



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Paper dels receptors
de les cèl·lules Natural Killer
i dels seus lligands, estudiats mitjançant
tecnologia NGS, en l'evolució de pacients
amb neoplàsies mieloides**

Laia Closa Gil



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

TESI DOCTORAL

**Paper dels receptors de les cèl·lules
Natural Killer i dels seus lligands, estudiats
mitjançant tecnologia NGS en l'evolució
de pacients amb neoplàsies mieloides**

LAIA CLOSA GIL



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Programa de Doctorat en Biomedicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL

**Paper dels receptors de les cèl·lules Natural Killer i dels seus lligands,
estudiats mitjançant tecnologia NGS, en l'evolució de pacients amb
neoplàsies mieloides**

Memòria presentada per

Laia Closa Gil

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Jose Luis Caro Oleas i del Dr.
Francisco Vidal Pérez, i sota la tutorització del Dr. Francisco Lozano Soto

Dr. Jose Luis Caro Oleas

Dr. Francisco Vidal Pérez

Dr. Francisco Lozano Soto

Laia Closa Gil

Doctoranda

Barcelona, Desembre 2020

Disseny portada: Anna Closa

ABSTRACT

The present doctoral thesis consists of a first part of the design and development of a new methodology to carry out the sequencing of NK cell receptor coding genes and their respective more polymorphic ligands. It has been demonstrated the great efficiency of NGS technology in obtaining the types of these genes in comparison with the alternatives that were in force at the beginning of this work. At the same time, it has become clear that the limiting factor of this type of strategy lies in the tools available to carry out the data analysis, a fact that leads us to continue comparing new programs that have been appearing to develop the KIR type at allele resolution. The validation of this method has not only allowed us to carry out the second part of this project, but has also allowed us to implement the strategy in the assistance activity of the Laboratory of Histocompatibility and Immunogenetics of the BST. The second part of the present thesis is based on the application of the strategy developed in a retrospective clinical study on the possible implication of NK cell receptor variants and their ligands in the response of patients with CML to ITC treatments. To do so, we studied the distribution of polymorphisms of these genes in our population as well as in a group of 190 patients. Finally, the hypothesis put forward at the beginning of this project was accepted, which stated that patients with CML and NK profiles with activating receptors have a better response to treatment and its links in the response of patients with CML to ITC treatments. To do so, we studied the distribution of polymorphisms of these genes in our population as well as in a group of 190 patients. Finally, the hypothesis put forward at the beginning of this project was accepted, which stated that patients with CML and NK profiles with activating receptors have a better response to ITC treatments.

ABSTRACT

La present tesi doctoral consta d'una primera part de disseny i desenvolupament d'una nova metodologia per dur a terme la seqüenciació de gens codificants de receptors de les cèl·lules NK i dels seus respectius lligands més polimòrfics. S'ha demostrat la gran eficàcia de la tecnologia NGS a l'hora d'obtenir els tipatges d'aquests gens en comparació amb les alternatives que es trobaven vigents a l'inici d'aquest treball. A la vegada, ha quedat palès que el factor limitant d'aquest tipus d'estratègies es troba en les eines disponibles per dur a terme l'anàlisi de les dades, fet que ens porta a seguir comparant nous programaris que van apareixent per posar a punt el tipatge KIR a resolució al·lèlica. La validació d'aquest mètode no només ha permès dur a terme la segona part d'aquest treball, sinó que també ha permès implementar l'estratègia a l'activitat assistencial del Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST. La segona part de la present tesi es basa en l'aplicació de l'estratègia desenvolupada en un estudi clínic retrospectiu on s'estudia la possible implicació de les variants dels receptors de les cèl·lules NK i dels seus lligands en la resposta de pacients amb CML als tractaments ITC. Per dur-ho a terme, s'ha estudiat la distribució dels polimorfismes d'aquests gens a la nostra població així com a un grup de 190 pacients. Finalment, s'ha acceptat la hipòtesi plantejada a l'inici d'aquest projecte, la qual afirmava que pacients amb CML i amb perfils NK amb receptors activadors presenten més bona resposta als tracta i dels seus lligands en la resposta de pacients amb CML als tractaments ITC. Per dur-ho a terme, s'ha estudiat la distribució dels polimorfismes d'aquests gens a la nostra població així com a un grup de 190 pacients. Finalment, s'ha acceptat la hipòtesi plantejada a l'inici d'aquest projecte, la qual afirmava que pacients amb CML i amb perfils NK amb receptors activadors presenten més bona resposta als tractaments ITC.



AGRAÏMENTS

Vull agrair a en Jose Luis i a en Fran, els meus directors, la confiança que van dipositar en mi perquè tirés endavant aquest projecte. Gràcies, Jose Luis, per tots els trajectes fins al BST per saber com anava, per les respostes a totes les preguntes que podien sorgir-me i per animar-me a participar en tants congressos. Gràcies, Fran, per donar-me tanta llibertat a l'hora de fer proves i per en lloc de donar-me sempre la resposta, fer que em trenqui el cap per trobar-la, ha estat molt més divertit així.

Als jefes d'HLA, al Francesc i a la María José, per respondre'm tots els dubtes d'immuno que podia tenir, i pel suport extra rebut un cop en Jose Luis va deixar el BST. Gràcies, Irene i a tot l'equip de Coagulopaties, per fer-me un foradet sempre que he necessitat ajuda amb PCR o els seqüenciadors, també per tots els dinars i sortides d'estiu. A la gent de l'Institut Carreras i de l'Hospital Clínic per adoptar-me els dies eters de buscar mostres als congeladors.

Emma! Sense tu tot aquest tocho no hauria estat possible, gràcies per integrar-me al grup i per ensenyar-m'ho tot quan vaig arribar, per animar-me quan entro al despatx remugant "*putus KIR*", i per totes les xerrades de milions de temes entre chocobom i chocobom!

Agrair a la Nina, la Iris i la Laura les estones dedicades a respondre'm preguntes, ja siguin relacionades amb la tesi com de la vida en general, pels sopars amb vinico, pels room escapes (sobretot a la Iris per salvar-nos a totes) i pels mojitos.

Gràcies a tot l'equip d'HLA per ajudar-me sempre que ho he necessitat al laboratori i per les converses al menjador sobre sèries, pelis i *tinder*. Marta, per tots els pitis terapèutics arreglant el món, "vamos, que la gente es imbecil". Gràcies Rocío i Oriol per ser sempre tan propers, per interessar-vos tant per nosaltres i pels sopars.

A l'Aleksandra Assànovna Elbakian, creadora de Sci-Hub, què faríem sense tu.

Als nois de Can Pou, sense vosaltres no hauria anat a treballar tan contenta cada dia, ni amb ressaca algun cop, tot s'ha de dir.

A la gent de la *Xina Maja*, (i a la Ning i al Leiou), per totes les Sant Miguels i els vostres "LA LAIA FA KIRKS", sou el gran moment de desconexió de la setmana.

A la Net, per deixar-se *axuxar* quan arribo a casa estressada i per (a vegades) acceptar tocar-me el cap mentre mirem la TV.

Tiet Fèlix, gràcies per preguntar-me sempre com em va i per deixar que es noti tant que estàs orgullós de les nebodes.

Ferran, gràcies per fer-me veure que puc amb tot allò que em proposi, per escoltar-me tant aquests últims mesos i per fer de Cals Dupond el millor lloc del món.

A vosaltres, pares, que us vau conèixer a la Facultat de Biologia i mira, *de tal palo tal astilla*. A tu, pare, segur que han estat els teus milions de “sabíeu que?” a l’hora de sopar, que han fet que m’hagi convertit en algú amb ganes de trobar respostes. I a tu, mare, que m’has animat molt sempre, estic segura que també t’hagués agradat molt fer una tesi, podem compartir aquesta.



ÍNDEX

ABREVIACIONS.....	15
INTRODUCCIÓ.....	19
1. Neoplàsies Hematològiques	19
1.1 Leucèmia Mieloide Crònica.....	19
1.1.1 Diagnòstic i progressió.....	20
1.1.2 Tractaments.....	22
1.1.3 Monitoratge.....	26
1.1.4 Discontinuació del tractament	27
2. Paper de les cèl·lules NK al sistema immunitari.....	28
2.1 Receptors de les cèl·lules NK	31
2.1.1 Receptor NKG2D.....	31
2.1.2 Receptors KIR.....	33
2.2 Lligands dels receptors de les cèl·lules NK.....	39
2.2.1 Complex d'Histocompatibilitat Principal	39
2.2.2 Molècules MICA i MICB	41
2.3 Cèl·lules Natural Killer en Neoplàsies Hematològiques	42
2.3.1 Nombre cel·lular alterat	43
2.3.2 Maduració alterada	43
2.3.3 Repertori de receptors	44
2.3.4 Immunoteràpia i cèl·lules NK.....	45
3. Mètodes de tipificació.....	46
3.1 PCR-SSP: Tipificació mitjançant encebadors específics de seqüència	46
3.2 PCR-SSO: Tipificació mitjançant sondes oligonucleotídiques específiques	46
3.3 Seqüenciació de Sanger i PCR-SBT: Tipificació basada en la seqüència	47
3.4 Seqüenciació de Segona Generació	49
3.4.1 Tecnologia d'Illumina.....	50
3.5 Seqüenciació de Tercera Generació.....	52
CONTEXT.....	57
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	61
RESULTATS.....	65
1. Article 1. Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing	69

2. Article 2. Distribution of Human Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Ligands among Blood Donors of Catalonia	81
3. Article 3. High-throughput genotyping of <i>HLA-G</i> , <i>HLA-F</i> , <i>MICA</i> and <i>MICB</i> and analysis of frequency distributions in healthy blood donors from Catalonia	93
4. Article 4. NK cell receptors and ligand variants modulate the response to tyrosine kinase inhibitors in patients with Chronic Myeloid Leukemia	123
RESUM GLOBAL DELS RESULTATS	159
1. Informe dels directors	159
2. Resum dels resultats	165
DISCUSSIÓ.....	175
CONCLUSIONS.....	193
BIBLIOGRAFIA	197



ABREVIACIONES

ABREVIACIONS

ABL1	Leucèmia murina d'Abelson
ADCC	Citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos
AML	Leucèmia Mieloide Aguda
AFND	Base de Dades de Freqüències Al·lèliques
BCR	Regió de tall de clúster
CCyR	Resposta Citogenètica Completa
CHR	Resposta Hematològica Completa
CML	Leucèmia Mieloide Crònica
DMR	Resposta Molecular Profunda
EMR	Resposta Molecular Primerenca
FB	Fase blàstica
FC	Fase crònica
MHC	Complex d'Histocompatibilitat Principal
GvHD	Malaltia d'empelt contra l'hoste
GvL	Empelt contra leucèmia
HLA	Antigen Leucocitari Humà
INF	Interferó
IL	Interleucina
ITC	Inhibidor de la tirosina cinasa
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
FA	Fase accelerada
MCyR	Resposta Citogenètica Major

ABREVIACIONS

MDS	Síndromes Mielodisplàstics
MIC	MHC I chain-related molecule
MiCyR	Resposta Citogenètica Mínima
MMR	Resposta Molecular
NGS	Seqüenciació de nova generació
NK	Natural Killer
NKG2D	Natural-killer group 2, member D
PCyR	Resposta Citogenètica Parcial
Ph	Cromosoma Philadelphia
REDMO	Registre Espanyol de Donants de Medul·la Òssia
SNP	Polimorfisme de nucleòtids simples
SSO	Sondes d'oligonucleòtids específics de seqüència
SSP	Primers específics de seqüència
TGS	Seqüenciació de tercera generació
TFR	Remissió Lliure de Tractament
TPH	Trasplantament de progenitors hematopoètic
UTR	Regió no traduïda
WHO	Organització Mundial de la Salut



INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. NEOPLÀSIES HEMATOLÒGIQUES

L'Organització Mundial de la Salut (WHO), utilitza criteris morfològics, immunofenotípics, genètics i clínics per definir i classificar les neoplàsies hematològiques. La classificació estratifica les neoplàsies segons el llinatge cel·lular del qual procedeixen a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica (mieloide o limfoide). A més, també es classifiquen segons la velocitat d'evolució d'aquestes. En leucèmies agudes, el nombre de cèl·lules immadures es multiplica ràpidament, mentre que en leucèmies cròniques, aquestes cèl·lules apareixen més gradualment i els símptomes poden no manifestar-se en molts anys. Tot i les diferències entre les taxes d'incidència de cada malaltia, generalment aquestes afecten a adults de més de 50 anys. Degut a l'envelliment de la població, es preveu que la incidència i la prevalença d'aquestes malalties augmentarà progressivament els pròxims anys, fent d'aquestes neoplàsies un greu problema pels sistemes sanitaris dels països desenvolupats d'arreu del món.

1.1 Leucèmia Mieloide Crònica

Les millores que Robert Hook i Anton van Leeuwenhoek van aplicar als microscopis durant el segle disset van ser indispensables per a poder descriure per primera vegada els glòbuls blancs i vermells.^{1,2} Tot i això, no va ser fins a l'any 1829 que Velpeau va presentar la primera descripció d'un cas de leucèmia utilitzant aquesta innovació. El pacient en qüestió, *monsieur Vernis*, era un florista parisenc de 63 anys, que es queixava de febre, debilitat i distensió abdominal. A la seva mort, uns pocs dies després del seu ingrés a l'hospital, Velpeau va realitzar l'autòpsia i va trobar que la melsa havia crescut fins a arribar a pesar 4,5 kg. A més, va descriure que la sang era extremadament espessa, de consistència "semblant a la d'un puré" i, utilitzant el microscopi, va observar que aquesta presentava nombrosos "glòbuls de pus".³ L'any 1869, quan el patòleg Ernst C. Neumann estudiava fragments d'os amb microscopi, va demostrar que l'hematopoesi tenia lloc a la medul·la òssia i va postular que les cèl·lules de la sang s'originaven d'una precursora comuna a la qual va denominar cèl·lula mare.

INTRODUCCIÓ

A més, Neumann va proposar que a part de les leucèmies limfàtiques proposades per patòlegs de l'època, n'hi havia una originada a la medul·la òssia, la qual va denominar Leucèmia Mieloide.^{4,5}

La Leucèmia Mieloide Crònica (CML) és un càncer hematològic amb una incidència d'entre 1-2 casos per cada 100.000 individus, representant un 10-15% del total de leucèmies en individus adults. Pot aparèixer a qualsevol edat, però la mitja de diagnòstic se situa al voltant dels 50 anys, amb un lleuger predomini en homes.

La CML es caracteritza per la fusió del gen *Abelson murine leukemia (ABL1)* situat al cromosoma 9, amb el gen *breakpoint cluster region (BCR)* del cromosoma 22 en una cèl·lula mare hematopoètica. Aquesta anormalitat cromosòmica es va anomenar cromosoma Philadelphia (Ph),⁶ assignant-li el nom de la ciutat on es trobaven els dos centres de recerca que ho van descriure. El resultat d'aquesta translocació recíproca és l'expressió d'una onco-proteïna anomenada BCR-ABL1.⁷ Aquesta és una proteïna constitutivament activa en forma de tirosina cinasa, que a través de la fosforilació i activació de diferents vies de senyalització, com RAS, RAF, JUN cinasa, MYC i STAT,⁸⁻¹⁰ promou el creixement i la replicació, així com alteracions en l'adhesió cel·lular i la inhibició de l'apoptosi (**Figura 1**).

1.1.1 Diagnòstic i progressió

Actualment, la meitat dels pacients són asimptomàtics quan els detecten CML. La malaltia sovint es diagnostica després d'una analítica de rutina, amb la detecció del cromosoma Ph, durant la primera fase o fase crònica (FC). Els símptomes més comuns en FC, quan n'hi ha, són resultants de l'anèmia i de l'esplenomegàlia. Aquests inclouen fatiga, pèrdua de pes, anorèxia o dolor. Altres manifestacions menys comunes inclouen sagnat (relacionat amb el baix recompte de plaquetes o la disfunció d'aquestes), trombosi (associat a la trombocitosi o a una marcada leucocitosis), artritis gotosa i altres. Aquests símptomes són fàcilment controlables amb l'administració de diferents agents terapèutics, permetent que els malalts portin una vida pràcticament normal.

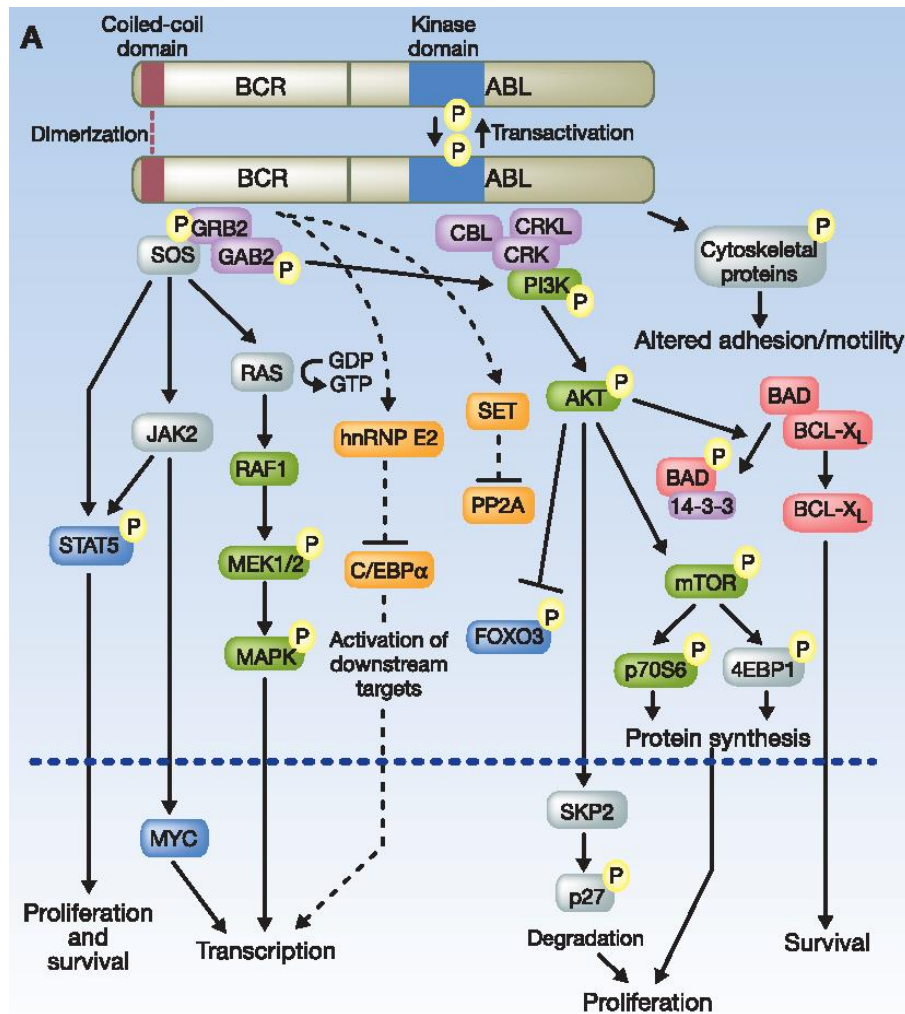


Figura 1. Vies de senyalització que s'activen a causa de l'activitat BCR-ABL1 en CML. La fosforilació descontrolada provoca l'activació de múltiples vies, augmentant la supervivència cel·lular, la inhibició de l'apoptosi, la pertorbació de l'adhesió cel·lular i la migració. Obtinguda de O'Hare et al., 2011.¹¹

L'evolució natural de malaltia, al cap d'un període d'entre 3 i 6 anys, consisteix a passar a les fases següents. Aquestes són: la fase accelerada (FA), que rarament sobrepasa l'any de duració, i la fase blàstica o crisi de blast (FB). La majoria dels pacients evolucionen cap a FA abans d'arribar a la FB, tot i que un 20% no arriben a passar per una FA i deriven directament a FB (**Figura 2**). Els pacients amb CML-FA presenten anèmia més severa, esplenomegàlia i infiltració en diferents òrgans. Finalment, CML-FB es presenta com una leucèmia aguda, amb símptomes més greus, sagnat, febre, infeccions, dolors ossis i un creixement progressiu de la melsa tot i el tractament.

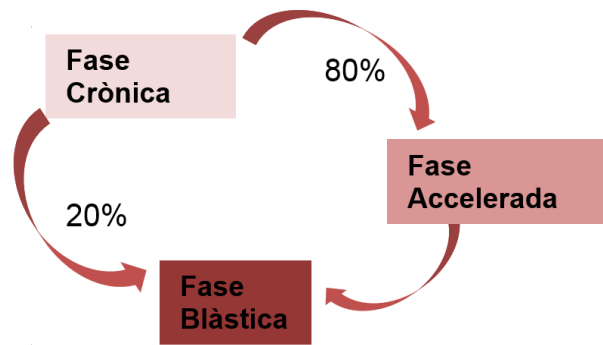


Figura 2. Probabilitat d'evolució per fases de CML. La gran majoria de pacients són diagnosticats en un examen rutinari, sense presentar símptomes, a la Fase Crònica. Sense tractament, el 80% d'aquests avancen cap a la Fase Accelerada i finalment cap a la Fase Blàstica. El 20% restant passa de la Fase Crònica a la Blàstica directament. Font: Elaboració pròpia.

