



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

FISIOPATOLOGIA E DIAGNOSTICA IN MEDICINA INTERNA
FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DI FEGATO

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DiBiMIS)

MED 17

RUOLO DELL' INTERAZIONE KIRs/HLA NEI PAZIENTI CON INFEZIONE CRONICA DA HBV

IL DOTTORE

Dott.ssa Raffaella Rubino

IL COORDINATORE

Prof. P. Almasio

IL TUTOR

Dott.ssa Claudia Colomba

CICLO XXV
ANNO 2015

INTRODUZIONE

Circa un terzo della popolazione mondiale ha evidenza sierologica di infezione da HBV in atto o pregressa e 350 milioni di persone hanno un'infezione cronica.

L'espressività clinica e la storia naturale della malattia sono ampiamente variabili. Oltre allo stato di portatore cronico inattivo di HBsAg, il decorso della malattia può includere forme subcliniche o acute autolimitantesi (95% dei casi), forme acute a decorso fulminante (0,5%) e forme acute, sintomatiche o subcliniche, che cronicizzano potendo evolvere in cirrosi (< 5% dei casi) e carcinoma epatocellulare (HCC) (6,4% dei pazienti con infezione cronica non trattati)[1,2].

I meccanismi patogenetici che sottendono il decorso dell'infezione da HBV non sono ancora del tutto chiariti e sembrerebbero includere fattori genetici dell'ospite, fattori virali e fattori ambientali [3,4]. HBV non ha un'azione citopatica diretta. Il danno epatocitario in corso di infezione da HBV, sia acuta che cronica, consegue alla risposta immunitaria dell'ospite, la quale finisce col determinare anche l'evoluzione dell'infezione. Quanto più vigorosa è la risposta immune tanto più severo è il danno epatico e maggiore la probabilità di eliminare il virus. Oltre all'intervento coordinato delle risposte anticorpale e cellulo-mediata, un ruolo importante viene svolto da alcune citochine infiammatorie rilasciate da cellule linfomononucleate attivate dal virus[3]. Le cellule NK costituiscono una sottopopolazione di cellule correlate ai linfociti, sono

effettori chiave della risposta immune innata e rappresentano circa un terzo dei linfociti intraepatici. Esse giocano un ruolo di primo piano nella difesa nei confronti delle infezioni virali potendo uccidere direttamente le cellule infettate, produrre citochine ed interagire con le cellule del sistema immune adattativo[5]. L'attivazione delle cellule NK sembrerebbe contribuire al danno infiammatorio epatico e la loro funzione è regolata da un complesso equilibrio di segnali generati da recettori attivatori e recettori inibitori presenti sulla superficie delle cellule stesse (*"induced self – recognition hypothesis"*). Molti di questi recettori, come NKp46 ed NKG2D, sono monomorfici ed attivatori. I recettori inibitori appartengono principalmente a due gruppi: i killer-cell immunoglobulin like receptors (KIRs) e i recettori della famiglia NKG2. I KIRs (19q13.4) sono numerosi, con una consistente differenziazione sia a livello allelico che aplotipico, possono essere attivatori, inibitori o attivatori/inibitori e si legano a molecole HLA di classe I anch'esse polimorfiche [6-10]. La distribuzione dei geni che codificano per i recettori KIR può variare nelle diverse popolazioni e, in uno stesso individuo, tali recettori possono essere espressi differenzialmente nei vari cloni di cellule NK[10, 11]. Sebbene l'espressione dei geni KIR sulla superficie delle cellule NK possa modificarsi nel corso della loro maturazione, una volta avvenuto questo processo il pattern dei KIRs su un determinato clone di cellule NK rimane costante anche al variare della stimolazione antigenica. E' molto probabile che la variabilità nella risposta immune nei confronti dei diversi patogeni sia attribuibile ai KIRs e dipenda anche dalla loro interazione coi contro - recettori specifici appartenenti al sistema HLA

