C grupe C1 57,3%, grupe C2 42,7%, broj heterozigota C1C2 49,0% te homozigota C1C1 32,7% i C2C2 18,2%. Od 55 parova bolesnika-davatelj, 10 parova (18,1%) je imalo ligand HLA-A3/A11 dok je ligand HLA-Bw4 bio prisutan kod 42 (76,4%) para. Iz tog razloga, prema modelu „ligand-ligand nepodudarnost“, s obzirom da ne postoji razlika u ligandima HLA između bolesnika i davatelja, proizlazi zaključak da će nakon TKMS svi pretpostavljeni inhibicijski receptori KIR davatelja imati svoje ligande u bolesniku i neće nastati aloreaktivne stanice s potencijalno pozitivnim učinkom na ishod TKMS.

4.3.1.3. Analiza utjecaja parova receptor KIR/ligand HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „KIR-ligand nepodudarnost“

Prema modelu „KIR-ligand nepodudarnost“ (usporedba receptor KIR-ligand HLA), za svaki par primatelj-davatelj određen je broj i vrsta postojećih kombinacija inhibicijskih receptora KIR (iKIR) i njihovih poznatih liganada HLA (KIR2DL1/C2; KIR2DL2/C1 ili KIR2DL3/C1; KIR3DL1/HLA-Bw4 i KIR3DL2/HLA-A3/A11). Najveći mogući broj postojećih parova iKIR/HLA je četiri, a najmanji jedan. S obzirom da se, bez obzira na potpunu podudarnost gena HLA, 49,0% primatelja i davatelja razlikuje u genima KIR, broj parova iKIR/ligand HLA određen je u dva smjera: smjer presađak protiv primatelja, GvH smjer (iKIR davatelja/ligand HLA primatelja) i smjer primatelj protiv presatka, HvG smjer (iKIR primatelja/ligand HLA davatelja). Razlika u broju parova iKIR/ligand HLA između ova dva smjera bila je prisutna kod samo 5 parova primatelj-davatelj i to kao posljedica nepostojanja receptora KIR za ligand HLA, a ne samog nepostojanja liganda. U GvH smjeru, utvrđeno je da kod čak 53 (96,4%) primatelja nedostaje barem jedan od četiri moguća liganda HLA za receptor KIR davatelja. Najveći broj parova primatelj-davatelj sadrži po tri iKIR/ligand HLA para (27/55, 49,0%). U estalost mogućih parova iKIR davatelja/ligand HLA primatelja te postojeće kombinacije u ispitivanoj skupini prikazane su na slici 30.

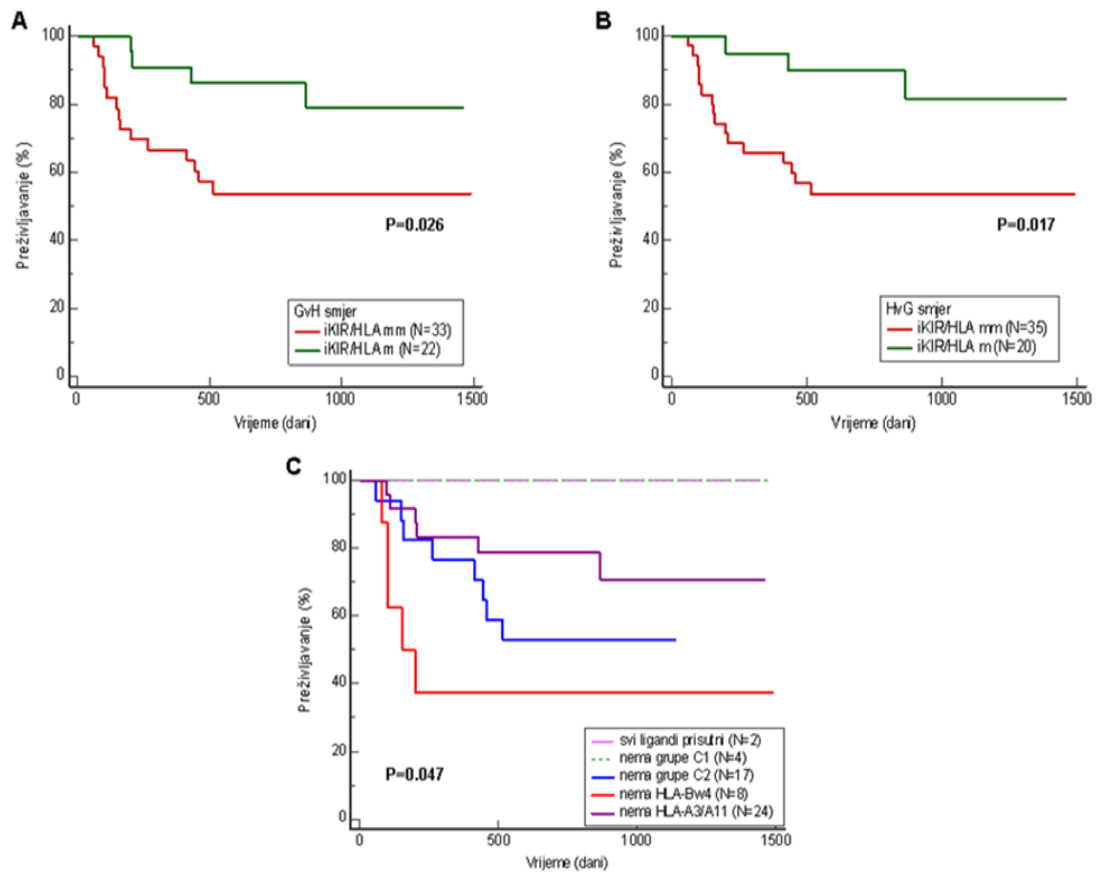


Slika 30. Broj parova iKIR davatelja/ligand HLA primatelja (A) te njihove postojeće kombinacije (1A-4A) u skupini ispitanika lije enih srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja (N=55)

Analiza utjecaja parova iKIR/HLA na pokazatelje ishoda TKMS ra ena je na na in da su parovi primatelj-davatelj koji su imali sva 4 para iKIR/HLA ili 3 para pri emu je nedostajala kombinacija KIR3DL2/HLA-A3/A11 smatrani iKIR/HLA podudarnima (iKIR/HLA m) dok su parovi primatelj-davatelj s 1, 2 ili 3 para me u kojima je nedostajala bilo koja kombinacija osim KIR3DL2/HLA-A3/A11 smatrani iKIR/HLA nepodudarnima (iKIR/HLA mm).

Analiza preživljavanja prema broju prisutnih parova iKIR/ligand HLA izme u primatelja i davatelja pokazala je statisti ki zna ajnu razliku (slika 31). U GvH smjeru (slika 31A), rezultati pokazuju statisti ki zna ajno bolje preživljavanje kada su primatelj i davatelj iKIR/HLA podudarni u odnosu na parove koji su iKIR/HLA nepodudarni (HR=3,3;

CI:1,3148 - 7,9816; P=0,026). I kod HvG smjera (slika 31B) preživljavanje je bolje kod iKIR/HLA podudarnih parova primatelj-davatelj nego kod parova koji su iKIR/HLA nepodudrani (HR=3,9; CI:1,5918 - 9,8129; P=0,017).



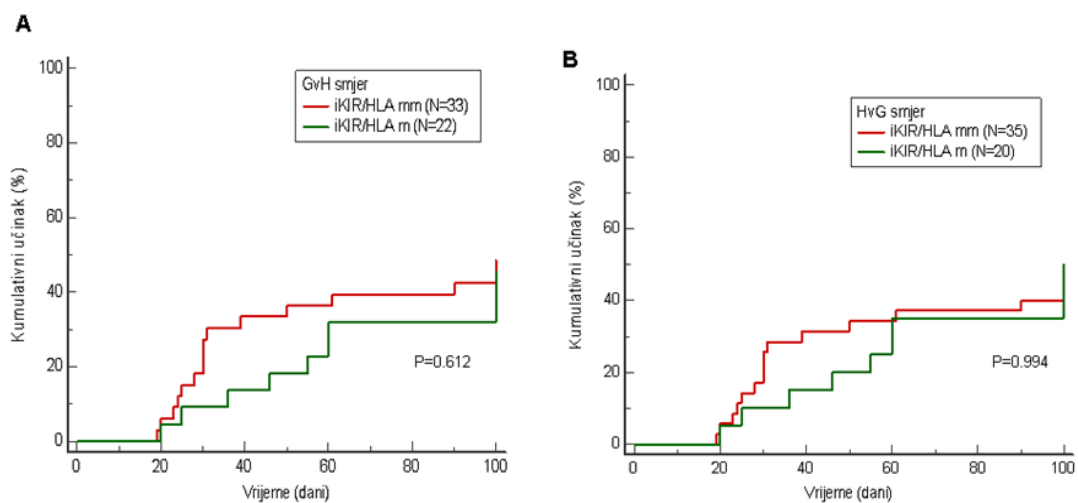
Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru; **C)** Utjecaj postoje ih parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru, a ovisno o vrsti liganda koji nedostaje.

Slika 31. Preživljavanje bolesnika nakon lije enja srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=55) s obzirom na podudarnost receptor KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

Tako er, nedostajanje odre ene kombinacije receptora KIR i liganda HLA (slika 31C) pokazuje statisti ki zna ajnu razliku u preživljavanju me u ispitanicima (P=0,047). U najve em broju slu ajeva (24 para) nedostaje ligand HLA-A3/A11 te ligandi HLA-C skupine C2 (17 para). U najmanje slu ajeva nedostaju ligandi HLA-C skupine C1 (4 para), dok ligandi

HLA-Bw4 nedostaju kod 8 parova ispitanika. Kod 2 para ispitanika prisutni su svi ligandi. Najbolje preživljavanje (100%) imaju primatelji kod kojih su prisutni svi ligandi ili nedostaje samo skupina C1 dok je najlošije preživljavanje u jednoj bolesnika kod kojih je nedostajao ligand HLA-Bw4 za receptor KIR3DL1 davatelja. U odnosu na HLA-Bw4 ligande, bolje preživljavanje postoji u slučaju kada nema liganada HLA-C skupine C2 (HR=2,0; CI:0,3846-10,4704; P=0,067) te liganda HLA-A3/A11 (HR=3,9; CI:0,8042-19,2613; P=0,0014).

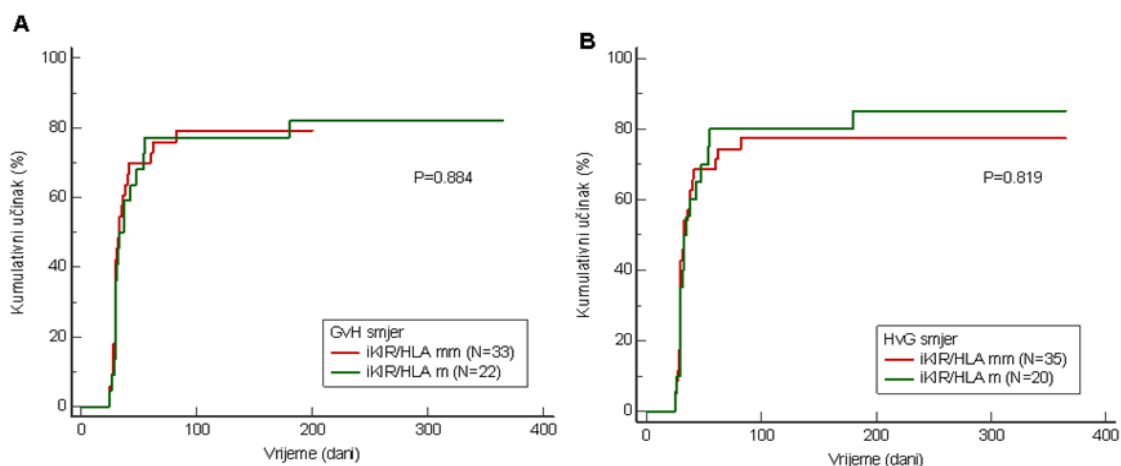
Povezanost pojave GvHD-a s brojem postojećih parova iKIR/ligand HLA (slika 32) ne pokazuje statistički značajnu razliku. U GvH smjeru je vidljiva mala razlika između pojave GvHD-a kod iKIR/HLA nepodudranih parova primatelj-davatelj u odnosu na iKIR/HLA podudrane parove (HR=1,3; CI:0,5624-2,6537; P=0,612) dok je u HvG smjeru ta razlika neprimjetna.



Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru.

Slika 32. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) s obzirom na podudarnost receptora KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

Analiza utjecaja parova iKIR/HLA na vrijeme postizanja punog kimerizma pokazala je da nema nikakvog utjecaja (slika 33).

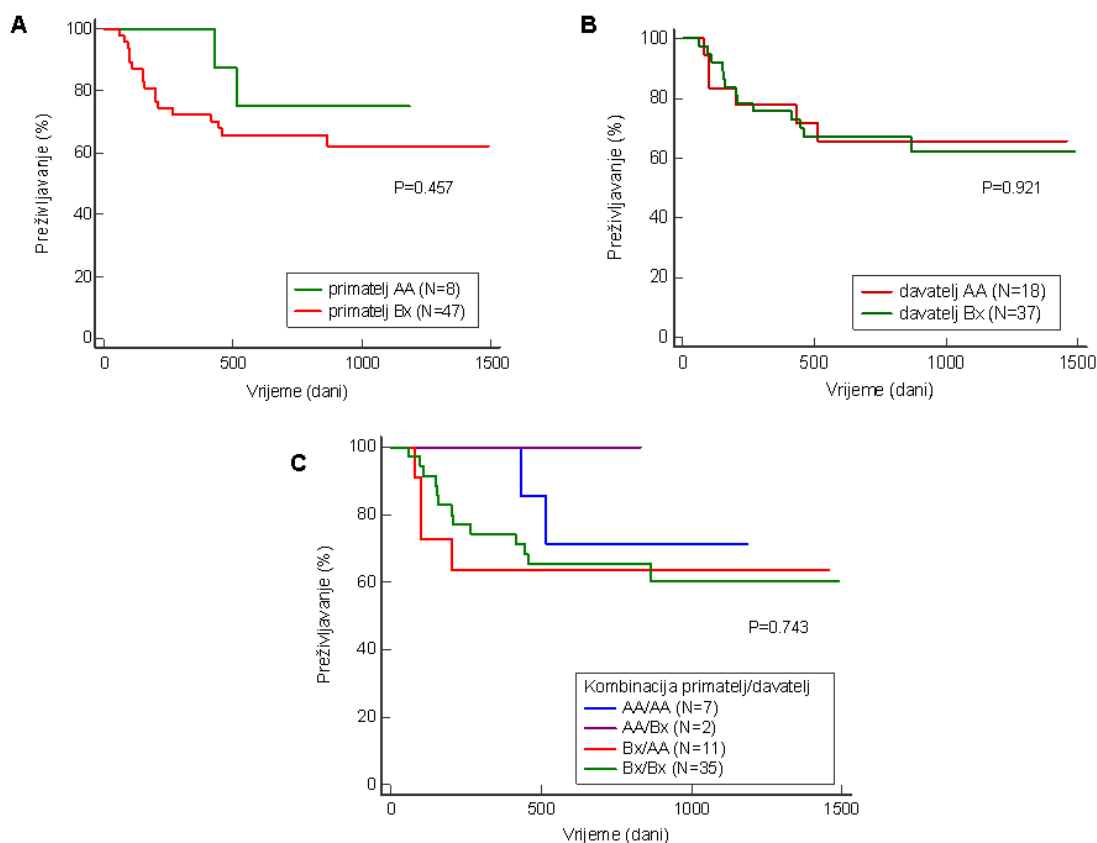


Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru.

Slika 33. Postizanje punog kimerizma kod bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) s obzirom na podudarnost receptor KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

4.3.1.4. Analiza utjecaja genotipa KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „haplotip KIR nepodudarnost“.

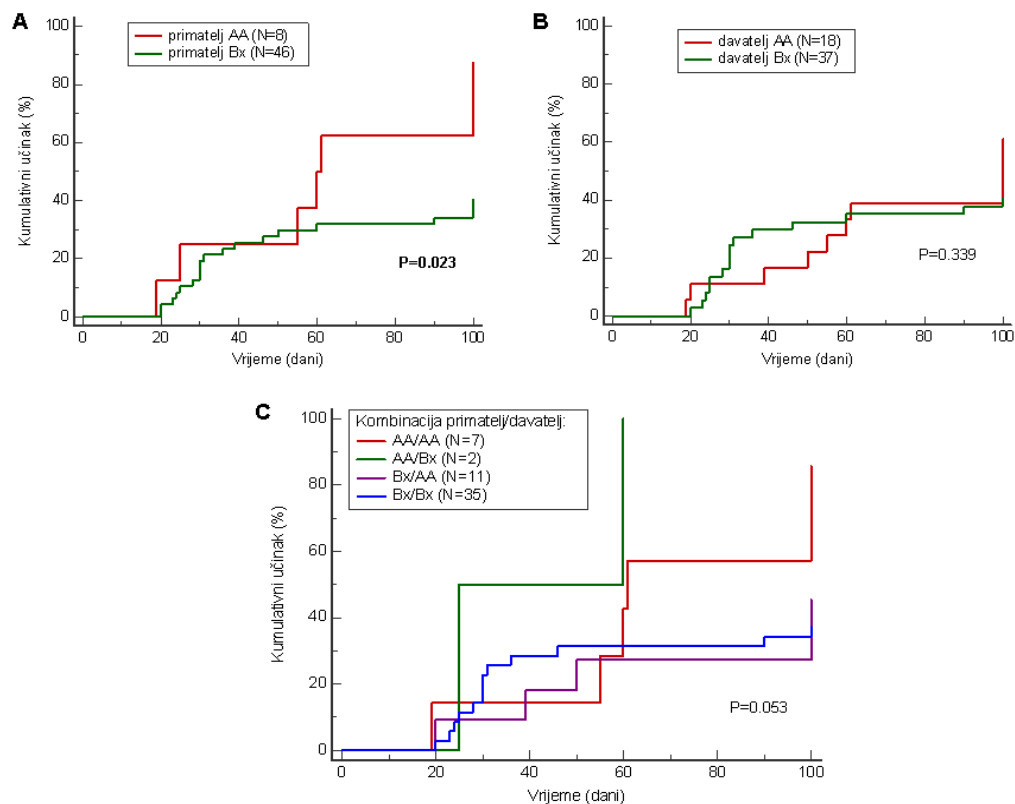
Analiza povezanosti genotipa KIR s preživljavanjem bolesnika nakon srodne TKMS nije pokazala statistički značajnu razliku (slika 34). Prema dobivenim rezultatima, preživljavanje je bolje za primatelje genotipa AA (HR=1,7; CI:0,5198-5,7343; P=0,457) u odnosu na primatelje koji su genotipa Bx, dok genotip AA ili Bx davatelja ne utječe na razliku. Također, nijedna od ispitivanih kombinacija genotipa KIR primatelj-davatelj nije pokazala statistički značajnu utjecaj na preživljavanje.



Legenda: A) Utjecaj genotipa KIR primatelja; B) Utjecaj genotipa KIR davatelja; C) Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj.

Slika 34. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) s obzirom na genotip KIR

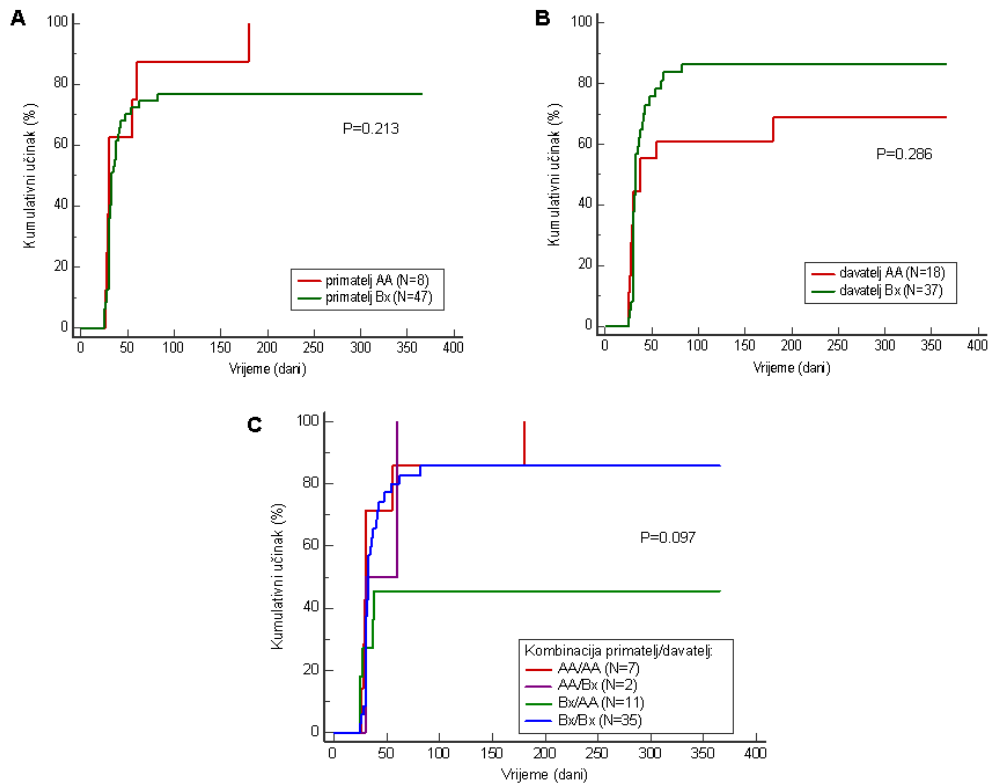
Genotip KIR pokazao je statistički značajan utjecaj na pojavu GvHD-a (slika 35). Uočena je statistički značajna razlika u veći pojavi GvHD-a kod bolesnika koji su genotipa AA u odnosu na bolesnike koji su genotipa Bx (HR=2,6; CI:0,8091-8,3097; P=0,023). Genotip KIR davatelja nema statistički značajan utjecaj, a neznatno manja pojava GvHD-a postoji u slučaju kada je davatelj genotipa AA u odnosu na davatelje genotipa Bx (HR=1,5; CI:0,6420-3,2682; P=0,339). Utjecaj kombinacije genotipova KIR primatelja i davatelja na granici je statistički značajnosti. Najveći postotak GvHD-a javio se kod parova primatelj-davatelj AA/Bx (HR=4,1; CI:0,2573-65,2964), dok je najmanja pojavnost u slučaju kombinacije Bx/AA (HR=0,2; CI:0,0153-3,8866; P=0,151).



Legenda: **A)** Utjecaj genotipa KIR primatelja; **B)** Utjecaj genotipa KIR davatelja; **C)** Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj.

Slika 35. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon lije enja srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=55) s obzirom na genotip KIR

Utjecaj genotipa KIR na vrijeme postizanja punog kimerizma nije pokazao statisti ki zna ajan u inak (slika 36). Krivulje pokazuju bolje postizanje punog kimerizma kod primatelja genotipa AA u odnosu na primatelje genotipa Bx (HR=1,6; CI:0,6444-3,8954; P=0,213). Kod davatelja je obrnuta situacija – lošije postizanje punog kimerizma u slu aju genotipa AA davatelja u odnosu na davatelje genotipa Bx (HR=1,4; CI:0,7526-2,6099; P=0,286). Ovakav rezultat odražava se na utjecaj kombinacija genotipova KIR primatelja i davatelja gdje najlošije vrijeme postizanja punog kimerizma postoji u slu aju kombinacije primatelj genotip Bx/davatelj genotip AA (HR=2,6; CI:0,5122-12,4856; P=0,012) u odnosu na najbolje vrijeme kod kombinacije primatelj genotip AA/ davatelj genotip Bx.



Legenda: A) Utjecaj genotipa KIR primatelja; B) Utjecaj genotipa KIR davatelja; C) Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj.

Slika 36. Postizanje punog kimerizma kod bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) s obzirom na genotip KIR

4.3.1.5. Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma.

Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR (aKIR) rađena je na način da se gledao utjecaj prisutnosti pojedinog gena u odnosu na utjecaj kada su geni odsutni. Analiza uključuje gene *KIR2DS4* rađena je na način da su ispitanici koji su imali samo alele *KIR2DS4*f* ili kombinaciju *KIR2DS4*f/KIR2DS4*d* smatrani *KIR2DS4* pozitivnima dok su ispitanici koji su imali samo alele *KIR2DS4*d* ili nisu imali uopće gen *KIR2DS4* smatrani *KIR2DS4* negativnima.

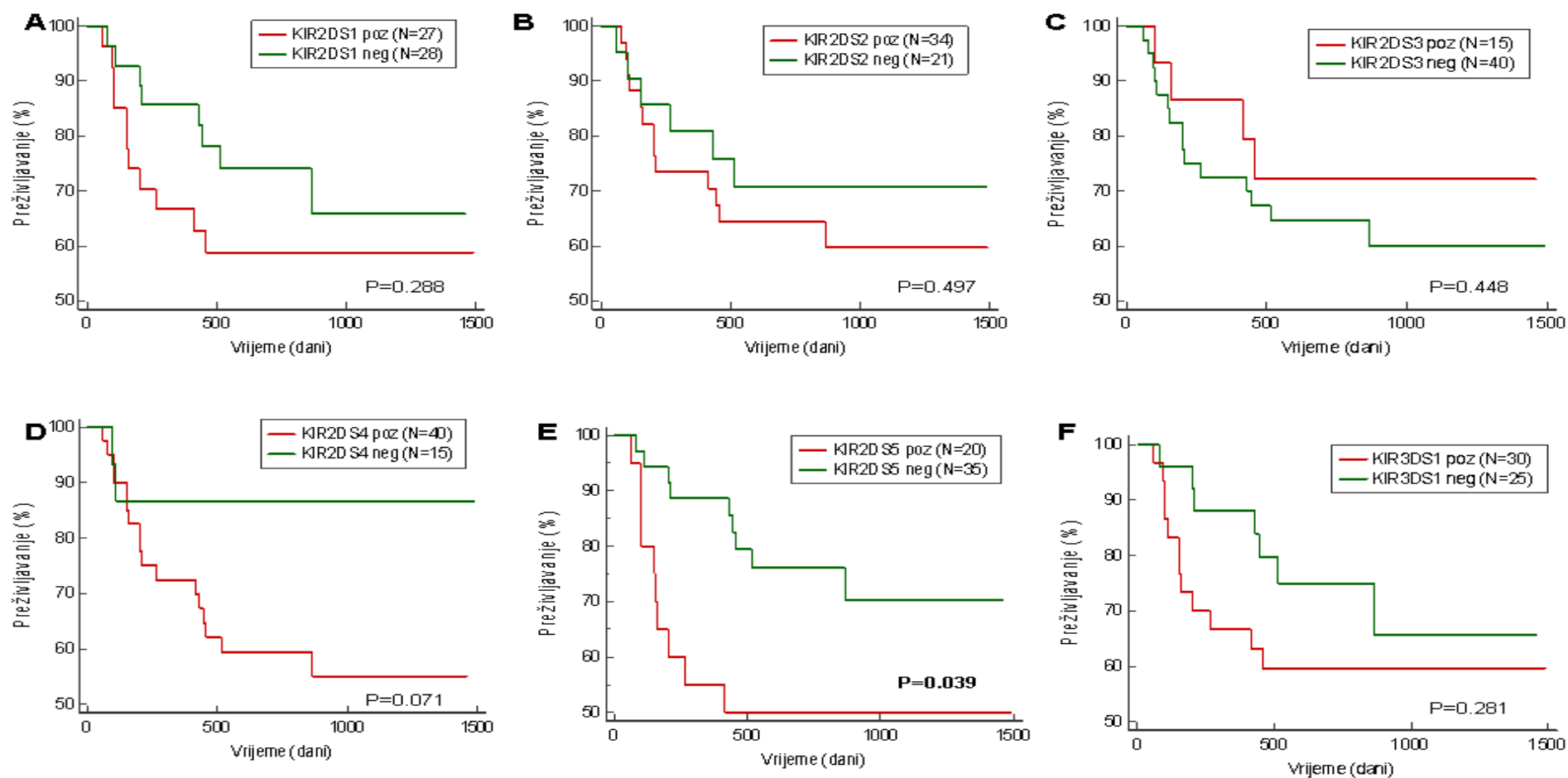
Analiziran je utjecaj pojedinačnih aktivacijskih gena KIR primatelja (HvG smjer) na preživljavanje bolesnika (slika 37). Jedina statistički značajna razlika u preživljavanju postoji

u slučaju gena *KIR2DS5* (slika 37E). Prisutnost gena *KIR2DS5* u primatelju znači lošije preživljavanje (HR=2,5; CI:0,9373-6,5575; P=0,039) u odnosu na situaciju kada gen nije prisutan. Nijedan drugi gen nije pokazao statistički značajnu razliku.