En CML, com en altres neoplàsies, la resposta immunològica contra l'afectació es veu deteriorada. En pacients diagnosticats de CML, les cèl·lules citotòxiques del sistema innat són disfuncionals. Per exemple, Chen *et al.*,¹² van observar com els pacients recentment diagnosticats tenien una proporció de cèl·lules NK molt baixa i que funcionalment també es trobaven deteriorades. La regulació de l'activació del sistema immune també es troba alterat en CML, el grup de Bachy *et al.*,¹³ han demostrat que les cèl·lules T reguladores es troben augmentades en pacients amb CML d'alt risc, comparat amb pacients de baix risc.

1.1.2 Tractaments

Quimioteràpia i immunoteràpia

Fins a principis dels anys vuitanta, la teràpia per combatre la CML estava basada en fàrmacs com el busulfan o la hidroxurea, els quals tenien un efecte quasi negligible en el curs natural de la malaltia. Talpaz *et al.*^{14,15} van dur a terme el primer estudi clínic utilitzant interferó alfa (IFN α) parcialment pur per gestionar la CML. El descobriment principal va ser que IFN α induïx una resposta citogenètica, més duradora i reproduïble que la que induïa fins llavors la quimioteràpia. Tot i que al principi es va estudiar utilitzant la forma parcialment pura d'IFN α , les formes recombinades (α 2a o α 2b) van arribar a ser dominants en els estudis clínics, utilitzant la mateixa dosi que s'havia emprat amb IFN α pur (2-5 MU/m² diaris). Les formes recombinants tenien respostes similars que les observades amb el

producte purificat.^{16,17} La ràtio de supervivència a 5 anys va augmentar d'un 29-44% utilitzant quimioteràpia, fins a un 50-59% amb l'IFN α .¹⁸⁻²⁰

Imatinib

A principis dels anys noranta es va descobrir que l'activitat constitutiva de BCR-ABL1 estava relacionada amb la patogènesi de la CML. Aquest descobriment va esperonar el desenvolupament de la teràpia molecular amb imatinib, un inhibidor de la tirosina cinasa (ITC), que va demostrar poder eliminar selectivament les cèl·lules que expressen la proteïna BCR-ABL.²¹ L'imatinib actua via inhibició competitiva col·locant-se al lloc d'unió de l'ATP a l'oncoproteïna BCR-ABL1, per la qual cosa s'inhibeix la fosforilació de proteïnes involucrades en el senyal de traducció cel·lular (**Figura 3**). Es van dur a terme investigacions per comparar els efectes de rebre Imatinib amb els efectes d'INF α combinat amb citarabina i es va demostrar que els resultats en pacients que havien rebut imatinib eren significativament millors que aquells tractats amb INF α , a part de ser també molt més prolongats.^{22,23}

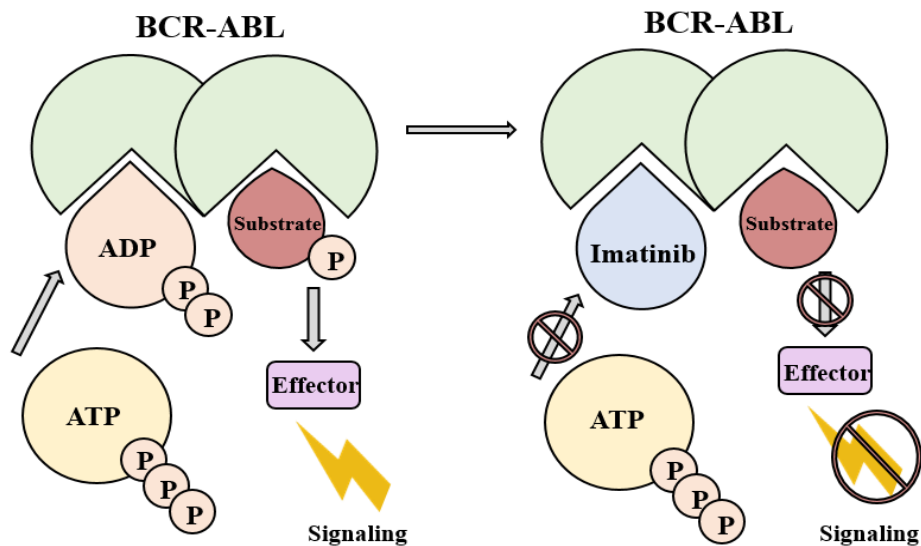


Figura 3. Via d'actuació de l'inhibidor de tirosin cinasa imatinib. La molècula inhibidora es col·loca al lloc d'unió de BCR-ABL1 amb l'ATP, evitant així la fosforilació que inicia la cascada de senyalització posterior. Font: Elaboració pròpia.

INTRODUCCIÓ

Tot i els bons resultats obtinguts, un alt nombre de persones no van respondre al tractament o van resultar intolerants al fàrmac. La major part dels efectes secundaris no-hematològics provocats per l'imatinib es troben relacionats amb problemes gastrointestinals, edema, erupcions cutànies i molèsties musculoesquelètiques. Més rarament pot associar-se també amb un potencial dany renal irreversible i també una disminució de la filtració glomerular i dels nivells d'hemoglobina, tot i que aquests dos últims efectes poden millorar després de la discontinuació del tractament.²⁴⁻²⁶ Poc després de l'aparició de l'imatinib pel tractament de la CML, es va fer palès com les cèl·lules positives pel cromosoma Philadelphia podien evolucionar per eludir la inhibició del tractament. Des d'aquells primers casos de pacients resistents, s'han pogut identificar diferents mutacions en el domini cinasa de la proteïna BCR-ABL1,²⁷⁻²⁹ que anul·len la unió amb l'imatinib.^{30,31} Per aquest motiu, es va començar a treballar la segona generació de ITCs per intentar tractar efectivament aquests pacients que no presentaven resposta o n'eren intolerants.

ITCs de segona generació

En cinc anys, aproximadament, la meitat dels pacients amb CML tractats amb imatinib han de deixar el tractament, sigui per resistència o per intolerància.^{32,33} Tant el dasatinib, com el nilotinib i el bosutinib van ser aprovats per ser utilitzats en pacients intolerants o resistents a l'imatinib, el que s'anomena un tractament de segona línia. El bosutinib, però, es va aprovar només per l'ús en aquells pacients els quals el dasatinib i el nilotinib no són considerats com a opcions adequades.³⁴ Gràcies a una inhibició més potent de la cinasa BCR-ABL, aquests ITC van ser també aprovats per ser utilitzats com a tractaments de CML de primera línia.²² Tots tres tractaments de segona generació han demostrat presentar respostes similars. Com que la causa de resistència a aquest tipus de tractament són els tipus de mutacions de la cinasa BCR-ABL i diferents tipus de mutacions presenten diferents sensibilitats als tractaments de segona generació, s'ha de tenir en compte quin tipus de BCR-ABL presenta cada pacient per tal d'escollir la millor opció en pacients resistents a l'imatinib.³⁴ A més, igual que amb l'imatinib, aquests tractaments presenten efectes secundaris que poden provocar el canvi d'un tractament per un altre.

En el cas del **dasatinib**, un 30% dels pacients desenvolupen efusió pleural, una complicació que normalment es gestiona fàcilment mitjançant interrupcions

temporals del tractament o amb dosis baixes d'esteroides.³⁵ En el cas de pacients que presentin risc de patir efusions pleurals es poden tenir en compte diferents estratègies, com ara la disminució de la dosi diària o aturar el tractament durant el cap de setmana.^{36,37}

El tractament amb **nilotinib** s'ha associat amb una major incidència de complicacions cardiovasculars, comparat amb aquells pacients tractats amb imatinib.³⁸ També s'ha descrit un augment dels nivells de glucosa i colesterol en plasma, tot i que no s'ha documentat un augment de casos de diabetis mellitus ni síndrome metabòlic.³⁹ Conseqüentment, els experts recomanen, sempre que sigui possible, no tractar amb nilotinib els pacients de CML amb un perfil d'alt risc cardiovascular.⁴⁰

L'efecte secundari més comú relacionat amb **bosutinib** és la diarrea, que es pot gestionar correctament amb interrupcions o disminucions del tractament.^{41,42} Tot i que l'efusió pleural és una complicació poc comú entre els pacients tractats amb bosutinib, aquells que han presentat aquesta complicació quan eren tractats amb dasatinib n'han tornat a presentar amb aquest ITC. Finalment, també s'ha observat una disminució del filtrat glomerular en aquells pacients amb una exposició prolongada a aquest tractament.

Actualment, les guies de pràctica clínica recomanen qualsevol dels ITC com a bona opció terapèutica pel tractament inicial contra la CML en fase crònica.⁴³ Els anomenats tradicionalment ITC de segona generació produeixen una ràtio més alta de respostes òptimes, però no tenen cap impacte en la supervivència a llarg termini a causa dels efectes tòxics que presenten. En pacients amb risc de desenvolupar efusions pleurals, amb històries clíniques de malalties pulmonars, cardíques o amb hipertensió descontrolada, el dasatinib ha de ser descartat.⁴⁴ D'altra banda, el nilotinib ha estat associat amb hiperglucèmia, per la qual cosa ha de ser descartat en aquells pacients que presentin diabetis descontrolada o història de pancreatitis.^{45,46}

Finalment, l'edat del pacient pren un paper important respecte al triatge. Els pacients de menys de 50 anys s'espera que visquin 30 anys més, per la qual cosa induir una remissió durable pot dur a una futura suspensió del tractament, la qual tractarem en més detall més endavant. Aquest aspecte, en pacients de més edat té menys importància, ja que la supervivència esperada és més curta i la suspensió de la teràpia menys rellevant.

1.1.3 Monitoratge

L'objectiu dels tractaments per CML és que el nombre de leucòcits i plaquetes en sang torni a la normalitat, que es redueixi i s'elimini la presència de cèl·lules que presentin el cromosoma Ph i que es redueixi o s'elimini l'expressió del gen *BCR-ABL1*. Per avaluar aquests canvis produïts en resposta al tractament, s'han de fer anàlisis hematològiques, citogenètiques i, cada cop més, moleculars.

Una resposta hematològica completa (CHR) s'aconsegueix quan els valors del recompte cel·lular tornen a nivells normals. És a dir, per arribar a presentar una CHR, el nombre de glòbuls blancs ha de ser $<10000 / \text{mm}^3$, el nombre de plaquetes $<450000/\text{mm}^3$, la presència de mielòcits més metamielòcits ha de ser $<5\%$, la de basòfils $<20\%$, hi ha d'haver absència de blasts i de promielòcits en sang perifèrica i, finalment, absència d'afectació extramedul·lar.^{47,48} Gairebé tots els pacients en CML-FC arriben a CHR utilitzant els nous tractaments.

Les anàlisis citogenètiques segueixen sent el tractament de monitoratge estàndard per CML. Les anàlisis convencionals requereixen una mostra de medul·la òssia per l'avaluació de <20 metafases. Els resultats d'aquestes proves es divideixen en categories segons el percentatge de metafases Ph⁺ trobades. S'entén com a Resposta Citogenètica Mínima (MiCyR) d'entre 36% a 95% de metafases de Ph⁺; Resposta Citogenètica Parcial (PCyR) d'entre 1% i 35% de metafases Ph⁺, Resposta Citogenètica Major (MCyR) des de 0% a 35% de metafases Ph⁺, i Resposta Citogenètica Completa (CCyR) amb 0% de metafases Ph⁺. La majoria (83%) dels pacients amb CML tractada amb teràpies ITC arriben a una CCyR (eliminació del cromosoma Ph a les metafases de la medul·la òssia), per la qual cosa són necessàries tècniques més sensibles per detectar la malaltia mínima residual.⁴⁹

El monitoratge molecular es du a terme normalment mitjançant una PCR quantitativa en temps real (RQ-PCR), una tècnica senzilla que pot utilitzar mostres de sang perifèrica i que és més sensible que els mètodes citogenètics convencionals.⁵⁰ En aquesta tesi doctoral, el monitoratge dels pacients amb CML s'ha dut a terme utilitzant tècniques moleculars, per la qual cosa tractarem fonamentalment amb els següents tipus de resposta. El primer nivell de resposta a molecular és la **Resposta Molecular Major (MMR/MR3.0)**, que correspon a 3-log de reducció del transcrit BCR-ABL1 en relació amb una línia de base estandarditzada ($\text{BCR-ABL1} \leq 0.1\%$). També s'han definit nivells de resposta

molecular més profunds, com l'anomenada **Resposta Molecular Profunda** (DMR), anomenada també MR4.0, quan indica una reducció ≥ 4 -log (BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$); MR4.5 quan indica $\geq 4,5$ -log de reducció (BCR-ABL1 $\leq 0,0032\%$); i MR5.0 on la reducció és de ≥ 5 -log (BCR-ABL1 $\leq 0,001\%$).⁵¹ S'ha relacionat una major supervivència i millor pronòstic en aquells pacients que arriben a un MMR. També aquells que obtenen una **Resposta Molecular Primerenca** (EMR), la qual es determina per obtenir una BCR-ABL1 $\leq 10\%$ durant els primers tres mesos de tractament.^{52,53}

1.1.4 Discontinuació del tractament

Diferents estudis han avaluat la seguretat de discontinuació del tractament en aquells pacients que han aconseguit mantenir-se a llarg termini en MR5.0. En aquests estudis, aquells pacients tractats amb imatinib i que s'havien mantingut en MR5.0 per més de dos anys van discontinuar la teràpia i van ser estudiats prospectivament. Aproximadament, la meitat dels pacients van experimentar recaiguda abans dels sis mesos de la discontinuació, i l'altra meitat van ser considerats en remissió lliure de tractament (TFR) de moment. En reprendre el tractament, la majoria van tornar a arribar a MR5.0, i als que no, els van disminuir notablement els nivells de BCR-ABL1 detectables. En tots els casos, els pacients seguien sent sensibles al tractament.^{54,55}

S'ha demostrat també com amb l'ús d'ITC de segona generació es poden obtenir ràtios més altes de TFR que les que s'aconsegueixen amb l'imatinib, degut a respostes moleculars més sostingudes.^{56,57} Aquestes ràtios més elevades suggereixen que els pacients més joves, que poden beneficiar-se de la discontinuació del tractament, siguin tractats amb ITC de segona generació com a teràpia de primera línia. A llarg termini, el nombre de pacients que es mantenen en TFR varia entre un 15% amb imatinib i un 25%-30% amb ITC de segona generació. Tot i l'increment de velocitat en l'obtenció de MR5.0 en aquells pacients tractats amb segona generació, el manteniment i obtenció global d'aquesta és similar a la d'imatinib, i a més, l'ús d'aquests tractaments augmenta significativament el cost.^{58,59}

2. PAPER DE LES CÈL·LULES NK AL SISTEMA IMMUNITARI

S'entén com sistema immunitari aquell conjunt de mecanismes d'un organisme que el protegeixen enfront de qualsevol agressió (generalment externa). La resposta immunitària pot ser de tipus inespecífic o innat i específic o adquirit.⁶⁰

La resposta immunitària inespecífica o innata és la primera línia de defensa de l'organisme i no necessita sensibilització prèvia. Consisteix en una sèrie d'elements moleculars i cel·lulars que no presenten capacitat de reconeixement específic, responen als patògens de manera genèrica.

La resposta immunitària adquirida és específica i requereix el reconeixement d'antígens externs durant el procés anomenat presentació d'antigen. En aquesta resposta, participen principalment els limfòcits i les molècules que aquests alliberen, com anticossos i citoquines. Les cèl·lules NK van ser originàriament descrites com limfòcits amb un gran nombre de grànuls i una citotoxicitat natural contra les cèl·lules tumorals, sense necessitat de sensibilització prèvia. Es van descobrir accidentalment als anys 70, quan immunòlegs mesuraven l'activitat *in vitro* d'unes cèl·lules específiques contra tumors obtingudes de ratolins. En aquest experiment, els controls negatius no sensibilitzats també van patir una lisis considerable de les cèl·lules tumorals. La caracterització d'aquesta destrucció inespecífica de les cèl·lules tumorals va revelar una nova població de limfòcits desconeguda fins aleshores.⁶¹ Més tard, es va esbrinar que pertanyien a un llinatge limfocitari que presentava com a funcions efectores la citotoxicitat i la producció de citoquines.⁶² Les cèl·lules NK, doncs, no presenten un sistema específic de detecció d'antigen com el que podem trobar en les cèl·lules T i B. Aquestes cèl·lules expressen una sèrie de receptors activadors i inhibidors que proveeixen uns senyals, el balanç dels quals regula l'activació o la inhibició de les cèl·lules NK. D'aquests receptors, uns quants reconeixen específicament el Complex d'Histocompatibilitat Principal (MHC) de classe I propi, que es troba present en la membrana de la major part de les cèl·lules nucleades.

Existeixen dues teories que, conjuntament, pretenen explicar com funciona l'activitat de les cèl·lules NK, conegudes com a teoria de *missing self* i *induced self*^{63,64}. **La teoria *missing self***, explica que les cèl·lules NK ataquen les cèl·lules diana que presenten baixa densitat de MHC de classe I en superfície. Com que MHC-I és lligand dels receptors inhibidors majoritàriament, aquests no s'activen i

no impedeixen l'atac de la cèl·lula NK. Per tant, quan MHC-I es troba expressat en la densitat adequada a la superfície de les cèl·lules, l'activació de la NK s'inhibeix, i aquesta no actua. D'altra banda, **la teoria *induced self*** explica com les NK són capaces de reconèixer certes molècules que s'expressen específicament en la superfície d'aquelles cèl·lules que es troben patint estrès cel·lular a causa de transformació tumoral o infecció vírica. Aquestes molècules, com poden ser MICA i MICB, són lligands de receptors activadors de les NK, com ara el receptor activador NKG2D, i que per tant, quan aquests les detecten, l'equilibri de senyals es desplaça cap a l'activació, i la cèl·lula NK elimina la cèl·lula diana alliberant grànuls carregats amb perforina, que crea porus a la membrana i granzims, que amb l'ajuda de la primera acaben produint l'apoptosi de la cèl·lula tumoral (**Figura 4**).