I classe [6,7]. Inoltre poichè geni KIR e geni HLA mappano su cromosomi differenti e segregano indipendentemente, in alcuni individui l'accoppiamento recettore – contro recettore può non verificarsi (fenotipi nulli)[6]. Finora sono stati identificati 17 geni KIR, di cui 8 inibitori (KIR2DL1-3, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1-3), 6 attivatori (KIR2DS1-5, 3DS1), uno attivatore/inibitore (KIR2DL4) e due pseudogeni (2DP1 e 3 DP1). A dimostrazione della suddetta ampia differenziazione a livello allelico, il KIR2DS4, ad esempio, ha 12 alleli, di cui 9 con mutazioni nelle regioni codificanti per cui solamente KIR2DS4*00101, KIR2DS4*00102 e KIR2DS4*00103 codificano per recettori espressi in superficie e funzionali mentre i restanti alleli codificano per una proteina tronca priva dei domini transmembrana e citoplasmatico[8]. La combinazione di più geni KIR forma un aplotipo [6,7][**Fig.1**]. Esistono due principali aplotipi: l'aplotipo A e l'aplotipo B. L'aplotipo A è più semplice e contiene prevalentemente geni inibitori (KIR2DL1-3, KIR3DL2 -3), KIR2DL4, KIR2DS4 mentre l'aplotipo B comprende un numero ampiamente variabile di geni KIR, la maggior parte attivatori (KIR2DS1-3, KIR2DS5)[6, 7-11]. Le molecole HLA I C classe, i cui geni sono situati sul cromosoma 19 vengono a loro volta suddivise in C1 e C2, a seconda che in posizione 80 si trovi rispettivamente un residuo di asparagina o di lisina. L'aminoacido in posizione 44 del dominio D1 dei KIRs sembra determinare la loro capacità di legarsi a molecole HLA C1 o HLA C2. KIR2DL1 e KIR2DS1 si legano esclusivamente a molecole HLA C2, mentre KIR2DL3, KIR2DL2 e KIR2DS2 si legano esclusivamente a molecole HLA C1[7][**Fig.2**]. KIR3DL1 invece lega

molecole HLA Bw4 (Bw4^I e Bw4^T) ed in particolare l'interazione dà luogo ad un più forte segnale inibitorio se avviene con l'allele Bw4^I (isoleucina in posizione 80)[7]. Infine KIR3DL2 lega molecole HLA A3 ed HLA A11. I recettori attivatori KIR2DS1, KIR2DS2 e KIR3DS1 condividono sequenze aminoacidiche del dominio extracellulare con i loro corrispettivi inibitori (KIR2DL1, KIR2DL2/DL3, KIR3DL1) e probabilmente, almeno in parte, condividono i ligandi HLA. Ciascuna interazione KIR/HLA attiva/inibisce con differente forza e tale sistema è in continua evoluzione[7-11][**Fig. 3**]. Come illustrato nella *Fig.3*, l'interazione KIR2DL1-HLA C2 sembra determinare un segnale inibitorio più forte dell'interazione KIR2DL3-HLA C1 impedendo il killing della cellula bersaglio. Le varianti alleliche non solo possono influenzare la forza dell'interazione ma possono anche essere espresse in percentuale differente nei diversi cloni di cellule NK : ad esempio, gli alleli del KIR3DL1 hanno un differente pattern di espressione sulla superficie delle cellule NK (high, low or no expression) [12-14]. Gli allotipi KIR3DL1 *h (high) interagiscono con il loro ligando HLA Bw4^I determinando una più forte inibizione del killing della cellula bersaglio [12]. Infine anche il peptide antigenico processato ed allocato nella tasca formata dai domini α_1 e α_2 dell'HLA può influire sull'interazione tra quest'ultima ed il corrispettivo KIR [15-17].

Diverse evidenze di letteratura supportano la relazione tra specifiche interazioni KIRs/HLA e la patogenesi ed il decorso di alcune malattie virali, autoimmuni e neoplastiche. In generale,

aplotipi contenenti prevalentemente geni attivatori conferiscono protezione nei confronti di diverse infezioni virali e suscettibilità allo sviluppo di malattie autoimmuni e neoplastiche [6,7].