Ipak, iz krivulja je vidljivo da i za gen *KIR2DS4* postoji određena razlika (slika 37D). Bolesnici koji su *KIR2DS4* negativni imaju znatno bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike koji su *KIR2DS4* pozitivni (HR=3,5; CI:1,3095-9,4509; P=0,071). Geni *KIR2DS1*, *KIR2DS2* i *KIR3DS1* (slika 37A, B i F) nemaju utjecaj na preživljavanje, iako postoji lagani trend boljeg preživljavanja bolesnika kod kojih geni nisu prisutni u odnosu na lošije preživljavanje bolesnika kod kojih su prisutni. Uočeno je također da je gen *KIR2DS3* (slika 37C) jedini gen koji ima pozitivan utjecaj na preživljavanje kada je prisutan u primatelju nego kada nije prisutan (HR=1,5; CI:0,5661-4,1140; P=0,448).

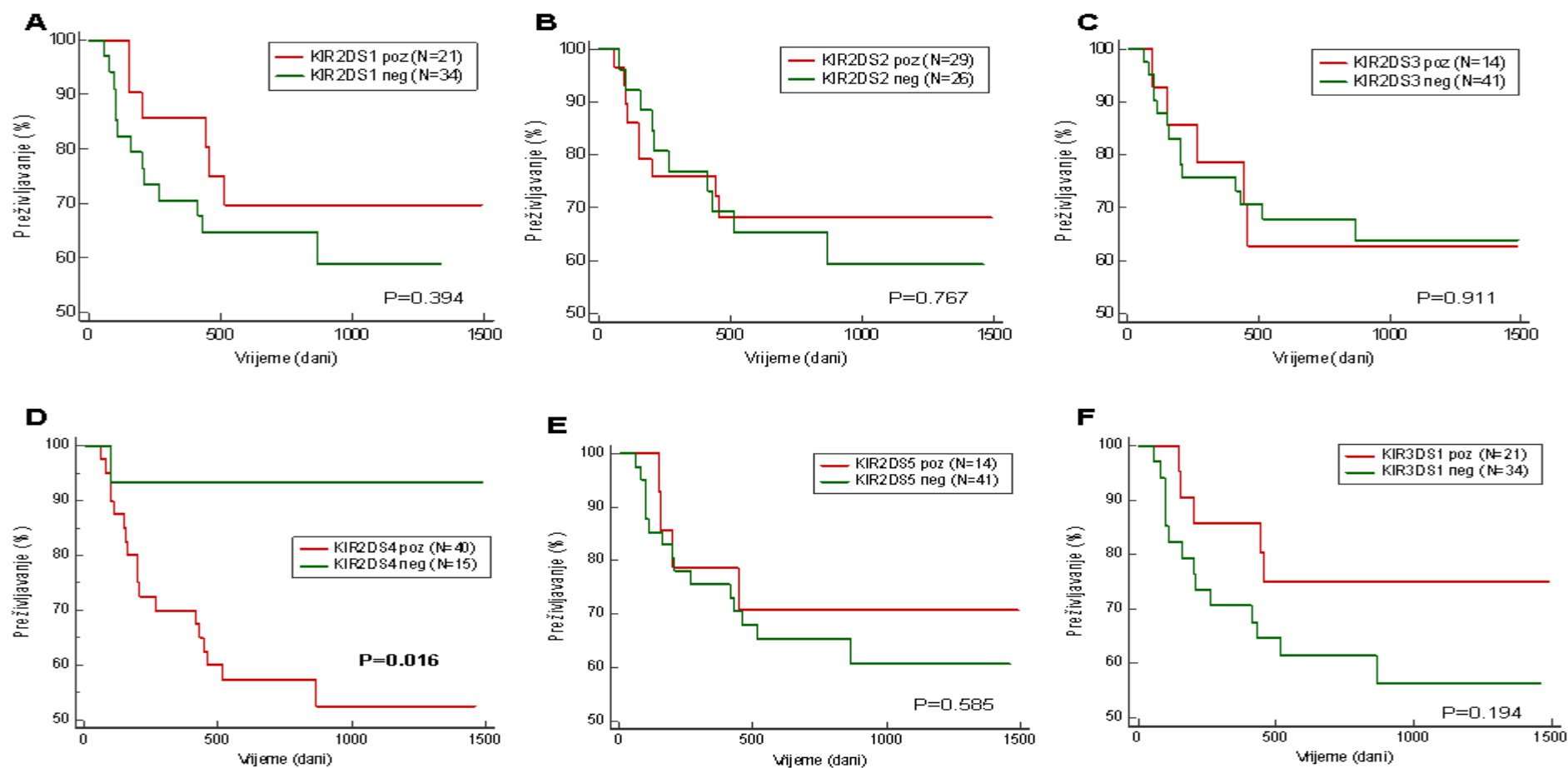
Analiziran je također i utjecaj pojedina nje aktivacijskih gena KIR davatelja na preživljavanje primatelja (GvH smjer) (slika 38). Jedina statistički značajna razlika u preživljavanju postoji u slučaju gena *KIR2DS4* (slika 38D). Bolesnici koji su davatelji *KIR2DS4* negativni imaju znatno bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike koji su davatelji *KIR2DS4* pozitivni (HR=7,9; CI:2,9870-21,0360; P=0,016).

Za ostale aktivacijske gene KIR nije uočena značajna razlika između prisutnosti/odsutnosti i utjecaja na preživljavanje. Kod gena *KIR3DS1* (slika 38F) uočeno je lošije preživljavanje u slučaju kada gen nije prisutan u davatelju u odnosu na bolje preživljavanje kada je gen prisutan (HR=1,9; CI:0,7771-4,8399; P=0,194), što je situacija suprotna od one kod HvG smjera.



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 37. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) u odnosu na aktivacijske gene KIR primatelja – HvG smjer



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

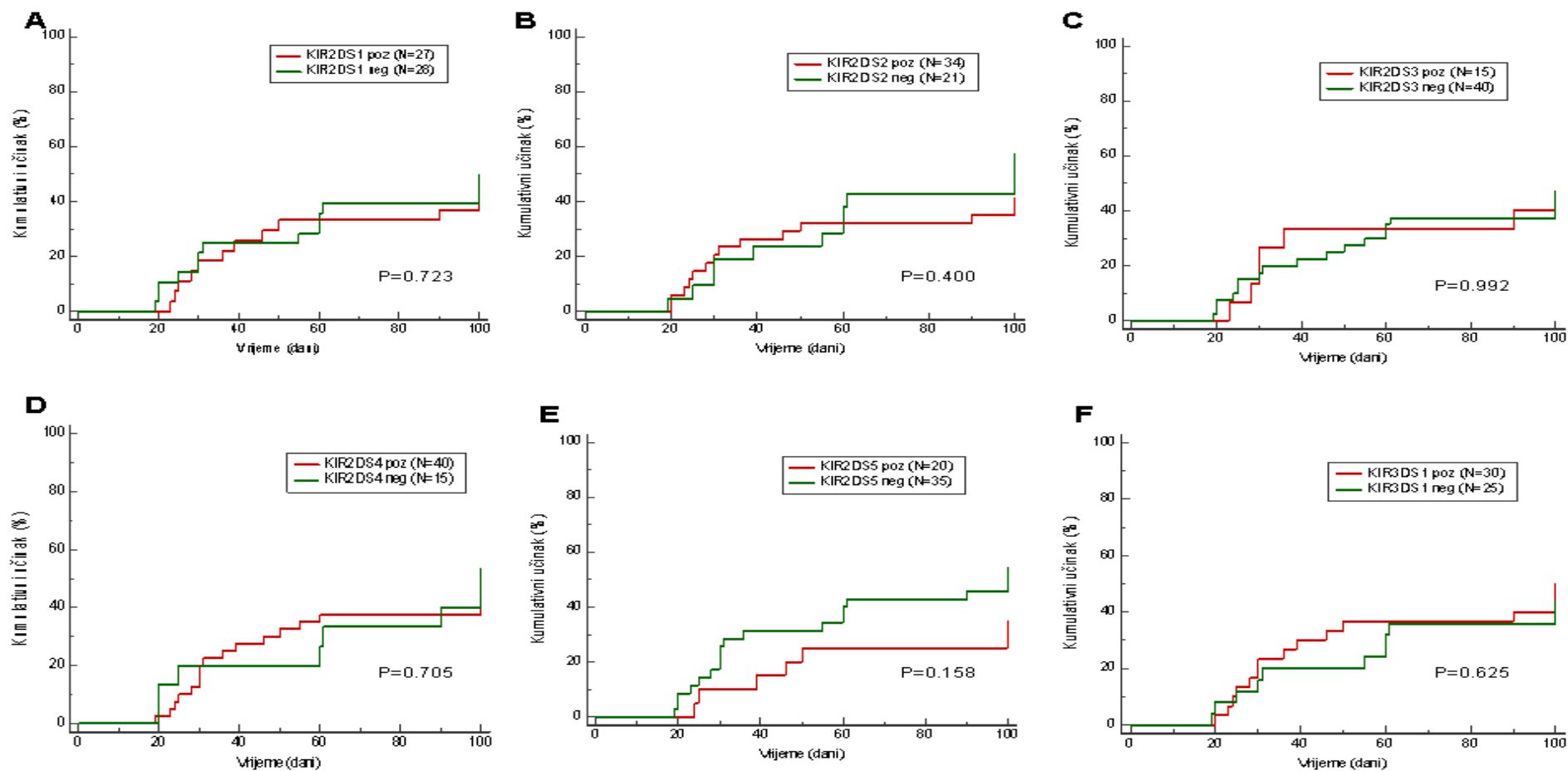
Slika 38. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja srodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=55) u odnosu na aktivacijske gene KIR davatelja – GvH smjer

Analizirana uestalost pojave GvHD-a ovisno o aktivacijskim genima KIR primatelja (slika 39) i aktivacijskim genima KIR davatelja (slika 40), nije pokazala statistički značajne razlike, ali je utvrđeno da prisutnost nekih gena pospešuje pojavu GvHD-a, odnosno prisutnost drugih je smanjuje.

U HvG smjeru razlika postoji samo kod gena *KIR2DS5* (slika 39E) pri čemu je pojava GvHD-a manja kod *KIR2DS5* pozitivnih bolesnika u odnosu na *KIR2DS5* negativne bolesnike (HR=1,8; CI:0,8344-4,0017; P=0,158).

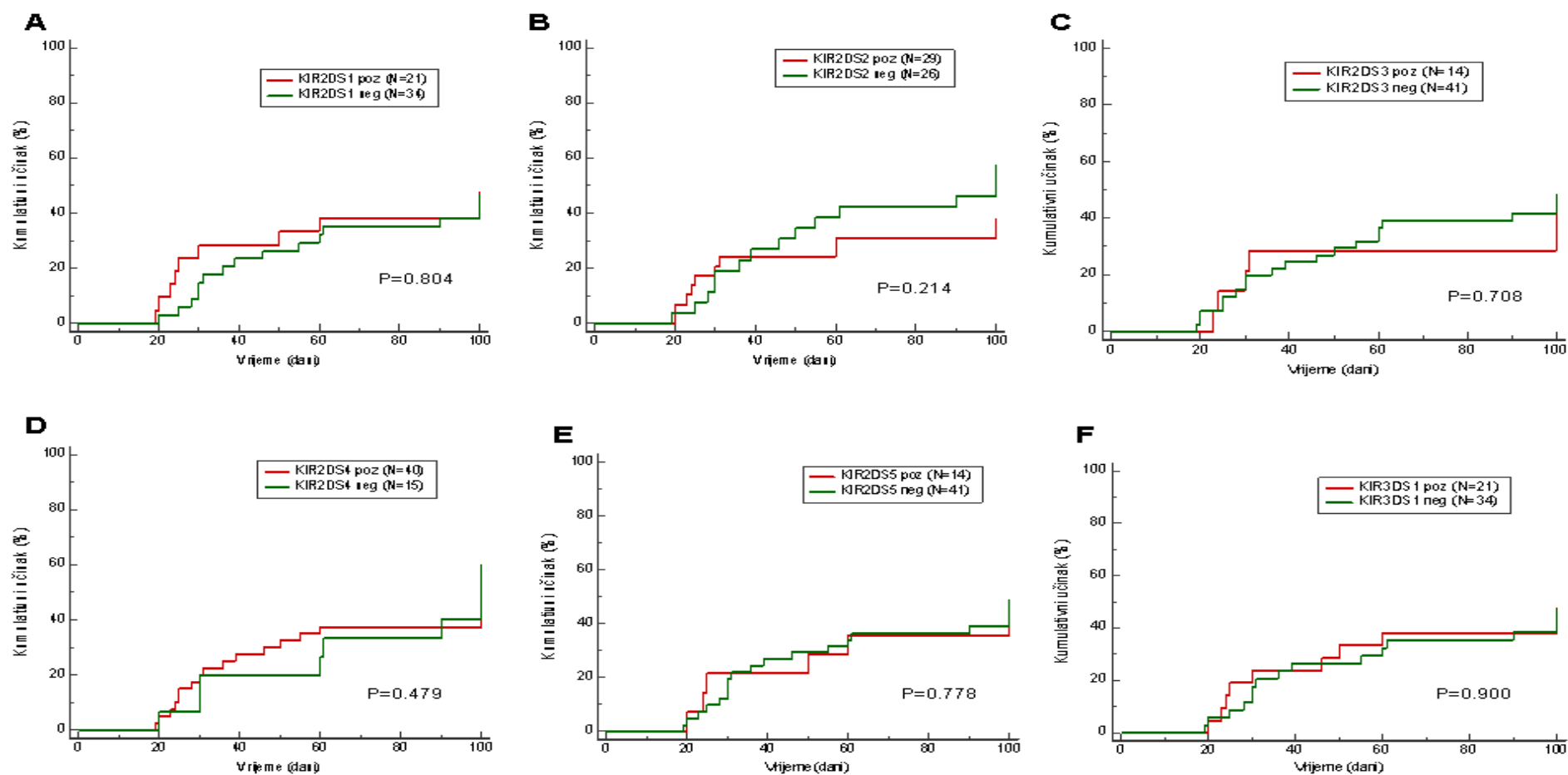
U GvH smjeru vidljiva je smanjena pojava GvHD-a kod bolesnika u prisutnosti gena *KIR2DS2* kod davatelja (slika 40B), a povećana kada gen *KIR2DS2* nije prisutan (HR=1,6; CI:0,7466-3,4934; P=0,214).

Rezultati analize utjecaja pojedinačnih aktivacijskih gena KIR primatelja i aktivacijskih gena KIR davatelja na vrijeme postizanja punog kimerizma nisu pokazali nikakvu razliku.



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 39. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon lije enja srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=55) u odnosu na aktivacijske gene KIR primatelja – HvG smjer



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

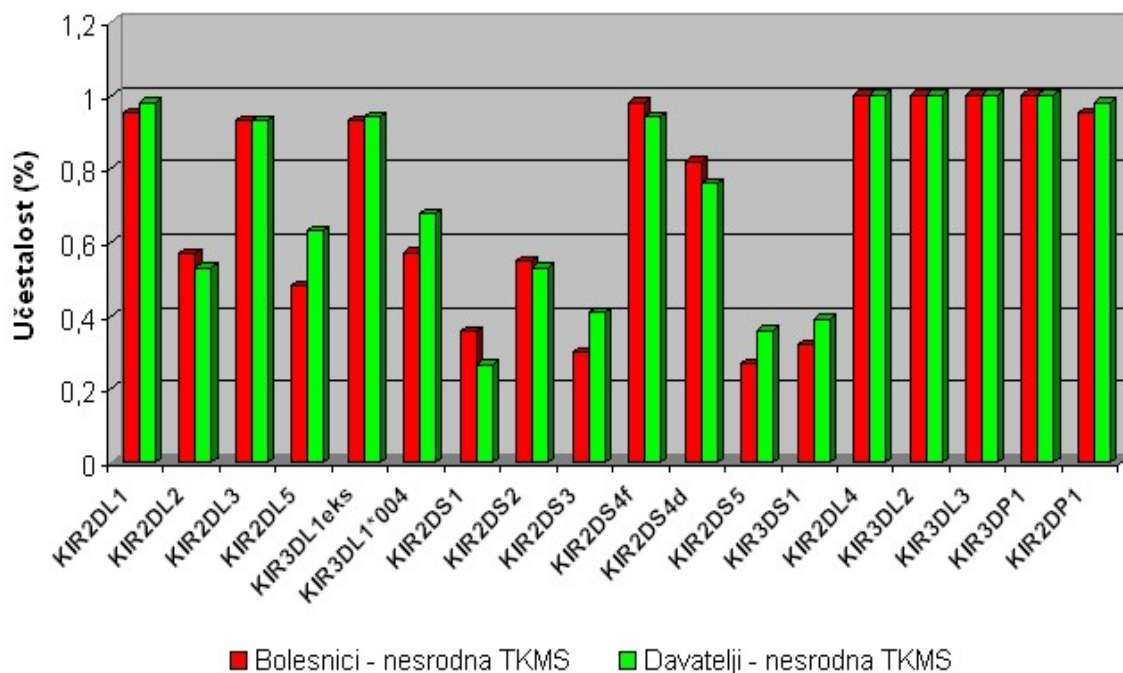
Slika 40. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon lije enja srodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=55) u odnosu na aktivacijske gene KIR davatelja – GvH smjer

4.3.2. ANALIZA ULOGE GENA KIR U NESRODNOJ TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATI NIH STANICA

Od ukupno 56 bolesnika lije enih nesrodnom TKMS, 22 (39,3%) ih je bilo živih na kraju perioda pra enja, a 34 (60,7%) je preminulo (15 relaps; 21 posttransplantacijske komplikacije). U ispitivanoj skupini, GvHD se razvio kod 26 (46,4%) bolesnika od ega je 20 bolesnika imalo akutni GvHD, a 6 bolesnika kroni ni GvHD. Puni kimerizam postignut je kod 50 bolesnika dok kod 6 bolesnika nije nikad postignut. Prosjek postizanja punog kimerizma je 30 dana. Parametri iji utjecaj na ishod TKMS je analiziran isti su kao i u skupini bolesnika lije enih srodnom TKMS.

4.3.2.1. Usporedba u estalosti gena, haplotipova i genotipova KIR bolesnika lije enih nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja

Usporedba u estalosti gena KIR bolesnika lije enih nesrodnom TKMS i njihovih davatelja (slika 41) nije pokazala statisti ki zna ajnu razliku za nijedan analizirani gen KIR.



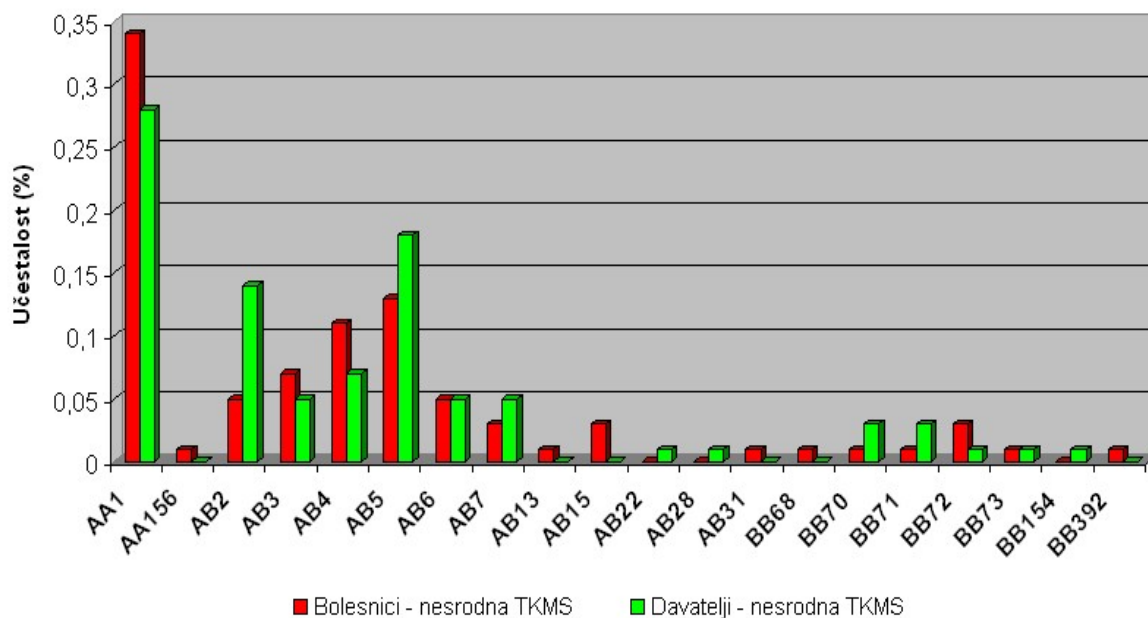
Slika 41. Grafi ki prikaz usporedbe u estalosti gena KIR u bolesnika lije enih nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja (N=56)

U estalost haplotipa A kod bolesnika iznosi 60,0% dok je u estalost haplotipa B 40,0% što je podjednako u estalostima haplotipa A (58,1%) i haplotipa B (41,9%) kod davatelja.

U skupini bolesnika lije enih nesrodnom TKMS 9 (16,1%) parova ima isti genotip KIR dok se 47 (83,9%) parova me usobno razlikuje u genotipu KIR. Usporedba u estalosti genotipova bolesnika i davatelja ne pokazuje zna ajniju razliku za nijednu skupinu genotipova.

U estalost genotipova skupine AA kod bolesnika iznosi 33,9%, a kod davatelja 28,5%; za skupinu AB kod bolesnika je u estalost 51,8% u odnosu na davatelje gdje iznosi 58,9% dok je za genotipove skupine BB najmanja razlika, 14,3% kod bolesnika i 12,5% kod davatelja.

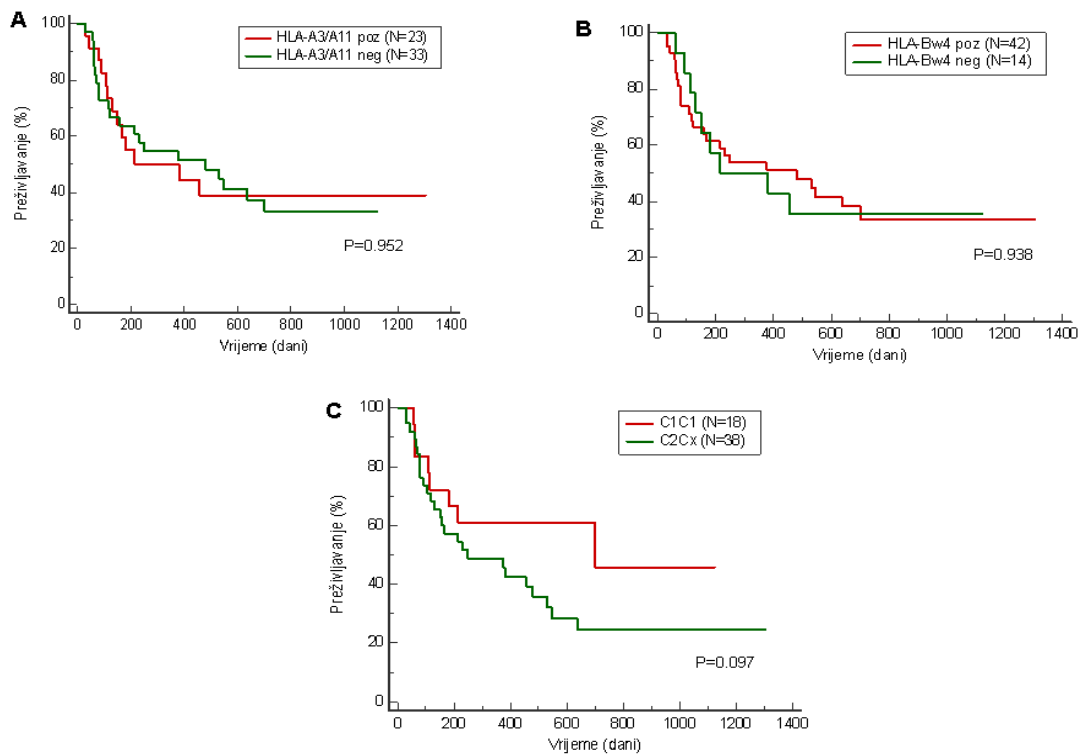
Od ukupno 20 genotipova KIR (slika 42), 6 genotipova (1 AA, 3 AB i 2 BB) postoji samo kod bolesnika, dok su kod davatelja jedinstvena 3 genotipa (2 AB i 1 BB).



Slika 42. Grafi ki prikaz usporedbe genotipova KIR u bolesnika lije enih nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica i njihovih davatelja (N=56)

4.3.2.2. Analiza utjecaja KIR liganada HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „ligand-ligand nepodudarnost“

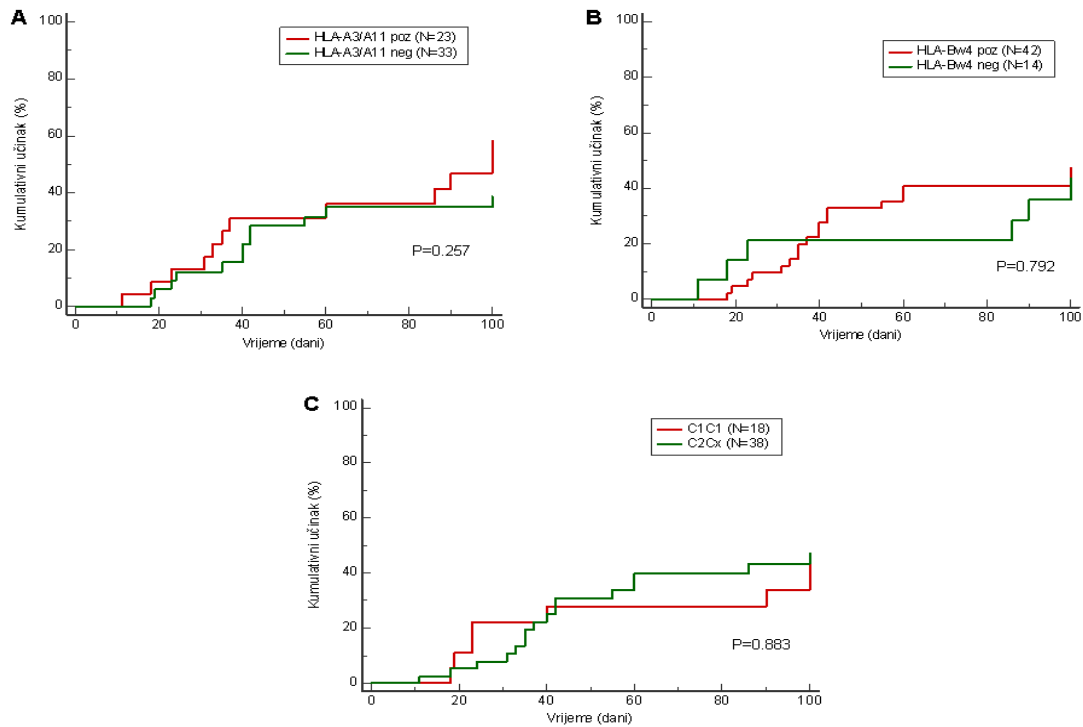
U skupini bolesnika lije enih nesrodnom TKMS analiziran je utjecaj 4 skupine liganada HLA (skupina C1, skupina C2, HLA-Bw4 i HLA-A3/A11) na op e preživljavanje bolesnika (slika 43). Za ligande HLA-A3/A11 kao i HLA- Bw4 ne postoji nikakva zna ajna razlika u preživljavanju bolesnika ovisno o njihovoj prisutnosti ili odsutnosti. Vidljiv utjecaj na preživljavanje bolesnika imaju ligandi skupine C1 i C2. U ovoj skupini bolesnika lošije preživljavanje je u slu aju kada je bolesnik bio C2Cx (medijan: 454 dana) u odnosu na bolesnike koji su C1C1 (medijan: 750 dana; HR=1,9, CI:0,9572-3,8487, P=0,097).



Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

Slika 43. Preživljavanje bolesnika nakon lije enja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matinih stanica (N=56) s obzirom na skupinu liganada HLA

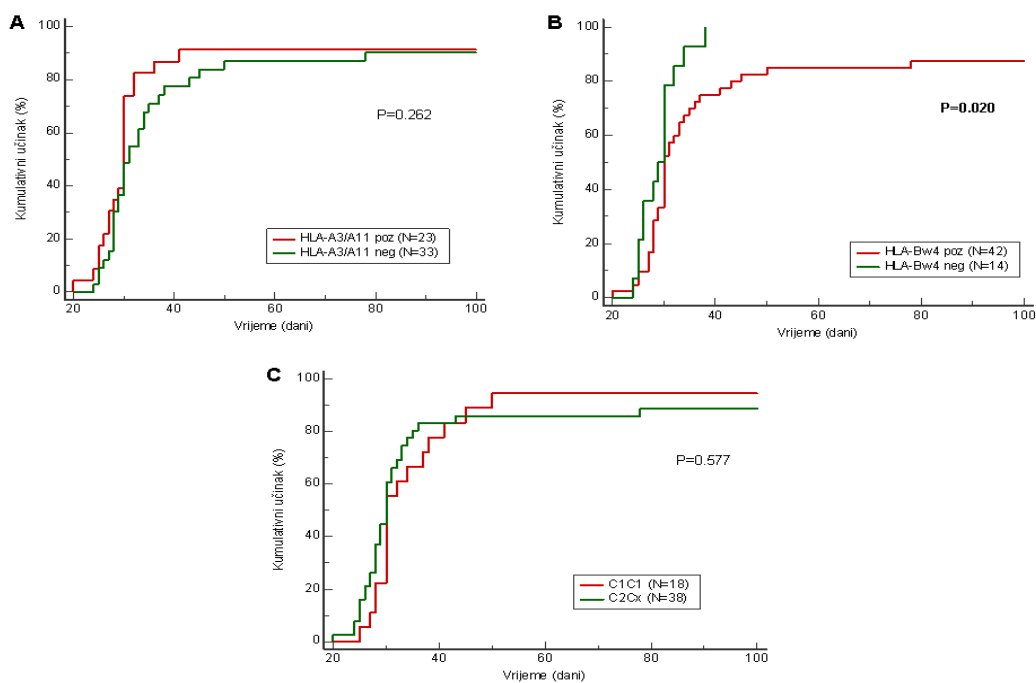
Analiziran je utjecaj liganada HLA-A3/A11, HLA-Bw4 te skupine C1 i C2 na pojavu GvHD-a. Rezultati pokazuju da ovi imbenici nemaju statistički značajan utjecaj (slika 44).



Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

Slika 44. Utjecaj liganada HLA na pojavu GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56)

Rezultati analize utjecaja liganada HLA-A3/A11 i liganada HLA-C skupine C1 i C2 na postizanje punog kimerizma nisu pokazali nikakav značajan utjecaj (slika 45). Statistički značajna razlika postoji jedino za ligand HLA-Bw4 gdje je postizanje punog kimerizma bolje u bolesnika koji su HLA-Bw4 negativni u odnosu na bolesnike koji su HLA-Bw4 pozitivni (HR=1,9, CI:0,9186-4,0495, P=0,020).



Legenda: **A)** Utjecaj liganada HLA-A3/A11 (receptor KIR3DL2); **B)** Utjecaj liganada HLA-Bw4 (receptor KIR3DL1); **C)** Utjecaj liganada HLA-C skupine C1 i C2 (receptori KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3) u odnosu da li primatelj ima skupinu C2 ili nema.

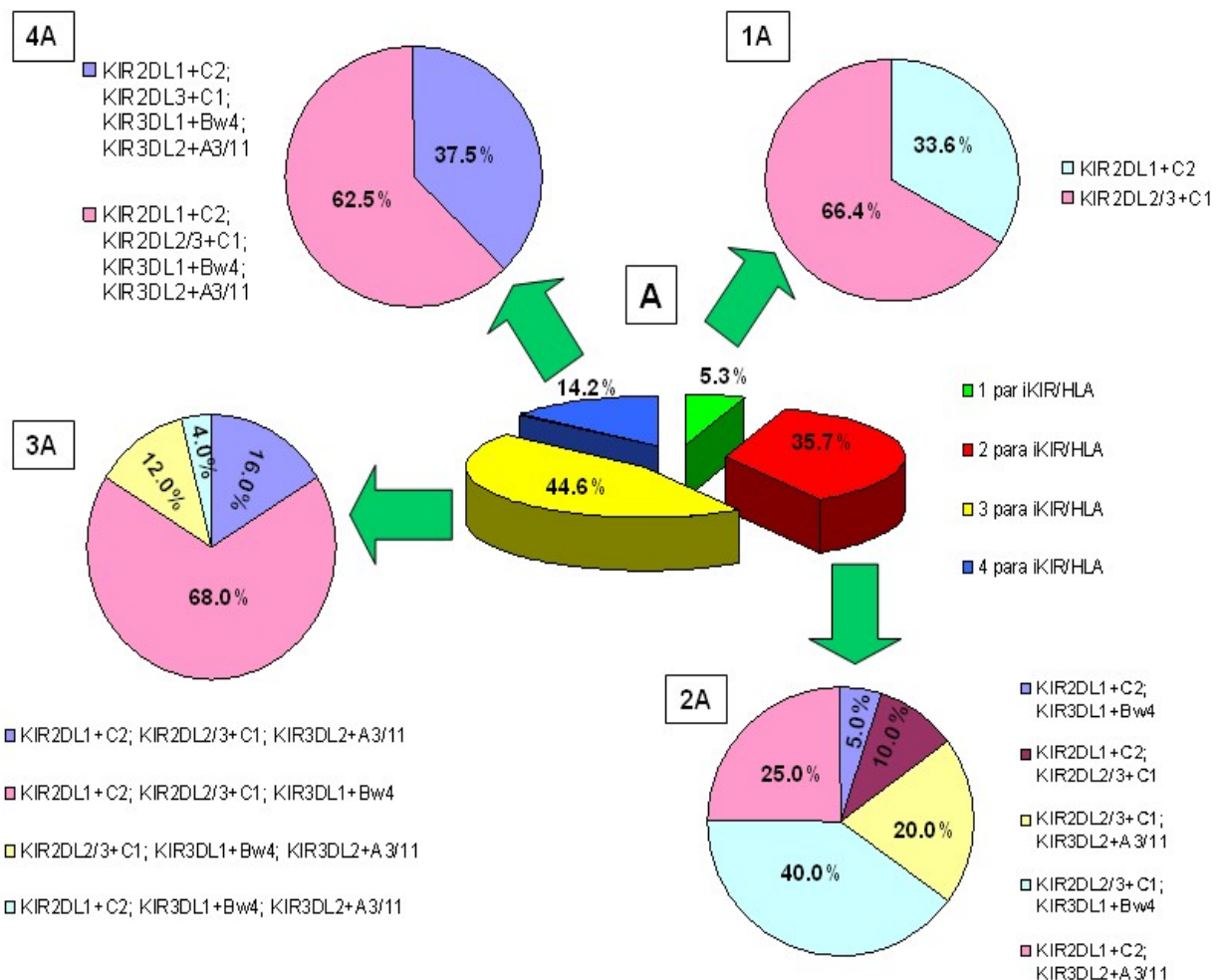
Slika 45. Utjecaj liganada HLA na postizanje punog kimerizma kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56)

Većina parova primatelj-davatelj je identična u alelima HLA (38 parova), dok kod ostalih 18 parova postoje nepodudarnosti u alelima HLA. Samo u pet slučajeva nepodudarnost je u alelima HLA-C zbog toga četiri para primatelj-davatelj imaju različite genotipove prema ligandima skupine C1 i C2. To ipak nema utjecaja na ukupnu učestalost liganada skupine C1 i C2 koja je ista kod bolesnika i kod davatelja (52,6% i 47,4%). Također, u omjeru heterozigota, C1/C2 (37,5%) te homozigota C1/C1 (33,9%) i C2/C2 (28,6%) ne postoji znatna razlika. Kod tri para nepodudarnost je u alelima HLA-B što ne utječe na učestalost liganada HLA-Bw4 koji postoje kod 40 (71,4%) parova. Od 56 parova primatelj-davatelj, 23 (41,1%) ih je imalo ligand HLA-A3/A11. Na temelju takvih učestalosti liganada, prema modelu „ligand-ligand nepodudarnost“ (usporedba ligand-ligand), razlika postoji samo u ligandima HLA-C skupine C1 i C2 kod navedena četiri para i to kod jednog para u GvH smjeru (nedostaje ligand skupine C2), a kod tri u HvG smjeru (nedostaje ligand skupine C2 i

2x C1). Zaključuje se da će nakon TKMS samo kod četiri para kod kojih nedostaje ligand C1 ili C2 nastati aloreaktivne stanice dok će svi ostali pretpostavljeni inhibicijski receptori KIR davatelja imati svoje ligande u primatelju i neće nastati aloreaktivne stanice s potencijalno pozitivnim učinkom na ishod TKMS.

4.3.2.3. Analiza utjecaja parova receptor KIR/ligand HLA na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „KIR-ligand nepodudarnost“

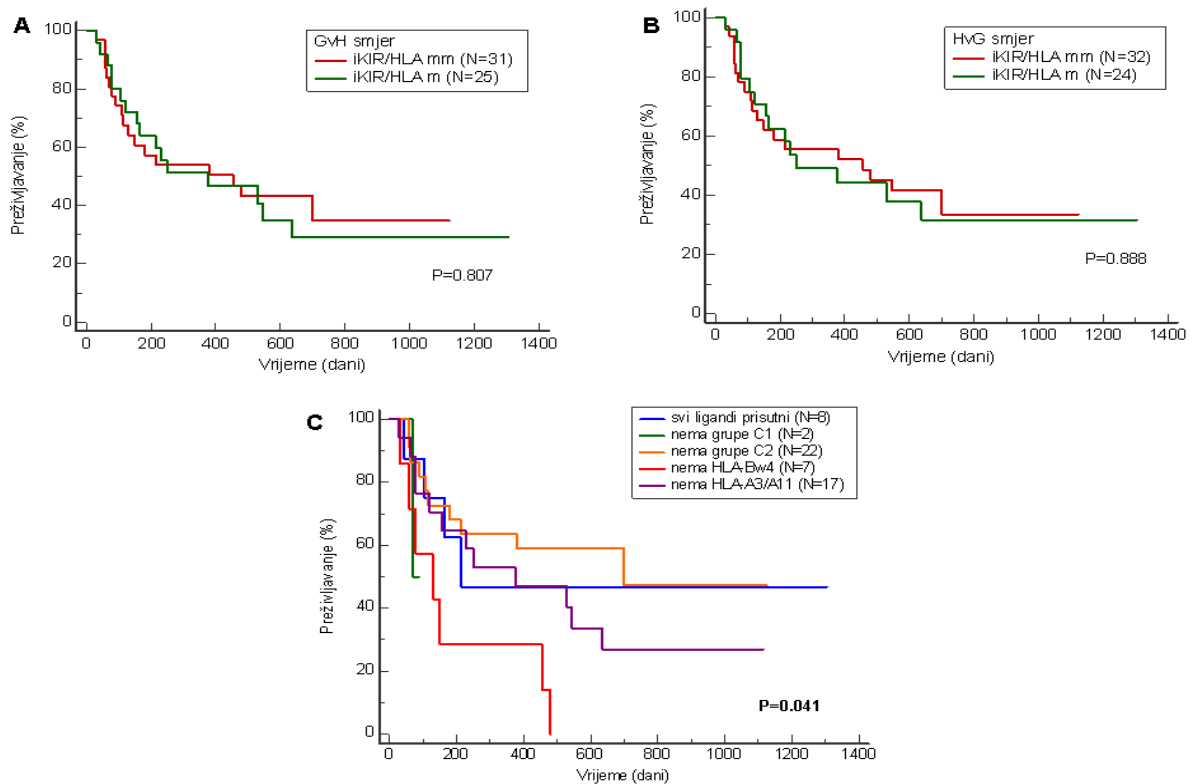
Prema modelu „KIR-ligand nepodudarnost“ (usporedba KIR receptor-ligand HLA), za svaki par primatelj-davatelj određen je broj i vrsta postojećih kombinacija inhibicijskih receptora KIR i liganada HLA te analiziran utjecaj na ishod TKMS.



Slika 46. Broj parova iKIR davatelja/ligand HLA primatelja (A) te njihove postojeće kombinacije (1A-4A) u skupini ispitanika liječenih nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica i njihovih davatelja (N=56)

Kod 47 parova primatelj-davatelj postoji razlika u genima KIR. Razlika u broju parova iKIR/ligand HLA izme u GvH smjera (iKIR davatelja/ligand HLA primatelja) i HvG smjera (iKIR primatelja/ligand HLA davatelja) bila je prisutna kod samo 8 parova primatelj-davatelj. Utvrđeno je da kod 48 (85,7%) primatelja nedostaje barem jedan od 4 moguća liganda HLA za receptor KIR davatelja. Najveći broj parova primatelj-davatelj sadrži po 3 iKIR/ligand HLA para (25/56, 44,6%). Uestalost parova iKIR davatelja/ligand HLA primatelja te postojeće kombinacije u ispitivanoj skupini prikazane su na slici 46.

Analiza preživljavanja prema broju prisutnih parova iKIR/ligand HLA izme u primatelja i davatelja nije pokazala statistički značajnu razliku u GvH smjeru kao ni u HvG smjeru (slika 47).

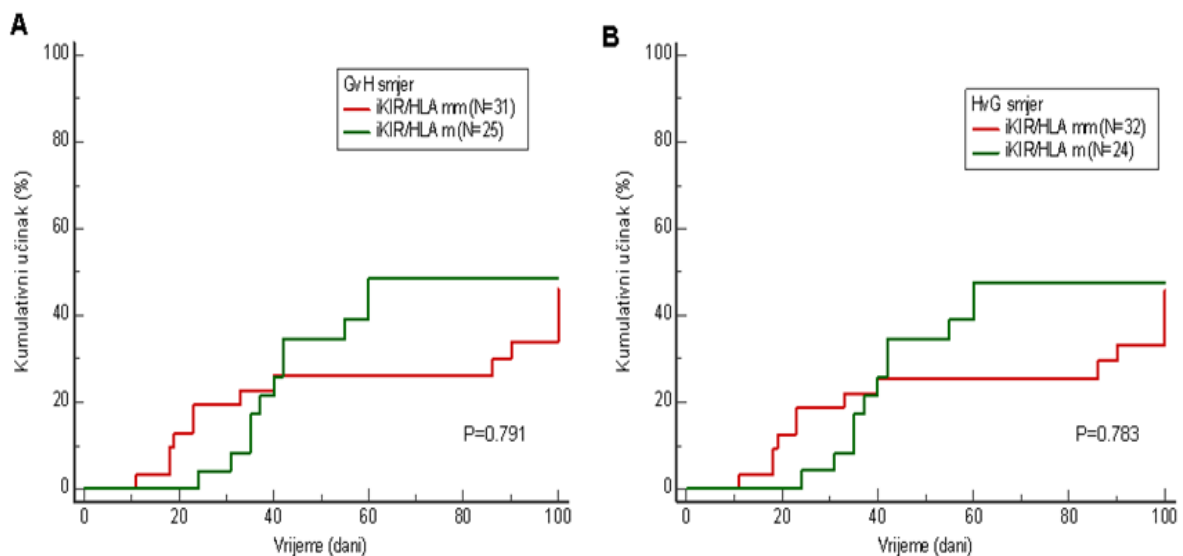


Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru; **C)** Utjecaj postojeće ih parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru, a u odnosu na vrstu liganda koji nedostaje

Slika 47. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) s obzirom na podudarnost receptor KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

Tako er nema značajne razlike ni kada se uzme u obzir kombinacija receptora KIR i liganda HLA koja nedostaje. U najvećem broju slučajeva nedostaje ligand HLA-A3/A11 (17 parova) te ligandi HLA-C skupine C2 (13 parova) i kombinacija skupina C2 + HLA-Bw4 (9 parova). U najmanjem broju parova nedostaju ligandi HLA-C skupine C1 (dva para), dok ligandi HLA-Bw4 nedostaju kod 7 parova ispitanika. Kod 8 parova ispitanika prisutni su svi ligandi. Prema slici 47C, najlošije preživljavanje je kod bolesnika kod kojih je nedostajao ligand HLA-Bw4 za receptor KIR3DL1 davatelja, a najbolje u slučaju kada je nedostajao ligand HLA-C skupine C2 (HR=4,6; CI:0,8773-23,8418; P=0,014). Uočeno je i lošije preživljavanje u slučaju kada su svi ligandi prisutni kod primatelja.

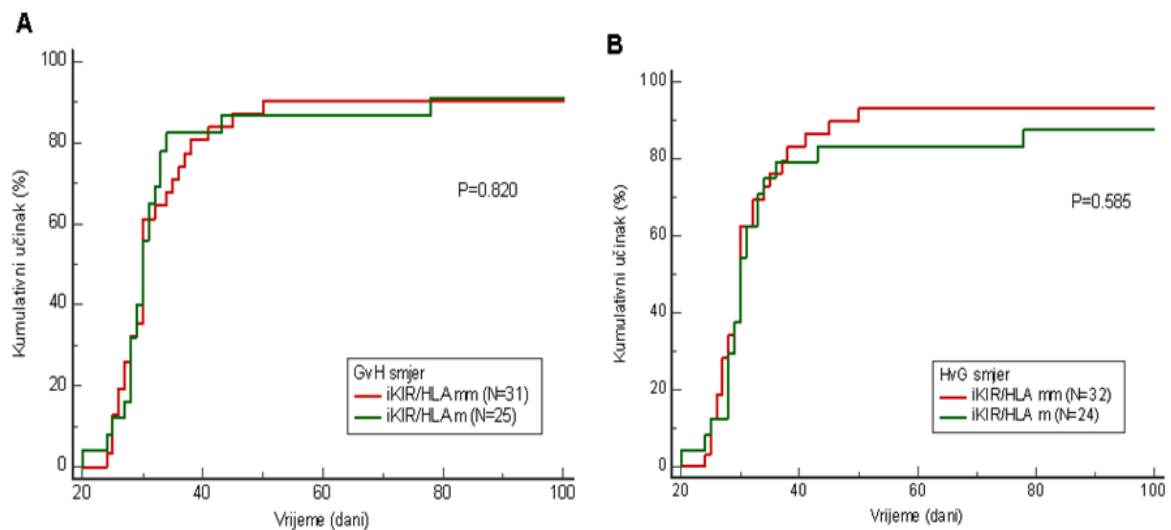
Povezanost pojave GvHD-a s brojem postojećih parova iKIR/ligand HLA (slika 48) također ne pokazuje statističku značajnost iako je uočeno da je pojava GvHD-a veća u slučaju podudarnosti iKIR/HLA u odnosu na nepodudarnost iKIR/HLA i to u GvH smjeru (HR=1,1; CI:0,4961-2,4951; P=0,791) i u HvG smjeru (HR=1,2; CI:0,4981-2,5065; P=0,783).



Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru

Slika 48. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) s obzirom na podudarnost receptora KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

Analiza utjecaja parova iKIR/ligand HLA na postizanje punog kimerizma (slika 49) pokazala je da podudarnost iKIR/HLA kao ni nepodudarnost iKIR/HLA nemaju nikakav utjecaj na bolje ili lošije postizanje punog kimerizma.

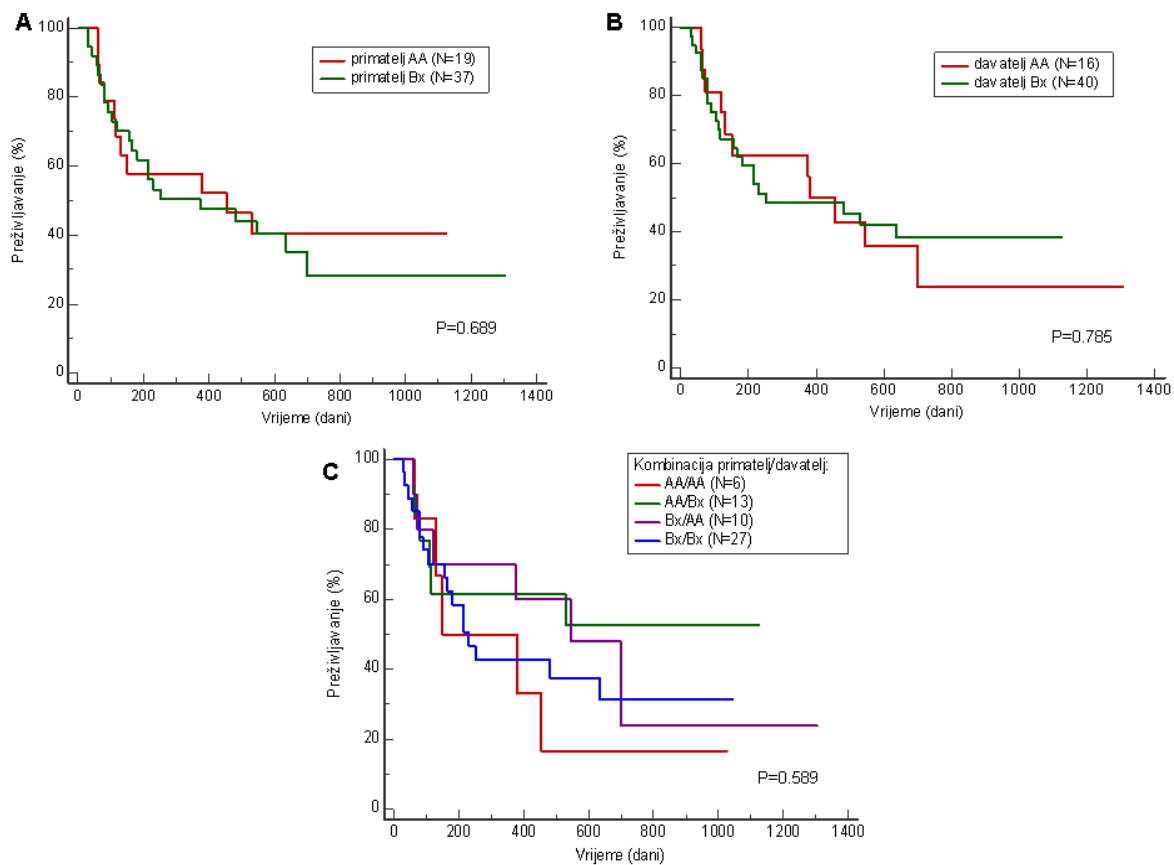


Legenda: **A)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u GvH smjeru; **B)** Utjecaj parova iKIR/ligand HLA u HvG smjeru

Slika 49. Postizanje punog kimerizma kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) s obzirom na podudarnost receptora KIR/ligand HLA primatelja i davatelja

4.3.2.4. Analiza utjecaja genotipa KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma. Model „haplotip KIR nepodudarnost“

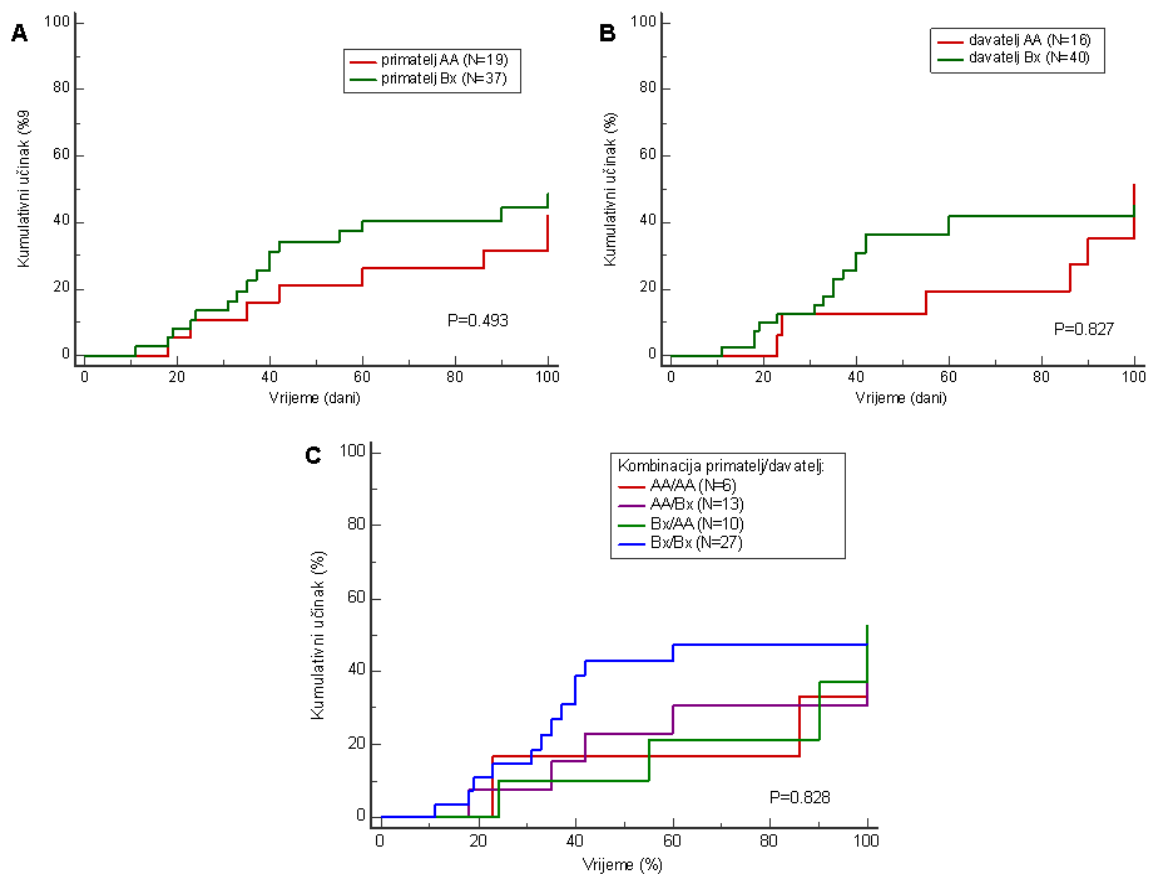
Analiza povezanosti genotipa KIR s preživljavanjem bolesnika nakon nesrodne TKMS nije pokazala statistički značajnu razliku u nijednoj od ispitivanih kombinacija (slika 50). Prema dobivenim rezultatima razlika u boljem preživljavanju postoji za primatelje genotipa AA (HR=1,2; CI:0,5733-2,3339; P=0,689) u odnosu na primatelje koji su genotipa Bx, kao i u slučaju kada je davatelj genotipa Bx, a ne genotipa AA (HR=1,1; CI:0,5312-2,2964; P=0,785). Ovakav rezultat vidljiv je i u krivuljama preživljavanja prema kombinaciji genotipova KIR primatelj-davatelj gdje je najbolje preživljavanje u slučaju kombinacije AA/Bx, a najlošije u kombinaciji AA/AA (HR=2,1; CI:0,6019-7,3123; P=0,177).



Legenda: *A) Utjecaj genotipa KIR primatelja; B) Utjecaj genotipa KIR davatelja; C) Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj*

Slika 50. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) s obzirom na genotip KIR

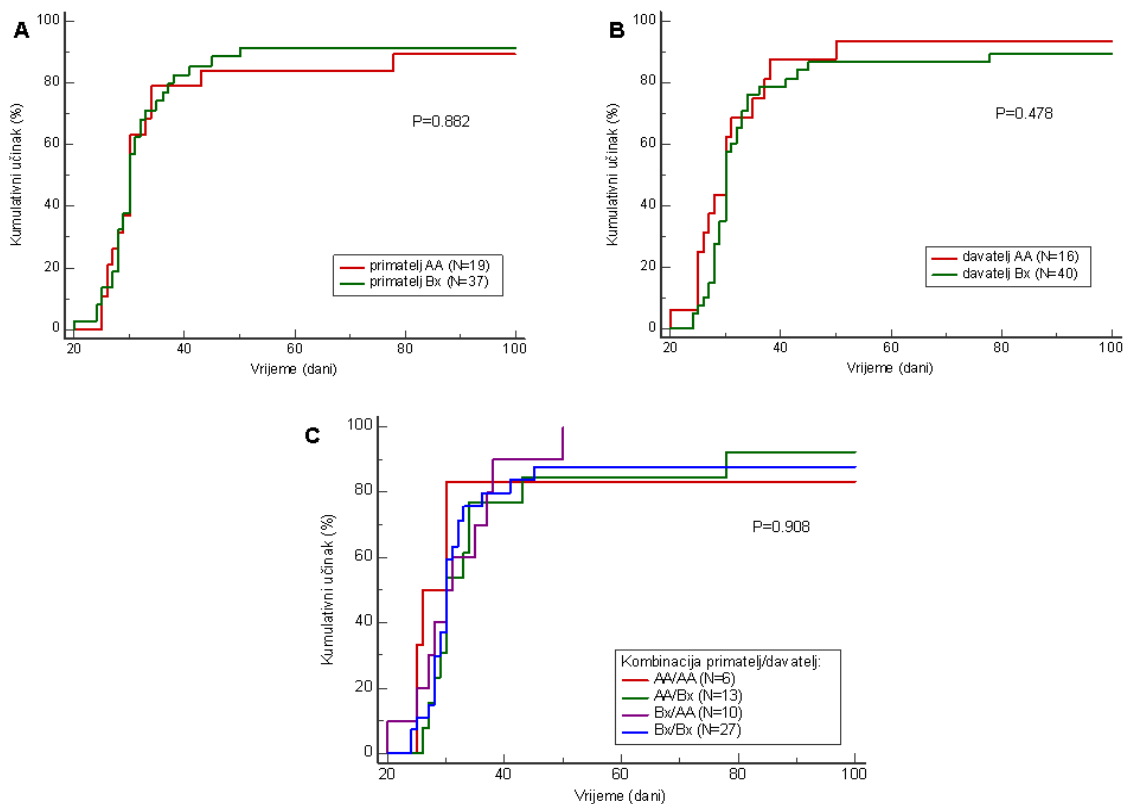
Pojava GvHD-a ovisno o genotipu KIR primatelja i davatelja (slika 51) nije pokazala statistički značajnu razliku. Uočeno je ipak da je pojava GvHD-a manja kada je primatelj genotipa AA (HR=1,3; CI:0,5911-3,0255; P=0,493) kao i u slučaju kada je davatelj genotipa AA (HR=1,1; CI:0,4644-2,6117; P=0,827). To je ponovo u skladu s uočenom povećanom pojavom GvHD-a koja se javila kod parova primatelj-davatelj Bx/Bx (HR=1,4; CI:0,3380-4,4214; P=0,312), dok je kod ostalih kombinacija genotipova razlika neprimjetna.