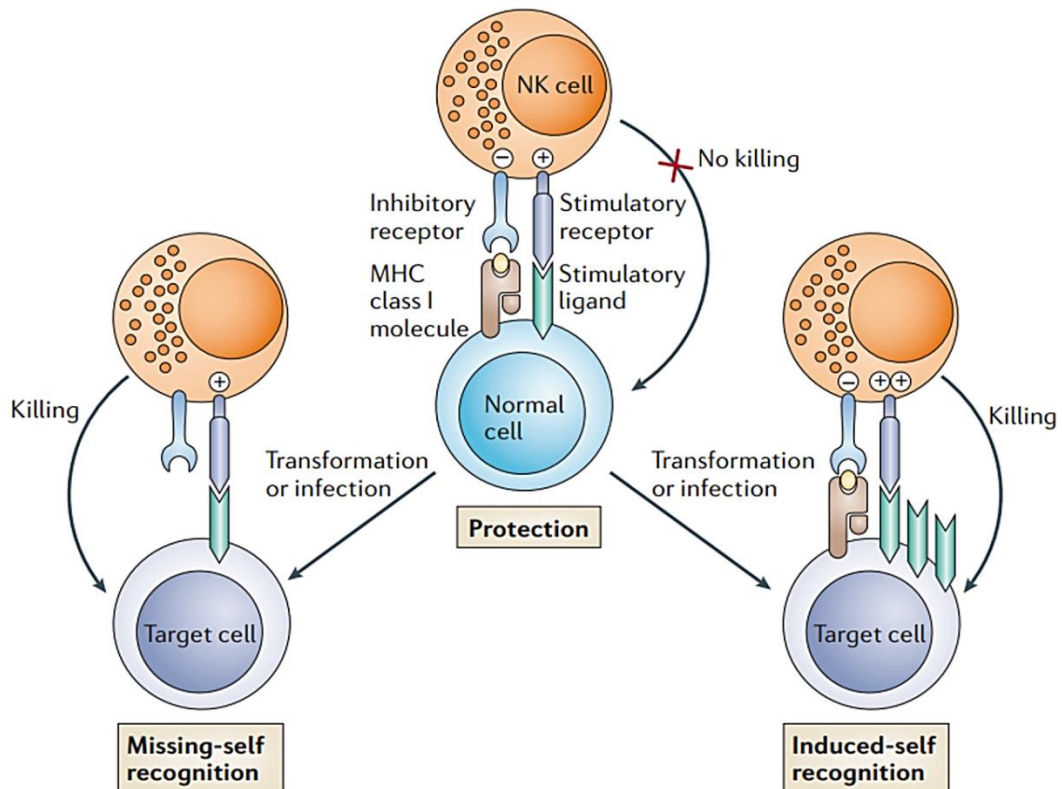


Figura 4. Mecanisme d'acció de les cèl·lules NK. Quan els receptors inhibidors de les cèl·lules NK detecten pocs lligands en la superfície de la cèl·lula diana, inhibeixen l'atac cel·lular (missing-self recognition). Quan augmenten en nombre els lligands de receptors activadors de les cèl·lules NK a la superfície de la cèl·lula diana, el senyal d'actuació es decanta cap a l'activació de la NK, que eliminarà la cèl·lula transformada o infectada (Induced-self recognition). Obtinguda de Raulet & Vance, 2006.⁶⁵

INTRODUCCIÓ

En concordança amb la seva funció de sentinelles innats, les NK es troben defensant tant teixits limfoides com no limfoides. En la majoria dels teixits, les NK representen una fracció menor del total de limfòcits (18% en sang perifèrica).⁶⁶ En humans, les cèl·lules NK poden dividir-se en CD56^{bright} i CD56^{dim}, les quals difereixen pel que fa a diverses propietats. Durant el procés de maduració cel·lular, les NK CD56^{bright} (immadures) presenten els receptors CD56, NKG2A i NCR, que van disminuint en densitat a la superfície cel·lular al llarg del temps. Mentrestant, les molècules CD16, CD57, KIR i LIR-1 van augmentant la seva densitat en superfície durant la maduració, fins que la cèl·lula s'acaba convertint en NK CD56^{dim} (**Figura 5**). Aproximadament el 90% de les NK en sang perifèrica i melsa són CD56^{dim}. Aquestes cèl·lules madures són citotòxiques i a part d'alliberar grànuls amb enzims lítics, també produeixen IFN- γ quan interaccionen amb cèl·lules tumorals.⁶⁷ D'altra banda, la majoria de les cèl·lules NK que es troben a nòduls limfàtics i amígdales són CD56^{bright}. Aquestes són menys citotòxiques i produeixen citoquines en resposta a les interleucines IL-12, IL-15 i IL-18.⁶⁸ La intensitat de les respostes de les NK depenen del nombre de citoquines presents al microambient, així com de les interaccions amb altres cèl·lules del sistema immunitari, com les cèl·lules T, les cèl·lules dendrítiques i els macròfags. L'interferó de tipus I, IL-2, IL-12, IL-18 i IL-15 són potents activadors de les funcions efectores de les NK i promouen la seva proliferació, citotoxicitat i secreció de citoquines.^{62,69}

El receptor CD16, que es troba expressat en més abundància a les cèl·lules NK CD56^{dim}, és l'únic capaç de desencadenar l'activació de la cèl·lula per si mateix.⁷⁰ **La citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos (ADCC)** es desencadena després del reconeixement d'anticossos per part de CD16. De fet, s'ha demostrat que les cèl·lules NK també formen part de l'efecte clínic dels anticossos terapèutics (com el rituximab o el trastuzumab) a l'hora de reconèixer i neutralitzar tumors associats a antigen.^{71,72} També s'ha descrit que els pacients amb el genotip CD16A158 V/V presenten una més alta afinitat per IgG.⁷³ A més, s'ha observat un augment en la infiltració de les NK en el tumor després de tractaments com trastuzumab. L'ADCC es troba limitada per l'esgotament de les cèl·lules NK i per la pèrdua de funció de CD16 induïda per l'activació continuada.^{74,75}

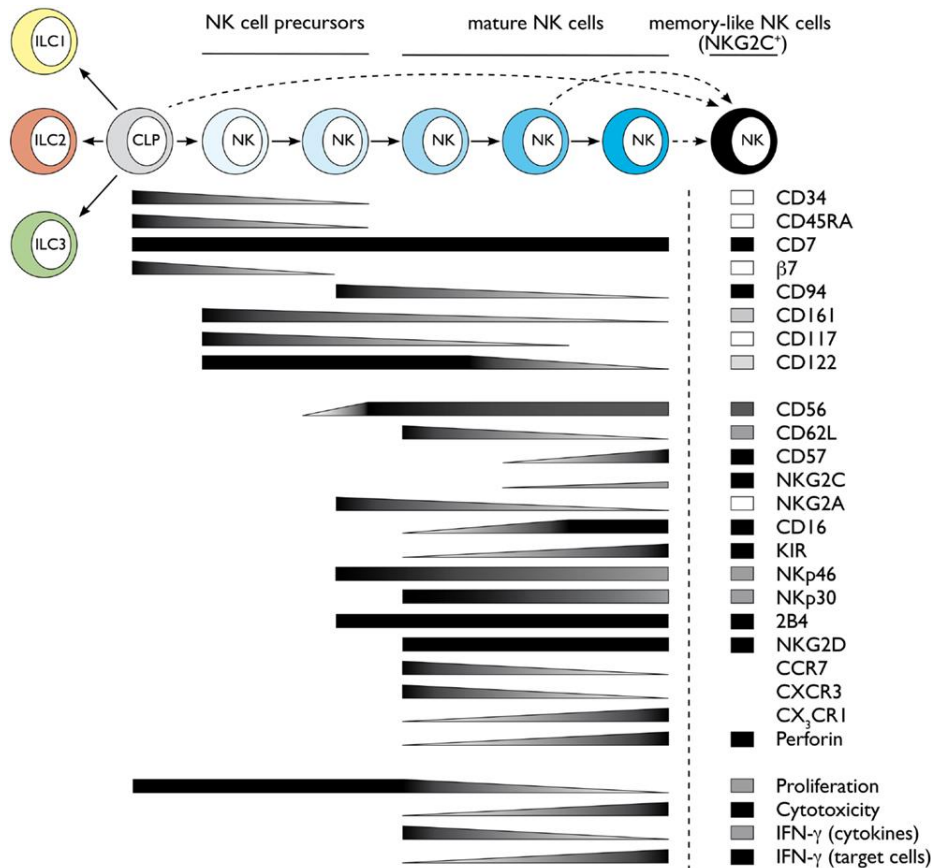


Figura 5. Adquisició i pèrdua de marcadors de superfície durant el desenvolupament de la cèl·lula NK humana. Els nivells d'expressió de proteïna s'indiquen en negre per alta expressió, blanc per zero expressió i gris per nivells intermedis. Obtinguda de Luetke-Eversloh et al., 2013.⁷⁶

2.1 Receptors de les cèl·lules NK

2.1.1 Receptor NKG2D

Un dels avenços més remarcables i que han fet ampliar la noció que tenim sobre la immuno-vigilància de les cèl·lules NK vers el càncer, ha estat el descobriment del receptor activador NKG2D (*Natural-killer group 2, member D*) i dels seus lligands MIC (*MHC I chain-related molecule*), expressats en cèl·lules humanes tumorals.^{77,78} Inicialment, NKG2D va ser identificat a la superfície de les NK com un receptor activador propi d'aquestes cèl·lules.⁷⁹ Més tard, però, també es va descriure la seva presència a la superfície de totes les cèl·lules T CD8⁺ i en alguns subtipus de T γδ.^{80,81}

INTRODUCCIÓ

El gen que codifica per NKG2D és *KLRK1*, que es troba a 12p13.2 flanquejat centromèricament per *KLRD1* (CD94) i telomèricament per *KLRC4* (NKG2F). Imai *et al*,⁸² van observar, en un estudi que va durar més d'una dècada, com la incidència de càncer era significativament menor en individus que presentaven limfòcits amb alta activitat citotòxica comparant-ho amb aquells que presentaven baixa activitat. Amb el temps, altres estudis van demostrar que aquesta diferència en l'activitat citotòxica de les NK estava associada amb variants genètiques específiques de NKG2D.⁸³ Els autors van determinar que l'haplotip que van anomenar HNK (High NK) es trobava relacionat amb un menor risc de desenvolupar càncer i que, per altra banda, l'haplotip anomenat LNK (Low NK) es correlacionava amb un major risc.⁸³ L'SNP (Polimorfisme de Nucleòtids Simples) rs1049174, localitzat a la regió 3'UTR del gen (**Figura 6**), permet diferenciar ambdós haplotips.

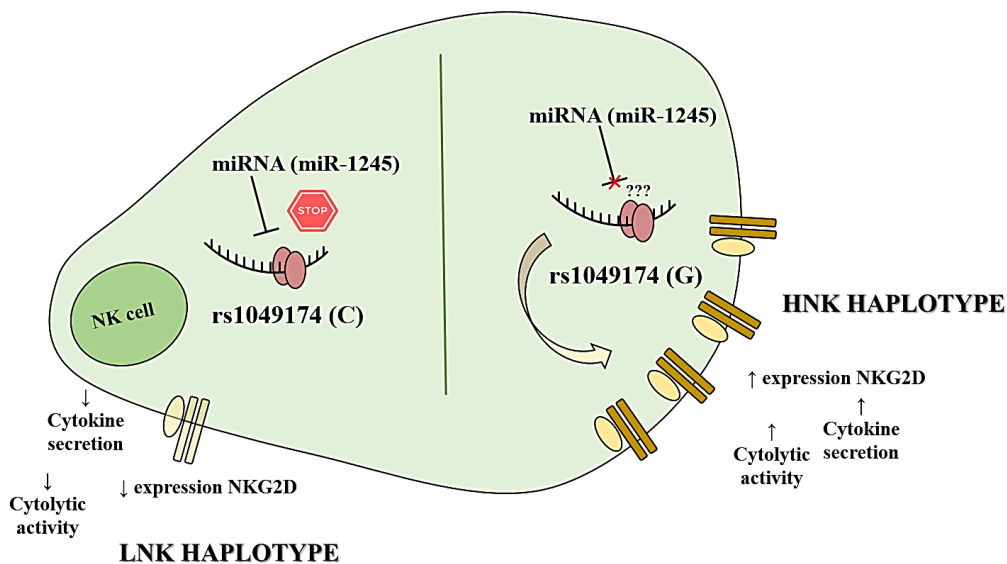


Figura 6. Mecanisme mitjançant el qual el miRNA-1245 disminueix o no l'expressió en membrana del receptor activador NKG2D segons la variant rs1049174, diferenciant els dos haplotips. Font: Elaboració pròpia.

Si bé *KLRK1* és limitadament polimòrfic, el receptor que codifica, NKG2D, reconeix un divers ventall de lligands que codifiquen per nombrosos gens molt polimòrfics. Els lligands de NKG2D rarament es troben expressats en teixits sans, són induïts principalment en cèl·lules infectades amb bacteris intracel·lulars i virus i també en cèl·lules tumorals de diferents classes (**Figura 7**).^{84,85} En humans, NKG2D reconeix les proteïnes codificades pels locus *MICA* i *MICB*, localitzats al MHC al

cromosoma 6, prop del locus *HLA-B* (Antigen Leucocitari Humà). Actualment, ja s'han identificat més de 100 al·lels de *MICA* i més de 40 de *MICB* en diferents poblacions humanes. A més, NKG2D també reconeix molècules d'una altra família de glicoproteïnes codificades pels gens *RAET1* que es troben al cromosoma 6q24.2-25.3 i que presenten menys polimorfisme al·lèlic que els gens *MIC*.

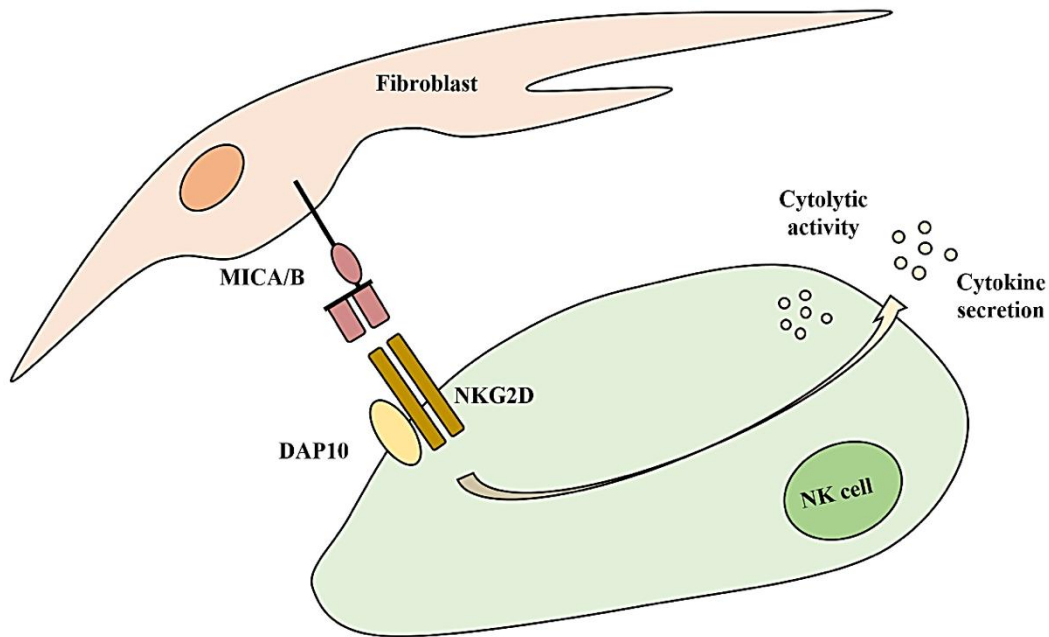


Figura 7. Funció de l'activació de la parella receptor-ligand NKG2D-MICA o MICB. Quan la cèl·lula NK, mitjançant el receptor NKG2D detecta les molècules MICA o MICB a la superfície cel·lular de la cèl·lula diana, inicia la seva activitat citolítica o la secreció de citocines. Font: Elaboració pròpia.

2.1.2 Receptors KIR

Els receptors KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), que pertanyen a la família de glicoproteïnes de transmembrana de tipus I, van ser identificats per la seva habilitat d'aportar certa especificitat a la citòlisi de les cèl·lules NK vers les cèl·lules infectades o en transformació.^{86,87} Els KIR regulen la citotoxicitat de les NK humanes mitjançant senyals activadores i inhibidores, resultat de la unió amb els seus lligands, que són, principalment, les molècules HLA de classe I i d'altres encara no coneguts.^{88,89} És per això que diferents parells de receptor-ligand generen diferents tipus d'activació, els quals estan associats a una major susceptibilitat o protecció davant d'un gran ventall de malalties, tant d'infeccioses

INTRODUCCIÓ

com també de la reproducció i càncers.⁹⁰⁻⁹² S'ha demostrat també, que el nivell de compatibilitat HLA/KIR pot determinar el nivell d'èxit en casos de trasplantament hematopoètic, quan aquest s'utilitza com a tractament per certes leucèmies.^{93,94} En els últims anys, han aparegut molts estudis caracteritzant el rol de les cèl·lules NK en la immunovigilància de la leucèmia. Les NK són la primera població cel·lular en aparèixer posttrasplantament hematopoètic, reconstruint l'activitat antiviral i antitumoral.⁹⁵ En aquest aspecte, s'ha descrit que si entre els receptors inhibidors de les cèl·lules NK del donant i HLA de classe I del receptor falta alguna parella receptor KIR inhibidor-ligand, es produeix el que s'anomena l'efecte empelt contra leucèmia (GvL), on les NK ataquen les cèl·lules canceroses del receptor. Curiosament, aquestes cèl·lules només produeixen GvL i no l'efecte empelt contra hoste (GvHD), ja que els teixits sans i no hematopoètics no presenten lligands dels receptors activadors, presents, d'altra banda, a les cèl·lules tumorals.

La característica principal d'aquests receptors, i motiu pel qual tants grups s'hi han interessat, és l'altíssim grau de polimorfisme que presenten a diferents nivells: cada individu pot presentar un nombre diferent de gens i la variació al·lèlica d'aquests se sospita que pot arribar a ser tan gran com en el cas de HLA, el seu lligand principal; a nivell transcripcional, cada clon NK pot expressar un o més receptors, seleccionats de manera estocàstica. A conseqüència d'aquest alt polimorfisme, la possibilitat que dos individus seleccionats a l'atzar presentin el mateix genotip KIR és molt baixa.

Nomenclatura dels gens KIR

Els noms assignats al gens KIR per *The Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* estan basats en l'estructura proteica que presenten. El primer dígit després de l'acrònim KIR correspon al nombre de dominis immunoglobulina de la molècula i la D que els segueix denota la paraula "domini". Aquesta pot anar seguida tant per una L de *long* que indica una cua citoplasmàtica llarga amb motius ITIM (inhibidors), o una S de *short* amb motius ITAM (activadors).⁹⁶ A més, quan dos o més gens tenen una estructura altament homòloga, se'ls distingeix per una lletra al final del nom, com és el cas de *KIR2DL5A* o *KIR2DL5B*.⁹⁷ Seguint el nom del gen, s'utilitza un asterisc abans de la designació numèrica d'al·lèls. Els primers tres dígits indiquen al·lèls que es diferencien en algun punt codificant de la seqüència. Els següents dos s'utilitzen per distingir al·lèls amb un canvi sinònim en la seqüència codificant. Finalment, els

últims dos dígits s'utilitzen per distingir al·lels que només es diferencien entre si per substitucions en regió no codificant, com ara a l'intró o al promotor (**Figura 8**).

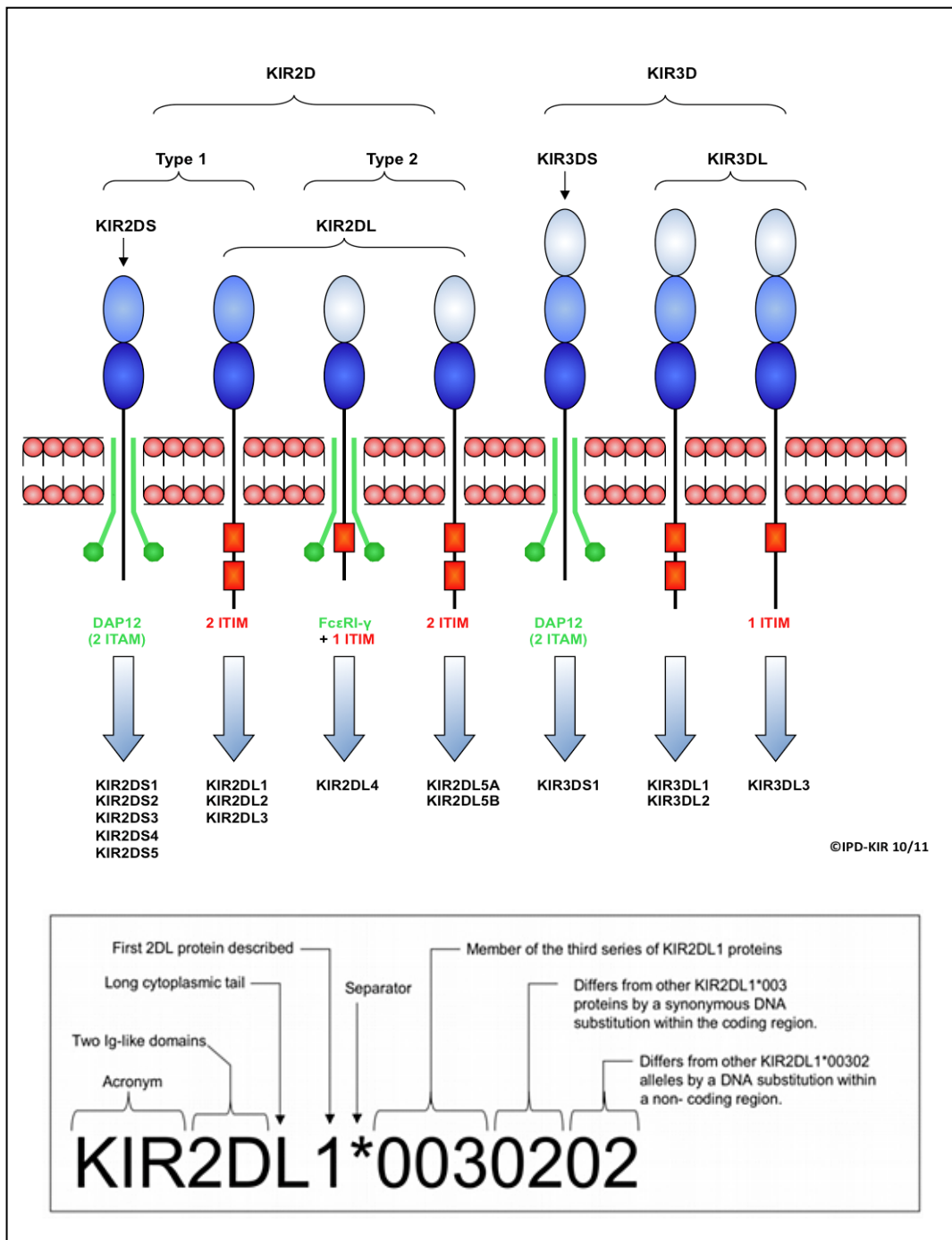


Figura 8. Nomenclatura dels gens KIR segons HUGO Genome Nomenclature Comitee. Obtinguda de la base de dades IPD-KIR.⁹⁸

Organització genètica del cluster KIR

El locus KIR, es troba al cromosoma 19q13.4, dins del *Leukocyte Receptor Complex* (LRC) i conté 15 gens KIR i dos pseudogens posicionats en tàndem al llarg d'aproximadament 150 kb.⁸⁶ Cada gen KIR té una llargada d'entre 4 i 16 kb i poden contenir d'entre 4 i 9 exons. La seqüència senyal es troba codificada en els primers dos exons, els dos o tres exons següents (depenent del gen KIR) codifiquen per dominis immunoglobulina (D0, D1 i D2), el *linker* i la regió transmembrana estan codificats pels exons 6 i 7 i, finalment, el domini citoplasmàtic es troba codificat pels dos exons finals, el 8 i el 9 (**Figura 9**).⁹⁹

Haplotips KIR

El nombre de gens i pseudogens KIR que poden expressar-se en un haplotip varia entre 9 i 16, depenent sobretot de la presència o absència dels loci activadors. Basant-se en el contingut genètic s'han definit dos haplotips (A i B) que originàriament es diferenciaven per la presència en l'haplotip B d'un fragment HindIII de 24 kb (que ara se sap que pertany a *KIR2DL5*) mitjançant una anàlisi Southern blot.