In corso di infezione da HIV, l'interazione KIR3DS1 – HLA Bw4^I è associata con una più lenta progressione, una più bassa carica virale ed una minore incidenza di infezioni opportunistiche e l'omozigosi KIR3DS1 è risultata essere più frequente tra i tossicodipendenti esposti ma sieronegativi per HIV e nei partners sieronegativi per HIV di coppie discordanti[18 -20].

Tuttavia anche l'interazione inibitoria KIR3DL1 *h / HLA Bw4^I è risultata protettiva in corso di infezione da HIV; ciò sembra essere contraddittorio ma probabilmente la forte inibizione che il legame KIR3DL1 *h / HLA Bw4^I determina durante la maturazione di un clone di cellule NK conduce ad una più energica attivazione dello stesso successivamente, quando il recettore KIR è down – regulated o addirittura non più espresso [14, 21-23].

Dati di letteratura recenti riportano una maggiore frequenza di riattivazione del citomegalovirus (CMV) in pazienti sottoposti a trapianto renale o di midollo osseo omozigoti per l'aplotipo A dei KIR, il quale come già esposto, contiene geni prevalentemente inibitori (unico gene attivatore KIR2DS4, i cui alleli sono nell' 80% dei casi alleli null)[24-26].

Da uno studio condotto da Di Bona D *et al.* pubblicato su *J Infect Dis* è emerso inoltre che pazienti immunocompetenti omozigoti per l'aplotipo A dei KIRs o per l'allele HLABw4^T hanno un rischio maggiore di sviluppare una malattia da CMV sintomatica [27] così come Khakoo *et al.* hanno dimostrato il ruolo sinergico protettivo dell'omozigosi KIR2DL3/HLA C1 nei

confronti dell'infezione da HCV in un gruppo di pazienti che avevano contratto l'infezione attraverso comportamenti sessuali a rischio e quindi presumibilmente con una bassa carica virale[28]. Tale ruolo protettivo è stato confermato da due successivi studi condotti da Vidal-Castiñeira JR *et al.* e da Knapp S *et al.* che includevano pazienti sia trattati che non, con differenti modalità di infezione [29,30].

I risultati emersi dagli studi sui pazienti con infezione cronica da HBV sono ancora discordanti, incompleti e condotti su popolazioni numericamente esigue e geneticamente differenti dalla nostra.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è valutare il ruolo, nella nostra area geografica, dell'interazione KIRs/HLA sul decorso dell'infezione da HBV confrontando soggetti HBcAb positivi e HBsAg negativi con o senza anti-HBs Ab, pazienti con infezione cronica da HBV e soggetti non esposti al virus HBV utilizzando le associazioni KIR/HLA più frequentemente riportate in letteratura.

MATERIALI E METODI

Nel corso dei tre anni di studio sono stati arruolati 55 pazienti (35 M e 20 F) con infezione cronica da HBV afferenti all'UOC di Malattie Infettive e all'UOC di Medicina Interna del Dipartimento di Patologie Emergenti dell' AOUP «P.Giaccone».

40 (27 M e 13F) tra i pazienti arruolati hanno fornito il consenso scritto e sono stati sottoposti al prelievo per le indagini genetiche. I campioni ematici sono stati raccolti in provetta da emocromo con EDTA e congelati a -20°C.

I pazienti con pregressa infezione da HBV evoluta in remissione spontanea ovvero i soggetti HBcAb positivi e HBsAg negativi con o senza anti-HBs Ab, insieme ai soggetti mai esposti all'HBV, sono stati reclutati presso l'U.O. di Medicina Trasfusionale dell'AOUP P. Giaccone.

Anche ai pazienti appartenenti ai suddetti due gruppi di controllo è stato richiesto un consenso scritto all'esecuzione di indagini genetiche. E' stato creato un database per tutti i pazienti arruolati.

Nel database dei pazienti con infezione cronica, oltre ai dati anagrafici, sono state incluse le informazioni cliniche relative alle modalità di esordio e di trasmissione dell'infezione, al decorso e all'eventuale terapia somministrata.