Legenda: *A) Utjecaj genotipa KIR primatelja; B) Utjecaj genotipa KIR davatelja; C) Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj*

Slika 51. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon lije enja nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=56) s obzirom na genotip KIR

Analiza uloge genotipa KIR primatelja i davatelja na postizanje punog kimerizma (slika 52) nije pokazala nikakvu razliku ni zna ajan u inak.



Legenda: A) Utjecaj genotipa KIR primatelja; B) Utjecaj genotipa KIR davatelja; C) Utjecaj kombinacije genotipa KIR primatelj-davatelj

Slika 52. Postizanje punog kimerizma kod bolesnika nakon lije enja nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=56) s obzirom na genotip KIR

4.3.2.5. Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR na preživljavanje, pojavu GvHD-a i vrijeme postizanja punog kimerizma.

Analiziran je utjecaj pojedina nih aktivacijskih gena KIR primatelja na preživljavanje (HvG smjer). Nijedan od ispitivanih gena KIR nema statisti ki zna ajan utjecaj na preživljavanje (slika 53), iako je uo eno lošije preživljavanje bolesnika kod kojih su ispitivani geni KIR prisutni u odnosu na preživljavanje bolesnika kod kojih nisu prisutni. Ve a razlika u preživljavanju uo ena je za gen *KIR2DS4* (slika 53D) gdje je preživljavanje lošije kod bolesnika koji imaju gen *KIR2DS4* u odnosu na bolesnike koji su negativni za navedeni gen (HR=1,8; CI:0,8493-3,8075; P=0,182).

Analiziran je tako er i utjecaj pojedina nih aktivacijskih gena KIR davatelja na preživljavanje primatelja (GvH smjer) (slika 54). Statisti ki zna ajan utjecaj postoji samo kod gena *KIR2DS3* dok kod ostalih gena ne postoji zna ajna razlika u u inku. Prisutnost gena *KIR2DS3* u davatelju (slika 54C) pokazuje bolje preživljavanje primatelja u odnosu na preživljavanje primatelja iji davatelji nemaju gen *KIR2DS3* (HR=2,1; CI:1,0507-4,0465; P=0,048).

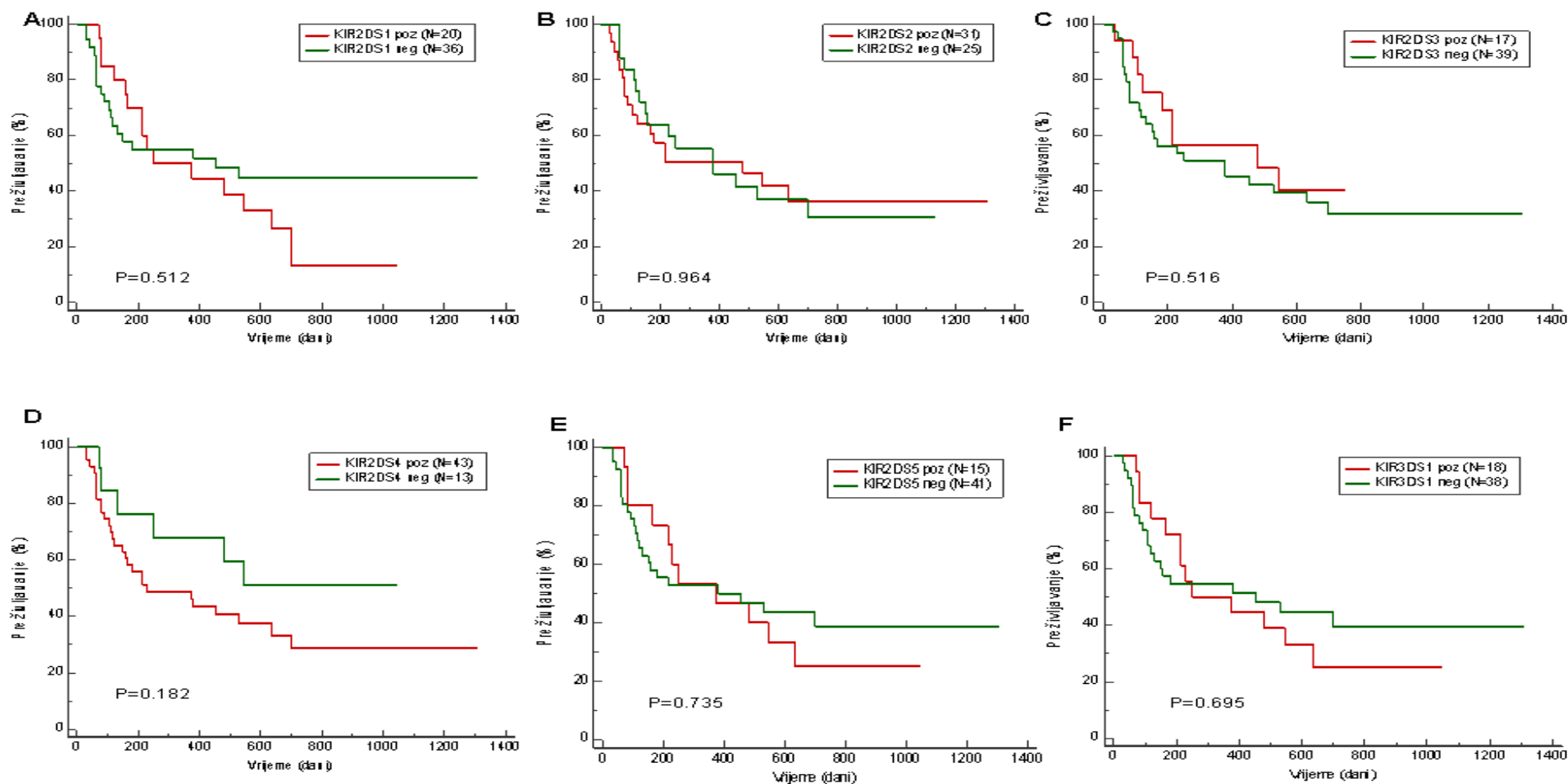
Razlika u preživljavanju tako er je uo ena i za gen *KIR2DS4* (slika 54D) gdje je preživljavanje lošije kod bolesnika iji davatelji imaju gen *KIR2DS4* u odnosu na bolesnike iji su davatelji negativni za navedeni gen (HR=1,5; CI:0,6943-3,1225; P=0,354).

Kada je analizirana u estalost pojave GvHD-a ovisno o aktivacijskim genima KIR primatelja i davatelja, uo eno je da prisutnost nekih gena pospješuje pojavu GvHD-a, odnosno prisutnost drugih je smanjuje.

U HvG smjeru (slika 55) ne postoji statisti ki zna ajan u inak na razliku u pojavi GvHD-a za nijedan ispitivani aktivacijski gen KIR. Nešto ve a razlika postoji kod gena *KIR2DS4* u smislu manje u estalosti pojave GvHD-a kada gen nije prisutan u odnosu na pove anu u estalost pojave GvHD-a kada je gen prisutan u primatelju (HR=2,5; CI:0,9616-6,0185; P=0,136).

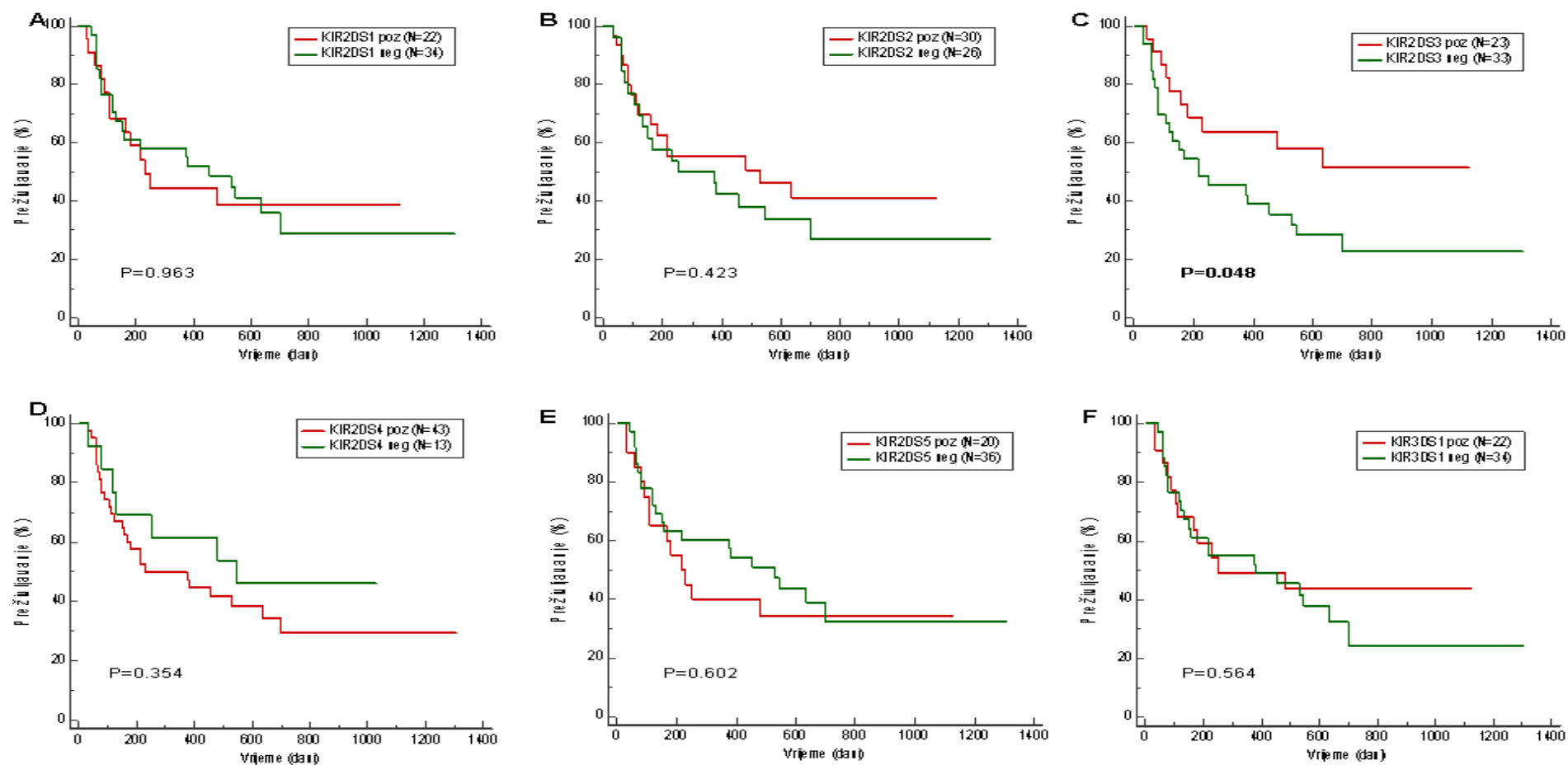
U GvH smjeru (slika 56) statisti ki zna ajna razlika postoji za gen *KIR2DS4*. Bolesnici iji su davatelji pozitivni za gen *KIR2DS4* imaju ve u pojavu GvHD-a u odnosu na bolesnike iji davatelji nemaju gen *KIR2DS4* (HR=8,2; CI:3,2991-20,3296; P=0,012). Uo ena je tako er manja u estalost GvHD-a u slu ajevima kada je davatelj pozitivan za gene *KIR3DS1* (HR=2,3; CI:1,0206-5,1314; P=0,066); *KIR2DS5* (HR=1,8; CI:0,7692-4,0347; P=0,217) i *KIR2DS1* (HR=1,7; CI:0,7598-3,8578; P=0,219).

Analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR primatelja i davatelja na vrijeme postizanja punog kimerizma nije pokazala statisti ki zna ajan u inak niti je uo ena razlika za nijedan ispitivani gen KIR.



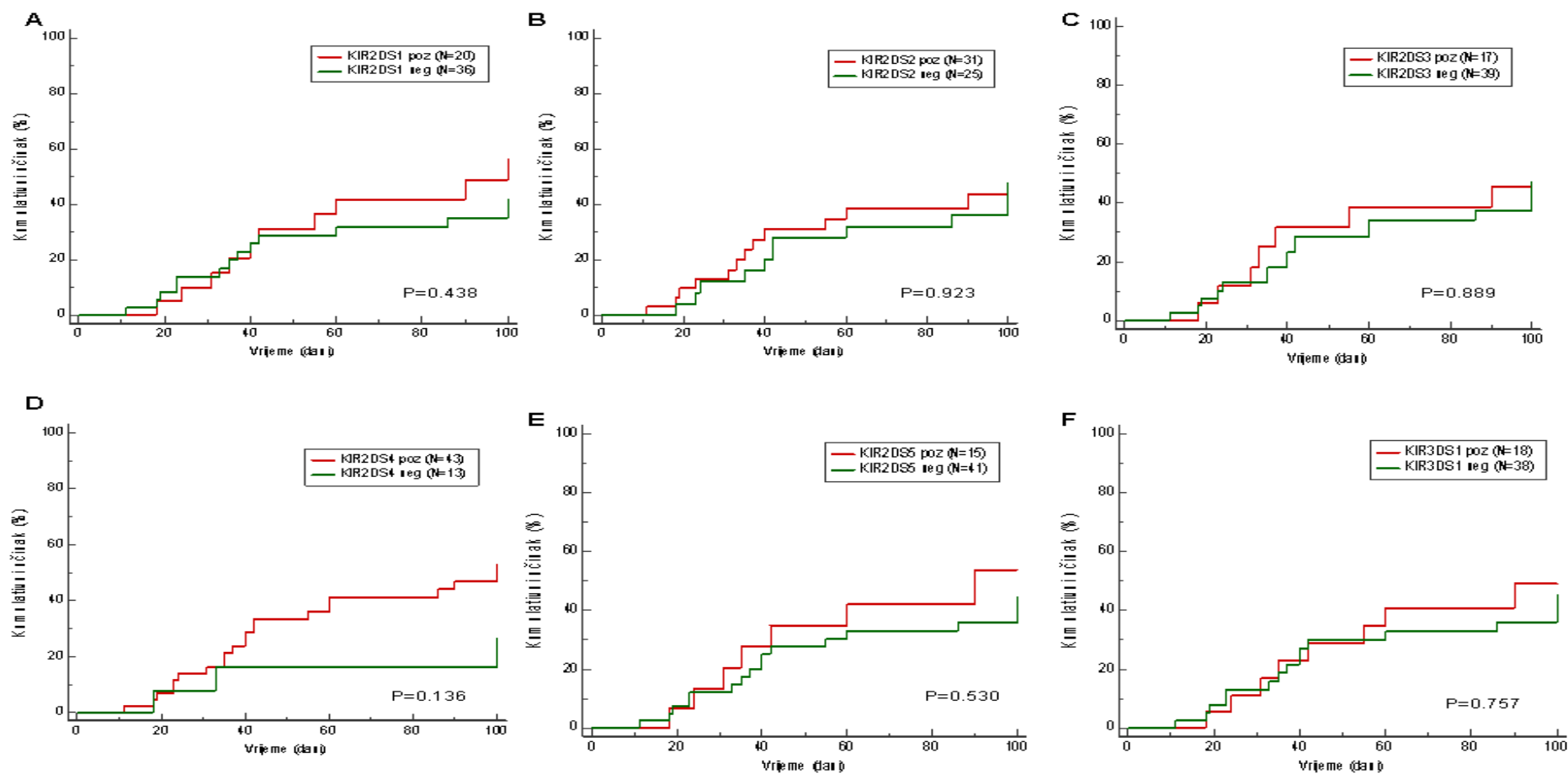
Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 53. Preživljavanje bolesnika nakon lije enja nesrodnom transplantacijom krvotvornih mati nih stanica (N=56) u odnosu na aktivacijske gene KIR primatelja - HvG smjer



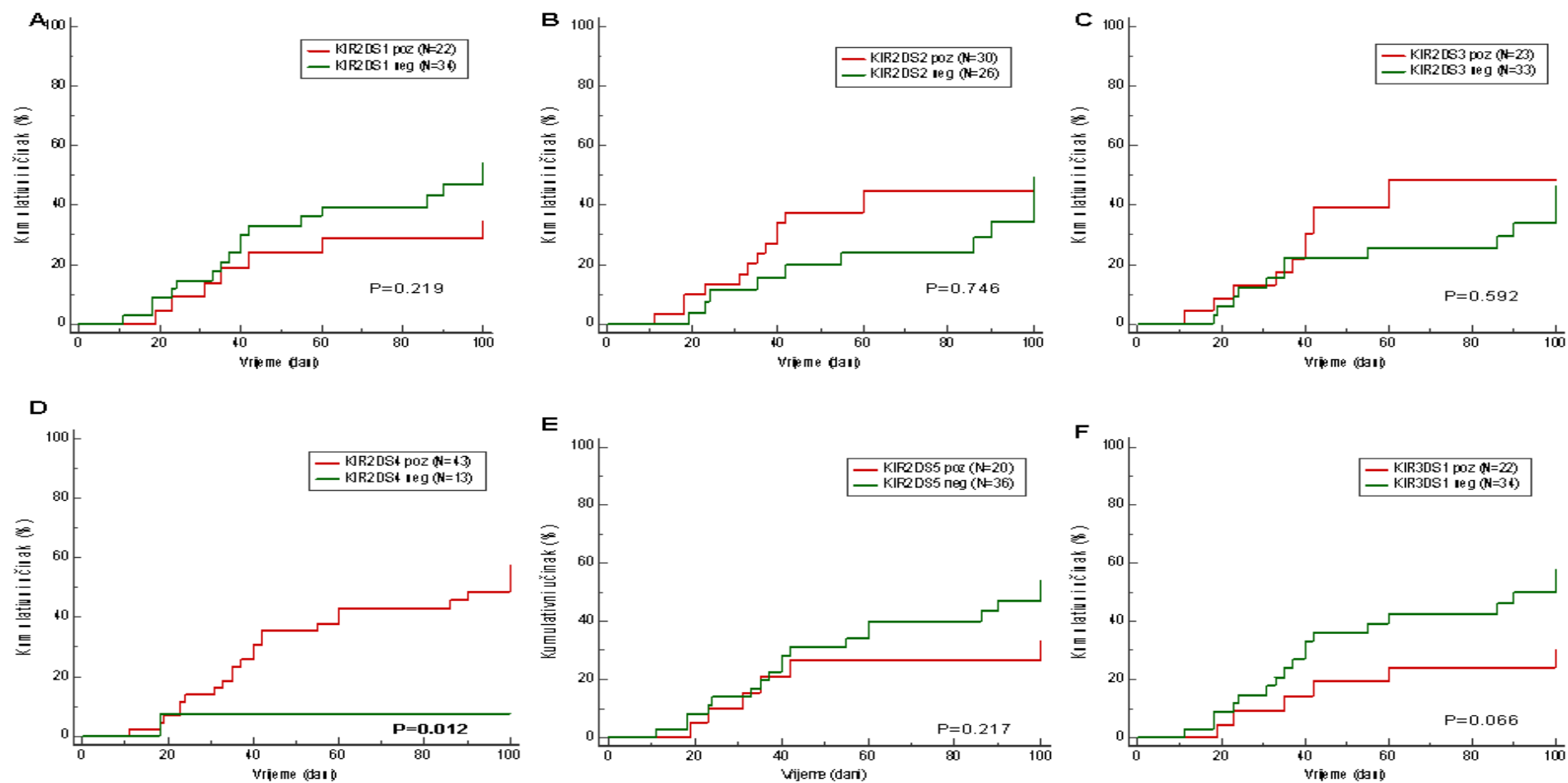
Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 54. Preživljavanje bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) u odnosu na aktivacijske gene KIR davatelja - GvH smjer



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 55. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) u odnosu na aktivacijske gene KIR primatelja - HvG smjer



Legenda: A) KIR2DS1; B) KIR2DS2; C) KIR2DS3; D) KIR2DS4; E) KIR2DS5; F) KIR3DS1

Slika 56. Pojava GvHD-a kod bolesnika nakon liječenja nesrodnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (N=56) u odnosu na aktivacijske gene KIR davatelja - GvH smjer

5. RASPRAVA

Raznovrsnost i uestalost gena KIR te složena biologija proteina KIR i njihova interakcija s molekulama HLA u postupcima liječenja TKMS teme su ove doktorske disertacije. Prvi cilj ovoga rada bio je istražiti raznovrsnost i uestalost gena KIR u hrvatskoj populaciji, odrediti osobitosti pojedinih lokusa KIR, raznovrsnost genotipova te haplotipova KIR. Dobivanje ovakvih populacijskih podataka osnova je za sva daljnja istraživanja uloge gena KIR, kako u transplantacijskoj medicini tako i u istraživanju o povezanosti s različitim autoimunim bolestima. Tako su ovi populacijski podaci iz reprezentative skupine zdravih ispitanika koji predstavljaju populaciju kojoj pripadaju i ispitanici liječeni srodnom i nesrodnom TKMS upotrebljeni za drugi cilj ovoga rada: istraživanje uloge gena KIR u TKMS.

Populacijski dio istraživanja proveden je na uzorku od 125 zdravih ispitanika. Ukupno 16 gena KIR od 17 službeno definiranih i imenovanih od strane HUGO Genome Nomenclature Committee (uvod, tablica 1) pronađeno je u ispitivanom uzorku. U brojnim populacijskim studijama definirani broj gena KIR se razlikuje u rasponu od 14 do 17 gena.

Prvi razlog je gen *KIR2DL5*. U slučaju ovog gena dokazano je da postoje dva različita lokusa odnosno gena: *KIR2DL5A*, koji se nalazi u telomernoj regiji haplotipa i *KIR2DL5B*, koji je smješten u centromernoj regiji (138). Ovi su geni produkt duplikacije gena *KIR2DL5* i samo jedna raznovrsnost u egzonu 1 razlikuje gen *KIR2DL5A* od gena *KIR2DL5B* dok su brojne druge substitucije zajedničke (139). Upravo postojanje navedena dva gena *KIR2DL5* u haplotipu i njihova raznovrsnost otežava genotipizaciju i to ne određivanje ova dva gena zasebno. Iz tog je razloga u ovom radu kao i u većini drugih populacijskih studija istraživano samo zajednički lokus *KIR2DL5*, bez mogućnosti razlikovanja njegovih stvarnih gena *KIR2DL5A* i *KIR2DL5B*.

Osim navedenog problema vezano uz gen *KIR2DL5*, razlog je taj što još uvijek nije jasno definirana razlika između toga što su zasebni geni KIR, a što aleli istog gena KIR. To se odnosi primjerice na gene *KIR3DL1* i *KIR3DS1* koji se smatraju alelima istog gena, ali još uvijek su u nomenklaturi imenovani i razlikuju se kao dva zasebna gena (140). Njihov status kao zasebnih gena je upitan bez obzira na različitu inhibicijsku odnosno aktivacijsku funkciju koju vrše. S obzirom da su u radovima prijavljene osobe koje su imale u istom haplotipu i *KIR3DS1* i dvije varijante *KIR3DL1* gena, to se činilo dovoljan argument da se radi o zasebnim genima. U prilog činjenici da se ipak radi o alelima ide njihova visoka homologija egzona i introna kao i to da u većini slučajeva osobe koje su *KIR3DL1* negativne obično budu *KIR3DS1* pozitivne i obratno ili nemaju niti jedan od ova dva gena. Najnovije spoznaje dokazuju da je *KIR3DS1* ipak alel gena *KIR3DL1* (39). Po tome je gen *KIR3DL1* jedinstven

jer sadrži alele koji kodiraju receptore s inhibicijskom i s aktivacijskom funkcijom, a označava se kao lokus *KIR3DL1S1*.

Slika 10, dokazano je da su geni *KIR2DL2* i *KIR2DL3* zapravo aleli jednog lokusa, *KIR2DL2L3*, pri čemu oba kodiraju receptore samo s inhibicijskim uinkom. Lokus *KIR2DL2L3* pripada centromernoj regiji haplotipa, pri čemu se gen *KIR2DL3* pojavljuje samo u haplotipu A, a gen *KIR2DL2* samo u haplotipu B (40). Ako se uzmu u obzir ove spoznaje, tada je stvaran broj gena KIR 15, a ne 17. U ovom radu vodili smo se službenom nomenklaturom IPD-KIR baze podataka (verzija 2.5.0, listopad 2013., broj gena KIR:17) i razmatrali *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* i *KIR3DS1* kao zasebne gene.

S obzirom da je i u većini drugih populacijskih studija princip istraživanja gena KIR isti, usporedba uestalosti gena KIR naše populacije s drugim populacijama bila je lakša i vjerodostojnija. Usporedba naše populacije s drugim populacijama pokazuje manje ili više razlike u uestalostima pojedinih gena KIR ovisno o geografskoj udaljenosti.

Iz klaster mape je vidljivo da su geni okvira istraživanja *KIR2DL4*, *KIR3DL2* i *KIR3DL3* kao i pseudogen *KIR3DP1* prisutni gotovo kod svih ispitanika u većini istraživanih populacija. Postoji nekoliko objavljenih radova s iznimkama gdje neki od gena okvira istraživanja nisu bili prisutni u genotipu: odsutnost gena *KIR2DL4* i *KIR3DP1* kod jednog člana obitelji ispitanika u Centre d'Etude Polymorphisme Humain (CEPH) (141); odsutnost gena *KIR2DL4* kod ispitanika Bubi populacije s Bioko Island Equatorial Guinea i dva ispitanika iz južne Azije (45); dva člana obitelji iz sjeverne Irske (142); odsutnost pseudogena *KIR3DP1* kod dva ispitanika u populaciji Makedonije (89).

Inhibicijski geni *KIR2DL1*, *KIR2DL3* i *KIR3DL1* prisutni su u više od 90,0% ispitanika u populacijama dok su geni *KIR2DL2* i *KIR2DL5* prisutni u rasponu od 30-60%. Veća uestalost gena *KIR2DL2* i *KIR2DL5* (65-80%) prisutna je u populaciji Aboridina iz Australije (98), Amerindijanaca iz Amazone (99), sjevernih Indijaca (100) dok su u populacijama Afrike (101, 113) prisutni s gotovo 100% u uestalosti.

Najveće razlike među populacijama su prisutne u uestalostima aktivacijskih gena KIR. Pri tome izrazito odstupa populacija Aboridina kod kojih je u uestalost aktivacijskih gena *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3* i *KIR3DS1* veća od 80,0% dok je u većini drugih populacija u uestalost između 35-55%. U uestalost gena *KIR2DS5* u većini je populacija 20-35%, u populaciji Xhosa iz Južne Afrike 62,0% (113) dok kod Amerindijanaca iz Amazone prelazi čak 90,0%. Populacije Japana (102) i Kine (103) također odstupaju od većine populacija po

zna ajno manjoj u estalosti gena *KIR2DL2*, *KIR2DS2* i *KIR2DS3* koja je za sva tri gena u rasponu od 12-17%.

U estalost gena *KIR2DS4* podjednaka je u svim populacijama i prelazi 90,0%, osim u populaciji Abori ina gdje iznosi 51,0%. Me utim, za nekolicinu populacija objavljene su i u estalosti potpunih (*KIR2DS4*f*) i deletiranih oblika (*KIR2DS4*d*) gena *KIR2DS4* pa na toj razini postoje zna ajne razlike. U našoj populaciji, gen *KIR2DS4*f* ima u estalost od 42,4% u odnosu na 83,2% u estalosti deletiranog gena *KIR2DS4*d*. To zna i da je omjer potpunog i deletiranog oblika gena *KIR2DS4* 1:2. Isti omjer postoji na primjer i u populaciji Italije (33,0%:89,0%) (90) i populaciji sjeverne Irske (36,0%:82,0%) (143). Prema objavljenim podacima u estalosti potpunog i deletiranog oblika gena *KIR2DS4* u populaciji Kine (80,0%:42,0%) (103) i Japana (70,0%:32,0%) (102), omjer ovih alela je potpuno suprotan i iznosi 2:1.

U slu aju gena *KIR3DL1*, postoji samo nekoliko radova s objavljenim podacima o u estalostima pojedinih alela (ne uklju uju i *KIR3DS1*). U hrvatskoj populaciji, aleli gena *KIR3DL1* koji se izražavaju na stanicama (*KIR3DL1*eks*) prisutni su kod 66,4% ispitanika, dok je alel *KIR3DL1*004* koji se nikad ne izražava na površini stanice prisutan kod 33,6% ispitanika što ini omjer 2:1. U svim ostalim objavljenim populacijskim istraživanjima, u estalosti ova dva alela variraju u postocima, ali njihov kona ni omjer je uvijek isti, 2:1.

Današnja velika raznovrsnost gena KIR kod ljudi nastala je iz samo jednog pradavnog gena, *KIR3D*, prije približno 135,5 milijuna godina (144). Procesima duplikacije gena *KIR3D*, prije 80 milijuna godina stvorena su dva prekursora (*KIR3DL* i *KIR3DX*) za etiri linije humanih gena KIR: linija I iz koje se razvio *KIR2DL4*; linija II koja je u kona nici dala gen *KIR3DL2*; linija III iz koje su formirani *KIR2DL1-3*, *KIR2DS1-5* i pseudogeni *KIR2DP1* i *KIR3DP1* te linija V za gen *KIR3DL3*. Geni KIR linije II i III, koji izražavaju receptore za molekule HLA-A, -B, -C, dalje su izrazito brzo evoluirali procesima miješanja domena (82) i ove dvije linije su karakteristi ne samo za ovjekolike majmune i ljude. Nasuprot tome, geni linije I, *KIR2DL4* i *KIR2DL5* ostali su relativno otporni na promjene.