Tant l'haplotip A com B inclouen de manera constitutiva quatre gens flanquejants: *KIR3DL3*, a l'extrem centromèric, *KIR3DL2* a l'extrem telomèric i *KIR3DP1* i *KIR2DL4* al centre, delimitant la regió centromèrica i la telomèrica.⁹⁹⁻¹⁰¹ Dins d'aquestes zones el contingut KIR és variable. Aquestes variacions permeten la distinció dels dos haplotips, diferenciant-los segons el nombre i la combinació de gens KIR presents. L'haplotip A és, normalment, no variable en termes d'organització gènica i presenta els quatre gens flanquejants a més de *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* i *KIR2DP1*, dels quals només *KIR2DS4* és activador. Pel que fa a aquest gen, existeix un al·lel no funcional present en alta freqüència a la població (*KIR2DS4*^{nul}), per la qual cosa individus homozigots per l'haplotip A poden no presentar cap gen KIR activador.¹⁰² L'haplotip B conté molta més variació en nombre de gens KIR presents i està caracteritzat per la presència d'un o més *KIR2DL2*, *KIR2DL5A/B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* i *KIR3DS1*.⁸⁶ Aquest haplotip posseeix des d'un fins a cinc gens *KIR* activadors i, a més, pot incorporar gens *KIR* inhibidors que mai es troben a l'haplotip A (*KIR2DL2* i *KIR2DL5*) (**Figura 10**).¹⁰³

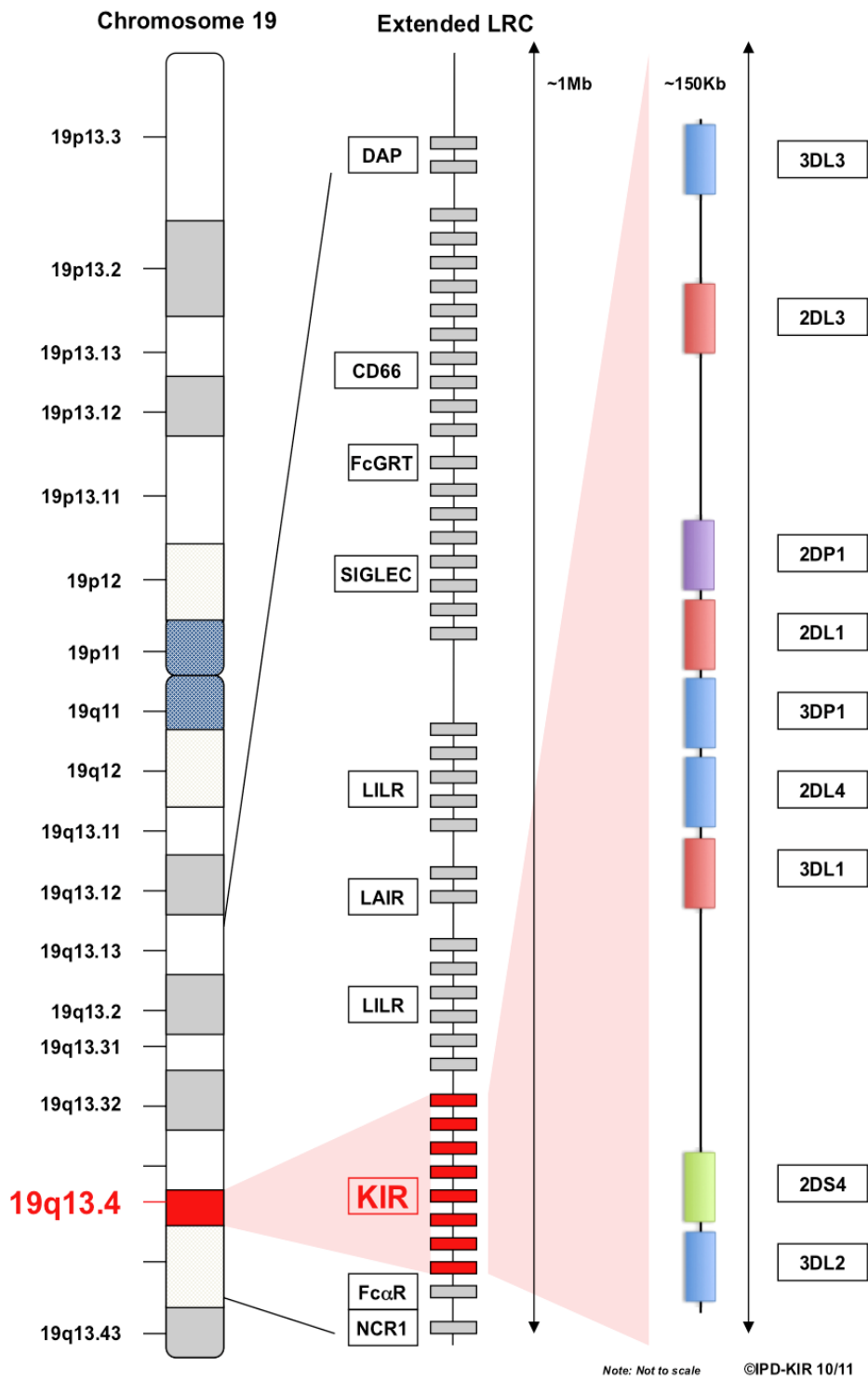


Figura 9. Organització dels gens KIR al cromosoma 19. Obtinguda de la base de dades IPD-KIR.⁹⁸

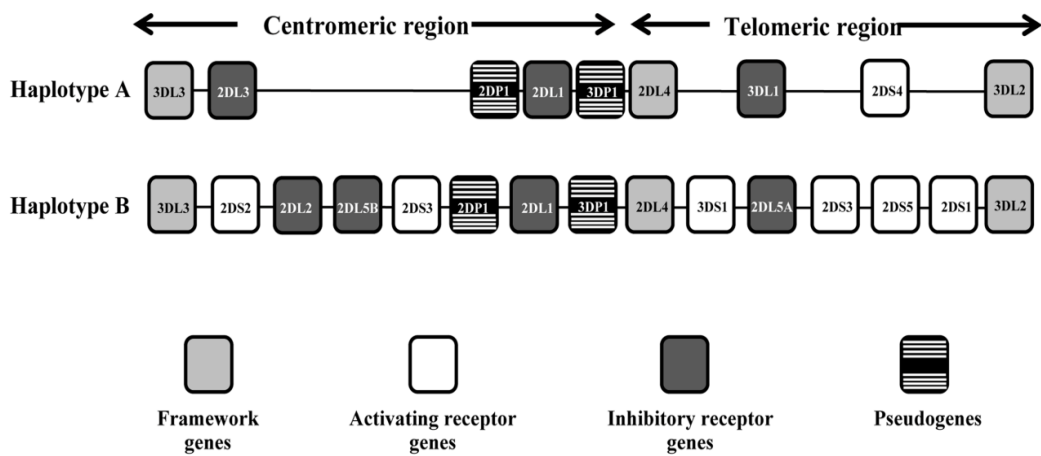


Figura 10. Representació dels haplotips KIR. L'ordre dels gens estan esquematitzats pels haplotips A i B. Font: Elaboració pròpia.

Variabilitat Al·lèlica

Les anàlisis de seqüenciació dels gens KIR han demostrat que presenten posicions altament polimòrfiques.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Els punts de variació en les seqüències poden observar-se al llarg de tot el gen, també en les posicions codificants dels residus que interaccionen amb HLA de classe I.¹⁰⁷

D'altra banda, l'elevada homologia que s'observa entre les seqüències dels diferents gens KIR i una llarga història evolutiva d'encreuaments desiguals a la regió, fa augmentar la dificultat per distingir entre al·lels d'un mateix gen i inclús de gens diferents. En un principi, per exemple, es creia que *KIR2DS4* i *KIR2DS1* eren variants al·lèliques d'un mateix locus.⁸⁶ Això no obstant, dades més recents suggereixen que representen gens diferents.⁹⁹ Tanmateix, *KIR3DL1* i *KIR3DS1* normalment ocupen la mateixa posició en els haplotips i recentment s'ha descrit que són al·lels d'un mateix gen.^{105,108} Un altre cas és *KIR2DL2*, del qual s'ha proposat que ha aparegut de la recombinació entre *KIR2DL1* i *KIR2DL3*, basant-se en l'alta similitud de les respectives seqüències.⁹⁹

2.2 Lligands dels receptors de les cèl·lules NK

2.2.1 Complex d'Histocompatibilitat Principal

Tots els mamífers estudiats fins al moment presenten el Complex d'Histocompatibilitat Principal. L'MHC humà, l'HLA, constitueix un grup de gens altament polimòrfics, els quals codifiquen per un amplíssim grup de molècules diferents. Aquestes, són crucials perquè els individus puguin adaptar-se a les agressions de l'entorn i constitueixen un dels pilars principals del sistema immunitari. Aquestes proteïnes s'expressen a la superfície cel·lular i són essencials pel reconeixement de molècules alienes. La seva funció principal és la de presentar antígens a les cèl·lules immunològiques que determinaran si aquest és propi o no i actuaran en conseqüència. El complex HLA consisteix en més de 200 gens localitzats pròxims els uns als altres en el braç curt del cromosoma 6 (6p21.3) que s'estenen en una longitud d'uns 4Mb i on podem distingir tres grups principals: HLA de classe I, HLA de classe II i HLA de classe III.

La regió on es troba HLA de classe I s'esten 1,8 Mpb i conté els loci que codifiquen per la cadena α de les tres molècules HLA de classe I clàssiques (HLA-A, -B i -C), així com les no clàssiques (HLA-E, -F i -G entre d'altres). Aquests tipus de gens presenten 8 exons, els quals corresponen amb cada domini estructural de la molècula.¹⁰⁹ Els polimorfismes d'aquests gens no es troben distribuïts a l'atzar al llarg de la seva seqüència, sinó que es troben localitzats predominantment en regions específiques, on se situen els aminoàcids que interaccionen amb els pèptids processats. Les regions de major variabilitat dels gens HLA de classe I es troben als exons 2 i 3. Pràcticament totes les cèl·lules nucleades de l'organisme expressen en superfície molècules d'HLA classe I que es troben unides a la β 2-microglobulina i presenten pèptids als limfòcits T citotòxics (CD8⁺). Aquestes molècules fixen pèptids generats a partir de la degradació de proteïnes del citosol pels proteosomes. És llavors quan el complex HLA-pèptid s'insereix a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Tot i això, HLA de classe I també pot presentar pèptids obtinguts a partir de proteïnes exògenes, en un procés anomenat Presentació Creuada, en el qual alguns tipus de cèl·lules presentadores d'antigen poden capturar mitjançant fagocitosis altres cèl·lules infectades per virus o tumorals, processar-les i presentar els seus antígens mitjançant el sistema HLA de classe I. D'aquesta manera, les cèl·lules sanes són ignorades, però les cèl·lules que presenten fragments de proteïnes estranyes per l'organisme són atacades pel

INTRODUCCIÓ

sistema immunitari. A més, una densitat concreta de HLA de classe I a membrana, exerceix una funció inhibidora de cèl·lules NK. D'aquesta manera, una reducció dels nivells normals de molècules HLA de classe I a la superfície cel·lular pot causar l'activació de les NK, les quals eliminen la cèl·lula diana, tal com s'ha explicat anteriorment amb el que es coneix com a teoria de *missing self*.

Inicialment, les molècules HLA de classe I es van caracteritzar mitjançant mètodes serològics que les agrupen segons l'aminoàcid present a la posició 80 del domini alfa-1 de l'hèlix alfa.¹¹⁰ Els receptors inhibidors KIR2DL2 i KIR2DL3, i l'activador KIR2DS2 reconeixen com a lligand el grup de molècules HLA-C1, mentre que l'activador KIR2DS1 reconeix HLA-C2. D'altra banda, alguns al·lels de *HLA-B* com també HLA-A23/-A24 i -A32 formen part del grup HLA-Bw4, reconegut pel receptor KIR3DL1.¹¹¹ A més, s'ha demostrat que proteïnes Bw4 que presenten una isoleucina a la posició 80 (Bw480I) presenten major afinitat per KIR respecte a aquelles que hi presenten una treonina a la mateixa posició (Bw480T).¹¹² Finalment, també s'ha demostrat com el receptor codificat pel gen constitutiu *KIR3DL2* detecta com a lligands les molècules HLA-A3 i HLA-A11 (**Figura 11**).¹¹³

D'altra banda, el complex HLA de classe II conté els gens clàssics *HLA-DP*, *-DQ*, i *-DR* i els no clàssics *HLA-DM* i *-DO*, que s'estenen 800 kb cap a la regió centromèrica. Aquestes molècules, a diferència de les de classe I, es troben només a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (*Antigen Presenting Cells, APC*), com les cèl·lules dendrítiques, macròfags i limfòcits B. Les molècules de classe II estan formades per una cadena α i una cadena β i se'ls denomina amb el nom del locus seguit de "A" o "B" en funció de si codifiquen per la cadena α o β respectivament. En aquest cas, els antígens que presenten deriven de proteïnes extracel·lulars que són endocitades i digerides als lisosomes per finalment migrar juntament amb la molècula HLA de classe II a la superfície cel·lular. Aquestes molècules interaccionen amb els limfòcits T helper (CD4⁺). Finalment, els gens HLA de classe III s'estenen al llarg de 730 Kb i es troben entre els dos grups anteriors. Codifiquen per proteïnes que difereixen tant en estructura com en funció amb classe I i classe II i que inclou components del complement, algunes citokines inflamatòries com *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) o també les proteïnes de xoc tèrmic (**Figura 12**).

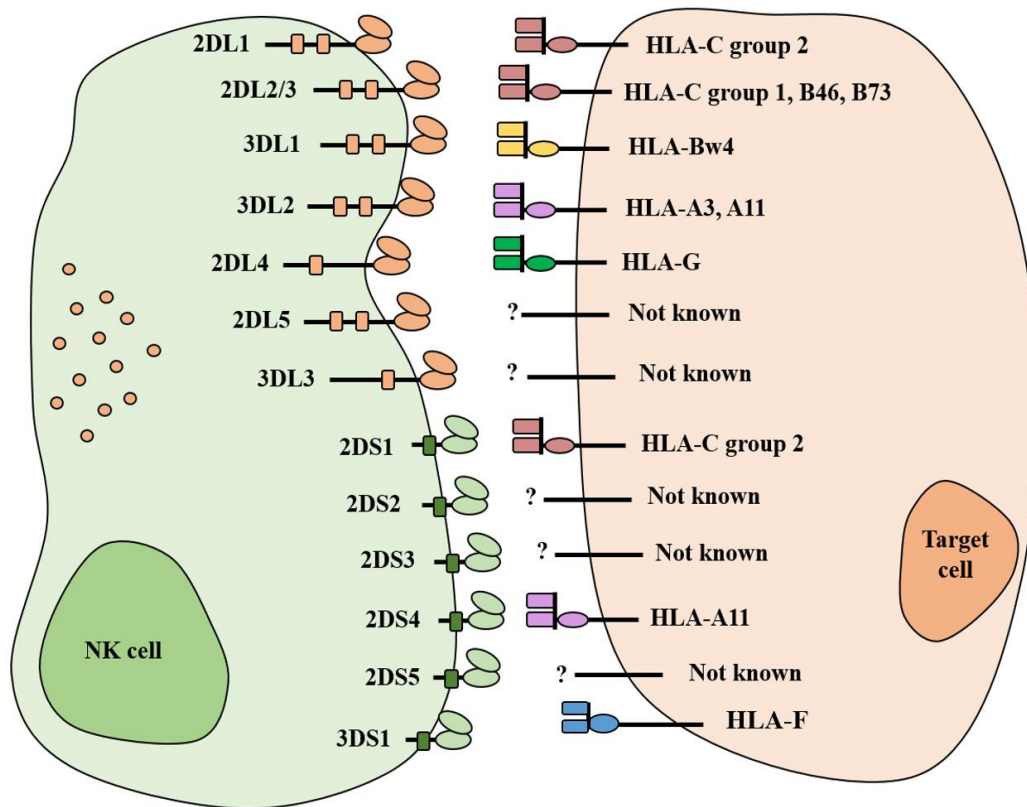


Figura 11. Esquema dels receptors KIR a la membrana de la cèl·lula NK i dels seus respectius lligands a la membrana de la cèl·lula diana. Els receptors de color taronja són els que, un cop detectin la presència del seu lligand, inhibiran l'atac de la cèl·lula NK. D'altra banda, els receptors de color verd, en detectar el seu respectiu lligand, activaran la cèl·lula NK perquè alliberi els grànuls citotòxics o les citoquines. Font: Elaboració pròpia.

2.2.2 Molècules MICA i MICB

No va ser fins a l'any 1994 quan van aparèixer els primers estudis on es descrivia un nou grup de gens de dins de MHC que van ser anomenats MHC class I chain-related (MIC).¹¹⁴ Les seqüències d'aquests gens presentaven un 30% d'homologia amb la classe I d'HLA, però amb una distribució diferent pel que fa a l'expressió als teixits, on s'expressen només com a senyal d'estrès cel·lular. A diferència d'altres HLA de classe I no clàssics, els gens *MIC* van ser descrits com a altament polimòrfics.¹¹⁵⁻¹¹⁷

Diversos estudis dels gens MHC al cromosoma 6 han identificat 7 gens del grup MIC (*MICA-MICG*), dels quals, només *MICA* i *MICB* s'expressen. Aquests dos gens es troben aproximadament a 46,4 kb i 141,2 kb centromeric de *HLA-B*, respectivament. L'anàlisi de l'organització genòmica d'aquests gens ha revelat que

INTRODUCCIÓ

la seva longitud (11,7 kb i 12,9 kb) és considerablement superior a la dels gens clàssics de classe I.

Amb el desenvolupament de les noves tècniques de seqüenciació s'han publicat diversos estudis on s'associen certs al·lels d'aquests gens amb determinades malalties. Tot i això, la major part d'aquestes associacions es relacionen amb unes repeticions de triplets en tàndem (GCT=Alanina) que es troben a l'exó 5 de *MICA*.