Anche i pazienti con coinfezione HBV/HDV, HBV/HIV ed HBV/HCV sono stati inseriti nel database e sottoposti a prelievo.

Il DNA è stato ottenuto dai leucociti del sangue periferico con la tecnica del salting-out ed è stato tipizzato per HLA C1, HLA C2, HLA Bw4^I ed HLA Bw4^T, HLA A3 ed HLA A11 mediante reazione polimerasica a catena (PCR-SSP, polymerase chain reaction sequence specific primer) (*Epitop-TYPE kit; BAG Health Care GmbH, Lich, Germany*). L'analisi dei KIRs è stata condotta usando il KIR – TYPE kit (*BAG Health Care GmbH*) ed ha incluso sia i geni inibitori (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3) sia i geni attivatori (KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 e KIR3DS1) sia i due pseudogeni (KIR2DP1 e KIR3DP1). Sulla base della presenza o assenza di ciascun gene KIR è stato ricavato l'aplotipo di ciascun paziente/controllo.

RISULTATI

Ad oggi sono stati analizzati 24 campioni di pazienti affetti da infezione cronica da HBV e 60 controlli non esposti al virus.

Come mostrato nella **tabella 1**, gli aplotipi AA ed AB + BB sono ugualmente rappresentati nelle due popolazioni studiate così come non emergono differenze statisticamente significative nella frequenza dei KIRs sia attivatori che inibitori tra i due gruppi. Solamente il recettore attivatore KIR2DS2 è maggiormente presente nei pazienti con infezione cronica rispetto ai non esposti (75 % vs 45 %, OR 3.7, p 0.02) ma se andiamo a valutare l'associazione tra il KIR2DS2 ed il suo contro - recettore HLA C1 tale differenza non risulta più significativa (42% vs 22%, OR 2,58, p n.s.). Tale risultato potrebbe tuttavia essere legato alla dimensione del campione in quanto l'OR rimane rilevante . Le due popolazioni risultano differenti anche per la frequenza dei geni HLA C2 (infetti cronici 87% vs non esposti 60%, OR 4.67, p 0.03), HLA Bw4^I (infetti cronici 58% vs non esposti 37%, OR 3.45, p 0.03) e soprattutto HLA A 3, 11 (infetti cronici 71% vs non esposti 10%, OR 21.86, p < 0.00001). In quest'ultimo caso la differenza tra le due popolazioni è veramente notevole. Per quanto riguarda le interazioni KIRs/HLA, mentre quelle attivatorie sono presenti nella stessa misura nei due gruppi in studio, molte di quelle inibitorie sono maggiormente espresse nei pazienti con infezione cronica da HBV: in particolare, KIR3DL2 - HLA A 3,11 (p < 0,00001, OR 21,86), HLA C1 – KIR2DL2 (p < 0,02, OR 3, 54).

DISCUSSIONE

I nostri risultati sono in accordo con altri dati pubblicati recentemente in letteratura.

Gao X *et al* [31] infatti riportano una frequenza significativamente maggiore dell'interazione KIR2DL1/HLA C2 nei pazienti con infezione cronica da HBV rispetto ai controlli sani (56% vs 42.1%, $p = 0.013$, OR 1.75; 95% CI, 1.12-2.73) e suggeriscono un possibile ruolo protettivo dell'omozigosi KIR2DL3/HLA C1 anche nell'infezione da HBV oltre che, come già dimostrato, in corso di infezione da HCV[28-30].

In uno studio condotto da Kibar F *et al.* su una piccola popolazione di pazienti turchi KIR2DL3 e KIR3DS1 sono risultati più frequenti nei controlli sani rispetto ai pazienti con infezione cronica da HBV e in remissione spontanea e pertanto può essere ipotizzato un ruolo protettivo di questi due geni nei confronti dell'infezione da HBV[32] così come riportato da Zhi-ming *et al.* per il KIR2DS1, per il KIR3DS1 e per il KIR2DL5[33].