Posljedica ovakve neobi ne i brze ekspanzije gena su brojni haplotipovi KIR koji se razlikuju u sastavu i broju gena KIR koji ih sa injavaju. U pokušaju odre ivanja sastava gena KIR na jednom kromosomu, haplotipovi KIR su podijeljeni u dvije osnovne kategorije, haplotip A i haplotip B. Unutar haplotipa, geni su podijeljeni u dvije regije, centromernu i telomernu, ome ene konzerviranim genima okvira itanja. Smatra se da je ve ina telomernih gena KIR nastala u posljednjih 1,7 milijuna godina, paralelno s pojavom *Homo erectus* te je

kvantitativna i kvalitativna razlika između haplotipa A i B jedinstvena za ljudsku vrstu i održavana je uravnoteženom selekcijom u svim populacijama istraživanim do danas (145).

Smatra se da takva ravnoteža haplotipova ima nužnu i evolucijski različitiju funkciju: KIR haplotip A nužan je za suzbijanje infekcija (146) dok KIR haplotip B ima značajnu ulogu u održavanju trudnoće (127), što znači da oba imaju izuzetno važnu ulogu u održavanju vrste. KIR haplotip B, za razliku od KIR haplotipa A značajno varira u sastavu gena KIR pri čemu sadrži više gena za aktivacijske receptore KIR. Stoga KIR haplotip A sadrži manji broj izrazito raznovrsnih gena, dok KIR haplotip B ima više i broj manje raznovrsnih gena KIR. Konzervirani KIR haplotip A sadrži više gena za inhibicijske receptore KIR sa samo jednim genom za aktivacijski receptor (*KIR2DS4*), bez obzira na gen *KIR2DL4* koji ima i inhibicijski i aktivacijski potencijal, ali sasvim drugačiju funkciju. To znači da 33,6% osoba (koje su genotipa AA) u našoj populaciji ima samo jedan aktivacijski gen KIR, a 22,4% osoba ima samo deletirani oblik gena *KIR2DS4*, što znači da te osobe nemaju nijedan funkcionalni gen za aktivacijski receptor KIR.

Zanimljivo je da je i u populacijama istočne Azije, gdje je omjer deletirani/potpuni aleli *KIR2DS4* 1:2, postotak osoba koje nemaju nijedan funkcionalni gen za aktivacijski receptor KIR također oko 20.0%. Razlog je znatno veća učestalost KIR haplotipa A u tim populacijama što u konačnici izjednačava učestalost alela *KIR2DS4* u populacijama. Mnoge ranije studije navodile su da je gen *KIR2DS4* predominantno prisutan samo u KIR haplotipu A, međutim segregacijska analiza haplotipova unutar obitelji u radu Maxwell-a i suradnika pokazuje da aleli *KIR2DS4* segregiraju i u KIR haplotipu B s učestalošću od 19,8% (143). S obzirom na tu činjenicu, smatraju da je klasična definicija KIR haplotipa A i B možda previše pojednostavljena organizacija gena KIR.

Odrediti detaljan sastav i jedinstvene haplotipove KIR prilično je teško kada se uzme u obzir broj gena KIR koji mogu biti prisutni (od svega četiri do maksimalno 17); raznovrsnost gena KIR te asimetrična recipročna rekombinacija koja brojnim duplikacijama, delecijama, insercijama i fuzijama gena KIR stvara jedinstvene haplotipove (43, 147). Pyo i suradnici razvili su metodu detaljnog određivanja haplotipa KIR koja se bazira na faznom sekvenciranju svakog pojedinog gena KIR (46, 145). Na uzorku od 4512 sekvenciranih DNA (9024 kromosoma) detaljno su odredili 37 različitih haplotipova KIR i još dodatnih 10 struktura koje su se pojavile samo jednom, a budući da se nisu mogle dokazati dodatnim metodama sekvenciranja, nisu uzete u obzir. Struktura 37 definiranih haplotipova prikazana je u prilogu 2. S obzirom da službeno nazivlje haplotipova KIR još uvijek nije uvedeno u

prakti nu primjenu, navedenih 37 haplotipova imenovano je na temelju prisutne centromerne ili telomerne regije haplotipova A i B.

Ovim radom potvrdili su i postojanje genskog bloka *2DL5-2DS3S5* (geni *KIR2DL5*, *KIR2DS3* i *KIR2DS5*) u obje regije, centromernoj i telomernoj uz 98,7% podudarnosti, što je posljedica asimetri ne rekombinacije koja je premjestila centromerni genski blok *2DL5-2DS3S5* u telomernu regiju ili obrnuto. Za gen *KIR2DL5* se zna da postoji u dvije forme i filogenetska analiza egzona 1 i 2 pokazuje jasnu diferencijaciju u *KIR2DL5A* koji je smješten u telomernoj regiji i *KIR2DL5B* koji se nalazi u centromernoj regiji. Analiza daljnje sekvence gena, od introna 3 do introna 9 gena *KIR2DL5* pokazuje da neki aleli (*2DL5A*00501* i *2DL5B*00201*) asociraju s *KIR2DS3* dok drugi (*2DL5A*001*, *2DL5B*00601*, *2DL5B*00801* i *2DL5B*00401*) asociraju s *KIR2DS5*. To bi zna ilo da egzoni 1 i 2 odre uju smještaj genskog bloka *2DL5-2DS3S5* (telomerno ili centromerno), dok ostatak gena odre uje asocijaciju s jednim od dva mogu a gena iz bloka (*KIR2DS3* ili *KIR2DS5*).

Jiang i suradnici tako er su objavili rad u kojem su na temelju segregacijske analize unutar 793 obitelji (ameri kog i europskog podrijetla) odredili 2999 parentalnih haplotipova KIR me u kojima su daljnjim postupcima genotipizacije i odre ivanja broja kopija gena odredili 71 jedinstveni haplotip KIR (47). Od navedenih 71 haplotipova, 11 haplotipova bilo je prisutno izme u 94,0% ispitanika, dok je ostalih 60 haplotipova imalo frekvenciju manju od 1%. Razlika izme u ove studije i studije Pyo-a i suradnika je na in interpretacije haplotipova kao i metodologija rada. Pyo i suradnici haplotipove koji su sadržavali gene *KIR2DS3* i *KIR2DS5* kao i *KIR2DS4*f* i *KIR2DS4*d* nisu razmatrali kao razli ite haplotipove ve kao jedan haplotip sa setovima gena *KIR2DS3/5* ili *KIR2DS4f/d*, ime se broj haplotipova smanjuje. Jiang i suradnici su takve haplotipove ra unali kao zasebne. Me utim, 11 naj eš ih haplotipova KIR odre enih u studiji Jiang-a i suradnika poklapa se s naju estalijim haplotipovima KIR odre enih sekvenciranjem u studiji Pyo-a i suradnika. Ono što se smatra upitnim u studiji Jianga i suradnika je 37 haplotipova koji se pojavljuju samo jednom u ispitivanoj skupini, a nisu potvr eni sekvenciranjem.

U estalost haplotipova KIR A i B zna ajno varira izme u razli itih etni kih skupina (148). Sedam naju estalijih genotipova (AA1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6 i AB7) koji su prisutni kod 85,0% ispitanika u hrvatskoj populaciji podudaraju se s naju estalijim genotipovima u svijetu. U populacijskim studijama do danas prona eno je 492 razli itih genotipova KIR. Genotip AB naju estaliji je u bijeloj rasi i populacijama Afrike, dok je genotip AA dominantan u populacijama Azije, prvenstveno Japana (102), Kine (103) i Koreje (149) gdje mu je zastupljenost preko 60,0%. Opsežna populacijska studija Hollenbach-a i

suradnika u kojoj su istraživali uzorke raznovrsnosti gena KIR unutar 52 populacije koje pokrivaju sedam velikih svjetskih regija, potvrdila je injenicu da se naju estaliji genotipovi prema klasifikaciji AFND baze (AA1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6 i AB7) poklapaju s naju estalijim odre enim haplotipovima KIR, odnosno da su kombinacija naj eš a tri centromerna i dva telomerna motiva gena KIR (150). U estalosti haplotipova na razini alela objavljeni su u radu Vierra-Green i suradnika (151). Najve a raznolikost alela postoji kod gena okvira itanja te gena telomerne regije haplotipa A (*KIR2DS4* i *KIR3DL1*). Ovi rezultati još jednom dokazuju da KIR haplotip B karakterizira ve a strukturna raznolikost gena KIR dok KIR haplotip A obilježava izrazita raznolikost alela.

Rezultati našeg istraživanja kao i svih drugih, do danas objavljenih studija, pokazuju visoku neravnotežu udruživanja gena KIR telomerne regije i gena KIR centromerne regije, ali gotovo nikakvu izme u gena tih dviju regija me usobno. S obzirom da u ovom radu nismo imali mogućnost provesti segregacijsku analizu niti koristiti metode sekvenciranja i odrediti stvarne haplotipove KIR, oslonili smo se samo na strukturu genotipa KIR pa su vrijednosti LD-a određene na temelju u estalosti pojavljivanja određene kombinacije dva gena KIR zajedno u genotipu. Pri tome je raznovrsnost alela KIR svedena na prisutnost ili odsutnost osnovnog gena KIR.

Gourraud i suradnici su u svom radu odredili vrijednosti LD-a upravo na ove dvije razine: strukturnoj (prisutnost ili odsutnost gena KIR) i haplotipskoj (alelnoj) razini (152), a vrijednosti i kombinacije gena KIR koje su u pozitivnom ili negativnom LD-u ne odstupaju zna ajno s obzirom na navedene pristupe izra una. Vrijednosti LD-a u ovom radu sukladne su s vrijednostima LD-a u njihovom radu i tako er se dijele oko gena *KIR2DL4* jasno ozna avaju i gene centromerne i gene telomerne regije. Gourraud i suradnici su na temelju u estalosti haplotipova i vrijednosti LD-a izme u gena KIR razvili strategiju “obilježavanja” i zaklju ili da je određivanje prisutnosti/odsutnosti 6 gena KIR dovoljno za određivanje ostatka gena u haplotipu. Neki od zaklju aka proizašli iz tih testiranja su slijede i: kada su geni *KIR2DL2* i *KIR2DS3* prisutni u haplotipu – prisutan je i *KIR2DL5B*; kada gen *KIR3DL1* nije prisutan u haplotipu - nije prisutan ni *KIR2DS4*, ali su prisutni geni *KIR2DL5A*, *KIR3DS1* i *KIR2DS1*; kada je prisutan gen *KIR2DL2* – gotovo uvijek je prisutan *KIR2DS2*, dok gena *KIR2DL3* nema. Izra unate pozitivne (PPV, engl. positive predictive value) i negativne (NPV, engl. negative predictive value) prediktivne vrijednosti svih parova gena KIR u centromernoj i u telomernoj regiji strategijom “obilježavanja” prikazane su u prilogu 3a i 3b. Izostavljeni su pseudogeni i geni okvira itanja, osim gena *KIR2DL4*. U našem radu LD

tako er nije izra unat za nijedan gen okvira itanja s obzirom da su prisutni kod svakog ispitanika.

Sve navedene karakteristike gena i alela KIR u kona nici se odražavaju na ispoljavanje razli itih oblika proteina na površini stanica NK s razli itim afinitetom vezanja liganada HLA. Do danas je poznato 678 nukleotidnih sekvenci gena KIR koje kodiraju 343 razli ita proteina KIR. Svi poznati ligandi receptora KIR su molekule HLA razreda I lokusa HLA-A, -B, -C i -G, ali ligandi za sve receptore KIR još uvijek nisu poznati.

Najdominantniji ligandi za ve i broj receptora KIR su molekule HLA-C skupine C1 i C2. U našem radu upravo geni za receptore KIR2DL3 i KIR2DL2, iji su ligandi molekule HLA-C skupine C1 te KIR2DL1, iji su ligandi molekule HLA-C skupine C2, imaju najve i broj prisutnih liganada u ispitivanoj skupini. Vezanje receptora KIR2DL1 s molekulama skupine C2 smatra se najja im inhibicijskim me udjelovanjem, kombinacija KIR2DL2/C1 srednje snažnim dok KIR2DL3/C1 predstavlja najslabije inhibicijsko me udjelovanje (84). Analog receptora KIR2DL1 s aktivacijskom funkcijom je KIR2DS1 koji tako er veže molekule skupine C2, ali sa znatno smanjenim u inkom. Zbog dva puta manje u estalosti u populaciji u odnosu na KIR2DL1, KIR2DS1 u ovom radu pokazuje najve u negativnu korelaciju s ligandima HLA.

Ve smo naveli prije da su geni KIR2DL2 i KIR2DL3 dva alela istog lokusa od kojih KIR2DL2 pripada haplotipu B dok KIR2DL3 pripada haplotipu A. Posljedica toga je kvantitativna razlika u specifi nosti i snazi vezivanja liganda kao i kvalitativna razlika u funkcionalnom u inku. Studija Moesta-e i suradnika pokazuje da je KIR2DL2 snažniji inhibicijski receptor za ligande skupine C1 od KIR2DL3 što je posljedica raznovrsnosti aminokiselina na poziciji 16 u domeni D1 i poziciji 148 u domeni D2 receptora KIR (49). Receptori KIR2DL2 i KIR2DL3 tako er pokazuju i sposobnost vezivanja liganada iz skupine C2, C*02 :02 i C*05 :01, pri emu KIR2DL2 snažnije i s podjednakim afinitetom kao molekule skupine C1 veže i te molekule skupine C2 dok KIR2DL3 pokazuje samo vrlo slabu reaktivnost u kombinaciji s molekulama skupine C2. Razlog je injenica da je KIR2DL2 u prošlosti nastao rekombinacijom gena KIR2DL1 i KIR2DL3 te ima vrlo veliku sli nost s KIR2DL3 u Ig domenama, a s KIR2DL1 u transmembranskoj i citoplazmatskoj regiji što ga po snazi me udjelovanja s ligandima stavlja u sredinu izme u receptora KIR2DL1 i KIR2DL3 (153). Primjeno je tako er da prisutnost receptora KIR2DL2 tijekom diferencijacije stanica NK dominantno smanjuje broj stanica NK koje izražavaju KIR2DL1 recepore (154). Ono što je poznato, a dokazano i u našem radu je snažan LD izme u KIR2DL2 i KIR2DS2, a unato vrlo velikoj sli nosti Ig domena, KIR2DS2 ne veže molekule

HLA-C. Rad Liu-a i suradnika iz 2014. godine dokazao je vezanje receptora KIR2DS2 s molekulama HLA-A*11 :01 (155).

Slijede a po u estalosti receptor/liganad kombinacija je ona receptora KIR3DL1 iji su ligandi molekule skupine HLA-Bw4. Studija iz 1994. godine pokazuje da raznolikost aminokiselina na poziciji 80 (I-izoleucin ili T-treonin) u molekulama HLA-Bw4 uzrokuje razli itu interakciju s KIR3DL1 pri emu su molekule HLA-Bw4 80I snažniji ligandi od molekula HLA-Bw4 80T (156). Rad Luque-a i suradnika pokazao je pak da stanice NK preferiraju ligande HLA-Bw4 80T (157). Danas se zna da je to posljedica razli ite specifi nosti brojnih alotipova receptora KIR3DL1 (158). Lokus *KIR3DL1S1* jedan je od najraznovrsnijih sa 108 razli itih alela poznatih do danas koji se mogu podijeliti u 3 osnovne skupine: *3DL1*005*, *3DL1*015* i *3DS1* (159). Receptor KIR3DS1 je visoko konzerviran u izvanstani nim domenama, ali se od svih ostalih alotipova receptora KIR3DL1 razlikuje u transmembranskoj i citoplazmatskoj regiji, što u kona nici i odre uje njegov aktivacijski u inak, ali i injenicu da nije dokazana interakcija sa molekulama HLA-Bw4. Ipak, brojne studije o povezanosti KIR3DS1 s bolestima pokazuju rezultate da ta veza ipak postoji i to u ve ini slu ajeva s molekulama HLA-Bw4 80I.

U našem radu ispitivana je samo interakcija KIR3DL1 receptora, izuzevši receptore KIR3DS1 (jer ligandi nisu sa sigurnoš u dokazani) kao i alel *KIR3DL1*004* koji nema ispoljen produkt u obliku receptora na površini stanice. Kao ligandi uzete su u obzir sve molekule HLA-B koje pripadaju skupini Bw4 (HLA-B*15:02, -B27, -B37, -B38, -B44, -B47, -B49, -B51, -B52, -B53, -B57, -B58, -B59) kao i molekule HLA-A za koje se zna da tako er pripadaju skupini Bw4 (HLA-A23, -A24, -A32) i za koje je dokazana interakcija s receptorom KIR3DL1.

Za receptor KIR3DL2 svojstveno je da je prisutan kod svih ispitanika te da je prisutan na gotovo svim stanicama NK, ali njegovi ligandi HLA-A3 i -A11 u populaciji su prisutni s malom u estaloš u od 11,2%, odnosno 5,2%. Studija Shaw-a i suradnika dokazala je da receptor KIR3DL2 veže i molekule HLA-B*27, ali samo kada su teški lanci u slobodnoj konformaciji, bez 2 mikroglobulina (160). Još nije jasno da li je veza funkcionalna kada su molekule HLA-B*27 u obliku monomera ili dimera kao što nije ni sasvim jasno da li je veza KIR3DL2 s HLA-A3/A11 ligandima funkcionalna samo u slu aju kada imaju vezane peptide Epstein-Barr virusa.

Receptor KIR2DS4, osim što je najstariji, možda je i najzanimljiviji i ima najširi spektar liganada s kojima stupa u interakciju. Istraživanje Graef-a i suradnika ispitivala je vezivanje solubilnih molekula KIR2DS4 (jer to je oblik u kojem ovaj receptor uglavnom

postoji s 95 različitih molekula HLA razreda I (51). Pozitivne rezultate vezanja dobili su samo u slučaju šest molekula HLA-C (skupina C1 - C*01:02, C*14:02 i C*16:01; skupina C2 - C*02:02, C*04:01 i C*05:01), dvije molekule HLA-A (A*11:01 i A*11:02) i nijedne molekule HLA-B. Specifičnost vezanja s molekulama iz skupine C2 podjednako je intenziteta i jednake snage kao i kada ih vežu receptori KIR2DL2 i KIR2DL3. U slučaju molekula skupine C1, ista takva specifičnost i snaga prisutna je samo kod vezanja C*16:01, dok je vezanje C*01:02 i C*14:02 znatno slabije. Također, snaga vezanja s HLA-A*11:02 je četiri puta veća u odnosu na HLA-A*11:01. Zanimljiva je činjenica da receptor KIR2DS4, kao produkt gena linije III veže molekule HLA-A*11 koje su glavni ligandi receptora KIR3DL2, produkta gena linije II. Smatra se da je gen *KIR2DS4* produkt konverzije gena *KIR3DL2*, a s obzirom da su to i dva susjedna gena, oba kodiraju receptore za ligand HLA-A*11, jedan s aktivacijskim, a drugi s inhibicijskim učinkom. Produkti alela *KIR2DS4* s delecijom ne vežu nijednu molekulu HLA.

Jedini preostali receptor za kojeg su poznati ligandi je receptor KIR2DL4. S obzirom da su njegovi ligandi molekule HLA-G prisutne na stanicama trofoblasta i da je njegova glavna funkcija vaskularizacija decidue i razvoj placente u trudnoći, u ovom radu nije detaljnije proučavan.

Sve do sada navedene karakteristike i funkcije gena/receptora KIR istraživane su i u skupini bolesnika liječenih TKMS. Usporedba skupine bolesnika s kontrolnom skupinom pokazala je da je među bolesnicima učestalost gena, haplotipova i genotipova KIR kao i omjer kombinacija receptor KIR/ligand HLA podjednako vrijednostima kontrolne skupine. Jedina statistički značajna razlika postoji za gen *KIR2DS4*F* koji je u znatno većem postotku prisutan u ispitivanoj skupini bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. Isti rezultati dobiveni su i u studiji Petlichkovskog i suradnika (161) te Bao-a i suradnika (162). Među ispitanicima kontrolne skupine i u skupini bolesnika ukupan broj određenih genotipova je 33 pri čemu je u skupini bolesnika otkriven jedan novi, neprijavljeni genotip u AFND bazi. U svibnju 2014. godine novi genotip KIR kao i ostali podaci o učestalosti gena i genotipova KIR u hrvatskoj populaciji, prijavljeni su u AFND bazu (prilog 4). Najučestaliji genotipovi zajednički su u obje skupine, razlika je u rijetkim genotipovima koji se pojavljuju samo jednom u skupini. To u konačnici rezultira i podjednako učestalošću haplotipova A i B između ove dvije skupine.

Za analizu utjecaja gena KIR na ishod TKMS, skupinu bolesnika podijelili smo u dvije skupine ovisno o vrsti davatelja za TKMS (srodan/nesrodan). Usporedba učestalosti gena KIR bolesnika i davatelja u nijednoj skupini nije pokazala statistički značajnu razliku. Također nije

uo ena razlika u u estalostima haplotipova A i B. Zanimljiva je usporedba podudarnosti genotipa KIR bolesnika i davatelja. U skupini srodnih, HLA identiteta parova samo 51% njih je identiteta za genotip KIR. To potvrđuje neovisnost nasljeđivanja gena HLA i gena KIR i činjenicu da podudarnost u genima HLA ne znači i podudarnost u genima KIR. U slučaju nesrodnih parova za očekivati je da će podudarnost biti znatno manja i u našoj skupini bolesnika ona iznosi 16.1%. Prema literaturi, samo 24% nesrodnih osoba će imati isti genotip KIR (66).

Nakon što smo istražili sve populacijske čimbenike, pristupili smo analizi utjecaja gena KIR na čimbenike ishoda TKMS. Na osnovu određenih gena KIR u genotipu svakog bolesnika i njegovog davatelja, pretpostavili smo da odgovarajući receptori KIR postoje i na površini stanica NK. Također, na temelju tipizacije HLA, odredili smo da li odgovarajući ligandi za postojeće receptore KIR postoje ili ne postoje kod svakog para bolesnik-davatelj. S obzirom da se u literaturi navodi pozitivan utjecaj aloreaktivnih stanica NK na ishod TKMS koje nastaju zbog nepostojanja inhibicijskog signala, u razmatranje su uzeti samo inhibicijski receptori KIR i njihovi dobro poznati ligandi (KIR2DL1+molekule HLA-C skupine C2; KIR2DL2/KIR2DL3+molekule HLA-C skupine C1 i C*02:02 i C*05:01 skupine C2; KIR3DL1+HLA-Bw4 i KIR3DL2+HLA-A3/A11). Na tom smo principu definirali broj parova receptor/ligand u rasponu od minimalno 1 do maksimalno 4 para. S obzirom da su to sve receptori čija je u estalost gena jako visoka, nije moguće da ne postoji nijedan inhibicijski par receptor/ligand. Aktivacijske receptore nismo razmatrali u sklopu njihovih liganada već kao zasebne faktore s obzirom da ligandi većine aktivacijskih receptora nisu poznati. Istraživanje je obuhvatilo sva tri modela utjecaja gena KIR na ishod TKMS koja postoje u literaturi („ligand-ligand nepodudarnost“, „KIR-ligand nepodudarnost“, i „haplotip KIR nepodudarnost“) analizirajući i zaseban utjecaj KIR liganada HLA; utjecaj parova KIR/HLA; utjecaj genotipa; zaseban utjecaj aktivacijskih receptora KIR.

Analiza pojedinačnog utjecaja svake od 4 skupine liganada HLA na preživljavanje bolesnika nakon liječenja srodnom TKMS nije pokazala statistički značajan utjecaj na preživljavanje bolesnika, kao ni kod bolesnika liječenih nesrodnom TKMS. Model „ligand-ligand nepodudarnost“ koji se temelji na usporedbi gena HLA primatelja i davatelja, u našem radu se nije pokazao kao dobar prognostički model. To je očekivani rezultat s obzirom da kod srodne TKMS svi parovi su identiteta u genima HLA pa se moguća reaktivnost stanica NK nakon TKMS na temelju HLA nepodudarnosti primatelja i davatelja ne može predvidjeti. Kod nesrodne TKMS HLA nepodudarno je 18 parova, a razlika u ligandima HLA postoji samo kod 4 para i u konačnici ne daje nikakav drugačiji rezultat na ishod TKMS. Također,

nedostatak modela je činjenica da postojanje odgovarajućeg liganda HLA ne znači da i za njega postoji odgovarajući i inhibicijski receptor KIR ili obrnuto. Naš je zaključak da model „ligand-ligand nepodudarnost“ nije dobar prognostički algoritam za ishod srodne ili nesrodne TKMS. Da smo imali mogućnost istražiti bolesnike liječene haploidentnom TKMS te bi razlike vjerojatno bile izraženije i ovaj model bi pokazao u protivnom.

Primjer je pionirska studija Ruggeri i suradnika rađena prema ovom modelu (163-165), koji se najviše naziva i model „Perugia“. Rezultati su pokazali značajno manji povratak bolesti, bolje preživljavanje i smanjen rizik smrtnosti nakon HLA haploidentne TKMS. Prema njihovom zaključku, davatelj koji su nepodudarni u ligandima HLA s primateljem, u GvH smjeru stvaraju klonove aloreaktivnih stanica NK koje onda ubijaju krvotvorne matične stanice primatelja uključujući i stanice leukemije. Dvije velike studije rađene na principu ovog modela kod TKMS s HLA podudarnim nesrodnim davateljem pokazale su različite rezultate. Studija Miller-a i suradnika na uzorku od 2062 ispitanika pokazala je značajno smanjenu pojavu povrata bolesti kada jedan ili više liganada HLA nedostaje kod primatelja (166). Međutim, pojava aGvHD-a bila je povećana, što objašnjavaju mogućnošću aktiviranja limfocita T u presatku odmah nakon TKMS koji su uzrokovali aGvHD prije nego su aloreaktivne stanice NK imale mogućnost ubiti dendritičke stanice i spriječiti aktivaciju limfocita T. Drugo istraživanje Farag-a i suradnika na uzorku od 1571 ispitanika (primatelj/nesrodni davatelj) pokazala je da nepodudarnost liganada HLA primatelja i davatelja nema nikakav pozitivan učinak na preživljavanje, pojavu GvHD-a ili povratak bolesti (167). Njihov zaključak je da izbor nesrodnog davatelja određujući nepodudarnost liganada KIR samo na temelju tipizacije HLA nema opravdanja. Studije koje su još rađene na principu ovog modela, a s pozitivnim (168, 169) odnosno negativnim ili nikakvim učinkom (170-172) navedeni su u prilogu 1.

Unatoč brojnim studijama i različitim pristupima istraživanja receptora KIR, još uvijek ne postoji jedinstven, jasan i klinički dokazan učinak njihove interakcije u TKMS. Ovaj rad je primjer toga u malom. Kada se usporede rezultati skupine bolesnika liječenih srodnom TKMS i bolesnika liječenih nesrodnom TKMS, gotovo da ne postoje istovjetni rezultati.

Prvi primjer je utjecaj liganada skupine C1 i C2 na preživljavanje. U skupini bolesnika liječenih srodnom TKMS, preživljavanje je najbolje (iako ne statistički značajno) kod bolesnika koji su C2C2 homozigoti ili C1C2 heterozigoti, a najlošije kada su C1C1 homozigoti. U skupini bolesnika liječenih nesrodnom TKMS, preživljavanje je najbolje kod bolesnika koji su C1C1 homozigoti, a najlošije kada su C1C2 heterozigoti ili C2C2 homozigoti. Dakle, rezultati su potpuno suprotni, međutim slični primjera ima i u ostalim

studijama. U radu Sobecks-a i suradnika (173), gdje je ispitivana skupina bolesnika lije ena srodnom TKMS, opisani su rezultati koji pokazuju najlošije preživljavanje za bolesnike koji su C1C2 heterozigoti, kao što je slučaj i u našoj skupini bolesnika lije enih srodnom TKMS. S obzirom da osobe koje su C1C2 heterozigoti imaju ve u vjerojatnost da e prona i odgovaraju i inhibicijski receptor KIR u odnosu na osobe koje su homozigoti C1C1 ili C2C2, ve a je i vjerojatnost da e izazvati ja i inhibicijski u inak stanica NK koje su uklju ene u GvL odgovor i time zapravo smanjiti uspješnost TKMS.