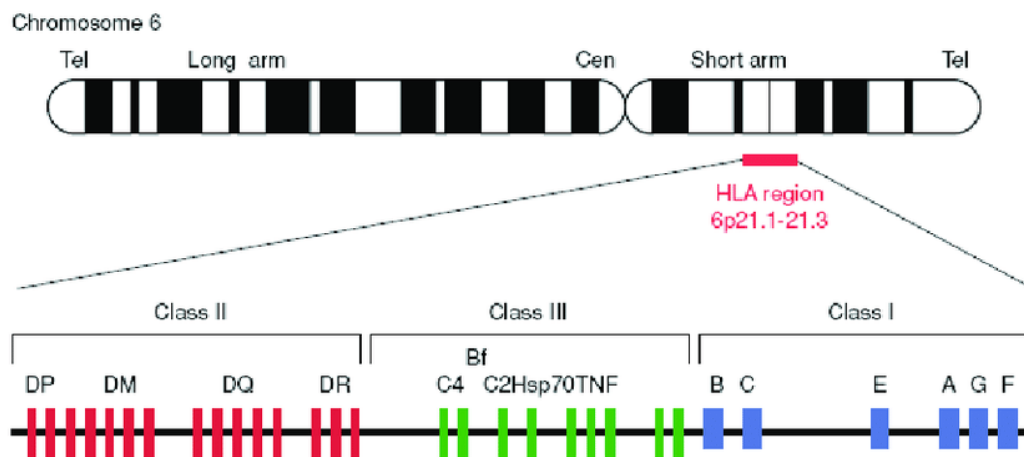


Figura 12. Esquema simplificat de la regió HLA al cromosoma 6 humà. Els gens que pertanyen a la classe II d'HLA de color vermell, els pertanyents a la classe III de color verd, i finalment els gens pertanyents al grup HLA de classe I de color blau. Obtinguda de Berlingerio et al.¹¹⁸

2.3 Cèl·lules Natural Killer en Neoplàsies Hematològiques

Ja són molts els estudis que han demostrat que les cèl·lules NK tenen la capacitat d'eliminar cèl·lules leucèmiques de llinatge mieloide. Aquestes evidències provenen principalment d'estudis que utilitzen línies cel·lulars leucèmiques i també blasts aïllats de pacients amb CML, Leucèmia Mieloide Aguda (AML) o MDS.¹¹⁹

Els primers estudis relacionats amb aquest tòpic es van dur a terme utilitzant blasts d'AML i CML, i van ser publicats uns pocs anys després del descobriment de les cèl·lules NK. En aquests estudis, els investigadors demostraven que blasts de pacients amb CML poden ser lisats utilitzant NK de donants sans i activades amb interferó.¹²⁰ Uns anys més tard, es va demostrar que en la inhibició del creixement de blasts en pacients amb AML, CML i MDS s'hi troben involucrats factors solubles produïts per les cèl·lules NK.¹²¹

La citotoxicitat que presenten les cèl·lules NK contra les cèl·lules leucèmiques es basa en les interaccions entre receptors de membrana que presenten aquestes cèl·lules i els seus respectius lligands que es troben a la superfície dels blasts. Així doncs, es va demostrar també com, bloquejant els receptors inhibidors d'aquestes cèl·lules, augmentava la capacitat de les NK d'eliminar blasts leucèmics,¹²² indicant que aquests presenten suficient HLA de classe I en membrana per inhibir parcialment les NK.

2.3.1 Nombre cel·lular alterat

L'activitat de les cèl·lules NK és inversament proporcional a la progressió d'aquests tipus de malaltia. Aquestes cèl·lules es veuen parcialment suprimides al moment del diagnòstic, recuperant nivells normals en cas de remissió i disminuïdes altra vegada en cas de recaiguda.^{123,124} En el cas de CML, el nombre de cèl·lules NK sembla que va decreixent gradualment durant la progressió de la malaltia de FC a FB, així com la seva citotoxicitat.¹²⁵ A més, s'ha demostrat com pacients que han arribat a presentar una resposta molecular profunda amb ITCs, tornen a presentar cèl·lules NK amb les funcions citolítiques restaurades.¹²⁶ Pel que fa als MDS, s'ha descrit que en pacients de baix risc, les quantitats de cèl·lules NK són normals,¹²⁷ en canvi, en pacients amb MDS d'alt risc, la població de NK es troba reduïda, amb baixa expressió de receptors activadors i amb una citotoxicitat deteriorada.^{128,129} Tots aquests descobriments suggereixen que un nombre elevat de cèl·lules NK, així com una bona activació d'aquestes al moment del diagnòstic, es podria correlacionar amb un millor pronòstic i supervivència. A més, també que cèl·lules NK són parcialment responsables del control d'aquest tipus de malalties, limitant la progressió.¹³⁰

2.3.2 Maduració alterada

La diferenciació de les cèl·lules NK es defineix segons combinacions de certs marcadors en superfície.¹³¹ A grans trets, la diferenciació d'aquesta població cel·lular es caracteritza per una disminució del receptor NKG2A i un increment dels KIR que alteraran l'activitat de la NK depenent del repertori de molècules HLA de classe I expressat a la superfície de les cèl·lules diana. Els canvis en la maduració de les NK en malalties mieloides que s'han publicat mostren resultats controvertits. En estudis amb pacients que presenten AML, i també amb ratolins, es demostra una pèrdua de cèl·lules NK immadures, així com un increment en

INTRODUCCIÓ

percentatge d'aquest tipus cel·lular més madur (CD56dimKIR⁺CD57⁺).^{124,132,133} D'altra banda, altres estudis reporten una disminució de la proporció de cèl·lules NK madures en pacients amb AML i MDS.¹³⁴ Dos estudis més obtenen resultats en la mateixa línia, on expliquen que pacients amb cèl·lules NK de fenotip més immadur presenten més, suggerint que la leucèmia indueix alteracions en la maduració d'aquesta població cel·lular i que això afecta el pronòstic dels pacients.^{135,136}

S'ha descrit també com les teràpies utilitzades per fer front a aquest tipus de malalties poden afectar la diferenciació de les cèl·lules NK. En el cas de pacients que presenten CML i que han estat tractats amb dasatinib, presenten unes NK amb citotoxicitat reduïda a causa de la inhibició de certes vies de senyalització, però que no afecten la seva viabilitat. En el cas del nilotinib, s'ha relacionat amb menys impacte pel que fa a la citotoxicitat NK, tot i que igualment inhibeix la producció de citoquines per part d'aquestes cèl·lules mitjançant la inducció de mort cel·lular de les NK CD56^{bright}.^{137,138}

2.3.3 Repertori de receptors

En el cas de CML, forces estudis suggereixen que tant l'aparició com el curs i la resposta als tractaments pot ser influenciada pels receptors KIR activadors i inhibidors que regulen la funció de les cèl·lules NK, tot i que els resultats són molt heterogenis.¹³⁹⁻¹⁴¹ En les cèl·lules tumorals s'hi poden trobar diversos lligands del receptor activador NKG2D, tot i que el més abundant sembla ser MICA i la interacció entre aquest receptor i el seu respectiu lligand augmenta les respostes antitumorals de les NK.¹⁴² En CML, la translocació del gen *BCR/ABL* té un efecte en les cèl·lules dendrítiques, permetent que activin les NK a partir de l'increment dels lligands d'aquest receptor. Exposicions llargues de NKG2D provoquen una secreció de MICA en forma de proteïna soluble (sMICA).¹⁴³ Un augment de sMICA s'ha relacionat amb expansió tumoral, ja que això indueix una modulació negativa del NKG2D en superfície de les NK.¹⁴⁴ S'ha descrit que els nivells de sMICA disminueixen després de la inhibició de la tirosina cinasa produïda per imatinib, i això pot estimular la lisis cel·lular mitjançant les cèl·lules NK.¹³⁹

En el cas de MDS, tot i les evidències de la implicació de les NK en l'evolució de la malaltia, són molt pocs els estudis que s'han dut a terme per relacionar els receptors d'aquestes cèl·lules amb la transició de MDS a AML. Stringaris *et al.*, en

un estudi amb 108 pacients que patien MDS, van examinar la distribució dels KIR activadors i els haplotips en dues cohorts diferents, una amb MDS i una amb AML. La investigació va concloure que el nombre de gens KIR activadors era menor en pacients amb MDS que en controls sans i encara menor en pacients amb AML secundària (derivada d'un MDS), comparat amb pacients amb AML *de novo*. Amb una anàlisi multivariant, van demostrar com l'haplotip A prediu un alt risc de conversió a AML i una pitjor supervivència comparat amb l'haplotip B.¹⁴⁵ La progressió de MDS cap a una AML implica canvis genètics i epigenètics.¹⁴⁶ A més, una vigilància immunològica ineficient de les NK amb baix contingut de KIR activadors podria explicar el fracàs en bloquejar l'expansió dels clons MDS, progressant d'aquesta manera cap a un MDS d'alt risc o AML.

2.3.4 Immunoteràpia i cèl·lules NK

Una de les eines moleculars que tenen com a diana les cèl·lules NK és el **bloqueig dels receptors inhibidors específics de HLA de classe I**. Els anticossos específics d'interferir entre els receptors inhibidors de les cèl·lules NK i els lligands HLA de classe I aconseguixen el mateix efecte que la resposta *missing-self*. Lirilumab (IPH2101) i Monalizumab (IPH2201) són dos anticossos monoclonals IgG4 en desenvolupament que actuen com a antagonistes de la funció dels receptors KIR2D i NKG2A, disminuïnt, per tant, la inhibició de les cèl·lules NK mitjançant la unió d'aquests receptors amb les molècules HLA-C i HLA-E, respectivament.^{147,148} **TIGIT** i **CD96** són receptors co-inhibidors expressats en cèl·lules NK humanes i que reconeixen la molècula de nectina, que es pot trobar sobreexpressada en un gran ventall de tipus de cèl·lules canceroses.^{149,150} Mentre la molècula CD96 es troba expressada constitutivament, TIGIT augmenta la seva expressió en membrana després de l'activació de la cèl·lula NK. El bloqueig d'aquests dos receptors s'està considerant per dur a terme immunoteràpies vers diferents tipus de càncer.¹⁵¹ L'expressió de **PD-1** s'ha descrit en poblacions de cèl·lules NK CD56^{dim} amb fenotip NKG2A⁻ KIR⁺. Aquest receptor, quan s'uneix al seu lligand **PD-L1** transmet un senyal inhibidor a la cèl·lula NK.¹⁵² Sembla ser doncs, que l'activació de les cèl·lules NK i de les seves funcions efectores i potencialment perjudicials, es troba sota control de diferents punts de control immunològic, els quals són aprofitats per les cèl·lules tumorals, sobre expasant PD-L1 per poder escapar de la seva eliminació per part del sistema immunitari.¹⁵³

3. MÈTODES DE TIPIFICACIÓ

Actualment, totes les metodologies de tipificació parteixen de l'ús de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per realitzar l'amplificació dels gens o regions genòmiques a estudiar. Tot i que existeixen múltiples variants, les tècniques que tenen un ús més extens als laboratoris d'histocompatibilitat i Immunogenètica són les descrites succintament als següents apartats.

3.1 PCR-SSP: Tipificació mitjançant encebadors específics de seqüència

La PCR-SSP es basa en l'ús d'encebadors específics per una seqüència concreta de DNA present únicament en una determinada variant del gen estudiat. La positivitat de les reaccions s'estableix per l'aparició d'una banda específica en realitzar una electroforesi en gel d'agarosa i tinció del DNA amb un marcador fluorescent.

Aquesta tècnica presenta avantatges, com ara una interpretació directa (reacció negativa o positiva). És idònia per tipificar mostres individuals i l'obtenció dels resultats és ràpida, a part de no requerir d'instrumentalització sofisticada. D'altra banda, estudiar, per exemple, els gens HLA de forma completa requereix de la realització d'un gran nombre de reaccions i, per tant, molt de temps. El seu ús també és limitat si es volen tipificar moltes mostres simultàniament i, a més, en moltes ocasions, no és possible dissenyar una PCR específica per cada una de les variants d'alguns gens. Finalment, amb la descripció constant de nous al·lels en el cas de gens com KIR i HLA, s'han d'anar actualitzant i redissenyant els encebadors per no perdre variants noves.¹⁵⁴

La PCR-SSP s'aplica en diferents contextos, però el seu ús està molt extens quan és necessari obtenir resultats de manera ràpida per una mostra concreta, o en determinacions de variants associades a determinades malalties (per exemple, la determinació de *HLA-B*27* pel diagnòstic d'Espondilitis Anquilopoètica).

3.2 PCR-SSO: Tipificació mitjançant sondes oligonucleotídiques específiques

El mètode PCR-SSO inclou també amplificació del DNA, en aquest cas d'una regió concreta i variable del gen i la unió d'aquest a un suport sòlid per després hibridar aquest producte amb sondes específiques marcades amb fluorescència que

indicaran presència o absència dels gens o variants d'interès. En els últims anys, s'ha desenvolupat una variant de la SSO pel tipatge HLA que utilitza la plataforma Luminex. Aquest instrument és un citòmetre de flux capaç de detectar microsfere amb fluorescència. Poden discriminar-se fins a 100 microsfere diferents mitjançant la seva fluorescència i en cada una d'elles s'hi pot adherir una sonda diferent. Amb aquest mètode, es realitza la hibridació del producte amplificat i una suspensió d'aquestes microsfere abans d'analitzar la reacció amb el Luminex. El resultat final és un patró de sondes positives i negatives per mostra. L'ús del Luminex permet la hibridació d'un gran nombre de sondes, amb una major automatització del procés i una lectura i interpretació dels resultats directa amb el *software* apropiat.

Els avantatges principals de la tècnica són la senzillesa i fiabilitat, essent idònia per tipificar moltes mostres al mateix temps. D'altra banda, com a inconvenients podríem destacar la necessitat de processament post-PCR i que requereix un gran nombre de sondes per obtenir una resolució adequada en gens altament variables com HLA i KIR.

Aquesta metodologia de tipificació s'utilitza àmpliament als laboratoris d'Histocompatibilitat i Immunogenètica, sobretot per realitzar les tipificacions de les mostres que no requereixen un resultat immediat i que puguin processar-se en tandes, juntament amb altres mostres.

3.3 Seqüenciació de Sanger i PCR-SBT: Tipificació basada en la seqüència

Va ser degut al desenvolupament d'aquest protocol que Frederick Sanger va ser premiat amb el premi Nobel de Química l'any 1980. Aquesta metodologia es basa en quatre reaccions diferents de síntesi de DNA, utilitzant la funció pròpia de síntesi de cadena complementaria del DNA polimerasa, utilitzant un didesoxinucleòtid (ddNTP), nucleòtid sense grup hidroxil a l'extrem 3', i un nucleòtid (dNTP) marcat radioactivament amb ³²P diferent a cada tub. Quan s'afegeix DNA polimerasa a la barreja, aquesta començarà a afegir nucleòtids a la cadena complementaria fins que, en haver afegit un ddNTP a l'atzar, s'aturi la síntesi de la cadena pel fet de no presentar un extrem 3' a partir del qual, es puguin seguir afegint nucleòtids. Com que la incorporació del ddNTP és a l'atzar, s'obtenen fragments de totes les mides possibles. Aquests fragments es poden

INTRODUCCIÓ

separar en un gel de poliacrilamida mitjançant electroforesis en quatre carrils diferents.¹⁵⁵

Aquest protocol inicial ha experimentat moltes variacions, fins a l'arribada del primer seqüenciador automàtic del mètode Sanger, l'Applied Biosystems 370A, el 1986. Finalment, l'any 1990, es paral·lelitzava la seqüenciació tradicional de Sanger en dispositius que podien realitzar moltes reaccions simultànies. A causa de l'alt polimorfisme dels gens d'HLA, el mètode per excel·lència de tipatge ha estat, i encara és en molts laboratoris, l'anomenat mètode SBT (Sequence-Based Typing), que utilitza seqüenciació de Sanger per determinar la seqüència dels al·lels presents a cada mostra.¹⁵⁶

La SBT com a tal consisteix en la seqüenciació nucleotídica directa del gen a tipificar mitjançant la tècnica clàssica de Sanger. L'aproximació més extensa en l'ús d'aquesta metodologia consisteix a obtenir la seqüència dels gens HLA. Per PCR s'amplifiquen les regions més polimòrfiques del gen en qüestió per poder dur a terme una reacció de seqüenciació nucleotídica Sanger amb terminadors didesoxi i una electroforesi de les reaccions obtingudes en un seqüenciador capil·lar. En aquest procés s'obtenen electroforogrames, gràfics amb pics de les fluorescències específiques de cada nucleòtid, a partir dels quals pot deduir-se la seqüència nucleotídica completa de la regió amplificada. Posteriorment, es compara la seqüència obtinguda amb la base de dades que conté les seqüències de totes les variants conegudes dels locus corresponents, per així determinar quines variants estan presents a l'individu tipificat. Aquesta anàlisi es realitza amb un programa informàtic específic.

Com a principals avantatges d'aquest mètode, podem destacar la informació que n'obtenim, ja que s'analitza tota la regió més polimòrfica dels gens d'interès. Els resultats, a més a més, s'obtenen en alta resolució, i finalment, permet identificar al·lels no descrits prèviament. Com a inconvenients trobem l'anomenat fenomen *drop-out*, el qual és l'amplificació preferencial d'un dels dos al·lels, donant com a resultat un aparent homozigot per un locus determinat. Un altre desavantatge és la necessitat de processament post-PCR, la qual cosa implica un major temps de realització i manipulació de productes amplificats, amb la possibilitat de contaminació. A més a més, poden existir ambigüitats, si el polimorfisme que diferencia dues variants està situat en una regió no inclosa en la seqüenciació. Finalment, també destacar el cost dels equips.

En l'actualitat, aquest mètode és considerat de referència en la tipificació dels gens HLA. S'utilitza majoritàriament per obtenir resultats d'alta resolució, sobretot pel trasplantament de progenitors hematopoètics, en el que el coneixement precís dels al·lels HLA presents és molt rellevant.

3.4 Seqüenciació de Segona Generació

Un cop es va completar el Projecte del Genoma Humà a principis dels 2000 amb l'ús de la seqüenciació de Sanger, es van dissenyar noves estratègies de seqüenciació, que presentessin menor taxa d'error i que fossin més ràpides i barates per dur a terme una seqüenciació massiva d'àcids nucleics. La comercialització de les primeres tecnologies *Next Generation Sequencing* (NGS) de segona generació l'any 2005, va revolucionar la recerca genòmica, sent molt més eficients tant econòmicament com en temps emprat en comparació amb la seqüenciació clàssica per mètode Sanger. Tanmateix, per aconseguir això, va ser inevitable reduir la mida de les lectures, fet que resulta en un augment important de la dificultat que presenta dur a terme l'anàlisi bioinformàtic posterior. D'altra banda, i com a novetat també, els nous seqüenciadors són capaços de generar centenars de milers de reaccions de seqüència en paral·lel gràcies a la immobilització de les reaccions en una superfície sòlida o *flow cell*. L'alt rendiment de la NGS ha multiplicat les seqüenciacions de genomes sencers, des de microorganismes fins al genoma humà.¹⁵⁷⁻¹⁶² Per tant, tot i les diferències en la química utilitzada, totes aquestes plataformes de seqüenciació massiva comparteixen les següents característiques:

- El DNA es fragmenta a l'atzar i a ambdues bandes de cada molècula s'hi uneixen uns adaptadors específics.
- L'amplificació de la llibreria es produeix mitjançant una immobilització dels fragments de DNA sobre una superfície sòlida a través dels adaptadors.
- La detecció de les bases passa al mateix temps en totes les molècules de DNA, el que s'anomena una seqüenciació massiva i en paral·lel.
- Les lectures són curtes.
- Les plataformes NGS permeten realitzar seqüenciació de tipus *paired-end* mitjançant el qual és possible llegir els diferents extrems del mateix fragment de DNA.

INTRODUCCIÓ

Com a principals avantatges d'aquest mètode, trobem el gran nombre de lectures de seqüència que cobreixen les regions de DNA, aportant seguretat en l'adjudicació dels nucleòtids a la seva posició. També l'alt rendiment, permetent el processament simultani de moltes mostres i gens. El cost per determinació és menor que amb la SBT si es realitzen tandes amb moltes mostres, i el temps emprat en l'anàlisi manual també és menor. Com a inconvenients cal destacar el cost de l'equip, també que no és adequat per mostres individuals, i finalment, que el temps de processament no és ràpid (3-4 dies).

3.4.1 Tecnologia d'Illumina

La tecnologia aplicada en aquesta tesi doctoral, Illumina, es caracteritza per utilitzar nucleòtids amb terminadors reversibles marcats amb molècules fluorescents, així com per la seva capacitat de dur a terme una seqüenciació massiva en paral·lel.

L'ús d'aquesta tecnologia, requereix una preparació de la llibreria particular, fragmentant el DNA prèviament amplificat en punts a l'atzar i seguint amb una lligació d'adaptadors tant a 5' com a 3' dels fragments. Seguidament, índex (o etiquetes) amb seqüències conegudes són simultàniament units als fragments de DNA de cada mostra, per poder fer un *pool* de totes les mostres i seqüenciar-les totes en una mateixa carrera de seqüenciació, reconeixent posteriorment quin fragment prové de cada mostra. Els fragments de DNA amb els adaptadors i els índexs units han de passar un procés de triatge per mida, seleccionant els fragments que presentin cert interval de llargada i descartant tota la resta. Un cop la llibreria està preparada, es carrega en una superfície sòlida anomenada *flow cell*. La *flow cell* és una superfície de vidre que presenta uns oligonucleòtids o adaptadors units que serveixen tant per capturar les molècules a seqüenciar així com de primers per amplificar-les en pont. Els clústers són generats per millorar el senyal de seqüenciació, a partir d'una única molècula de DNA a través de l'amplificació per pont en fase sòlida, obtenint com a resultat un motlle del DNA original de fins a 1000 còpies densament empaquetades i unides a la *flow cell*.