Dal nostro studio emerge una netta prevalenza dell' HLA A 3,11 nei pazienti con infezione cronica rispetto ai non esposti e questo è un dato mai riportato in letteratura.

Inoltre, le interazioni inibitorie KIR3DL2 - HLA A 3,11 e KIR2DL2 - HLA C1 ed il gene KIR2DS2 sono risultati espressi in misura significativamente maggiore nei pazienti con infezione cronica e dall'elaborazione dei nostri dati, ancora parziali, i pazienti con infezione cronica da HBV sembrerebbero complessivamente più inibiti nell'attivazione delle cellule NK

da parte dei KIRs rispetto ai soggetti HBV – non esposti e sicuramente la popolazione che cronicizza è geneticamente differente da quella dei non esposti.

Fig. 1

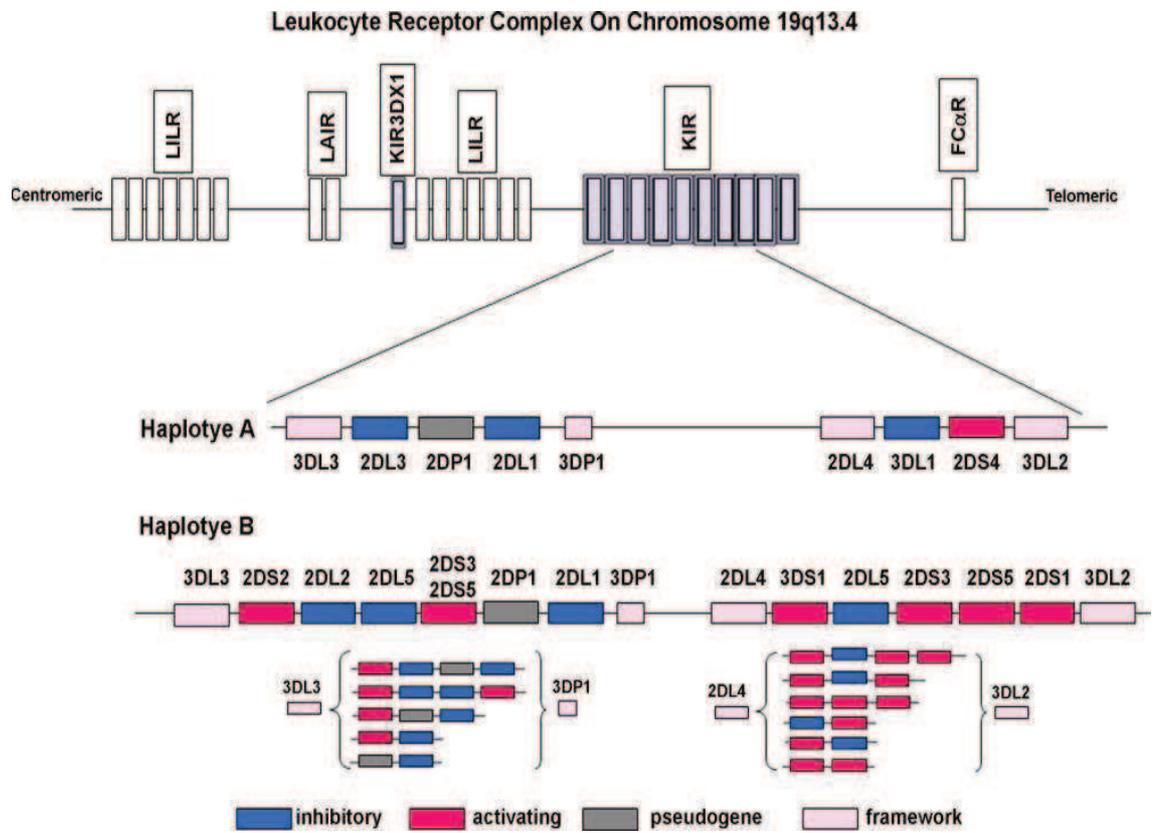


Fig. 2

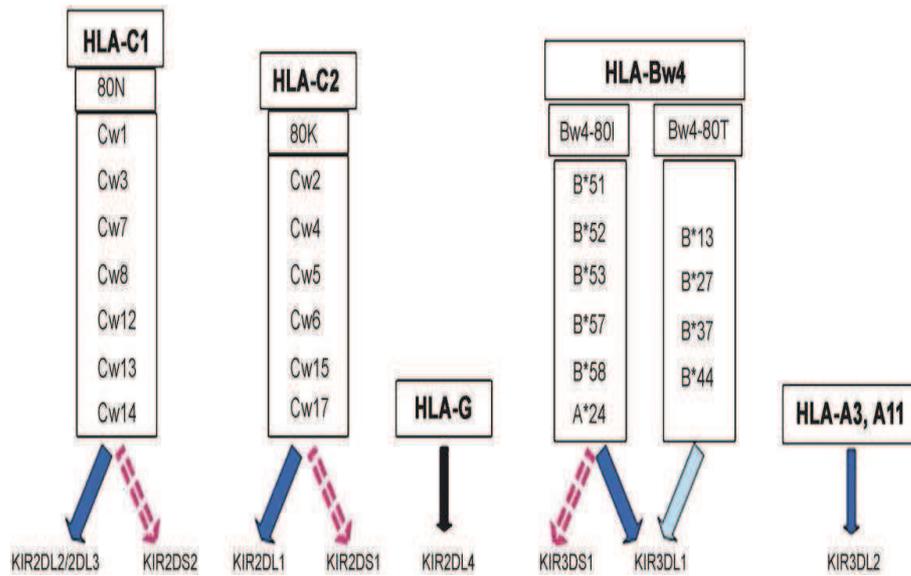
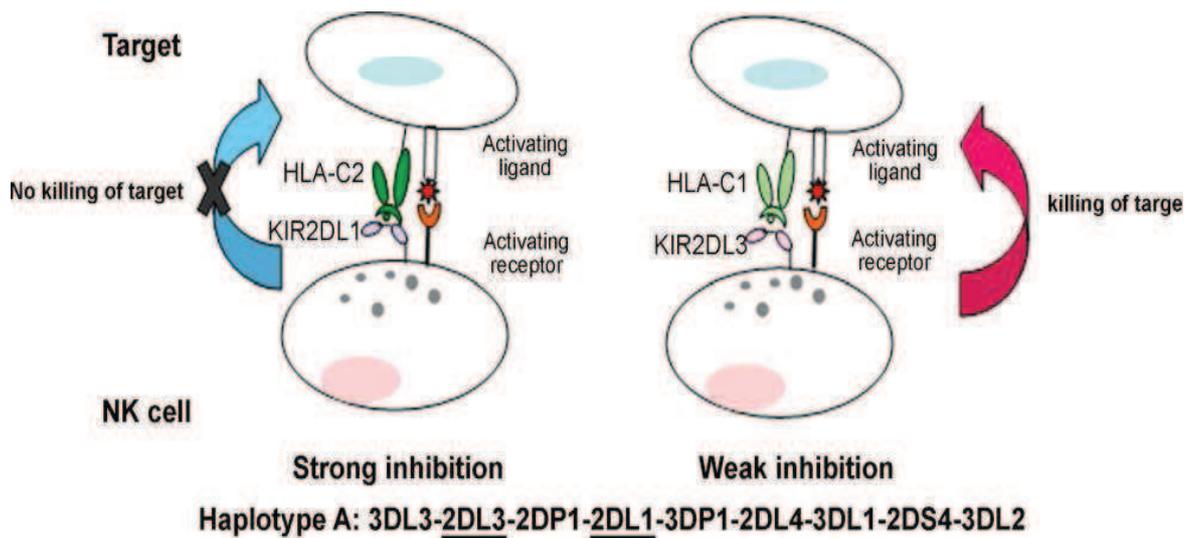