Ve i je broj istraživanja koja idu u prilog našim rezultatima dobivenim u skupini bolesnika lije enih nesrodnom TKMS (174-176) u kojima je isto preživljavanje bolje kod bolesnika koji su C1C1 homozigoti. Mogu e objašnjenje ovakvog rezultata leži u karakteristikama stanica NK koje nastaju tijekom obnavljanja krvotvornog sustava nakon TKMS. Stanice NK u ranoj fazi nakon TKMS dominantno izražavaju receptore KIR2DL2 i KIR2DL3 na svojoj površini, dok receptor KIR2DL1 bude izražen tek u nekoj kasnijoj fazi obnavljanja krvotvornog sustava bolesnika. S obzirom da su ligandi receptora KIR2DL2 i KIR2DL3 molekule HLA-C skupine C1, bolesnici koji su C1C1 homozigoti imaju odmah na po etku ve i broj imunokompetentnih stanica NK koje mogu djelovati protiv stanica leukemije i time pove ati vjerojatnost preživljavanja.

Kada pogledamo utjecaj liganada skupine C1 i C2 na pojavu GvHD-a, ponovo su dobiveni razli iti rezultati. Iako ne postoje zna ajne razlike me u samim ligandima, ipak je vidljivo da je u skupini bolesnika lije enih srodnom TKMS pojava GvHD-a je ve a kod bolesnika koji su C1C1 homozigoti, dok je u drugoj skupini bolesnika lije enih nesrodnom TKMS kod bolesnika koji su C1C1 homozigoti pojava GvHD-a najmanja. U studiji Ludajic i suradnika, bolesnici koji su C1C1 homozigoti imaju pove an rizik za pojavu GvHD-a, koji se još dodatno pove ava ukoliko bolesnik primi transplantat od davatelja koji je KIR2DL1 negativan (177). Tako er, Kanga i suradnici su prijavili rezultate gdje bolesnici koji su C1C1 homozigoti imaju pove an rizik za cGvHD, a bolesnici koji su C2C2 homozigoti za aGvHD dok prisutnost i C1 i C2 liganada ima zaštitni u inak (178). U ve spomenutoj studiji Wang-a i suradnika (175) dobiveni su druga iji rezultati gdje je pojava GvHD-a zna ajno manja kod bolesnika koji su C1C1 ili C2C2 homozigoti nego kod heterozigota C1C2.

Utjecaj liganada HLA-Bw4 na preživljavanje je neznatan. Tako er za liganade HLA-A3/A11 gotovo da i nema razlike u preživljavanju kada su prisutni ili nisu što može biti zapravo potvrda *in vitro* studija gdje je dokazano da su ove molekule ligandi za KIR3DL2 samo u slučaju kada imaju vezane peptide Epstein-Barr virusa.

Analiza primjenom modela „KIR-ligand nepodudarnost“ (usporedba KIR receptor-ligand HLA), za svaki par primatelj-davatelj određen je broj i vrsta postoje ih kombinacija inhibicijskih receptora KIR i liganda HLA u smjeru GvH i HvG. Ukoliko primatelj nema odgovarajući i ligand HLA za inhibicijski receptor davatelja, nepodudarnost je u GvH smjeru, a par u kojem primatelj ima receptor KIR za koji ne postoji odgovarajući i ligand HLA kod davatelja nepodudaran je u HvG smjeru. Što je broj određenih kombinacija iKIR-HLA manji, nepodudarnost je veća, a time i veća vjerojatnost nastanka aloreaktivnih stanica NK. Općenito gledajući, u obje skupine bolesnika preživljavanje je najbolje kada su sve kombinacije iKIR-HLA prisutne, tj. kada su primatelj i davatelj KIR-HLA podudarni, u odnosu na lošije ishode kada postoji nepodudarnost. Takvi rezultati nisu u skladu s teorijom da nastanak aloreaktivnih stanica NK ima pozitivan utjecaj na ishod TKMS. Brojne studije (179-187) također imaju različite i nejedinstvene rezultate (prilog 1). Daljnje analize trebalo bi usmjeriti na određivanje kombinacija iKIR-HLA koje nedostaju, pri čemu ligandi skupine C1 i C2 imaju najvažniju ulogu. U skupini bolesnika liječenih srodnom TKMS, statistički bolje preživljavanje imaju primatelji kod kojih su prisutni svi ligandi ili nedostaje samo skupina C1, što je u skladu s prethodnim rezultatom da je preživljavanje bolesnika najlošije kada je skupina C1 prisutna. U nesrodnoj TKMS ne postoji tako jasna granica koji od liganda bi imao značajan utjecaj, iako postoji tendencija da su to molekule skupine C2 i možda HLA-Bw4. Utjecaj broja nepodudarnosti iKIR-HLA na pojavu GvHD-a također nema neku značajniju razliku. Iako ne postoji statistički značajna razlika između pojave GvHD-a i broja postojećih parova iKIR/ligand HLA, najveći postotak GvHD-a bio je kod bolesnika koji su imali po 3 para iKIR/ligand HLA, među kojima u najviše slučajeva nedostaje ligand skupine C2. Za pretpostaviti je da su zapravo ligandi skupine C1 rizični faktori u pojavi GvHD-a, dok skupina C2 djeluje zaštitno.

Gledajući i rezultate utjecaja genotipa KIR primatelja i davatelja na ishod TKMS, u obje skupine bolesnika najbolje je preživljavanje u kombinaciji primatelj AA/davatelj Bx dok je najlošija kombinacija ona gdje je davatelj genotipa AA. Ti su rezultati u skladu sa studijom Symons-a i suradnika čiji rezultati pokazuju statistički značajno bolje preživljavanje bolesnika s genotipom AA čiji je davatelj bio genotipa Bx, dok je najlošije preživljavanje kada je davatelj bio genotipa AA (188). Također, istraživanje Cooley-e i suradnika dokazalo je da davatelji s jednim ili dva haplotipa B (AB ili BB genotip) više od 30% povećavaju preživljavanje bolesnika i smanjuju povrat bolesti (189). Njihov zaključak je da bi u slučaju izbora, davatelj genotipa Bx trebao uvijek biti odabran ispred davatelja koji je genotipa AA. Suprotni rezultati prikazani su u studiji McQueen-a i suradnika gdje rezultati

pokazuju najbolje preživljavanje u slučaju kada je primatelj genotipa Bx, a davatelj genotipa AA odnosno, najlošiji ishod kada je primatelj genotipa AA u kombinaciji s davateljem genotipa Bx (190). Takve loše kombinacije ujedno povećavaju i pojavu GvHD-a kao i povrata bolesti. U našem radu, povećana pojava GvHD-a minimalno postoji upravo u slučaju najpovoljnije kombinacije za preživljavanje, primatelj AA/davatelj Bx.

Analiza uloge pojedinačnih gena za aktivacijske receptore KIR na ishod TKMS pokazala je značajni utjecaj gena *KIR2DS4* i njegovih potpunih i deletiranih oblika alela. U obje skupine bolesnika, prisutnost gena *KIR2DS4* (u GvH i HvG smjeru) povezana je s lošijim preživljavanjem i većom pojavom GvHD-a dok je preživljavanje najbolje i pojava GvHD-a najmanja u slučaju kada gena *KIR2DS4* nema ili postoji samo alel *KIR2DS4*d*. Isti rezultati dobiveni su u radu Bao-a i suradnika (162). Poznato je da *KIR2DS4*f* aleli imaju zaštitnu ulogu za reaktivacije CMV-a (191), međutim u ovom radu nismo istraživali povezanost gena KIR s CMV infekcijom kod bolesnika nakon TKMS. Možemo zaključiti da je *KIR2DS4* gen na kojeg bi u svakom slučaju trebalo obratiti pozornost prilikom odabira davatelja.

Gen *KIR2DS5* pokazuje statističku značajnost u skupini bolesnika liječenih srodnom TKMS pri čemu je preživljavanje lošije u njegovoj prisutnosti, dok je pojava GvHD-a manja. Studije o receptoru *KIR2DS5* povezuju ga s različitim bolestima i različitim učincima, međutim direktna povezanost s TKMS nije opisana. S obzirom da točna funkcija kao ni ligandi ovog receptora nisu točno opisani, teško je pretpostaviti mehanizam djelovanja. U studiji Schellekens-a i suradnika receptor *KIR2DS5* povezan je s povećanom učestalošću povrata bolesti (192). U radu Nowak-a i suradnika dokazali su da prisutnost gena *KIR2DS5* štiti presadak bubrega od akutnog odbacivanja dok njegova odsutnost povećava odbacivanje presatka (193).

Gen *KIR2DS3* jedini je koji pokazuje pozitivan učinak na preživljavanje kada je prisutan, ali ujedno i povećanu učestalost GvHD-a. Povećana pojava GvHD-a nakon TKMS u kojoj je davatelj bio *KIR2DS3* pozitivan prikazana je i u radu Gagne-a i suradnika (194). Rad McQueen-a i suradnika ponovo pokazuje suprotne rezultate i prema njima *KIR2DS3* djeluje zaštitno protiv GvHD-a (190).

Za ostale aktivacijske gene KIR u našem radu nije vidljiv značajan utjecaj na preživljavanje ili GvHD. Prema podacima u literaturi, prisutnost gena *KIR2DS2* u davatelju povezana je s povećanom smrtnosti primatelja (195); gen *KIR2DS1* zaštitno djeluje na povrat bolesti, pospješuje prihvatanje presatka i smanjuje pojavu GvHD-a (196, 197); gen *KIR3DS1* povezan je sa smanjenom pojavom GvHD-a i smanjenom smrtnošću primatelja (198).

Analiza utjecaja gena/receptora KIR na postizanje punog kimerizma u našem radu nije pokazala statistički značajnu povezanost, a razlika postoji u slučaju kombinacije genotipova KIR primatelja i davatelja, gdje je postizanje punog kimerizma najlošije u slučaju kombinacije primatelj Bx/davatelj AA. U studiji Sobecks-a i suradnika ispitan je u inak parova iKIR-HLA na postizanje punog kimerizma pri čemu dobiveni rezultati govore da što je manji broj parova iKIR-HLA prisutan, to je lošije postizanje punog kimerizma i povećano odbacivanje presatka (204). To znači da bolesnici s malim brojem inhibicijskih receptora imaju veći broj aktivnih stanica NK usmjerenih protiv stanica davatelja koje reduciraju postizanje punog kimerizma. Suprotni rezultati dobiveni su u studiji Wysoczansk-a i suradnika gdje je postizanje punog kimerizma bilo bolje kod primatelja s haplotipom B što bi značilo da veći broj aktivacijskih receptora doprinosi postizanju punog kimerizma (205). Međutim, za donošenje bilo kakvog konačnog zaključka treba biti vrlo oprezan i uzeti u obzir da su istraživane skupine bolesnika raznovrsne, a poznato je da bolesnici s različitim dijagnozama, protokolima kondicioniranja, vrstom transplantata i sliče ne postižu puni kimerizam u različitim postocima, a da kod nekih bolesnika nije ni nužno da se postigne puni kimerizam.

Iako mehanizmi djelovanja svih gena KIR nisu još točno opisani, ovakvi podaci o kliničkom utjecaju pojedinih gena KIR trebali bi se uzimati u obzir prilikom izbora davatelja, a u svrhu poboljšavanja ishoda TKMS. Različiti učinci kao i brojni proturječni rezultati prijavljeni su kroz studije navedene u ovom radu. Moguće objašnjenje je individualna i vrlo složena priroda postupaka TKMS. Prvi razlog bi mogli biti transplantacijski protokoli koji se od bolnice do bolnice razlikuju u postupcima kondicioniranja, primjenjenim lijekovima, korištenju različitih vrsta transplantata, profilakse GvHD-a i slično. Dalje, svaki bolesnik je različit uzevši u obzir dijagnozu, stupanj bolesti u vrijeme TKMS, dob, spol, izvor KMS, podudarnost u genima HLA bolesnik-davatelj i slično. Složenost genskog sustava KIR također dodatno doprinosi raznovrsnosti rezultata.

Većina radova sadrži konstruktivne podatke, ali nijedna ne daje jasne, formulirane zaključke i smjernice na koje treba koristiti gene KIR i sve njihove karakteristike u TKMS. Ipak, Leung je u svom radu u svrhu reguliranja aktivnosti stanica NK u TKMS iznio slijedeći i prijedlog algoritma odabira davatelja (206):

- I) Dostupan >1 HLA podudaran davatelj
 - 1) odabir davatelja s nepodudarnošću u receptor KIR/ligand HLA

- 2) odabir davatelja s KIR haplotipom B
- 3) nije potrebno uzimati u obzir nepodudarnost receptor KIR/ligand HLA

II) Nedostupan HLA podudaran davatelj

- 1) odabir davatelja s najmanjim brojem nepodudarnosti HLA
- 2) odabir davatelja s nepodudarnoš u receptor KIR/ligand HLA
- 3) odabir davatelja s KIR haplotipom B
- 4) izbje i davatelja s nepodudarnoš u KIR/ligand HLA

Usporedba rezultata razli itih studija i predloženih smjernica dovodi ovaj algoritam u pitanje. Primjer je odmah rezultat iz našeg rada gdje nismo dokazali da nepodudarnost receptor KIR/ligand HLA ima pozitivan u inak na preživljavanje. Slijede i primjer mogu biti nejedinstveni rezultati u pogledu pozitivnog ili negativnog u inka KIR haplotipa B kod davatelja. U našem radu rezultati idu u prilog ovom algoritmu jer je najbolje preživljavanje bilo kod bolesnika iji je davatelj sadržavao KIR haplotip B. Me utim, ve smo naveli i studije u kojima je davatelj s haplotipom B najlošiji izbor. U svakom slu aju ovaj bi algoritam trebalo dalje raspraviti.

Moderne i sve naprednije tehnologije odre ivanja gena i alela KIR te interakcija receptora KIR s definiranim ligandima proizvesti e još više imunogenetskih podataka koje bi trebalo zajedni kim snagama standardizirati i pokušati prona i najbolji na in kako ih direktno primjeniti. Tako er, bilo bi potrebno provesti me unarodnu multicentarsku studiju koja bi dala podatke o velikom broju homogenizirane skupine bolesnika (lije enih po istim transplantacijskim protokolima i ujedna enih prema klini kim osobinama) na temelju kojih bi se mogao izvesti zaklju ak o ulozi gena KIR u TKMS. injenica je da svako istraživanje vezano uz TKMS nastoji prona i najbolju strategiju izbora davatelja kako bi ishod transplantacije, a u kona nici i kvaliteta života bolesnika bila što bolja.

6. ZAKLJU AK

Na temelju rezultata uestalosti, gena, haplotipova i genotipova KIR u kontrolnoj skupini može se zaključiti da su u hrvatskoj populaciji prisutni svi do danas poznati geni KIR, pri čemu su geni okvira itanja prisutni kod svih ispitanika. Na temelju usporedbe uestalosti gena KIR u hrvatskoj populaciji s ostalim istraživanim populacijama Europe i svijeta zaključujemo da je populacija Hrvatske genetski najbliža s populacijama Srbije, Irana, Turske, Makedonije i Njemačke.

Na temelju rezultata uestalosti, gena, haplotipova i genotipova KIR u skupini bolesnika liječnik TKMS može se zaključiti da, zbog statistički značajne veće uestalosti gena *KIR2DS4**f u odnosu na kontrolnu skupinu, ovaj gen može biti od značaja u TKMS.

Na temelju rezultata istraživanja tri različita modela kojima se na temelju dosadašnjih spoznaja nastoji objasniti uloga gena KIR u srodnoj i nesrodnoj TKMS možemo zaključiti:

- model "ligand-ligand nepodudarnost" nije dobar prognostički model za procjenu ishoda niti u srodnoj niti u nesrodnoj TKMS
- model "KIR-ligand nepodudarnost" mogao bi se primjeniti kao prognostički model za procjenu ishoda srodne TKMS
- model "haplotip KIR nepodudarnost" najbolji je model za procjenu ishoda i srodne i nesrodne TKMS

Rezultati modela "haplotip KIR nepodudarnost" ukazuju da je slabije preživljavanje u srodnoj TKMS povezano s prisutnošću u gena *KIR2DS5* kod primatelja te s prisutnošću u gena *KIR2DS4* kod davatelja. Nasuprot tome, u nesrodnoj TKMS, prisutnost gena *KIR2DS3* kod davatelja povezana je s boljim preživljavanjem bolesnika, dok je prisutnost gena *KIR2DS4* kod primatelja povezana s većom uestalošću u pojave GvHD-a. Ovi rezultati su u skladu s dobivenim rezultatima koji ukazuju na najbolje preživljavanje kod kombinacije genotipova primatelj AA/davatelj Bx u obje skupine bolesnika.

Na temelju ovih rezultata proizlazi da se u srodnoj i nesrodnoj TKMS, u slučaju mogući odabira između nekoliko davatelja, može razmotriti mogućnost da se najpodobnijeg davatelja odredi i na temelju modela "haplotip KIR nepodudarnost".

Rezultati ovog istraživanja, sukladno rezultatima istraživanjima drugih autora, ukazuju da uloga gena KIR na ishod TKMS još uvijek nismo u mogućnosti do kraja razjasniti te da bi

daljnja istraživanja trebalo usmjeriti na meunarodne multicentrične studije koje su jedini model koji omogućuje stvaranje skupina s velikim brojem bolesnika ujednaenih prema kliničkim osobinama.

Posebna vrijednost ovog istraživanja je novootkriveni genotip KIR u ispitivanoj skupini bolesnika koji se sastoji od 10 gena KIR: *KIR2DL1-2DL2-2DL3-2DL4-2DL5-2DS4-3DL2-3DL3-2DP1-3DP1* koji je prijavljen u AFND bazu u svibnju 2014. godine gdje mu je dodijeljen identifikacijski broj BB/546.

Uz novi genotip KIR i ostali podaci o učestalosti gena i genotipova KIR u hrvatskoj populaciji prijavljeni su u AFND bazu, a rezultati ovog rada dali doprinos svjetskoj bazi podataka o genetskoj raznovrsnosti gena KIR.

7. POPIS LITERATURE

1. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW (1959) Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 38:1709-1716.
2. Andreis I, Batini D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2004) *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb, šesto izdanje.
3. Štingl K (2009) Uloga rezultata analize mikrosatelitskih lokusa u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
4. Beksač M, Dalva K (2012) Role of Killer Immunoglobulin-Like Receptor and Ligand Matching in Donor Selection. *Bone Marrow Res* 27:1695.
5. Moretta L, Moretta A (2004) Killer immunoglobulin-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 16:626-633.
6. Duraković N (2008) Uloga primateljevih dendritičnih stanica u adoptivnoj imunoterapiji nakon transplantacije koštane srži. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
7. Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975) Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5:112-117.
8. Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) *Immunobiology* 5, Garland Publishing
9. Farag Sherif S, Fehniger Todd A, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100:1935-1947.
10. Yoon SR, Chung JW, Choi I (2007) Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Molecules and Cells* 24:1-8.
11. Mujaj SA, Spanevello MM, Gandhi MK, Nourse JP (2011) Molecular mechanisms influencing NK cell development: implications for NK cell malignancies. *Am J Blood Res* 1:34-45.
12. Austen KF, Michael MF, Atkinson JP, Cantor H (2001) *Samter's immunological diseases*, 6th edition.
13. Cooper AM, Fehniger AT, Turner CS, Chen SK, Ghaheri AB, Ghayur T, Carson EW, Caligiuri AM (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* 97:1845-1850.

14. Lünemann A, Lünemann DJ, Münz C (2009) Regulatory NK-Cell Functions in Inflammation and Autoimmunity. *Mol Med* 15:352-358.
15. Boyton RJ, Altmann DM (2007) Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clinical and Experimental Immunology* 149:1-8.
16. Hallet William HD, Murphy William J (2004) Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cellular & Molecular Immunology* 1:12-21.
17. Parham P (2003) Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Tissue Antigens* 62:194-200.
18. Pigeon VS, Rudnicka D, Davis MD (2012) Illuminating the dynamics of signal integration in Natural Killer cells. *Front Immunol* 3:308.
19. O'Connor MG, Hart MO, Gardiner MC (2005) Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 117:1-10.
20. Witt CS, Goodridge J, Gerbase-DeLima MG, Daher S, Christiansen FT (2004) Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction* 19:2653-2657.
21. Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005) Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet* 1:e27.
22. Raulet HD, Vance ER (2006) Self-tolerance of natural killer cells. *Nature* 6:520-531.
23. Gardiner CM (2007) Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *International Journal of Immunogenetics* 35:1-8.
24. Orr TM, Lanier LL (2010) Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 142:847-856.
25. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity ? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49.
26. Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar, Bergemann TL, McQueen KL, Guethlein LA, Parham P, Miller JS (2007) A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood* 110:578-586.
27. Meyaard L, Hurenkamp J, Clevers H, Lanier LL, Phillips JH (1999) Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 function as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology* 162:5800-5804.

28. Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM (2007) Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. *Hum Immunol* 68:128-134.
29. Maltseva DV, Sakharov DA, Tonevitsky EA, Northoff H, Tonevitsky AG (2011) Killer cell immunoglobulin-like receptors and exercise. *EIR* 17:150-163.
30. Béziat V, Traherne JA, Liu LL, Jayaraman J, Enqvist M, Larsson S, Trowsdale J, Malmberg KJ (2013) Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* 121:4703-4707.
31. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P (2008) MHC-class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 112:2369-2380.
32. Malmberg KJ, Michaëlsson J, Parham P, Ljunggren HG (2011) Killer cell immunoglobulin-like receptor Workshop: insights into evolution, genetics, function and translation. *Immunity* 35:653-657.
33. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA (2011) Variable NK cell Receptors Exemplified by Human KIR3DL1/S1. *J Immunol* 187:11–19.
34. Campbell SK, Purdy KA (2010) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132:315–325.
35. Frazier WR (2013) Allelic variation in KIR2DL3 generates a KIR2DL2-like receptor with increased binding to its HLA-C ligand. A dissertation, Faculty of the graduate school of arts and sciences of Georgetown University.
36. Long OE (2008) Negative signalling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 224:70–84.
37. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE (2013) IPD-the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Research* 41:1234-1240.
38. Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H (2003) Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002. *Tissue Antigens* 62:79-86.
39. O'Connor GM, McVicar D (2013) The yin-yang of KIR3DL1/S1: molecular mechanisms and cellular function. *Crit Rev Immunol* 33:203-218.

40. Keaney L, Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D (2004) Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity III. KIR2DL3. *Tissue Antigens* 64:188-194.
41. Carrington M, Norman P (2003) The KIR gene cluster. [Internet] Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
42. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Research* 39:913-919.
43. Traherne JA, Martin M, Ward R, Ohashi M, Pellett F, Gladman D, Middleton D, Carrington M, Trowsdale J (2010) Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex. *Hum Mol Genet* 19:737-751.
44. Rajalingam R (2011) Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* 46:216-228.
45. Middleton D, Gonzalez F (2009) The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 129:8-19.
46. Pyo CW, Wang R, Vu Q, Cereb N, Yang SY, Duh FM, Wolinsky S, Martin MP, Carrington M, Geraghty DE (2013) Recombinant structures expand and contract inter and intragenic diversification at the KIR locus. *BMC Genomics* 14:89.
47. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, Cookson WO, Trowsdale J, Traherne JA (2012) Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res* 22:1845-1854.
48. Boyington JC, Sun PD (2002) A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 38:1007-1021.
49. Moesta A, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol* 180:3969-3979.
50. Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E (2003) Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J. Exp. Med* 7:933-938.
51. Graef T, Moesta AK, Norman PJ, Abi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM, Gleimer M, Hammond JA, Guethlein LA, Bushnell DA, Robinson PJ, Parham P (2009) KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 206:2557-2572.

52. Foley BA, De Santis D, Van Beelen E, Lathbury LJ, Christiansen FT, Witt CS (2008) The reactivity of Bw4 + HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood* 112:435–443.
53. Pando JM, Gardiner MC, Gleimer M, McQueen LK, Parham P (2003) The protein made from a common allele of KIR3DL1(3DL1/004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 11. *J Immunol* 171:6640–6649.
54. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A (2008) Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 112:708–710.
55. Körner C, Altfeld M (2012) Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immunol* 326:1-11.
56. Shaw J, Kollnberger S (2012) New perspectives on the ligands and function of the killer cell immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in health and disease. *Front Immunol* 339:1-7.
57. Willemze R, Ruggeri A, Purtill D, Rodrigues CA, Gluckman E, Rocha V, Eurocord and of the European Group of Blood and Marrow Transplantation (2010). Is there an impact of killer cell immunoglobulin-like receptors and KIR-ligand incompatibilities on outcomes after unrelated cord blood stem cell transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol* 23:283-290.
58. Rajagopalan S, Long EO (2012) KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol* 258:1-6.
59. Miah SM, Hughes TL, Campbell KS (2008) KIR2DL4 differentially signals downstream functions in human NK cells through distinct structural modules. *J Immunol* 180:2922-2932.
60. Petersdorf EW, Malkki M, Hsu K, Bardy P, Cesbron A, Dickinson A, Dubois V, Fleischhauer K, Kawase T, Madrigal A, Morishima Y, Shaw B, Spellman S, Spierings E, Stern M, Tiercy JM, Velardi A, Gooley T (2013) International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation.16th IHIW: international histocompatibility working group in hematopoietic cell transplantation. *Int J Immunogenet* 40:2-10.
61. Grzywacz B, Miller JS, Verneris MR (2008) Use of natural killer cells as immunotherapy for leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 21:467-483.

62. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS (2010) Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* 22:130-137.
63. Moretta L, Locatelli F, Pende D, Sivori S, Falco M, Bottino C, Mingari MC, Moretta A (2011) Human NK receptors: from the molecules to the therapy of high risk leukemias. *FEBS Lett* 585:1563-1567.
64. Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Bertaina A, Falco M, Moretta A, Moretta L (2013) Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol* 15:1-7.
65. Hallett WH, Murphy WJ (2004) Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol* 1:12-21.
66. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S (2013) Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer* 4:25-35.
67. Leung W, Iyengar R, Triplett B, Turner V, Behm FG, Holladay MS, Houston J, Handgretinger R (2005) Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol* 174:6540-6545.
68. Hsu CK, Dupont B (2005) Natural killer cell receptors: Regulating innate immune responses to hematologic malignancy. *Transplant Immunobiology* 42:91-103.
69. Oevermann L, Handgretinger R (2012) New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatric Research* 71:418-426.
70. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SG, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS (2010) Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 116:2411-2419.
71. Laperrousaz S, Tiercy S, Villard J, Ferrari-Lacraz S (2012) HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation. *Swiss Med Wkly* 142:w13668.
72. Vampa ML, Norman PJ, Burnapp L, Vaughan RW, Sacks SH, Wong W (2003) Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. *Transplantation* 76:1220-1228.

73. Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K (2007) KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation* 84:1527–1533.
74. Nowak I, Magott-Procelewska M, Kowal A, Miazga M, Wagner M, Niepiekło-Miniewska W, Kamińska M, Wiñiewski A, Majorczyk E, Klinger M, Łuszczek W, Pawlik A, Płoski R, Barcz E, Senitzer D, Kunierczyk P (2012) Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA genotypes affect the outcome of allogeneic kidney transplantation. *PLoS One* 7:e44718.
75. Van Bergen J, Thompson A, Haasnoot GW, Roodnat JJ, de Fijter JW, Claas FH, Koning F, Doxiadis II (2011) KIR-ligand mismatches are associated with reduced long-term graft survival in HLA-compatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 11:1959-1964.
76. Tran TH, Mytilineos J, Scherer S, Laux G, Middleton D, Opelz G (2005) Analysis of KIR ligand incompatibility in human renal transplantation. *Transplantation* 80:1121-1123.
77. Tran TH, Unterrainer C, Fiedler G, Döhler B, Scherer S, Ruhstroth A, Adamek M, Middleton D, Opelz G (2013) No impact of KIR-ligand mismatch on allograft outcome in HLA-compatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 13:1063-1068.
78. Hanvesakul R, Spencer N, Cook M, Gunson B, Hathaway M, Brown R, Nightingale P, Cockwell P, Hubscher SG, Adams DH, Moss P, Briggs D (2008) Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. *Am J Transplant* 8:1931-1941.
79. Fosby B, Næss S, Hov JR, Traherne J, Boberg KM, Trowsdale J, Foss A, Line PD, Franke A, Melum E, Scott H, Karlsen TH (2014) HLA variants related to primary sclerosing cholangitis influence rejection after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 20:3986-4000.
80. Askar M, Avery R, Corey R, Lopez R, Thomas D, Pidwell D, Eghtesad B, Miller C, Fung J, Zein NN (2009) Lack of killer immunoglobulin-like receptor 2DS2 (KIR2DS2) and KIR2DL2 is associated with poor responses to therapy of recurrent hepatitis C virus in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 15:1557-1563.
81. Cheent K, Khakoo SI (2009) Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 126:449–457.