Per dur a terme la lectura, l'encebador de seqüència s'uneix als fragments units a la *flow cell* i a cada cicle els diferents nucleòtids intenten unir-se a la cadena creixent, però només els que siguin complementaris a la seqüència ho podran fer. Aquest tipus de seqüenciació utilitza terminadors reversibles, on els quatre

nucleòtids estan marcats amb fluorescència i s'afegeixen de forma simultània, de manera que només un nucleòtid pot unir-se a cada cicle. Un cop s'acaba cada cicle, els clústers són excitats per una font de llum i un senyal fluorescent característica és captada per una càmera (**Figura 13**). Després, el terminador s'elimina químicament, es fa un rentat, i comença el següent cicle. Per un clúster, totes les seqüències idèntiques són llegides de manera simultània, i centenars de milions de clústers són seqüenciats de forma massiva i paral·lela.

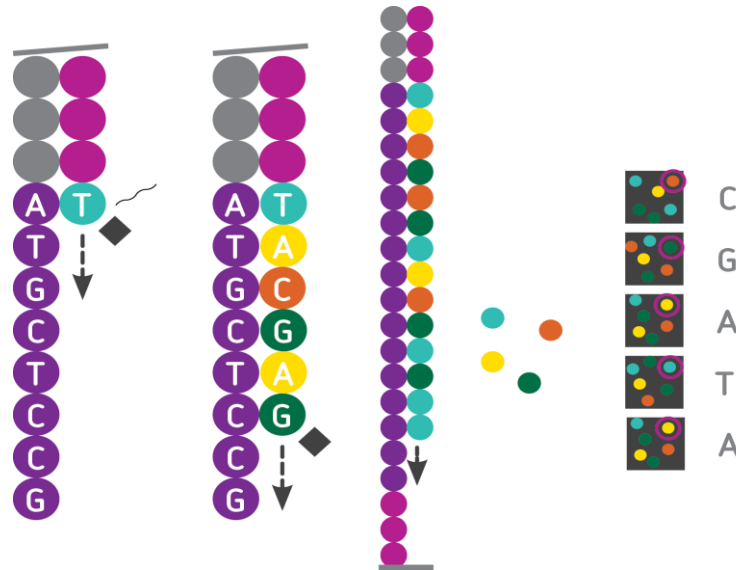


Figura 13. Seqüenciació per síntesi de la plataforma Illumina. Font: Obtinguda de © 2019 Illumina, Inc.

Pel que fa a l'anàlisi bioinformàtic, les dades en brut que s'obtenen directament del seqüenciador s'emmagatzemen en arxius FASTQ, que contenen l'identificador de cada mostra, la seqüència de bases nitrogenades, i dades de qualitat per cada una de les bases obtingudes. Per cada mostra s'obtenen dos arxius FASTQ: un per la lectura *forward* i una per la *reverse* de la seqüència. El primer pas que s'ha de dur a terme és el preprocessat, un control de qualitat dels arxius FASTQ, obtenint una sèrie de paràmetres a través dels quals es pot determinar si els arxius compleixen o no uns valors mínims de qualitat per poder continuar l'anàlisi. Existeixen diferents programes bioinformàtics que eliminen les lectures de menor qualitat. Un cop s'han obtingut FASTQ amb qualitats de lectura millorades, es du a terme el procés d'alineament. Aquest procés consisteix en fer un mapa les lectures obtingudes front una referència coneguda, ja sigui un sol gen com un

genoma complet. Finalment, les variants les detectem trobant diferències entre les seqüències de referència i les obtingudes.

3.5 Seqüenciació de Tercera Generació

Tot i que les tecnologies de seqüenciació de segona generació són extremadament potents, també tenen alguns inconvenients. La limitació més important són les lectures curtes. Com que els genomes contenen moltes regions repetitives que poden ser més llargues que una d'aquestes lectures, això pot portar problemes quan es vol fer el muntatge de les lectures en aquestes zones. Poc després de l'aparició de la tecnologia NGS de segona generació van sorgir les tecnologies de tercera generació (TGS). Les característiques principals d'aquestes estratègies són bàsicament que són seqüències d'una molècula sencera, i que es duen a terme a temps real (a diferència d'Illumina, amb la qual la seqüenciació s'atura després de la incorporació de cada base). La primera tecnologia de tercera generació va ser dissenyada al laboratori de Stephen Quake, comercialitzat més tard per Helicos BioSciences.^{163,164} La TGS més àmpliament utilitzada va sortir al mercat l'any 2011, comercialitzada per Pacific Biosciences (PacBio) i es denomina seqüenciació de *Single-Molecule Real-Time* (SMRT). Més recentment, el 2014, Oxford Nanopore Technologies (ONT) va introduir la seqüenciació amb nanoporus. A més de no fer falta utilitzar amplificacions per PCR, ambdues plataformes produeixen lectures llargues. Aquestes tecnologies estan revolucionant la investigació genòmica, ja que permeten explorar genomes a una resolució sense precedents. Tot i això, a causa de diferents reptes en l'àmbit tecnològic, aquestes noves plataformes de seqüenciació encara presenten altes taxes d'errors pel que fa a la determinació de bases. De totes aquestes plataformes, la més prometedora és la seqüenciació per nanoporus, ja que a part de poder seqüenciar DNA i RNA, és capaç de detectar i quantificar tot tipus de substàncies biològiques i molècules.¹⁶⁵ La idea d'utilitzar nanoporus inserits en una membrana per seqüenciar DNA o RNA d'una sola cadena es va originar a finals dels anys vuitanta. Tot i això, degut a obstacles tècnics, els primers resultats exitosos van començar a reportar-se a partir del 2012. Dos anys després, Oxford Nanopore Technologies va posar a la venda el seu primer seqüenciador, el MinION de butxaca. El principi d'ONT es basa en un nanoporus que pot ser tant biològic com sintètic col·locat en una membrana artificial on s'aplica un voltatge. Gràcies a aquest voltatge, es crea un flux d'ions que passen d'una banda a l'altra

de la membrana a través dels porus. Quan les bases del DNA el travessen, es genera un canvi en el flux característic per cada nucleòtid, i d'aquesta manera es determina la seqüència.^{166,167} Les molècules de DNA es preparen mitjançant protocols de preparacions de llibreries que inclouen afegir un adaptador unit a una proteïna motora que és capaç d'obrir el DNA de doble cadena i fer que aquest passi en forma de cadena simple a través del porus, causant canvis concrets en el corrent de la membrana que poden ser enregistrats i descodificats a bases. Gràcies a la ràpida evolució dels reactius químics utilitzats per aquesta plataforma, s'ha aconseguit un augment significatiu del rendiment. Mentre els primers reactius produïen d'entre 184 i 450 milions de bases de dades de seqüències en 48 hores, les *flow cells* d'avui en dia, en combinació amb les últimes versions dels *kits* de preparació de llibreries, poden produir fins a 20 Gb de dades de seqüència. A més, la velocitat de translocació ha augmentat; de 30 bases per segon a 450 en els últims anys. En contrast amb els preus d'altres plataformes de seqüenciació, el MinION, juntament amb dues *flow cells* i alguns reactius, són posats a la venda per només 1000\$. D'aquesta manera, ONT ha permès que gairebé qualsevol grup pugui tenir accés a aquesta plataforma i per tant, a l'ús de la genòmica en la seva recerca. Una altra particularitat d'aquesta plataforma és la seva gran portabilitat i el fet que només requereix d'un port USB d'un ordinador portàtil, permetent fins i tot, de seqüenciar DNA per primer cop a l'Estació Espacial Internacional.¹⁶⁸

Són pocs encara els grups que han desenvolupat estratègies per dur a terme el tipatge de gens altament variables utilitzant aquesta tecnologia. Com a avantatges principals és necessari destacar el baix cost de l'equipament i també la reducció dels problemes per determinar la fase entre al·lels, ja que permet disposar de lectures llargues. L'inconvenient principal, el seu grau d'error, no ha animat els laboratoris d'Histocompatibilitat i Immunogenètica a optar per aquesta tecnologia, tot i que any rere any aquest disminueix, i podria acabar convertint-se en un gran competidor dins d'aquest àmbit.



CONTEXT

CONTEXT

La present tesi doctoral s'ha dut a terme entre el Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica i el Laboratori de Coagulopaties Congènites del Banc de Sang i Teixits (BST).

El Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST realitza estudis de tipificació HLA per tots els hospitals de l'Institut Català de la Salut, pel banc de cordó umbilical del BST, i pel Registre Espanyol de Donants de Medul·la Òssia. L'activitat d'aquest laboratori, utilitzant tècniques de biologia molecular, està relacionada principalment amb el trasplantament de progenitors hematopoètics i amb l'avaluació del diagnòstic de malalties associades a HLA. A més, també realitza tipificació dels gens KIR per trasplantament haploidèntic i clíniques de fertilitat.

L'any 2015, quan la majoria dels laboratoris encara utilitzaven la SBT per realitzar el tipatge HLA, el laboratori ja va posar a punt, junt amb el Laboratori de Coagulopaties Congènites, el tipatge HLA mitjançant seqüenciació massiva. Disposant d'aquesta tecnologia, el laboratori ha pogut realitzar estudis poblacionals i de malalties associades a HLA gràcies al gran rendiment d'aquesta tecnologia. D'altra banda, el tipatge dels gens KIR seguia obtenint-se mitjançant la PCR-SSO.

L'any 2017, a l'inici d'aquesta tesi, els únics laboratoris que realitzaven el tipatge KIR mitjançant seqüenciació massiva eren el Departament de *Structural Biology* de la Universitat de Stanford, i a *l'Etablissement Français du Sang*, a Nantes, França. Durant el desenvolupament d'aquest treball, el nombre de laboratoris i instituts que han posat a punt una estratègia de tipatge KIR per NGS ha anat en augment i, ara com ara, ja existeixen dues cases comercials que han desenvolupat un kit comercial per dur-ho a terme. Aquest augment demostra l'interès creixent de la comunitat científica en realitzar el tipatge KIR en alta resolució i per grans volums de mostres. Gràcies a aquests avenços, s'ha anat demostrant que aquests gens podien ser un bon indicador de pronòstics tant en leucèmies com en trasplantament hematopoètic.



HIPÒTESI I

OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Les cèl·lules NK són essencials per generar una bona resposta immunològica, tant innata com adaptativa i, per tant, tenen un paper clau en el control de les cèl·lules canceroses. En el cas de les neoplàsies hematològiques, s'ha demostrat com, variacions tant en nombre com en la funció d'aquesta població cel·lular, poden tenir un efecte en la progressió d'aquestes malalties. Les funcions citotòxiques d'aquestes cèl·lules, s'exerceixen a través d'un gran nombre de receptors activadors i inhibidors que s'expressen a la membrana citoplasmàtica i de les interaccions d'aquests amb els seus respectius lligands. La tecnologia NGS permetrà detectar variants d'aquests receptors en un gran nombre de pacients de manera efectiva i a baix cost. D'aquesta manera es vol demostrar com, mitjançant aquesta tecnologia, podem augmentar la magnitud de les cohorts a estudiar de manera ràpida i sense augment de cost, i que les variants dels receptors d'aquestes cèl·lules, així com dels seus lligands, es relacionen amb l'evolució clínica de pacients de neoplàsies mieloides.

L'objectiu global d'aquesta tesi doctoral consisteix en, mitjançant la tecnologia NGS, desenvolupar i validar un protocol econòmic i d'alt rendiment per estudiar l'efecte de les diferents variants dels receptors de les cèl·lules NK i dels respectius lligands en neoplàsies mieloides. Els objectius concrets d'aquesta tesi es poden desglossar en:

1. Desenvolupar i validar un protocol per dur a terme el tipatge dels gens KIR mitjançant tecnologia *Next Generation Sequencing* de segona generació i que es pugui aplicar conjuntament amb el tipatge HLA de classe I sota les mateixes condicions de PCR.
2. Desenvolupar i validar un protocol per seqüenciar la regió 3' UTR del gen *KLRK1* i els seus lligands *MICA* i *MICB* mitjançant tecnologia *Next Generation Sequencing* de segona generació.
3. Caracteritzar grans cohorts de donants de sang de Catalunya per tenir un grup control per futurs estudis d'associacions entre les variants dels gens codificants per receptors de cèl·lules NK-malaltia.
4. Aplicar els anteriors procediments per estudiar el paper de variants de receptors de les cèl·lules NK i dels seus respectius lligands en el pronòstic i evolució de pacients amb Leucèmia Mielòide Crònica.



RESULTATS

RESULTATS

Els resultats de la present tesi doctoral es presenten com a compendi de publicacions i estan dividits en dues seccions:

Secció 1: Desenvolupament i validació d'un protocol per a la caracterització dels receptors de cèl·lules Natural Killer i dels seus respectius lligands.

Secció 2: Impacte de l'aplicació del mètode desenvolupat.

Secció 1.

Desenvolupament i validació d'un protocol per a la caracterització dels receptors de cèl·lules Natural Killer i dels seus respectius lligands

1. ARTICLE 1. DESIGN AND VALIDATION OF A MULTIPLEX KIR AND HLA CLASS I GENOTYPING METHOD USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro

Frontiers in Immunology 2018 Dec 19;9:2991

DOI: 10.3389/fimmu.2018.02991

Resum

Els receptors KIR, considerats els reguladors de les cèl·lules NK més polimòrfics, presenten com a lligands les molècules HLA de classe I d'altres desconeguts. L'interès en genotipar KIR ha incrementat darrerament degut a la importància que s'ha vist que presenten aquests receptors pel que fa a la identificació del millor donant en el trasplantament de progenitors hematopoètics i obtenir l'efecte empelt contra leucèmia. Fins ara, els protocols de rutina clínica per determinar el contingut de gens KIR dels pacients es basaven exclusivament en les tècniques PCR-SSO i PCR-SSP. Per millorar l'estudi d'aquests gens, hem desenvolupat una estratègia *long range PCR* en *multiplex* que és capaç d'obtenir el tipatge de manera simultània els gens HLA de classe I a nivell de seqüència, i els gens KIR utilitzant seqüenciació de nova generació. Aquest protocol permet l'amplificació de 14 gens KIR, 2 pseudogens KIR, i HLA classe I clàssic amb la subseqüent seqüenciació en la plataforma Illumina. L'anàlisi bioinformàtic per obtenir el tipatge KIR es basa en una hibridació virtual de sondes gen-específiques, i el de HLA mitjançant el *software* NGSEngine de GenDx. Per validar el mètode, es van utilitzar 192 mostres de DNA que havien estat prèviament caracteritzades amb PCR-SSO. Per una banda, quan un gen KIR ha estat present en una mostra, s'hi ha detectat un gran nombre de sondes gen-específiques, per altra banda, quan aquest ha estat absent, s'han detectat un nombre molt baix o fins i tot cap sonda, permetent establir valors llindar. La concordança entre els tipatges previs tant KIR com HLA i els obtinguts utilitzant aquest nou protocol van ser del 100%. En conclusió, aquesta estratègia basada en la seqüenciació de nova generació i la PCR en *multiplex* pot proveir d'un mètode més econòmic i eficient comparat amb les

RESULTATS

tècniques utilitzades fins ara. A més a més, l'obtenció d'un tipatge KIR a nivell de seqüència serà possible utilitzant aquest mètode un cop aparegui un *software* capaç d'analitzar-ho.



Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing

Laia Closa^{1,2}, Francisco Vidal^{2,3,4}, Maria J. Herrero¹ and Jose L. Caro^{1,2*}

¹ Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain, ² Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, ³ Congenital Coagulopathy Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain, ⁴ CIBER of Cardiovascular Diseases, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Aurore Saudemont,
GlaxoSmithKline, United Kingdom

Reviewed by:

Amir Horowitz,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States
Rajalingam Raja,
University of California, San Francisco,
United States
William Hildebrand,
University of Oklahoma Health
Sciences Center, United States

*Correspondence:

Jose L. Caro
jlcaro@clinic.cat

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 31 August 2018

Accepted: 04 December 2018

Published: 19 December 2018

Citation:

Closa L, Vidal F, Herrero MJ and
Caro JL (2018) Design and Validation
of a Multiplex KIR and HLA Class I
Genotyping Method Using Next
Generation Sequencing.
Front. Immunol. 9:2991.
doi: 10.3389/fimmu.2018.02991

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), considered the most polymorphic natural killer (NK) cell regulators, bind HLA class-I molecules or still unknown ligands. Interest in KIR genotyping is increasing because of the importance of these receptors for identifying the best possible donor in hematopoietic stem cell transplantation to obtain a graft-versus-leukemia effect. Currently, routine protocols to determine the gene content of the KIR cluster are exclusively performed by PCR-SSO and PCR-SSP. To improve the study of these genes, we developed a multiplex, long-range PCR strategy suitable for simultaneous, high-resolution HLA class I and KIR genotyping by next generation sequencing (NGS). This protocol allows amplification of the 14 KIR genes, 2 KIR pseudogenes, and HLA class I genes, with subsequent sequencing on an Illumina platform. The bioinformatics analysis for KIR genotyping was performed by virtual hybridization of gene-specific probes, and HLA genotyping was done by GenDX NGSengine software. To validate the method reliability, 192 genomic DNA samples previously characterized by PCR-SSO were used. When a specific KIR gene was present, a large number of gene-specific virtual probes were detected, whereas when it was absent, very few or none were found, enabling cutoff establishment. Concordance for both the KIR and HLA assignments as compared with the previous characterization was 100%. In conclusion, the multiplex PCR NGS-based strategy presented could provide an efficient, less costly method for KIR-ligand genotyping by gene presence/absence. Furthermore, allele resolution will be possible when KIR-specific software becomes available.

Keywords: KIR, HLA, next generation sequencing, genotyping, NGS analysis

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are lymphocytes with a critical role in innate immunity by protecting against viral infection and malignant cells (1). This function seems to be controlled by a complex network of surface receptors and the interactions with their ligands. Among these receptors, killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), which belong to a family of type I transmembrane glycoproteins expressed on NK cells, are considered the most polymorphic and one of the most important regulators of these cells (2). KIR proteins can tune potent effector functions by mediating

human NK cell cytotoxicity via activating or inhibiting signals resulting from selective binding with human leukocyte antigen (HLA) class-I molecules and some still unknown ligands (3, 4). This group of receptors prevents NK cell-mediated attack against normal autologous cells, whereas cells in which HLA class I expression is compromised by tumor transformation or viral infection become susceptible to NK-mediated killing. The anti-leukemia effect of donor NK cell alloreactivity in KIR ligand-mismatched haploidentical (partially-matched related donor) hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) may provide curative therapy for many patients. However, the impact of KIR allele polymorphism on NK cell alloreactivity remains to be investigated (5). The KIR locus, which contains a family of polymorphic and highly homologous genes, is located on chromosome 19q13.4 within the leukocyte receptor complex. In contrast to HLA class I genes, that are defined purely on allelic polymorphisms, the KIR gene complex is both polygenic and extremely polymorphic. The structural variation creates multiple gene-content haplotypes. In addition, extensive allelic variability has been identified, particularly in the inhibitory genes (6). Variability in gene-content haplotypes is responsible for significant diversity both within and between populations (7). This greatly differences between individuals are explained because KIR genes have evolved rapidly by mutation and recombination to generate multiple alleles at every locus and the KIR-gene content appear at different and varying frequencies in each population (8).

The KIR system is composed of 13 genes and 2 pseudogenes, four of these genes are constitutive and are always present in the genome of all individuals, and 10 are variable, (i.e., they may be present or not in the genome). These genes are 9 to 16 Kb in size and contain 8 or 9 exons that encode the signal peptide, 2 or 3 extracellular domains, a stem region, a transmembrane region, and a cytoplasmic tail (9). KIR gene content has been organized into 2 haplotypes, A and B. Haplotype A is invariant in terms of gene content and has only 1 activating KIR gene (*KIR2DS4*), whereas haplotype B is quite variable and has additional activating genes (**Figure 1**). Moreover, the distribution of receptors in the NK cell is stochastic; each NK clone may express 1 or more receptors and show increasing transcriptional complexity. Finally, the largest contributor to the diversity of the KIR region is its elevated gene polymorphism, with 907 currently defined alleles (Release 2.7.0 July 2017) (10, 11).

KIR genotyping is usually performed on the request of a specialized physician for fertility studies or for haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. The methods currently used to determine the KIR gene content are PCR-SSO, based on amplification of the locus of interest by PCR followed by hybridization with gene-specific oligonucleotide probes, or PCR-SSP, consisting in gene-specific PCRs to determine the presence of each gene (12, 13). These strategies provide information in low resolution, genotyping the KIR gene system by determining the presence or absence of genes. Conversely, NGS technology has great potential for detecting allelic variants, as has been demonstrated in HLA typing, in which a large number of samples can be efficiently analyzed simultaneously (14).