Fig. 3



BIBLIOGRAFIA

1. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J of Hepatology* 2012, (57): 167-185;
2. Papatheodoridis G.V. *et al.* “Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review”. *J of Hepatology* 2010, (53): 348 -356;
3. Ganem D *et al.* “ Hepatitis B virus infection: natural history and clinical consequences”. *N Engl J Med* 2004, 350:1118-1129;
4. Custer B *et al.* “Global epidemiology of hepatitis B virus”. *J Clin Gastroenterol* 2004, 38: 158-168;
5. Lanier LL. “NK cell recognition”. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:225 – 274;
6. Khaleel M J *et al.* “ KIR/HLA Interactions and pathogen immunity” . *J of Biomedicine and Biotechnology* 2011, article ID298348;
7. Kulkarni S. *et al.*” The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease”. *Seminars in Immunology* 2008, (20) 343-352;
8. Vilches C *et al.* “KIR diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity”. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 217-251;
9. Middleton D *et al.* ” KIR genes”. *Transp Immunol* 2005, 14: 135-142;
10. Hsu KC *et al.* “The killer cells immunoglobulin – like receptor (KIR) genomic region: geneorder, haplotypes and allelic polymorphism”. *Immunol Rev* 2002, 190: 40-52;
11. Uhrberg M *et al.* “Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes”. *Immunity* 1997, 7: 753-763.

12. Yawata M *et al.* "Roles for HLA and KIR polymorphism in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function". *J Exp Med* 2006, 203(3): 633-645;
13. Gardiner CM *et al.* " Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism". *J Immunol* 2001, 166 (5): 2992-3001.
14. Pando MJ *et al.* " The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at position 86 in Ig domain 0 and Ig domain in Ig domain 1. *J Immunology* 2003, 171(12): 6640-6649;
15. Malnari MS *et al.* " Peptide specificity in the recognition of MHC di I classe in the natural killer cell clones". *Science* 1995, 267(5200): 1016-1018;
16. Rajagopalan S *et al.* " The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen(HLA) – Cw4 exhibits peptide selectivity". *J Exp Med* 1997, 185(8): 1523-1528;
17. Zappacosta P *et al.* " Peptides isolated from HLA- Cw* 0304 confer different degrees of protection natural killer cell-mediated lysis". *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94(12):6313-6318;
18. Martin MP *et al.* "Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS". *Nat Genet* 2002, 31(4): 429-434;
19. QI Y *et al.* " KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections". *PLoS Pathog* 2006, 2(8):e79;
20. Aiter G *et al.* " Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes". *J Exp Med* 2007, 204(12): 3027-3036;
21. Kim S *et al.* " Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules". *Nature* 2005, 436(7051):709-713;

22. Anfossi N *et al.* “ Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I “. *Immunity* 2006, 25(2): 331-342;
23. Kim S *et al.* “ HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105(8): 3053-3058;
24. Cook M *et al.* “ Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation”. *Blood* 2006, 107: 1230-1232;
25. Hadaya K *et al.* “Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation”. *Am J Transplant* 2008; 8: 2674-2683;
26. Stern M *et al.* “The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients”. *Am J Transplant* 2008; 8:1312-1317;
27. Di Bona *et al.* “HLA and Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors Influence the Natural Course of CMV Infection”. *J Infect Dis* 2014, 210 (7):1083-9;
28. Khakoo SI *et al.* “HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection” *Science* 2004, 305: 872-874;
29. Vidal-Castiñeira JR *et al.* “Effect of killer immunoglobuline like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection”. *Journal of Virology* 2010, 84: 1 pp 475-481;
30. Knapp S *et al.* “Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobuline -like receptors 2D3L and group 1 human leukocyte antigen C following exposure to hepatitis C virus”. *Hepatology* 2010, 51:4 pp 1168-1175;

31. Gao X *et al.* "Inhibitory KIR and specific HLA – C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B". *Clinical Immunology* 2010, 137:139-146;
32. Kibar F *et al.* "Role of KIR genes and genotypes in susceptibility to or protection against hepatitis B virus infection in a Turkish cohort". *Med Sci Monit*, 2014. 20:28-34;
33. Zhi-ming L *et al.* " Polymorphism of killer-cell immunoglobuline like receptors gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population". *Croat Med J* 2007, 48:800-806