82. Rajalingam R, Parham P, Abi-Rached L (2004) Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors. *J Immunol* 172:356-369.
83. Takeshita LY, Gonzalez-Galarza FF, dos Santos EJ, Maia MH, Rahman MM, Zain SM, Middleton D, Jones AR (2013) A database for curating the associations between killer cell immunoglobulin-like receptors and diseases in worldwide populations. *Database (Oxford)* 2013:bat021
84. Moesta AK, Parham P (2012) Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2 and KIR2DL3. *Front Immunol* 336:1-13.
85. Middleton D, Curran M, Maxwell L (2002) Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology* 10:147-164.
86. Luszczek W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, Kusnierczyk P (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 65:758-766.
87. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J, Young NT (2006) Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 7:576-582.
88. Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcev A (2008) Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenet* 35:57-61.
89. Djulejic E, Petlichkovski A, Trajkov D, Hristomanova S, Middleton D, Spiroski M (2010) Distribution of killer cell immunoglobulinlike receptors in the Macedonian population. *Hum Immunol* 71:281-288.
90. Bontadini A, Testi M, Cuccia MC, Martinetti M, Carcassi C, Chiesa A (2006) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. *J Transl Med* 4:44.
91. Jiang Y, Chen O, Cui C, Zhao B, Han X, Zhang Z, Liu J, Xu J, Hu Q, Liao C, Shang H (2013) KIR3DS1/L1 and HLA-Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors. *BMC Infect Dis* 405:1-11.
92. de Vasconcelos JM, de Jesus Maués Pereira Mória L, Amaral Ido S, Miranda EC, Cicalisetakeshita LY, de Oliveira LF, de Araújo Melo Mendes L, Sastre D, Tamegão-Lopes BP, de Aquino Pedroza LS, Batista Dos Santos SE, Soares Mdo C, de Araújo MT, Bandeira CL, de Sousa da Silva AM, de Medeiros ZL, Sena L, Demachki S, Dos

- Santos EJ (2013) Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil. *Genet Mol Biol* 36:22-27.
93. Parham P (2004) NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 200:951-955.
94. Chazara O, Xiong S, Moffett A (2011) Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol* 90:703-716.
95. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A (2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200:957-965.
96. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L, Tower C, Regan L, Moore GE, Carrington M, Moffett A (2010) Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120:4102-4110.
97. Hiby SE, Apps R, Chazara O, Farrell LE, Magnus P, Trogstad L, Gjessing HK, Carrington M, Moffett A (2014) Maternal KIR in Combination with Paternal HLA-C2 Regulate Human Birth Weight. *J Immunol* [in press]
98. Toneva M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, Vu-Trien A, Michaylova A, Naumova E, McCluskey J, Charron D (2001) Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 57:358-362.
99. Ewerton PD, Leite de Meira M, Magalhaes M, Sena L, Melo dos Santos EJ (2007) Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics* 59:625-630.
100. Rajalingam R, Krausa P, Shilling HG, Stein JB, Balamurugan A, McGinnis MD, Cheng NW, Mehra NK, Parham P (2002) Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics* 53:1009-1019.
101. Norman P (2007) Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nature Genetics* 39:1092-1099.
102. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203:633-645.
103. Jiang K, Zhu FM, Lv QF, Yan LX (2005) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens* 65:556-563.

104. Uhrberg M, Parham P, Wernet P (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54:221–229.
105. Shahsavari F, Tajik N, Entezami KZ, Fallah R, Radjabzadeh M, Asadifar B, Alimoghaddam K, Ostadali Dahaghi M, Jalali A, Ghashghaie A, Ghavamzadeh A (2010) KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. *Iran J Immunol* 7:8-17.
106. Middleton D, Meenagh A, Sleator C, Gourraud P-A, Ayna T, Tozki H, Köse AA, Azizleri G, Diler AS (2007) No association of KIR genes with Behcets disease. *Tissue Antigens* 70:435-438.
107. Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R (2007) Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 59:1-15.
108. Rudnick CCC, Franceschi DSA, Marangon AV, Guelsin GAS, Sell AM, Visentainer JEL (2008). Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Parana. *Hum Immunol* 69:872–887.
109. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J, Young NT (2006) Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun.* 7:576-582.
110. Denis L, Sivula J, Gourraud PA, Kerdudou N, Chout R, Ricard C (2005) Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 66:267–276.
111. Gutiérrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez L, Díaz-Flores M, Marsh SGE, Valladares-Salgado A, Madrigal JA, Mejía-Arangure JM, García CA, Huerta-Zepeda A, Ibarra-Cortés B, Ortega-Camarillo C, Cruz M (2006). KIR Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico. *Human Immunology* 67:85-93.
112. Santin I, Pérez de Nanclares G, Calvo B, Gaafar A, Castaño L, GEPV-N Group, Bilbao RJ (2006) Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genes in the Basque Population: Association Study of KIR Gene Contents With Type 1 Diabetes Mellitus. *Human Immunology* 67:118-124.
113. Williams F, duToit ED, Middleton D (2004) KIR allele frequencies in a Xhosa population from South Africa. *Human Immunology* 65:1084-1085.
114. Solgi G, Ghafari H, Ashouri E, Alimoghdam K, Rajalingam R, Amirzargar A (2011) Comparison of KIR gene content profiles revealed a difference between northern and

- southern Persians in the distribution of KIR2DS5 and its linked loci. *Hum Immunol* 72:1079–1083.
115. Burek MK, Grubic Z, Stingl K, Zunec R (2013) Distribution of KIR genes in the Croatian population. *Hum Immunol* 74:952-956.
 116. Arnheim L, Dillner J, Sanjeevi CB (2005) A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. *Tissue Antigens* 65:252-259.
 117. Williams F, Middleton D, Leheny W (2004) HLA-A and -B Alleles, Cytokine Polymorphisms and KIR Gene Frequencies in a Population from Oman. *Human Immunology* 65:1034-1038.
 118. Williams F, Hawkins B, Middleton D (2004) HLA-A and -B and KIR Gene Allele Frequencies in a Chinese Population from Hong Kong. *Human Immunology* 65:948-952.
 119. Niokou D, Spyropoulou-Vlachou M, Darlamitsou A, Stavropoulos-Giokas C (2003) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Hum Immunol* 64:1167-1176.
 120. Demanet C, Verheyden S (2004) KIR Allele Frequencies in a Belgium Population. *Human Immunology* 65:864-865.
 121. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT (1999) Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 68:1784-1789.
 122. Majorczyk E, Łuszczek W, Nowak I, Pawlik A, Wi niewski A, Jasek M, Ku nierczyk P (2008) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Poles. *Int J Immunogenet* 35:405-407.
 123. Faridi RM, Das V, Tripthi G, Talwar S, Parveen F, Agrawal S (2009) Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 24:1758-1764.
 124. Wang S, Li YP, Ding B, Zhao YR, Chen ZJ, Xu CY, Fu YB, Wang XT (2014) Recurrent miscarriage is associated with a decline of decidual natural killer cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors specific for human leukocyte antigen C. *J Obstet Gynaecol Res* 40:1288-1295.

125. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA (2012) Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:800-811.
126. Khakoo SI, Rajalingam R, Shum BP, Weidenbach K, Flodin L, Muir DG, Canavez F, Cooper SL, Valiante NM, Lanier LL, Parham P (2000) Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 12:687-698.
127. Guethlein LA, Flodin LR, Adams EJ, Parham P (2002) NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Ig-like receptors with MHC-C. *J Immunol* 169:220-229.
128. Hershberger KL, Shyam R, Miura A, Letvin NL (2001) Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *J Immunol* 166:4380-4390.
129. Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P (2001) Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 193:135-146.
130. Mager DL, McQueen KL, Wee V, Freeman JD (2001) Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons. *Curr Biol* 11:626-630.
131. Soper DS (2014) A-priori Sample Size Calculator for Student t-Tests [Software]. <http://www.danielsoper.com/statcalc>.
132. Mohty M, Bay JO, Faucher C, Choufi B, Bilger K, Tournilhac O, Vey N, Stoppa AM, Coso D, Chabannon C, Viens P, Maraninchi D, Blaise D (2003) Graft-versus-host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen. *Blood* 102:470-476.
133. Parameswaran H, Carreras J, Zhang MJ, Gale RP, Bolwell BJ, Bredeson CN, Burns JL, Cairo SM, Freytes OC, Goldstein CS, Hale AG, Inwards JD, LeMaistre FC, Maharaj D, Marks ID, Schouten CH, Slavin S, Vose MJ, Lazarus MH, van Besien K (2008) Allogeneic transplants in follicular lymphoma: higher risk of disease progression after reduced intensity compared to myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:236-245.
134. Malard F, Szydlo RM, Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Ayari S, Dubruille V, Le Gouill S, Mahe B, Gastinne T, Blin N, Saulquin B, Harousseau JL, Moreau P, Mohty M (2010) Impact of cyclosporine-A concentration on the incidence

- of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:28-34.
135. Gourraud PA, Barnetche T, Vidan-Jeras B, Cambon-Thomsen A (2005) Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transpl Immunol* 14:245-253.
 136. Cramer H (1999) *Mathematical methods of statistics (PMS-9)*. Princeton University Press. ISBN: 9780691005478.
 137. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
 138. Gómez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C (2002) Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 54:314-319.
 139. Cisneros E, Moraru M, Gómez-Lozano N, López-Botet M, Vilches C (2012) KIR2DL5: An Orphan Inhibitory Receptor Displaying Complex Patterns of Polymorphism and Expression. *Front Immunol* 3:289.
 140. Halfpenny IA, Middleton D, Barnett YA, Williams F (2004) Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Hum Immunol* 65:602-612.
 141. Martin MP, Single RM, Wilson MJ, Trowsdale J, Carrington M (2008) KIR haplotypes defined by segregation analysis in 59 Centre d'Etude Polymorphisme Humain (CEPH) families. *Immunogenetics* 60:767-774.
 142. Middleton D, Meenagh A, Gourraud PA (2007) KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 59:145-158.
 143. Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D (2004) Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum Immunol* 65:613-621.
 144. Guethlein LA, Older Aguilar AM, Abi-Rached L, Parham P (2007) Evolution of killer cell Ig-like receptor (KIR) genes: definition of an orangutan KIR haplotype reveals expansion of lineage III KIR associated with the emergence of MHC-C. *J Immunol* 179:491-504.
 145. Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SG, Miller JS, Parham P, Geraghty DE (2010) Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One* 5:e15115.

146. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305:872-874.
147. Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, Graef T, McQueen KL, Guethlein LA, Carrington CV, Chandanayingyong D, Chang YH, Crespí C, Saruhan-Direskeneli G, Hameed K, Kamkamidze G, Koram KA, Layrisse Z, Matamoros N, Milà J, Park MH, Pitchappan RM, Ramdath DD, Shiau MY, Stephens HA, Struik S, Tyan D, Verity DH, Vaughan RW, Davis RW, Fraser PA, Riley EM, Ronaghi M, Parham P (2009) Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res* 19:757-769.
148. Borhis G, Khakoo SI (2011) NK cell receptors: evolution and diversity. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/NKCellRecEvoDivID20095.html>
149. Whang DH, Park H, Yoon JA, Park MH (2005) Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol* 66:146-154.
150. Hollenbach JA, Necedal I, Ladner MB, Single RM, Trachtenberg EA (2012). Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations. *Immunogenetics* 64:719-737.
151. Vierra-Green C, Roe D, Hou L, Hurley CK, Rajalingam R, Reed E, Lebedeva T, Yu N, Stewart M, Noreen H, Hollenbach JA, Guethlein LA, Wang T, Spellman S, Maiers M (2012) Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One* 7:e47491.
152. Gourraud PA, Meenagh A, Cambon-Thomsen A, Middleton D (2010) Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. *Immunogenetics* 62:729-740.
153. Hilton HG, Vago L, Older Aguilar AM, Moesta AK, Graef T, Abi-Rached L, Norman PJ, Guethlein LA, Fleischhauer K, Parham P (2012) Mutation at positively selected positions in the binding site for HLA-C shows that KIR2DL1 is a more refined but less adaptable NK cell receptor than KIR2DL3. *J Immunol* 189:1418-1430.

154. Schönberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M (2011) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 117:98-107.
155. Liu J, Xiao Z, Ko HL, Shen M, Ren EC (2014) Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2662-2667.
156. Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 180:1235–1242.
157. Luque I, Solana R, Galiani MD, Gonzalez R, Garcia F, Lopez de Castro JA, Pena J (1996) Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. *Eur J Immunol* 26:1974–1977.
158. Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 175:5222-5229.
159. O'Connor GM, McVicar D (2013) The yin-yang of KIR3DL1/S1: molecular mechanisms and cellular function. *Crit Rev Immunol* 33:203-218.
160. Shaw J, Kollnberger S (2012) New perspectives on the ligands and function of the killer cell immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in health and disease. *Front Immunol* 3:339.
161. Petlichkovski A, Stojanoski Z, Djulejic E, Georgievski B, Spiroski M (2012) Association of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes with the Graft versus Host Disease after Related Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Haematological Malignancies from Republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Medical Sciences* 5:404-410.
162. Bao XJ, Hou LH, Su AN, Qiu QC, Yuan XN, Chen MH, Chen ZX, He J (2010) The impact of KIR2DS4 alleles and the expression of KIR in the development of acute GVHD after unrelated allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 5:1435-1441.
163. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94:333-339.
164. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100.

165. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A (2007) Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* 110:433-440.
166. Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQueen KL, Guethlein LA, Trachtenberg EA, Haagenson M, Horowitz MM, Klein JP, Weisdorf DJ (2007) Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* 109:5058-5061.
167. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, Hurley C, Dupont B, Caligiuri MA, Boudreau C, Nelson G, Oudshoorn M, van Rood J, Velardi A, Maiers M, Setterholm M, Confer D, Posch PE, Anasetti C, Kamani N, Miller JS, Weisdorf D, Davies SM (2006) KIR Study Group, Center for International Blood and Marrow Transplantation Research. The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:876-884.
168. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B (2005) Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105:4878-4884.
169. Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, Sanz G, Michel G, Socié G, Rio B, Sirvent A, Renaud M, Madero L, Mohty M, Ferra C, Garnier F, Loiseau P, Garcia J, Lecchi L, Kögler G, Beguin Y, Navarrete C, Devos T, Ionescu I, Boudjedir K, Herr AL, Gluckman E, Rocha V; Eurocord-Netcord and Acute Leukaemia Working Party of the EBMT (2009) KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* 23:492-500.
170. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR (2002) Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood* 100:3825-3827.
171. Schaffer M, Malmberg KJ, Ringdén O, Ljunggren HG, Remberger M (2004) Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 78:1081-1085.

172. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trenscher R, Grosse-Wilde H (2005) 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* 105:2594-2600.
173. Sobecks RM, Ball EJ, Maciejewski JP, Rybicki LA, Brown S, Kalaycio M, Pohlman B, Andresen S, Theil KS, Dean R, Bolwell BJ (2007) Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligand groups for killer immunoglobulin-like receptors. *Bone Marrow Transplant* 39:417-424.
174. Fischer JC, Kobbe G, Enczmann J, Haas R, Uhrberg M (2012) The impact of HLA-C matching depends on the C1/C2 KIR ligand status in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics* 64:879-885.
175. Wang H, He Y, Zhai WJ, Wang M, Zhou Z, Zhao YX, Feng SZ, Han MZ (2013) The impact of recipient HLA-Cw and donor killer immunoglobulin-like receptor genotyping on the outcome of patients receiving HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Swiss Med Wkly* 143:w13717.
176. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PJ, Mahendra P, Craddock CF, Moss PA, Briggs DC (2004) The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 103:1521-1526.
177. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeböller H, Rosenmayr A, Fae I, Fischer GF, Kouba M, Pohlreich D, Kalhs P, Greinix HT (2009) KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44:97-103.
178. Kanga U, Mourya M, Seth T, George J, Sood P, Sharma R, Saxena A, Mehra NK (2012) Role of killer immunoglobulin-like receptor-ligand interactions in human leukocyte antigen-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 44:919-921.
179. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J (2003) Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 102:814-819.

180. Bishara A, De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, Nagler A, Slavin S (2004) The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens* 63:204-211.
181. Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G (2004) Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood* 103:2860-2862.
182. De Santis D, Bishara A, Witt CS, Nagler A, Brautbar C, Slavin S, Christiansen FT (2005) Natural killer cell HLA-C epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors both influence outcome of mismatched unrelated donor bone marrow transplants. *Tissue Antigens* 65:519-528.
183. Kröger N, Binder T, Zabelina T, Wolschke C, Schieder H, Renges H, Ayuk F, Dahlke J, Eiermann T, Zander A (2006) Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation. *Transplantation* 82:1024-1030.
184. Dalva K, Gungor F, Soydan Akcaglayan E, Beksac M (2006) Two independent effects of immunoglobulin-like receptor (KIR) allele matching between siblings: inhibitory KIR, (IKIR) mismatches are associated with graft versus host disease (GVHD) while activating KIR matches, (AKIR) and CGVHD are associated with graft versus leukemia (GVL). *Blood* 108 (supplement 1) 2912a.
185. Brunstein CG, Wagner JE, Weisdorf DJ (2009) Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* 113:5628–5634.
186. Weisdorf D, Cooley S, Devine S, Fehniger TA, DiPersio J, Anasetti C, Waller EK, Porter D, Farag S, Drobyski W, Defor T, Haagenson M, Curtisinger J, Miller J (2012) T cell-depleted partial matched unrelated donor transplant for advanced myeloid malignancy: KIR ligand mismatch and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 18:937-943.
187. Chen DF, Prasad VK, Broadwater G, Reinsmoen NL, DeOliveira A, Clark A, Sullivan KM, Chute JP, Horwitz ME, Gasparetto C, Long GD, Yang Y, Chao NJ, Rizzieri DA (2012) Differential impact of inhibitory and activating Killer Ig-Like Receptors (KIR) on high-risk patients with myeloid and lymphoid malignancies undergoing reduced

- intensity transplantation from haploidentical related donors. *Bone Marrow Transplant* 47:817-823.
188. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, Zahurak M, Jones RJ, Fuchs EJ (2010) Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:533-542.
 189. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SG, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Weisdorf DJ (2009) Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 113:726-732.
 190. McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P (2007) 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* 68:309-323.
 191. Bao XJ, He J, Sun AN, Qiu QC, Yuan XN, Chen ZX, Zhang XG (2010) The impact of KIR2DS4 gene on clinical outcomes of HLA matched unrelated allo-HSCT. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 31:726-731.
 192. Schellekens J, Rozemuller HE, Petersen JE, van den Tweel GJ, Verdonck FL, Tilanus GJM (2008) Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Molecular Immunology* 45:2255–2261.
 193. Nowak I, Majorczyk E, Wi niewski A, Pawlik A, Magott-Procelewska M, Passowicz-Muszy ska E, Malejczyk J, Płoski R, Giebel S, Barcz E, Zo -Giebel A, Malinowski A, Tchórzewski H, Chlebicki A, Łuszczek W, Kurpisz M, Grybo M, Wilczy ski J, Wiland P, Senitzer D, Sun JY, Jankowska R, Klinger M, Ku nierczyk P (2010) Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases? *PLoS One* 5:e12381.
 194. Gagne K, Brizard G, Gueglio B, Milpied N, Herry P, Bonneville F, Chéneau ML, Schleinitz N, Cesbron A, Folléa G, Harrousseau JL, Bignon JD (2002) Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 63:271-280.
 195. Giebel S, Nowak I, Wojnar J, Markiewicz M, Dziaczkowska J, Wylezol I, Krawczyk-Kulis M, Bloch R, Kusnierczyk P, Holowiecki J (2006) Impact of activating killer immunoglobulin-like receptor genotype on outcome of unrelated donor-hematopoietic cell transplantation. *Transplant Proc* 38:287-291.

196. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC (2012) HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med* 367:805-816.
197. Sivori S, Carlomagno S, Falco M, Romeo E, Moretta L, Moretta A (2011) Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood* 117:4284-4292.
198. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, Petersdorf E, Hsu KC (2010) Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115:3162-3165.
199. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C (2005) A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 19:1446-1451.
200. Kim HJ, Choi Y, Min WS (2007) The activating killer cell immunoglobulin-like receptors as important determinants of acute graft-versus host disease in hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Transplantation* 84:1082-1091.
201. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y (2008) Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:75-87.
202. 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 (2009) Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 83:343-356.
203. Stringaris K, Adams S, Uribe M, Eniafe R, Wu CO, Savani BN, Barrett AJ (2010) Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1257-1264.

204. Sobecks RM, Ball EJ, Askar M, Theil KS, Rybicki LA, Thomas D, Brown S, Kalaycio M, Andresen S, Pohlman B, Dean R, Sweetenham J, Macklis R, Bernhard L, Cherni K, Copelan E, Maciejewski JP, Bolwell BJ (2008) Influence of killer immunoglobulin-like receptor/HLA ligand matching on achievement of T-cell complete donor chimerism in related donor nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 41:709-714.
205. Wysoczanska B, Koscińska K, Mizia S, Lange A (2013) Chimerism in children with primary immunodeficiencies is influenced by number of activating killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the donor and/or killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatch. *Transplant Proc* 45:3366-3370.
206. W. Leung (2011) Use of NK cell activity in cure by transplant. *British Journal of Haematology* 155:14–29.

8. PRILOZI

PRILOG 1. Kronološki prikaz objavljenih istraživanja o utjecaju gena KIR u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Studija	Broj ispitanika	Izvor KMS	Davatelj (srodan/ nesrodan)	Podudarnost HLA (m, mm, h)	Model studije	Preživljavanje	GvHD	Povrat bolesti
Ruggeri i sur. 2002 (164)	92	PK	Srodan	HLA-h	M1*	Bolje	Smanjen	Smanjen
Davies i sur. 2002 (170)	175	KS	Nesrodan	HLA-mm	M1*	Lošije	Bez utjecaja	Bez utjecaja
Giebel i sur. 2003 (179)	130	KS	Nesrodan	HLA-m	M2*	Bolje	Bez utjecaja	Smanjen
Bishara i sur. 2004 (180)	62	PK	Srodan	HLA-h	M2*	Bolje (podudarnost KIR u GvH smjeru)	Povećan (D:aKIR)	Bez utjecaja
Cook i sur. 2004 (176)	220	?	Srodan	HLA-m	M2*	Lošije (P:C2C2 / D:KIR2DS2 poz)	Bez utjecaja	/
Bornhauser i sur. 2004 (181)	118	PK/KS	Nesrodan	HLA-m	M2*	Bez utjecaja	Bez utjecaja	Povećan
Schaffer i sur. 2004 (171)	190	PK/KS	Nesrodan	HLA-m	M1*	Lošije	Bez utjecaja	Bez utjecaja
Hsu i sur. 2005 (168)	178	KS	Srodan	HLA-m	M1*	Bolje	Bez utjecaja	Smanjen
Beelen i sur. 2005 (172)	374	PK/KS	Nesrodan	HLA-m	M1*	Bez utjecaja	Bez utjecaja	Smanjen

Studija	Broj ispitanika	Izvor KMS	Davatelj (srodan/ nesrodan)	Podudarnost HLA (m, mm, h)	Model studije	Preživljavanje	GvHD	Povrat bolesti
De Santis i sur. 2005 (182)	104	PK/KS	Nesrodan	HLA-mm	M2*	Lošije	Povećan	Bez utjecaja
Kroger i sur. 2005 (183)	73	PK/KS	Nesrodan	HLA-m	M2*	Bez utjecaja	Bez utjecaja	Smanjen
Verheyden i sur. 2005 (199)	65	PK/KS	Srodan	HLA-m	M3*	Bez utjecaja	Povećan (P:C1C1 ili C2C2)	Smanjen (D:2DS1+ i 2DS2+)
Dalva i sur. 2006 (184)	84	PK/KS	Srodan	HLA-m	M2*/M3*	Bolje (aKIR m)	Smanjen (iKIR m)	Smanjen (aKIRm; D:KIR haplotip B)
Farag i sur. 2006 (167)	1571	KS	Nesrodan	HLA-m	M1*	Bez utjecaja	Bez utjecaja	Bez utjecaja
Ruggeri i sur. 2007 (165)	112	PK	Srodan	HLA-h	M1*	Bolje	Smanjen	Smanjen
McQueen i sur. 2007 (190)	202	PK/KS	Srodan	HLA-m	M3*	Lošije (D:KIR haplotip B)	Povećan (D:KIR haplotip B)	Povećan (D:KIR haplotip B)
Kim i sur. 2007 (200)	53	PK/KS	Srodan	HLA-m	M3*	Bolje (D:aKIR)	Povećan (D:aKIR)	Smanjen (D:aKIR)
Miller i sur. 2007 (166)	2062	PK/KS	Nesrodan	HLA-m	M1*	/	Povećan	Smanjen

Studija	Broj ispitanika	Izvor KMS	Davatelj (srodan/ nesrodan)	Podudarnost HLA (m, mm, h)	Model studije	Preživljavanje	GvHD	Povrat bolesti
Sobecks i sur. 2007 (173)	60	KS	Srodan	HLA-m	M2*	Lošije (P:C1C2)	Bez utjecaja	Povećan (P:C1C2)
Yabe i sur. 2008 (201)	1489	KS	Nesrodan	HLA-m	M2*/M3*	Lošije	Povećan (D:2DS2)	Bez utjecaja
Schellekens i sur. 2008 (192)	83	PK	Srodan	HLA-m	M3*	Bolje (D:aKIR)	/	Povećan (2DS5+)
Giebel i sur. 2009 (202)	100	PK/KS	Srodan / nesrodan	HLA-m	M3*	Lošije (aKIR mm + skupina C2)	Povećan (aKIR mm)	Povećan (aKIR mm)
Cooley i sur. 2009 (189)	448	?	Nesrodan	HLA-m	M3*	Bolje (D:KIR haplotip B)	Bez utjecaja	Smanjen (D:KIR haplotip B)
Gagne i sur. 2009 (194)	264	KS	Nesrodan	HLA-m	M3*	Lošije (HLA identični; P:skupina C1 neg)	Smanjen (D:KIR haplotip B)	Smanjen
Brunstein i sur. 2009 (185)	257	UK	Nesrodan	HLA-mm	M2*	Lošije	Povećan	Smanjen
Willemze i sur. 2009 (169)	218	UK	Nesrodan	HLA-mm	M1*	Bolje	Smanjen	Smanjen
Ludajic i sur. 2009 (177)	124	PK/KS	Nesrodan	HLA-mm	M2*/M3*	Bez utjecaja	Povećan (KIR/ligand mm; P:C1C1 i genotip AA)	/

Studija	Broj ispitanika	Izvor KMS	Davatelj (srodan/ nesrodan)	Podudarnost HLA (m, mm, h)	Model studije	Preživljavanje	GvHD	Povrat bolesti
Stringaris i sur. 2010 (203)	246	PK/KS	Srodan	HLA-m	M3*	Bolje (D:KIR haplotip B) /		Smanjen (D:aKIR ili KIR haplotip B)
Symons i sur. 2010 (188)	86	KS	Srodan	HLA-h	M2*/M3*	Bolje (D:KIR haplotip B; P:KIR haplotip A; iKIR mm)	Bez utjecaja	Smanjen
Cooley i sur. 2010 (70)	1086	?	Nesrodan	HLA-m	M3*	Bez utjecaja (D:KIR haplotip B)	Povećan	Bez utjecaja (D:KIR haplotip B)
Venstrom i sur. 2010 (198)	1087	KS	Nesrodan	HLA-m	M3*	Bolje (D:3DSI+)	Smanjen (D:3DSI+)	Bez utjecaja
Weisdorf i sur. 2012 (186)	24	PK	Srodan	HLA-h	M2*/M3*	Bez utjecaja	Bez utjecaja	Bez utjecaja
Chen i sur. 2012 (187)	84	PK	Srodan	HLA-h	M1*/M2*	Bolje (iKIR mm + C2 neg P)	Bolje (iKIR mm + C1 i C2 mm)	Bolje (iKIR mm + C2 neg P)
Fischer i sur. 2012 (174)	97	PK	Nesrodan	HLA-m	M2*	Bolje (AML:P C1C1)	Smanjen (C2 m)	Smanjen (P:C1C1); povećan (C2 m)
Kanga i sur. 2012 (178)	26	PK	Srodan	HLA-m	M2*	/	Povećan (P:C1C1 ili C2C2; D:genotip AA)	/

Studija	Broj ispitanika	Izvor KMS	Davatelj (srodan/ nesrodan)	Podudarnost HLA (m, mm, h)	Model studije	Preživljavanje	GvHD	Povrat bolesti
Wang i sur. 2013 (175)	52	?	Srodan	HLA-m	M2*	Bolje (P:C1C1 ili C2C2 i KIR mm)	Smanjen (P:C1C1 ili C2C2)	Povećan (P:C1C2)

Legenda: **D** – davatelj; **GvHD** - reakcija presatka protiv primatelja (engl. Graft-versus-Host Disease); **h** – haploidentni; **HLA** - humani leukocitni antigeni; **KMS** - krvotvorne matične stanice; **KS** - koštana srž; **m** - podudarni (engl. match); **mm** - nepodudarni (engl. mismatch); **M1*** - model „ligand-ligand nepodudarnost“; **M2*** - model „KIR-ligand nepodudarnost“; **M3*** - model „haplotip KIR nepodudarnost“; **P** – primatelj; **PK** - periferna krv; **UK** - umbilikalna krv;

PRILOG 3a. Prisutnost ili odsutnost gena KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL2, KIR2DL5B, KIR2DS3 i KIR2DL1 (geni biljezi) u centromernoj regiji haplotipa KIR označava prisutnost ili odsutnost drugih gena KIR (obilježeni geni). (Gourraud i sur.,152)

Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.
KIR2DS2*POZ	2DL3	NEG	100.00%	99.30%	32.1%	KIR2DL3*POZ	2DS2	NEG	100.00%	98.53%	67.5%	KIR2DL2*POZ	2DS2	POS	100.00%	98.27%	30.9%
	2DL2	POS	96.27%	100.00%	30.9%		2DL2	NEG	100.00%	94.85%	67.5%		2DL3	NEG	100.00%	97.58%	30.9%
	2DL5B	POS	43.28%	99.65%	13.9%		2DL5B	NEG	99.65%	42.65%	67.2%		2DL5B	POS	44.96%	99.65%	13.9%
	2DS3	POS	42.54%	96.48%	13.6%		2DS3	NEG	96.45%	41.91%	65.1%		2DS3	POS	44.19%	96.54%	13.6%
	2DL1	NEG	54.48%	99.30%	17.5%		2DL1	POS	99.65%	54.41%	67.2%		2DL1	NEG	56.59%	99.31%	17.5%
	2DL4	POS	98.51%	0.70%	31.6%		2DL4	POS	99.65%	2.21%	67.2%		2DL4	POS	98.45%	0.69%	30.4%
	3DL1	POS	73.88%	17.96%	23.7%		3DL1	POS	82.27%	26.47%	55.5%		3DL1	POS	75.97%	19.03%	23.4%
	3DS1	NEG	72.39%	17.25%	23.2%		3DL1	NEG	17.73%	73.53%	12.0%		3DS1	NEG	74.42%	18.34%	23.0%
	2DL5A	NEG	73.88%	17.25%	23.7%		3DS1	NEG	82.62%	27.21%	55.7%		2DL5A	NEG	75.97%	18.34%	23.4%
	2DS5	NEG	79.85%	15.49%	25.6%		3DS1	POS	17.38%	72.79%	11.7%		2DS5	NEG	82.17%	16.61%	25.4%
	2DS1	NEG	73.13%	18.66%	23.4%		2DL5A	POS	17.38%	74.26%	11.7%		2DS1	NEG	75.19%	19.72%	23.2%
2DS4	POS	70.90%	17.61%	22.7%	2DL5A	NEG	82.62%	25.74%	55.7%	2DS4	POS	72.87%	18.69%	22.5%			
KIR2DS2*NEG	2DL3	POS	99.30%	100.00%	67.5%	2DS5	POS	15.60%	80.15%	10.5%	2DS2	NEG	98.27%	100.00%	67.9%		
	2DL2	NEG	100.00%	96.27%	67.9%	2DS5	NEG	84.40%	19.85%	56.9%	2DL3	POS	97.58%	100.00%	67.5%		
	2DL5B	NEG	99.65%	43.28%	67.7%	2DS1	NEG	81.56%	27.21%	55.0%	2DL5B	NEG	99.65%	44.96%	68.9%		
	2DS3	NEG	96.48%	42.54%	65.6%	2DS1	POS	18.44%	72.79%	12.4%	2DS3	NEG	96.54%	44.19%	66.7%		
	2DL1	POS	99.30%	54.48%	67.5%	2DS4	POS	82.62%	29.41%	55.7%	2DL1	POS	99.31%	56.59%	68.7%		
	2DL4	POS	99.30%	1.49%	67.5%	2DS4	NEG	17.38%	70.59%	11.7%	2DL4	POS	99.31%	1.55%	68.7%		
	3DL1	NEG	17.96%	73.88%	12.2%	2DS2	POS	98.53%	100.00%	32.1%	3DL1	NEG	19.03%	75.97%	13.2%		
	3DL1	POS	82.04%	26.12%	55.7%	2DL2	POS	94.85%	100.00%	30.9%	3DL1	POS	80.97%	24.03%	56.0%		
	3DS1	NEG	82.75%	27.61%	56.2%	2DL5B	POS	42.65%	99.65%	13.9%	3DS1	POS	18.34%	74.42%	12.7%		
	3DS1	POS	17.25%	72.39%	11.7%	2DS3	POS	41.91%	96.45%	13.6%	3DS1	NEG	81.66%	25.58%	56.5%		
	2DL5A	NEG	82.75%	26.12%	56.2%	2DL1	NEG	54.41%	99.65%	17.7%	2DL5A	POS	18.34%	75.97%	12.7%		
	2DL5A	POS	17.25%	73.88%	11.7%	2DL4	POS	97.79%	0.35%	31.8%	2DL5A	NEG	81.66%	24.03%	56.5%		
	2DS5	NEG	84.51%	20.15%	57.4%	3DL1	POS	73.53%	17.73%	23.9%	2DS5	POS	16.61%	82.17%	11.5%		
	2DS5	POS	15.49%	79.85%	10.5%	3DS1	NEG	72.79%	17.38%	23.7%	2DS5	NEG	83.39%	17.83%	57.7%		
	2DS1	NEG	81.34%	26.87%	55.3%	2DL5A	NEG	74.26%	17.38%	24.2%	2DS1	POS	19.72%	75.19%	13.6%		
2DS1	POS	18.66%	73.13%	12.7%	2DS5	NEG	80.15%	15.60%	26.1%	2DS1	NEG	80.28%	24.81%	55.5%			
2DS4	NEG	17.61%	70.90%	12.0%	2DS1	NEG	72.79%	18.44%	23.7%	2DS4	NEG	18.69%	72.87%	12.9%			
2DS4	POS	82.39%	29.10%	56.0%	2DS4	POS	70.59%	17.38%	23.0%	2DS4	POS	81.31%	27.13%	56.2%			

Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	Freq.	Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	Freq.
KIR2DL5B*POZ	2DS2	POS	98.31%	78.83%	13.9%	KIR2DS3*POZ	2DS2	POS	85.07%	78.06%	13.6%	KIR2DL1*POZ	2DS2	NEG	82.22%	97.33%	67.5%
	2DL3	NEG	98.31%	78.27%	13.9%		2DL3	NEG	85.07%	77.49%	13.6%		2DL3	POS	81.92%	98.67%	67.2%
	2DL2	POS	98.31%	80.22%	13.9%		2DL2	POS	85.07%	79.49%	13.6%		2DL2	NEG	83.67%	97.33%	68.7%
	2DS3	POS	96.61%	97.21%	13.6%		2DL5B	POS	85.07%	99.43%	13.6%		2DL5B	POS	15.74%	93.33%	12.9%
	2DL1	POS	91.53%	19.50%	12.9%		2DL1	POS	95.52%	20.51%	15.3%		2DL5B	NEG	84.26%	6.67%	69.1%
	2DL4	POS	96.61%	0.56%	13.6%		2DL4	POS	100.00%	1.14%	16.0%		2DS3	POS	18.66%	96.00%	15.3%
	2DS5	NEG	74.58%	15.60%	10.5%		2DS5	NEG	74.63%	15.38%	12.0%		2DS3	NEG	81.34%	4.00%	66.7%
KIR2DL5B*NEG	2DS2	NEG	78.83%	98.31%	67.7%	KIR2DS3*POZ	2DS2	NEG	78.06%	85.07%	65.6%		2DL4	POS	99.42%	2.67%	81.6%
	2DL3	POS	78.27%	98.31%	67.2%		2DL3	POS	77.49%	85.07%	65.1%		3DL1	POS	78.72%	17.33%	64.6%
	2DL2	NEG	80.22%	98.31%	68.9%		2DL2	NEG	79.49%	85.07%	66.7%		3DL1	NEG	21.28%	82.67%	17.5%
	2DS3	NEG	97.21%	96.61%	83.5%		2DL5B	NEG	99.43%	85.07%	83.5%		3DS1	POS	21.57%	84.00%	17.7%
	2DL1	NEG	19.50%	91.53%	16.7%		2DL1	NEG	20.51%	95.52%	17.2%		3DS1	NEG	78.43%	16.00%	64.4%
	2DL1	POS	80.50%	8.47%	69.1%		2DL1	POS	79.49%	4.48%	66.7%		2DL5A	NEG	78.72%	14.67%	64.6%
	2DL4	POS	99.44%	3.39%	85.4%		2DL4	POS	98.86%	0.00%	83.0%		2DL5A	POS	21.28%	85.33%	17.5%
	3DL1	POS	82.45%	38.98%	70.8%		3DL1	POS	84.05%	44.78%	70.6%	2DS5	POS	16.91%	82.67%	13.9%	
	3DS1	NEG	82.45%	38.98%	70.8%		3DS1	NEG	84.90%	49.25%	71.3%	2DS5	NEG	83.09%	17.33%	68.2%	
	2DL5A	NEG	82.73%	37.29%	71.1%		2DL5A	NEG	85.19%	47.76%	71.5%	2DS1	NEG	77.84%	17.33%	63.9%	
	2DS5	NEG	84.40%	25.42%	72.5%		2DS5	POS	15.38%	74.63%	12.9%	2DS1	POS	22.16%	82.67%	18.2%	
	2DS5	POS	15.60%	74.58%	13.4%		2DS5	NEG	84.62%	25.37%	71.1%	2DS4	NEG	21.28%	78.67%	17.5%	
	2DS1	NEG	81.89%	40.68%	70.3%		2DS1	NEG	83.48%	46.27%	70.1%	2DS4	POS	78.72%	21.33%	64.6%	
	2DS4	POS	81.89%	40.68%	70.3%		2DS4	POS	83.19%	44.78%	69.9%	2DS2	POS	97.33%	82.22%	17.5%	
												KIR2DL1*NEG	2DL3	NEG	98.67%	81.92%	17.7%
													2DL2	POS	97.33%	83.67%	17.5%
													2DL5B	NEG	93.33%	15.74%	16.7%
													2DS3	NEG	96.00%	18.66%	17.2%
													2DL4	POS	97.33%	0.58%	17.5%
													3DL1	POS	82.67%	21.28%	14.8%
													3DS1	NEG	84.00%	21.57%	15.1%
													2DL5A	NEG	85.33%	21.28%	15.3%
													2DS5	NEG	82.67%	16.91%	14.8%
													2DS1	NEG	82.67%	22.16%	14.8%
												2DS4	POS	78.67%	21.28%	14.1%	

PRILOG 3b. Prisutnost ili odsutnost gena KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DL5A, KIR2DS2, KIR2DS1 i KIR2DS4 (geni biljezi) u telomernoj regiji haplotipa KIR označava prisutnost ili odsutnost drugih gena KIR (obilježeni geni). (Gourraud i sur., 152)

Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježeni gen	P/N	PPV	NPV	U est.
KIR2DL4*POZ	2DL3	POS	67.87%	75.00%	67.2%	KIR3DS1*POZ	2DL5B	NEG	73.26%	10.84%	15.1%	KIR2DL5A*POZ	2DL5B	NEG	73.81%	11.08%	14.8%
	2DL5B	NEG	86.23%	50.00%	85.4%		2DL1	POS	86.05%	18.98%	17.7%		2DL1	POS	86.90%	19.16%	17.5%
	2DS3	NEG	83.82%	0.00%	83.0%		2DL4	POS	100.00%	1.20%	20.6%		2DL4	POS	100.00%	1.20%	20.1%
	2DS3	POS	16.18%	100.00%	16.0%		3DL1	NEG	95.35%	98.80%	19.6%		3DL1	NEG	97.62%	98.80%	19.6%
	2DL1	POS	82.37%	50.00%	81.6%		2DL5A	POS	96.51%	99.70%	19.9%		3DS1	POS	98.81%	99.10%	19.9%
	3DL1	POS	80.19%	100.00%	79.4%		2DS5	POS	79.07%	99.10%	16.3%		2DS5	POS	82.14%	99.40%	16.5%
	3DS1	NEG	79.23%	0.00%	78.5%		2DS1	POS	95.35%	97.89%	19.6%		2DS1	POS	98.81%	98.20%	19.9%
	3DS1	POS	20.77%	100.00%	20.6%		2DS4	NEG	91.86%	96.99%	18.9%		2DS4	NEG	94.05%	97.01%	18.9%
	2DL5A	NEG	79.71%	0.00%	78.9%		2DS2	NEG	70.78%	43.02%	56.2%		2DS2	NEG	70.36%	41.67%	56.2%
	2DL5A	POS	20.29%	100.00%	20.1%		2DL3	POS	70.18%	43.02%	55.7%		2DL2	NEG	70.66%	36.90%	56.5%
	2DS5	NEG	83.33%	50.00%	82.5%		2DL2	NEG	71.08%	38.37%	56.5%		2DL5B	NEG	88.92%	26.19%	71.1%
	2DS1	NEG	79.47%	100.00%	78.7%		2DL5B	NEG	89.16%	26.74%	70.8%		2DS3	NEG	89.52%	38.10%	71.5%
2DS4	POS	79.47%	100.00%	78.7%	2DS3	NEG	89.76%	38.37%	71.3%	2DL1	NEG	19.16%	86.90%	15.3%			
KIR3DL1*POZ	2DS2	NEG	70.18%	40.70%	55.7%	2DL1	POS	81.02%	13.95%	64.4%	KIR2DL5A*NEG	2DL1	POS	80.84%	13.10%	64.6%	
	2DL2	NEG	70.48%	36.05%	56.0%	2DL1	NEG	18.98%	86.05%	15.1%		2DL4	POS	98.80%	0.00%	78.9%	
	2DL5B	NEG	89.16%	26.74%	70.8%	2DL4	POS	98.80%	0.00%	78.5%		3DL1	POS	98.80%	97.62%	78.9%	
	2DS3	NEG	88.86%	34.88%	70.6%	3DL1	POS	98.80%	95.35%	78.5%		3DS1	NEG	99.10%	98.81%	79.2%	
	2DL1	POS	81.33%	15.12%	64.6%	2DL5A	NEG	99.70%	96.51%	79.2%		2DS5	NEG	99.40%	82.14%	79.4%	
	2DL1	NEG	18.67%	84.88%	14.8%	2DS5	NEG	99.10%	79.07%	78.7%		2DS1	NEG	98.20%	98.81%	78.5%	
	2DL4	POS	100.00%	4.65%	79.4%	2DS1	NEG	97.89%	95.35%	77.8%		2DS4	POS	97.01%	94.05%	77.5%	
	3DS1	NEG	98.80%	95.35%	78.5%	2DS4	POS	96.99%	91.86%	77.0%							
	2DL5A	NEG	99.40%	95.35%	78.9%												
	2DS5	NEG	99.70%	81.40%	79.2%												
	2DS1	NEG	99.10%	100.00%	78.7%												
	2DS4	POS	98.19%	96.51%	78.0%												
KIR3DL1*NEG	2DL5B	NEG	73.26%	10.84%	15.1%												
	2DL1	POS	84.88%	18.67%	17.5%												
	2DL4	POS	95.35%	0.00%	19.6%												
	3DS1	POS	95.35%	98.80%	19.6%												
	2DL5A	POS	95.35%	99.40%	19.6%												
	2DS5	POS	81.40%	99.70%	16.7%												
	2DS1	POS	100.00%	99.10%	20.6%												

Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	U est.	Biljeg gen	Obilježen gen	P/N	PPV	NPV	U est.
KIR2DS5*POZ	2DL5B	NEG	78.87%	12.68%	13.4%	KIR2DS1*POZ	2DL5B	NEG	73.03%	10.64%	15.6%	KIR2DS4*POZ	2DS2	NEG	71.12%	43.82%	56.0%
	2DS3	NEG	76.06%	14.41%	12.9%		2DL1	POS	85.39%	18.84%	18.2%		2DL3	POS	70.82%	44.94%	55.7%
	2DL1	POS	81.69%	17.87%	13.9%		2DL4	POS	95.51%	0.00%	20.3%		2DL2	NEG	71.43%	39.33%	56.2%
	2DL4	POS	97.18%	0.58%	16.5%		3DL1	NEG	96.63%	100.00%	20.6%		2DL5B	NEG	89.36%	26.97%	70.3%
	3DL1	NEG	98.59%	95.39%	16.7%		3DS1	POS	92.13%	98.78%	19.6%		2DS3	NEG	88.75%	33.71%	69.9%
	3DS1	POS	95.77%	94.81%	16.3%		2DL5A	POS	93.26%	99.70%	19.9%		2DL1	POS	82.07%	17.98%	64.6%
	2DL5A	POS	97.18%	95.68%	16.5%		2DS5	POS	79.78%	100.00%	17.0%		2DL1	NEG	17.93%	82.02%	14.1%
	2DS1	POS	100.00%	94.81%	17.0%		2DS4	NEG	94.38%	98.48%	20.1%		2DL4	POS	100.00%	4.49%	78.7%
	2DS4	NEG	95.77%	93.95%	16.3%		2DS2	NEG	70.21%	40.45%	55.3%		3DL1	POS	99.09%	93.26%	78.0%
KIR2DS5*NEG	2DL5B	POS	12.68%	78.87%	10.5%	KIR2DS1*NEG	2DL2	NEG	70.52%	35.96%	55.5%	KIR2DS4*NEG	3DS1	NEG	97.87%	88.76%	77.0%
	2DL5B	NEG	87.32%	21.13%	72.5%		2DL5B	NEG	89.36%	26.97%	70.3%		2DL5A	NEG	98.48%	88.76%	77.5%
	2DS3	POS	14.41%	76.06%	12.0%		2DS3	NEG	89.06%	34.83%	70.1%		2DS5	NEG	99.09%	76.40%	78.0%
	2DS3	NEG	85.59%	23.94%	71.1%		2DL1	POS	81.16%	14.61%	63.9%		2DS1	NEG	98.48%	94.38%	77.5%
	2DL1	POS	82.13%	18.31%	68.2%		2DL1	NEG	18.84%	85.39%	14.8%		2DL5B	NEG	73.03%	10.64%	15.6%
	2DL1	NEG	17.87%	81.69%	14.8%		2DL4	POS	100.00%	4.49%	78.7%		2DL1	POS	82.02%	17.93%	17.5%
	2DL4	POS	99.42%	2.82%	82.5%		3DL1	POS	100.00%	96.63%	78.7%	2DL4	POS	95.51%	0.00%	20.3%	
	3DL1	POS	95.39%	98.59%	79.2%		3DS1	NEG	98.78%	92.13%	77.8%	3DL1	NEG	93.26%	99.09%	19.9%	
	3DS1	NEG	94.81%	95.77%	78.7%		2DL5A	NEG	99.70%	93.26%	78.5%	3DS1	POS	88.76%	97.87%	18.9%	
	2DL5A	NEG	95.68%	97.18%	79.4%		2DS5	NEG	100.00%	79.78%	78.7%	2DL5A	POS	88.76%	98.48%	18.9%	
	2DS1	NEG	94.81%	100.00%	78.7%		2DS4	POS	98.48%	94.38%	77.5%	2DS5	POS	76.40%	99.09%	16.3%	
	2DS4	POS	93.95%	95.77%	78.0%							2DS1	POS	94.38%	98.48%	20.1%	

Legenda: **PPV** - pozitivna prediktivna vrijednost, vjerojatnost da obilježeni gen označava prisutnost biljeg gena; **NPV** - negativna prediktivna vrijednost, vjerojatnost da odsutnost obilježenog gena označava odsutnost biljeg gena; **POZ** - oznaka da je gen KIR prisutan; **NEG** - oznaka da je gen KIR odsutan.

Primjenjene smjernice: minimalna PPV vrijednost mora biti 65%; prikazani su samo haplotipovi s u estaloš u ve om od 5% (N=418); u estalost je određivana direktnim brojanjem.

Primjer očitavanja tablice: (Tablica P3b, 2.dio/1 red) odsutnost gena *KIR2DL5B* daje vjerojatnost 78.87% da je gen *KIR2DS5* prisutan, odnosno vjerojatnost 12.68% da je gen *KIR2DS5* odsutan pri čemu je u estalost haplotipa *KIR2DS5*POZ-KIR2DL5B*NEG* 13.4%.

PRILOG 4. Prikaz izvornog izgleda mrežne stranice „The Allele Frequency Net Database“ (AFND) u koju je prijavljen novi genotip KIR (Bx 546) te podaci o u estalosti gena i genotipova KIR u hrvatskoj populaciji



KIR Database » Genotype Reference List

Hapl Group	Genotype ID †	3DL1	2DL1	2DL3	2D84	2DL2	2DL5	3D81	2D81	2D82	2D83	2D85	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	Worldwide			Croatia KIR (n=125)	Croatia KIR pop 2 (n=111)
																		Populations	Individuals	Population on which the unique genotype was found ‡		
AA	1																	146	5,087		33.6	23.4
AA	195																	24	102			0.9
AA	156																	8	13			0.9
Bx	6																	116	679		4.8	5.4
Bx	7																	103	467		6.4	4.5
Bx	3																	125	885		4.8	8.1
Bx	18																	25	48			0.9
Bx	13																	64	154		0.8	1.8
Bx	61																	2	2			0.9
Bx	5																	121	1,108		14.4	8.1
Bx	188																	17	30			0.9
Bx	4																	135	1,586		12.8	15.3
Bx	8																	101	394		1.6	1.8
Bx	2																	135	1,772		8.0	4.5
Bx	35																	20	33		0.8	
Bx	36																	11	12		0.8	
Bx	14																	49	134		0.8	0.9
Bx	15																	45	119		0.8	1.8
Bx	184																	6	10			0.9
Bx	80																	22	38			1.8
Bx	79																	22	73			1.8
Bx	73																	65	203			1.8
Bx	90																	50	120			0.9
Bx	71																	84	323		1.6	1.8
Bx	392																	2	2			0.9
Bx	391																	4	16		0.8	
Bx	240																	8	13		0.8	
Bx	76																	35	70		0.8	
Bx	72																	45	117		1.6	2.7
Bx	87																	19	40		0.8	1.8
Bx	86																	14	17			1.8
Bx	468																	2	2			0.9
Bx	546																	1	1	Croatia KIR pop 2		0.9
Bx	154																	18	43			0.9
Bx	70																	75	203		0.8	
Bx	159																	16	30		0.8	
Bx	68																	73	153		0.8	
Bx	69																	84	227			0.9
Bx	74																	17	57		0.8	

Listing 39 genotype(s).

† Genotype ID - ID assigned by the Allele Frequency Net Database. Please use this number for citations.

‡ Unique population on which the genotype has been found.

PRILOG 5. Popis kratica

ADCC	stani na citotoksi nost ovisna o protutijelima (engl. Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
AFND	Allele Frequencies Net Database (www.allelefrequencys.net)
ALL	akutna limfati na leukemija (engl. Acute Lymphoblastic Leukemia)
AML	akutna mijeloi na leukemija (engl. Acute Myeloid Leukemia)
ATG	anti-timocitni globulin (engl. thymoglobuline)
BMDW	Svjetski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih mati nih stanica (engl. Bone Marrow Donors Worldwide)
C1	skupina molekula HLA-C sa zajedni kim epitopom C1
C2	skupina molekula HLA-C sa zajedni kim epitopom C2
CF _i	opažena u estalost gena (engl. Carrier frequency)
CI	interval pouzdanosti (engl. Confidence Interval)
CLL	kroni na limfati na leukemija (engl. Chronic Lymphocytic Leukemia)
CML	kroni na mijeloi na leukemija (engl. Chronic Myelogenous Leukemia)
CMV	citomegalovirus
CSA	ciklosporin A
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DAP10	molekula adaptor
DAP12	molekula adaptor
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EFI	Europska federacija za imunogenetiku (engl. European Federation for Immunogenetics)
G-CSF	imbenik rasta kolonije granulocita (engl. Granulocyte Colony Stimulating Factor)
GF _i	o ekivana u estalost gena (engl. gene frequency)
GM-CSF	imbenik rasta kolonija granulocitnih makrofaga (engl. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)
GvH	presadak protiv primatelja (engl. Graft versus Host)
GvHD	reakcija presatka protiv primatelja (engl. Graft-versus-Host Disease)
GvL	reakcija presatka protiv tumora (engl. Graft-versus-Leukemia)
HCV	virus hepatitisa C

HGNC	HUGO Genome Nomenclature Committee
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. Human Immunodeficiency Virus)
HL	Hodgkinov limfom (engl. Hodgkin lymphoma)
HLA	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigen)
HR	omjer rizika (engl. hazard ratio)
HvG	primatelj protiv presatka (engl. host versus graft)
IFN-	interferon-
IgSF	imunoglobulinska obitelj (engl. Immunoglobulin Super-Family)
IHWG	the International Histocompatibility Working Group
IPD-KIR	baza nukleotidnih i proteinskih sekvenci gena KIR (engl. Immuno Polymorphism Database)
ITIM	inhibicijska sekvenca u proteinu KIR (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
ITAM	aktivacijska sekvenca u proteinu KIR (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)
KDDB	KIR and Diseases Database
KIR	receptori prirodnobila kih stanica sli ni imunoglobulinu (engl. killer cell immunoglobulin-like receptor)
iKIR	inhibicijski receptori prirodnobila kih stanica sli ni imunoglobulinu
aKIR	aktivacijski receptori prirodnobila kih stanica sli ni imunoglobulinu
LD	neravnoteže udruživanja gena (engl. linkage disequilibrium)
LRC	sustav leukocitnih receptora (engl. leukocyte receptor complex)
LILR	leukocitni receptori sli ni imunoglobulinu (engl. leukocyte immunoglobulin like receptor).
LAIR	porodica leukocitno-vezanih inhibicijskih receptora (engl. leukocyte-associated inhibitory receptor)
M	oznaka muškog spola
MAC	mijeloablativno kondicioniranje (engl. myeloablative conditioning regime)
MDS	mijelodisplasti ni sindrom (engl. Myelodysplastic Syndrome)
MMF	mikofenolat mofetilom (engl. Mycophenolate mofetil)
NHL	non-Hodgkinov limfom (engl. Non-Hodgkin lymphoma)
NK	prirodnobila ke stanice (engl. Natural Killer cells)
N-CAM	neuralna adhezijska molekula
NKp46	prirodno citotoksi ni receptor stanica NK

NKC	sustav gena koji kodiraju integralne membranske proteine s izvanstaničnim domenama nalik C-tipu lektina (engl. natural killer complex)
NKG2A	inhibicijski receptor na stanicama NK
NKG2B	inhibicijski receptor na stanicama NK
NKG2C	aktivacijski receptor na stanicama NK
P	statistička značajnost
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
PCR-SSP	metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih primera (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Priming)
PCR-SSO	metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih oligonukleotidnih proba (engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe)
R	Pearson-ov koeficijent korelacije
RDDKMS	hrvatski Registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica
RIC	nemijeloablativno kondicioniranje (engl. reduced intensity conditioning regime)
SA-PE	streptavidin (R-fikoeritrin)
SHP-1	inhibicijska fosfataza 1
SHP-2	inhibicijska fosfataza 2
SIGLEC	adhezijska molekula na stanicama makrofaga
TGF- β	transformirajući i inhibirajući rastni faktor (engl. Tumor Growth Factor beta)
TKMS	transplantacija krvotvornih matičnih stanica
TNF α	inhibirajući nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor alpha)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)
Ž	oznaka ženskog spola

9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marija Burek Kamenari , dipl. ing. mol. biologije

Datum i mjesto ro enja: 11. srpnja 1981. godine, Zagreb, Hrvatska

Naobrazba: 1994. - 1999. Op a gimnazija „Ivan Švear“ Ivani -grad
1999. - 2004. Prirodoslovno-matemati ki fakultet Sveu ilišta u Zagrebu,
Biološki odsjek, smjer molekularna biologija
2007. – 2014. Poslijediplomski doktorski studij biologije,
Prirodoslovno-matemati ki fakultet Sveu ilišta u Zagrebu

Radno mjesto: 2006. - 2008. Citogenetski laboratorij Zavoda za medicinsku genetiku i
bolesti metabolizma, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb.
2008. – do danas: Klini ke jedinice za tipizaciju tkiva, Klini ki zavod za
transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb

lanstva: European Federation for Immunogenetics (EFI)
Hrvatsko društvo biologa u zdravstvu (HDBUZ)
Hrvatsko društvo za humanu genetiku (HDHG)

Prisustvovanja znanstvenim skupovima:

2007. - 2014. 8 me unarodnih znanstvenih skupova (2 usmena priop enja, 17 postera)

Popis znanstvenih radova:

- 19 kongresnih priop enja u asopisima indeksiranim u CC i SCI
 - 5 znanstvenih radova u asopisima indeksiranim u CC i SCI:
1. MK Burek, Z Grubic, K Stingl, R Zunec. Distribution of KIR genes in the Croatian population. *Human Immunology*, 2013; 74:952-956
 2. M Calusic, Z Grubic, K Stingl, MK Burek, R Zunec. Diversity of HLA-B*35 alleles and haplotypes among Croatians. *Immunological Investigations*, 2012; 41(8):856-63
 3. Z Grubic, MK Burek, M Mikulic, K Stingl Jankovic, M Maskalan, R Zunec. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International journal of immunogenetics*, 2014; 41:211-221
 4. Z Grubic, K Stingl Jankovic, M Maskalan, R Sereventi-Seiwerth, M Mikulic, MK Burek, D Nemet, R Zunec. HLA allele and haplotype polymorphisms among Croatian patients in unrelated hematopoietic stem cell donor searches program. *Transplantation immunology*, 2014; doi: 10.1016/j.trim.2014.06.007 (in press)
 5. Z Grubic, MK Burek, M Maskalan, K Stingl Jankovic, R Zunec. Non-frequent but well documented, rare and very rare HLA alleles observed in the Croatian population. *Tissue antigens*, 2014 (in press)