In this study, we aimed to develop and validate an economically viable method to genotype receptors and ligands simultaneously by taking advantage of the shared regions of most KIR genes, and obtain information about all the KIR loci and the classic HLA class I genes.

MATERIAL AND METHODS

Samples

In total, 192 samples were selected: 30 samples of genomic DNA from the 10th International Histocompatibility Workshop (IHW), known for their high-resolution KIR and HLA class I and II genotyping, and 162 genomic DNA samples from the BST Histocompatibility and Immunogenetic laboratory, well-characterized by PCR-SSO for KIR content and by PCR-NGS and/or SBT for high-resolution HLA class I genotyping. All individuals gave written informed consent, in accordance with the protocols approved by the Barcelona Blood and Tissue Bank ethics committee.

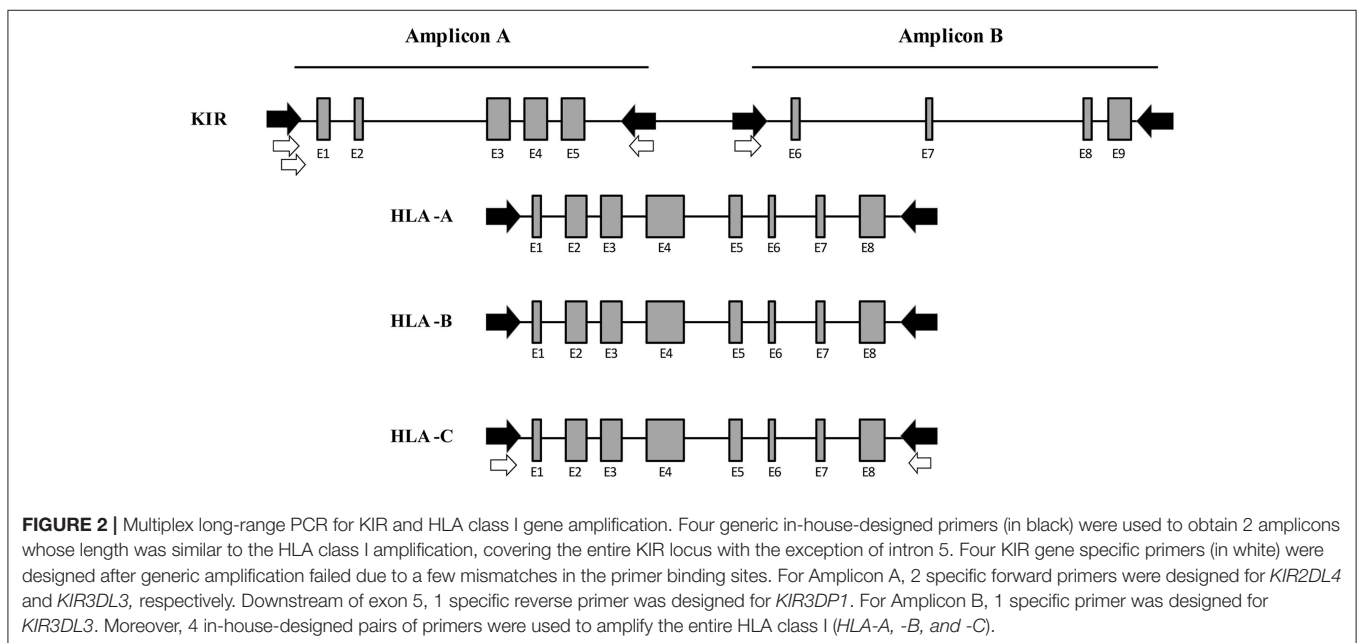
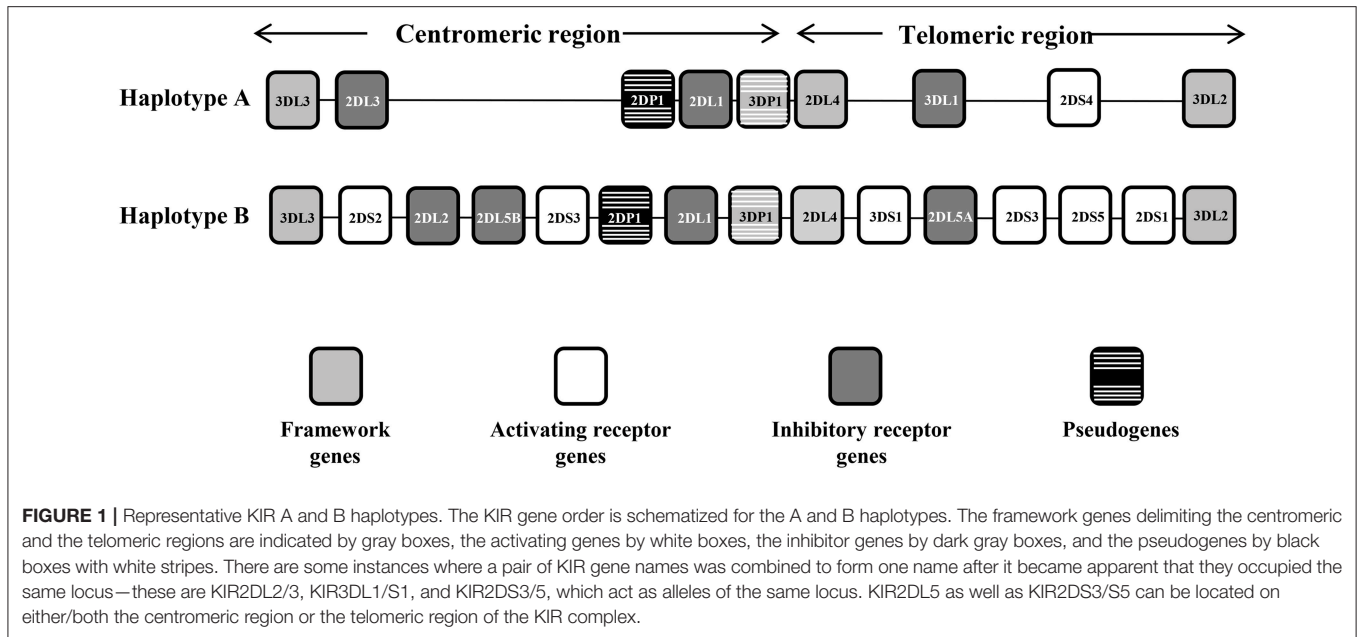
Method Validation

Four runs were performed to validate the method. The first 2 runs (96 samples/run) were sequenced using the 300-cycle MiSeq reagent kit, and the other 2 runs (78 samples/run) were performed with the 500-cycle MiSeq kit to enable comparison of the results obtained with different read lengths.

KIR and HLA Class I Multiplex Long-Range (LR) PCR

The QIASymphony DNA kit was used for genomic DNA extraction. DNA concentration in all samples was measured using a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Scientific) at 260 nm.

To amplify the total of KIR genes and pseudogenes, 8 primers were designed to obtain 2 amplicons having a length similar to that of the class I HLA genes and covering around 80% of the entire KIR cluster. Multiple alignments of KIR reference sequences from the Immuno Polymorphism Database (IPD; see Web Resources) were used to delimit the best regions to specifically amplify all genes comprising the KIR system simultaneously. For amplicon A, which covers exons 1 to 5, 3 forward primers were designed, 1 generic primer for all KIR genes and 2 specific primers for *KIR2DL4* and *KIR3DL3*, respectively. Downstream of exon 5, 2 reverse primers were designed, 1 generic for all KIR and 1 specific for *KIR3DP1*. For amplicon B, which covers exons 6 to 9, 2 forward primers were designed, 1 generic and 1 specific for *KIR3DL3*. Finally, 1 reverse primer was designed downstream of exon 9 to generically target all KIR genes. Using this method, only intron 5 remained partially uncovered. The expected amplicon length varied according to each KIR gene, and ranged from 3,800 to 8,000 bp. This wide range is due to the considerable structural diversity of the KIR alleles, which include various duplications and deletions. These 8 KIR primers plus 4 previously designed in-house primer pairs to amplify the full length of *HLA-A*, *HLA-B*, and *HLA-C* comprised a mix with a total of 16 primers for simultaneous amplification of 19 loci (**Figure 2**).



Multiplex LR-PCR amplification was established and optimized for best performance using the SequalPrep Long PCR Kit with dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification was carried out on a Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher). PCR products underwent electrophoresis and visualization on SYBR safe-stained 1% agarose gel to verify the absence of non-specific bands and ensure that amplicon sizes were as expected (Figure 3).

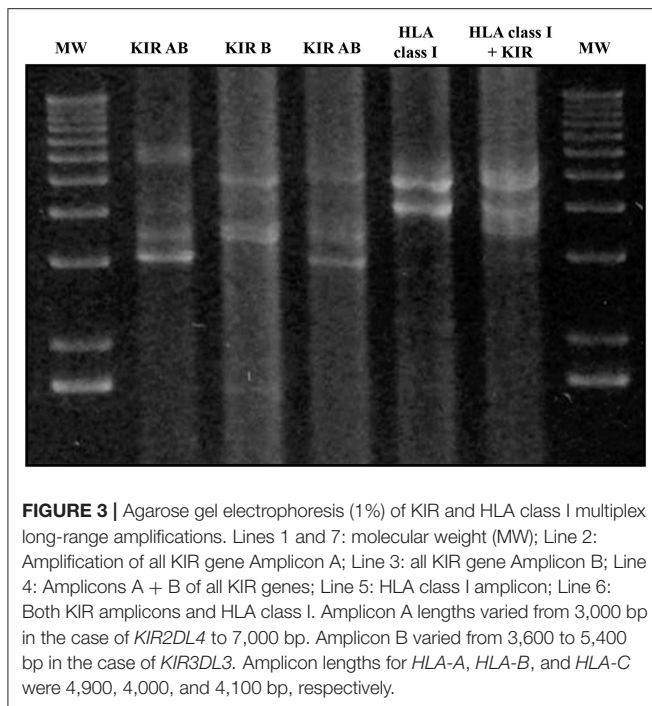
Library Preparation and Sequencing

Library preparation was performed by enzymatic fragmentation of PCR products and double indexing using the NGSgo kit (GenDx,

Utrecht, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The indexed libraries were pooled, denatured, and diluted to a final concentration of 4 nM. The pooled library was sequenced on the MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA).

Data Analysis for KIR Gene Content Determination and HLA Genotyping From NGS Data

Indexed sequences were de-multiplexed and analyzed individually. KIR reads were mapped to the human genome reference sequence hg19 (GRCh37), and the binary alignment



map (BAM) files containing the mapped reads were visualized using CLC Genomics Workbench 11 (Qiagen, Hilden, Germany).

To determine KIR gene content in NGS samples, 2 short (10–30 bp) gene-specific virtual sequences for Amplicon A and 2 for Amplicon B for all KIR genes were carefully chosen from IPD-KIR, resulting in 4 gene-specific sequences (virtual probes) for each KIR gene. These virtual probes were used to find exact match binding sites in reads from FASTQ files of NGS samples (using the CLC Genomics Workbench). This “*in-silico* hybridization” technique enabled determination of presence/absence and relative quantification of individual KIR genes (15). The virtual probes designed can recognize almost all alleles described to date. The only exception was 2 virtual probes from amplicon A that did not detect two uncommon alleles (*KIR2DL1*020* and *KIR2DS3*005*) (16). All sequences of the virtual probes were aligned with BLAST against the human reference genome (hg19) to confirm KIR specificity (17).

The number of matching virtual probes per gene in each experiment was normalized against the total number of probes matched per sample. The results (KIR content) corresponding to the samples analyzed by NGS were compared with the results obtained by PCR-SSO. Using these data, an NGS threshold of <1% of probes detected was established to consider that a gene was absent. It should be noted that the probe range varied considerably, but negative results were usually below 0.1% (Table 1).

The HLA class I genotype was determined with NGSengine 2.9.1 (GenDx) using the IMGT 3.31.0 reference database, according to the manufacturer’s recommendations and with all parameters set to default values. Omixon HLA Explore software

(Omixon, Budapest, Hungary) was used in some samples to confirm the HLA genotype.

Data Availability

The primers, virtual probes sequences and the PCR conditions are not publicly available because are currently protected by intellectual property rights of the authors, in prevision of their potential future commercial exploitation.

RESULTS

Method Design

The alignment of all KIR genes was downloaded from the IDP-KIR database to enable design of PCR primers sufficiently generic to simultaneously amplify the total of KIR genes. This database was also used to design the specific virtual probes. In addition, specific primers had to be designed for genes showing little or no amplification with the generic primers. Sequence analysis corroborated amplification of all KIR genes using the specific sequences. The KIR primers were then combined with the primers for PCR amplification of the classic class I HLA genes, and the relative percentages were adjusted to obtain an appropriate number of reads for proper genotyping of both gene systems. Lastly, the cutoffs used in the validation procedure were established by analysis of 50 samples.

Technical Validation of the Multiplex LR-PCR for Class I HLA and KIR Genotyping

Fifteen samples did not meet the minimum requirements for analysis and were discarded as technical failures during library preparation, regardless of KIR or HLA genotype (6 using the 300-cycle kit and 9 using the 500-cycle kit). Overall, the genotype was obtained in 186 samples with the 300-cycle MiSeq Reagent Kit v2 and in 147 samples with the 500-cycle MiSeq Reagent Kit v2. The validation study involved 4 runs, 2 with the 300-cycle kit and 2 with the 500-cycle kit. The study using the 300-cycle kit (2×150 bp sequence reads) yielded a cluster density of 926 ± 12 and 650 ± 16 K/mm² with a passing filter of 91.62 ± 1.24 and 92.86 ± 1.95 , respectively, in 2 independent sequencing runs of 96 indexed libraries. The study using the 500-cycle kit (2×250 -bp sequence reads) gave a cluster density of $1,059 \pm 18$ and 731 ± 17 K/mm² with a passing filter of 90.44 ± 0.86 and 92.85 ± 1.10 , respectively, in 2 independent sequencing runs of 78 indexed libraries. When using the 300-cycle MiSeq kit, approximately 130,000 reads were needed to obtain clear genotyping results for all genes; hence, a maximum of around 250 samples can be simultaneously typed in a single MiSeq run. On the other hand, using the 500-cycle kit, approximately 110,000 reads were needed for the analysis, which means that 300 samples can be genotyped in a single run.

Determination of KIR Gene Content Using Specific Virtual Probes

The results based on identifying the presence or absence of all KIR genes, using gene-specific virtual probe analysis with

TABLE 1 | Average number (maximum–minimum) of gene-specific virtual probes and normalized data on raw data in samples with presence and absence of specific KIR genes using the 300-cycle MiSeq Reagent Kit.

	Average number of virtual probes detected		N° probes per gene / total N° of probes detected *100	
	POSITIVE	NEGATIVE	POSITIVE	NEGATIVE
2DL1	237 (621–52) <i>n</i> = 184	3.5(3–2) <i>n</i> = 2	5.8 (11.5–2.0) <i>n</i> = 184	0.096 (0.146–0.0469) <i>n</i> = 2
2DL2	190 (702–20) <i>n</i> = 101	3 (23–0) <i>n</i> = 85	4.6 (16.9–1.1) <i>n</i> = 101	0.074 (0.6–0) <i>n</i> = 85
2DL3	296 (942–43) <i>n</i> = 164	5 (11–0) <i>n</i> = 22	7.3 (13.0–2.2) <i>n</i> = 164	0.106 (0.29–0) <i>n</i> = 22
2DL5	761 (2253–132) <i>n</i> = 108	1 (8–0) <i>n</i> = 78	16.8 (30.8–3.9) <i>n</i> = 108	0.04 (0.2–0) <i>n</i> = 78
2DS1	151 (391–37) <i>n</i> = 78	2 (6–0) <i>n</i> = 108	3.4 (6.6–1.2) <i>n</i> = 78	0.0385 (0.17–0) <i>n</i> = 108
2DS2	199 (601–43) <i>n</i> = 101	5 (25–0) <i>n</i> = 85	4.9 (12.9–2.0) <i>n</i> = 101	0.1225 (0.75–0) <i>n</i> = 85
2DS3	158 (374–41) <i>n</i> = 68	2 (14–0) <i>n</i> = 118	3.8 (14–1.6) <i>n</i> = 68	0.055 (0.27–0) <i>n</i> = 118
2DS4	213 (583–36) <i>n</i> = 117	4 (5–2) <i>n</i> = 9	5.5 (10.6–1.6) <i>n</i> = 177	0.1 (0.207–0.05) <i>n</i> = 9
2DS5	164 (381–29) <i>n</i> = 64	6 (21–0) <i>n</i> = 122	4 (12.5–1.5) <i>n</i> = 64	0.1755 (0.61–0) <i>n</i> = 122
3DL1	372 (1039–54) <i>n</i> = 176	3 (5–0) <i>n</i> = 10	9.4 (18.1–3.1) <i>n</i> = 176	0.0585 (0.126–0) <i>n</i> = 10
3DS1	194 (487–48) <i>n</i> = 75	2 (7–0) <i>n</i> = 111	4.6 (19.3–1.7) <i>n</i> = 75	0.033 (0.228–0) <i>n</i> = 111
2DP1	630 (1947–107) <i>n</i> = 184	4 (7–1) <i>n</i> = 2	15 (25.5–8.0) <i>n</i> = 184	0.104 (0.16–0.048) <i>n</i> = 2
3DP1	436 (1030–92) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0	10.3 (18.7–2.6) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0
3DL2	324 (711–83) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0	8.2 (16.7–3.7) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0
3DL3	271 (684–52) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0	6.6 (12.9–2.3) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0
2DL4	356 (1113–61) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0	9 (60.4–2.3) <i>n</i> = 186	<i>n</i> = 0

the CLC Genomics Workbench and the established cutoffs, showed strong concordance (97.84%) with the PCR-SSO analysis, providing an identical genotype in 182 of the 186 samples studied. The following 4 discordant results occurred: In 3 samples, PCR-SSO results were positive for *KIR2DS3*, whereas *KIR2DS3* was not detected by NGS, and in the remaining discordant sample, the PCR-SSO indicated an absence of *KIR3DL1*, whereas 246 hybridizations with *KIR3DL1*-specific virtual probes detected this gene by NGS (Table 2). All 4 discordant samples were further analyzed by PCR-SSP, a second well-established and technically validated technique. PCR-SSP results were in complete agreement with the NGS findings, thereby providing evidence that NGS-based KIR genotyping was 100% accurate for all 186 samples. An average of 4,199 virtual probes matched per sample using the 300-cycle kit and 5,984 using the 500-cycle kit, after limiting the number of reads per sample to 50% to speed up the analysis without affecting the outcome. Moreover, possible overexpression of amplicon A compared to amplicon B was calculated by analyzing the number of virtual probes that belonged to each amplicon. Amplicon expression was sufficiently balanced in all KIR genes with the exception of *KIR2DP1*, *KIR2DS4*, and *KIR2DL4*, in which one of the amplicons was increased compared to the other, due to generic amplification of all KIR genes simultaneously (Figure 4).

HLA Class I Genotyping

In the paired-end 2 × 150 sequencing approach, average coverage for HLA across all samples was 378 reads and mappability was 76.02%. Genotype concordance was 99.46%, with only a single difference: HLA-B*07:05:01:01 performed by SBT was detected as HLA-B*07:06:01 by NGS. The sample was re-analyzed using Omixon HLA Explore to rule out a software problem and the same result as that found by NGS Engine software was obtained.

Study of the typing discordance showed that the mismatch between B*07:05:01:01 and B*07:06:01 is located in exon 5, a region that is not covered by SBT. Therefore, the NGS result was taken as correct, and 100% concordance was established.

In the 2 × 250 approach, average coverage for HLA across all samples was 345 reads, mappability was 62.77%, and the same genotypes were obtained (Table 3).

DISCUSSION

Over the last few years, impressive progress has been made in NGS techniques. This new high-throughput technology has begun to show its value in clinical practice, as more and more laboratories are successfully applying it in HLA typing. Nevertheless, incorporation of NGS-based KIR genotyping into routine practice has been delayed. This task is still performed by PCR-SSO or PCR-SSP, mainly because there is no available commercial kit or user-friendly analysis software for this purpose. In an attempt to fill this gap, we developed and validated a protocol based on NGS technology for genotyping the 14 KIR genes, 2 KIR pseudogenes, and all the classic HLA class I genes simultaneously.

Validation of the method was performed with 186 samples previously typed by PCR-SSO, and concordance was initially 97.84%. Nonetheless, analysis of the discordant samples with another validated technique led to the conclusion that the NGS results were correct in 100% of the samples. Of note, the 3 false-positive *KIR2DS3* detected by Luminex technology had adjusted values in the gray area (mean = 0.362, with a cut-off of 0.288). There was also a false-negative result for *KIR3DL1* with PCR-SSO technology. This error may have resulted from the presence of an unknown KIR allele with a mismatch at the binding site of the PCR-SSO specific *KIR3DL1* probe (18).

TABLE 2 | Results obtained in the 4 discordant samples by PCR-SSO, PCR-SSP, NGS, and the number of specific virtual probes obtained, considering 1 as positive and 0 as negative.

	SSO	SSP	NGS	Probes NGS		SSO	SSP	NGS	Probes NGS
ID:1									
2DL1	1	1	1	142	2DS4	1	1	1	144
2DL2	1	1	1	200	2DS5	1	1	1	210
2DL3	1	1	1	276	2DP1	1	1	1	414
2DL4	1	1	1	268	3DL1	1	1	1	184
2DL5	1	1	1	488	3DL2	1	1	1	294
2DS1	1	1	1	146	3DL3	1	1	1	180
2DS2	1	1	1	170	3DS1	1	1	1	214
2DS3	1	0	0	6	3DP1	1	1	1	322
ID:2									
2DL1	1	1	1	173	2DS4	0	0	0	11
2DL2	1	1	1	241	2DS5	1	1	1	327
2DL3	1	1	1	268	2DP1	1	1	1	529
2DL4	1	1	1	362	3DL1	0	0	0	0
2DL5	1	1	1	966	3DL2	1	1	1	407
2DS1	1	1	1	409	3DL3	1	1	1	269
2DS2	1	1	1	201	3DS1	1	1	1	426
2DS3	1	0	0	8	3DP1	1	1	1	349
ID:3									
2DL1	1	1	1	287	2DS4	0	0	0	7
2DL2	0	0	0	0	2DS5	1	1	1	367
2DL3	1	1	1	354	2DP1	1	1	1	690
2DL4	1	1	1	395	3DL1	0	0	0	4
2DL5	1	1	1	944	3DL2	1	1	1	364
2DS1	1	1	1	334	3DL3	1	1	1	251
2DS2	0	0	0	4	3DS1	1	1	1	436
2DS3	1	0	0	8	3DP1	1	1	1	478
ID:4									
2DL1	1	1	1	172	2DS4	1	1	1	150
2DL2	1	1	1	254	2DS5	1	1	1	236
2DL3	1	1	1	255	2DP1	1	1	1	578
2DL4	1	1	1	596	3DL1	0	1	1	246
2DL5	1	1	1	796	3DL2	1	1	1	428
2DS1	1	1	1	220	3DL3	1	1	1	298
2DS2	1	1	1	262	3DS1	1	1	1	224
2DS3	0	0	0	2	3DP1	1	1	1	480

Discordant results highlighted in dark gray PCR-SSO, polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide; PCR-SSP, polymerase chain reaction sequence-specific primers; NGS, next generation sequencing.

A large number of samples was included in the present validation compared with other validations of NGS KIR genotyping methods (19, 20), and it was performed with both 300- and 500-cycle sequencing, which proved to be equally useful in terms of accuracy. This finding has cost implications, as the 300-cycle MiSeq Reagent Kit is much less expensive than the 500-cycle kit.

The analytical design presented has several advantages: (1) The multiplex PCR enables amplification of all the KIR and classic HLA class I genes in one tube, (2) Amplification of full-length HLA genes enables high-resolution genotyping without ambiguities, (3) With amplification of full-length KIR genes, allelic resolution can be obtained when adequate software

becomes available, and (4) Use of 4 probes for KIR analysis increases confidence in the results. Of note, PCR-SSO usually has only 1 probe for each microsphere (equivalent to detection of 1 KIR gene).

The difference in the number of probes found per sample according to presence or absence of a gene was significant enough to establish appropriate cutoffs. However, in a few samples, the number of probes found when a gene was negative was higher than expected due to the huge number of reads involved in the analysis. To avoid errors due to variations in the read numbers per sample, we performed the calculations using percentages; that is, we quantified the percentage of probes belonging to each gene to eliminate variability due to differing read numbers per sample.

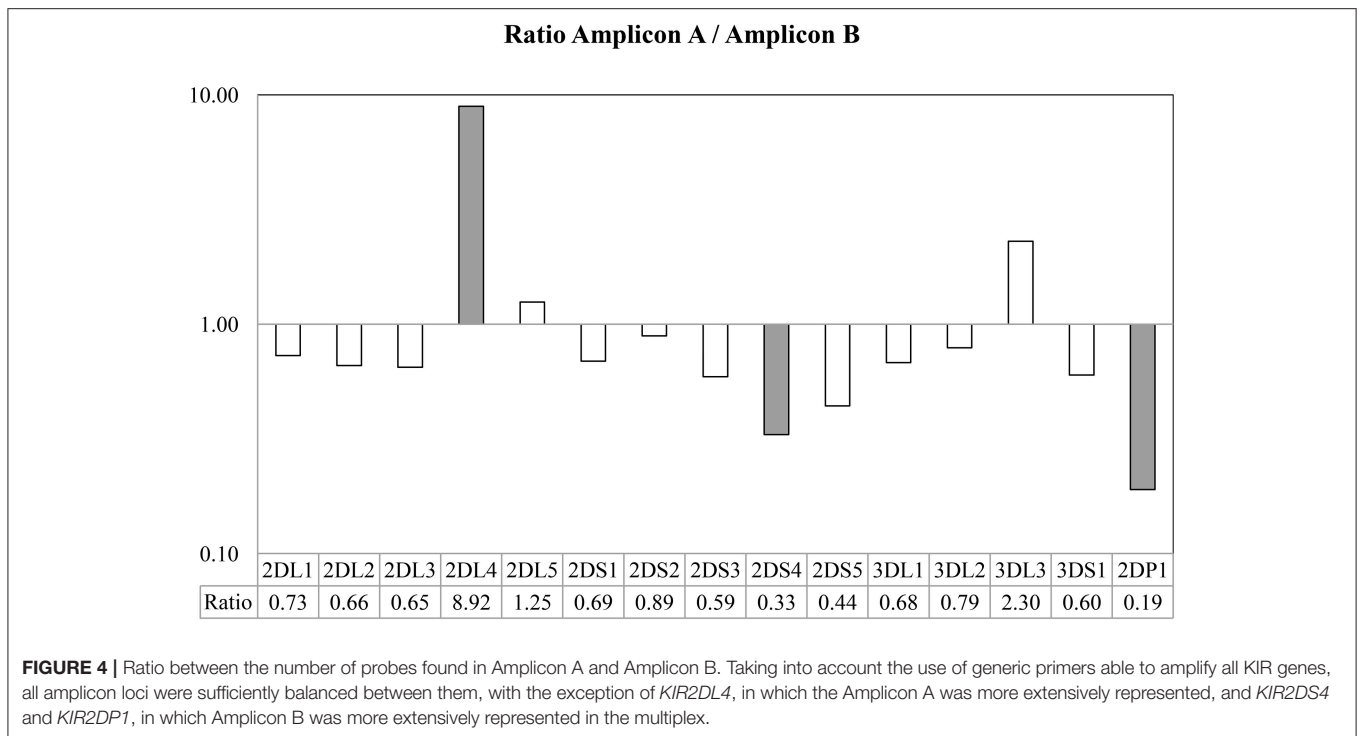


TABLE 3 | Number of reads, mappability, and read depth obtained from HLA class I sequencing using the 300-cycle or 500-cycle MiSeq Reagent Kit.

Genes	N° of reads	Mappability %	Read depth
300-Cycle MiSeq REAGENT KIT			
HLA-A	8676.45	70.79	373.51
HLA-B	8894.60	79.13	401.31
HLA-C	7569.11	78.14	359.22
MEAN	8380.05	76.02	378.01
500-Cycle MiSeq REAGENT KIT			
HLA-A	9941.22	58.34	347.96
HLA-B	10408.61	66.50	396.98
HLA-C	7475.52	63.47	290.315
MEAN	9275.115	62.77	345.08

Using this normalized approach, determination of the cutoffs to further establish the method was more reliable.

To date, 2 groups have developed NGS-based KIR genotyping approaches—Norman et al. (19), using exome capture and Manianguou et al. (20), using LR-PCR and subsequent sequencing—thus highlighting the increasing interest in characterizing KIR gene sequences. In addition to NGS-based KIR genotyping techniques, both the above-mentioned groups have developed software for high-resolution KIR genotyping. However, these require further refinement, as some discrepancies were detected when the two high-resolution approaches were used to obtain the genotype in the same 30 DNA samples (20). In contrast to these strategies, the method presented here is the first that enables simultaneous genotyping of all genes in the KIR cluster and concomitant genotyping of the ligand—HLA

class I—using NGS technology, an accurate approach that is less costly and with higher throughput capacity than these previous methods. In our laboratory, the implementation of this technique has meant a saving of approximately 50% in reagents' cost and hands-on-time procedure, compared to the separately HLA class I typing by NGS and KIR by PCR-SSO.

Implementation of our multiplex NGS method for large-scale KIR plus HLA class I genotyping will provide a reliable tool with several potential applications; for example, selection of the most appropriate donor for allogeneic HSCT in cases of hematopoietic cord blood or partially-matched related donor (haploidentical) transplantation. The main demand for KIR genotyping comes from fertility and reproductive health centers, always in combination with HLA-C genotyping. In addition, reports are emerging of an association between KIR gene content and several conditions, such as infectious diseases, cancer, and reproductive failure (21–25).

Our future work in this line will focus on analysis of the samples reported here with our own KIR-specific software (currently in development) to reach allelic resolution. However, high-resolution KIR genotyping may require changes in some aspects of the method presented, such as new calculations to determine how many samples can be simultaneously genotyped in one MiSeq run. Adjusting the balance between HLA class I and KIR primers may also be needed, as conclusive results may require higher coverage of the KIR amplicons.

In conclusion, 100% concordance was obtained in the technical validation of the KIR genotyping method presented, based on specific virtual probes. The added advantage of simultaneous high-resolution HLA class I genotyping makes this technique an attractive candidate for further development as an

effective replacement for the commonly used methods for KIR genotyping, PCR-SSO and PCR-SSP.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC performed the technique design and development, performed KIR and HLA genotyping by next-generation sequencing,

performed the interpretation and analysis of data, and wrote the manuscript. FV designed the study, supervised the technique development, and commented on the manuscript. MH commented on the manuscript. JC designed the study, supervised the technique development, and commented on the manuscript. All the authors have approved the manuscript for publication.

REFERENCES

- Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunol.* (2016) 17:1025–36. doi: 10.1038/ni.3518
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* (1997) 7:753–63.
- Yokoyama WM. Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol.* (1993) 5:67–73
- Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunology Today* (1996) 17:86–91
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* (2002) 295:2097–100. doi: 10.1126/science.1068440
- Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD—the Immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res.* (2010) 38:D863–9. doi: 10.1093/nar/gkp879
- Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. 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.* (2012) 367:800–11. doi: 10.1098/rstb.2011.0266
- Ordóñez D, Meenagh A, Gomez-Lozano N, Castano J, Middleton D, Vilches C. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes. *Genes Immun* (2008) 9:431–7. doi: 10.1038/gene.2008.34
- Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2000) 97:4778–83. doi: 10.1073/pnas.080588597
- Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol.* (2002) 168:2307–15. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2307
- Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol Rev.* (1997) 155:183–96
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. *Methods Mol Biol.* (2010) 612:365–75. doi: 10.1007/978-1-60761-362-6_25
- Nong T, Saito K, Blair L, Tarsitani C, Lee JH. KIR genotyping by reverse sequence-specific oligonucleotide methodology. *Tissue Antigens* (2007) 69(Suppl. 1):92–5. doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.762_3.x
- Lange V, Bohme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schone B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* (2014) 15:63. doi: 10.1186/1471-2164-15-63
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD—the immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res.* (2013) 41:D1234–40. doi: 10.1093/nar/gks1140
- Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39:D913–9. doi: 10.1093/nar/gkq1128
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* (2000) 7:203–14. doi: 10.1089/10665270050081478
- Planelles D, Vilches C, Gonzalez-Escribano F, Muro M, Gonzalez-Fernandez R, Sanchez F, et al. Report from the first and second spanish killer immunoglobulin-like receptor genotyping workshops: external quality control for natural killer alloreactive donor selection in haploidentical stem cell transplantation. *Transpl Proc.* (2016) 48:3043–5. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.07.037
- Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Marin WM, Norberg SJ, Ashouri E, et al. Defining KIR and HLA class I genotypes at highest resolution via high-throughput sequencing. *Am J Hum Genetics* (2016) 99:375–91. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.06.023
- Manianguou B, Legrand N, Alizadeh M, Guyet U, Willem C, David G, et al. Killer immunoglobulin-like receptor allele determination using next-generation sequencing technology. *Frontiers in immunology* (2017) 8:547. doi: 10.3389/fimmu.2017.00547
- Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, Guinan KJ, Hagan R, Irish HCVR, et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:5736–41. doi: 10.1073/pnas.1016358108
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* (2004) 305:872–4. doi: 10.1126/science.1097670
- Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics* (2010) 62:767–71. doi: 10.1007/s00251-010-0480-x
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* (2004) 200:957–65. doi: 10.1084/jem.20041214
- Long W, Shi Z, Fan S, Liu L, Lu Y, Guo X, et al. Association of maternal KIR and fetal HLA-C genes with the risk of preeclampsia in the Chinese Han population. *Placenta* (2015) 36:433–7. doi: 10.1016/j.placenta.2014.05.008

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Closa, Vidal, Herrero and Caro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Secció 2.

Impacte de l'aplicació del mètode desenvolupat

2. ARTICLE 2. DISTRIBUTION OF HUMAN KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS AND LIGANDS AMONG BLOOD DONORS OF CATALONIA

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro

HLA 2019 Nov.

DOI 10.1111/tan.13754

Resum

Els gens KIR pertanyen a una família de gens codificants per uns receptors molt diversos presents en les cèl·lules NK i en alguns subtipus de cèl·lules T. Els seus lligands són les molècules HLA de classe I i, igual com aquestes molècules, presenten un alt nivell polimòrfic. Aquest estudi és el primer a determinar la diversitat dels gens KIR i HLA de classe I en 445 donants de sang no relacionats residents a Catalunya (una regió del nord-est d'Espanya) i que es van registrar al Banc de Sang i Teixits de Barcelona entre el 2017 i el 2018. L'estudi va ser dut a terme utilitzant un mètode recentment desenvolupat i validat pel nostre grup, basat en la seqüenciació de nova generació i que es caracteritza per una important disminució de costos i increment de l'efectivitat. S'han observat 38 genotips KIR diferents. Les freqüències dels haplotips van ser 24.49% per AA i 75.51% per BX. El genotip més freqüent, observat en 109 individus (24.49%) era el genotip ID 1. Disset genotips van ser observats en només un individu. Tretze individus eren portadors de tots els gens KIR (genotip ID 6). Vam detectar 46 al·lels d'*HLA-A*, 63 d'*HLA-B* i 40 d'*HLA-C*. La majoria dels individus van resultar ser heterozigots per C1/C2 (42.24%), un 3

Un 8.43% eren homozigots per C1, i finalment 19.33% homozigots per C2. La parella KIR-HLA més freqüent era *KIR3DL1-HLABw4+*, present en el 75.73% dels casos. No es van trobar diferències entre les freqüències KIR trobades en la cohort

RESULTATS

de Catalunya comparat amb altres cohorts de la península Ibèrica. Els resultats obtinguts en aquest estudi seran útils per futurs treballs que avaluïn la importància de les associacions KIR-ligand en certes malalties.

ORIGINAL ARTICLE

Distribution of human killer cell immunoglobulin-like receptors and ligands among blood donors of Catalonia

Laia Closa^{1,2} | Francisco Vidal^{2,3,4} | Maria J. Herrero¹ | Jose L. Caro^{2,5}

¹Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain

²Department of Immunology, Hospital Clínic, Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute, Autonomous University of Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona, Spain

³Congenital Coagulopathy Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain

⁴CIBER of Cardiovascular Diseases, Barcelona, Spain

⁵Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Correspondence

Jose L. Caro, Department of Immunology, Hospital Clínic, Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute-Autonomous University of Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona, Spain.
Email: jlcaro@clinic.cat

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) belong to a diverse family of receptors present in NK cells and certain subsets of T cells. They bind to HLA class I molecules and, such as these, are highly polymorphic. This study is the first to determine KIR gene content diversity and perform high-resolution genotyping of corresponding HLA class I ligands in 445 unrelated blood donors resident in Catalonia (northeast Spanish region) and registered in the Blood and Tissue Bank of Barcelona between 2017 and 2018. The study was performed using a new next-generation sequencing method developed and validated by our group, with an important hands-on-time reduction and very cost-effectiveness. Thirty-eight KIR genotypes were observed. Haplotype combination frequencies were 24.49% for AA, 75.51% for BX. The most frequent genotype, found in 109 individuals (24.49%), was genotype ID 1. Seventeen genotypes occurred only once. Thirty individuals carried all KIR genes (genotype ID 6). We detected 46 HLA-A, 63 HLA-A-B, and 40 HLA-A-C alleles. A majority of individuals were heterozygous for C1/C2 (42.24%), 38.43% were homozygous for C1, and 19.33% were homozygous for C2. The most common KIR-HLA ligand pair was KIR3DL1-Bw4+, present in 75.73% of cases. No differences were found in KIR gene frequencies between the Catalan cohort and other Iberian Peninsula populations. Our findings will be useful for guiding further research evaluating the functional significance of KIR-ligand associations in specific diseases.

KEYWORDS

Frequencies, HLA, KIR

1 | INTRODUCTION

NK cells were originally described as lymphocytes with huge numbers of granules and high cytotoxicity against tumor cells. After many years of research into the non-specific ability of these cells to destroy tumors, it is known that they belong to a lineage of lymphocytes whose main effector functions include cytotoxicity and

cytokine production.¹ Unlike T and B cells, NK cells do not have a specific antigen detection system. Their effector ability is controlled by a complex network of inhibitory and activating cell surface receptors and receptor-ligand interactions. These receptors produce signals, the balance of which determines whether NK cells are activated or inhibited and to which extent. Increased activation and inhibition confers susceptibility to or protection against a

range of infections²⁻⁴ and malignancies,⁵ and in the case of pregnancy, NK cells have an important role in ensuring tolerance towards the fetus allograft.⁶ In short, research has clearly demonstrated that NK cells have a crucial role in immune response regulation.

HLA class I molecules are encoded by genes located within the major histocompatibility complex on chromosome 6,⁷ and act as ligands for various human lymphocyte receptors. This pathway allows NK cells to kill malignant, infected, or otherwise stressed cells.⁸ Two hypotheses have been proposed to explain the activity of NK cells: the “missing self” hypothesis and the “induced self” hypothesis.^{9,10} The missing self-hypothesis suggests that NK cells attack target cells with a low surface density of HLA class I molecules (eg, virally infected or tumor cells). By binding to inhibitory receptors, HLA class I molecules allow the receptors to transmit inhibitory signals and accordingly prevent the NK cells from attacking the target cells. The induced self-theory suggests that certain activated NK cell receptors are able to recognize certain molecules (activating receptor ligands) expressed only on the surface of infected, malignant, or otherwise stressed cells, enabling thus their elimination. The NK cell receptor repertoire thus prevents NK autoreactivity against healthy cells and allows the killing of target cells with altered HLA class I expression and upregulated stress-inducible antigens.¹¹

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) are highly polymorphic receptors that have a key role in the regulation of human NK cell function. They regulate the

cytotoxic activity of these cells through activating and mostly inhibitory signals resulting from their binding to HLA class I molecules and other ligands that are still unknown (mostly activating KIR ligands).¹²⁻¹⁴ Inhibitory KIRs have long cytoplasmic tails containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs that on KIR-ligand engagement become phosphorylated, enabling them to recruit tyrosine phosphates and causing NK cells to switch off their responses. Activating KIRs, by contrast, have a positively charged amino acid residue in their transmembrane region that allows them to interact with DAP-12, an adaptor signaling molecule with an immunoreceptor tyrosine-based activating motif.¹⁵⁻¹⁷

The KIR locus is both polygenic and extremely polymorphic. This structural variation results in multiple gene-content haplotypes, which explains the significant diversity observed both within and between populations. Extensive allelic variability has also been identified, particularly in the case of inhibitory genes.¹⁸ The significant KIR gene content diversity observed in and across populations can be explained by the rapid evolution of these genes through mutation and recombination resulting in multiple alleles at each locus.¹⁹

KIR gene content has been organized into group A and group B haplotypes combinations (Figure 1). A haplotypes profiles have invariant gene content and just one activating KIR (KIR2DS4), while B haplotypes have more variable content and a greater number of activating KIRs.^{14,20} Each haplotype has four KIR genes that are present in almost all

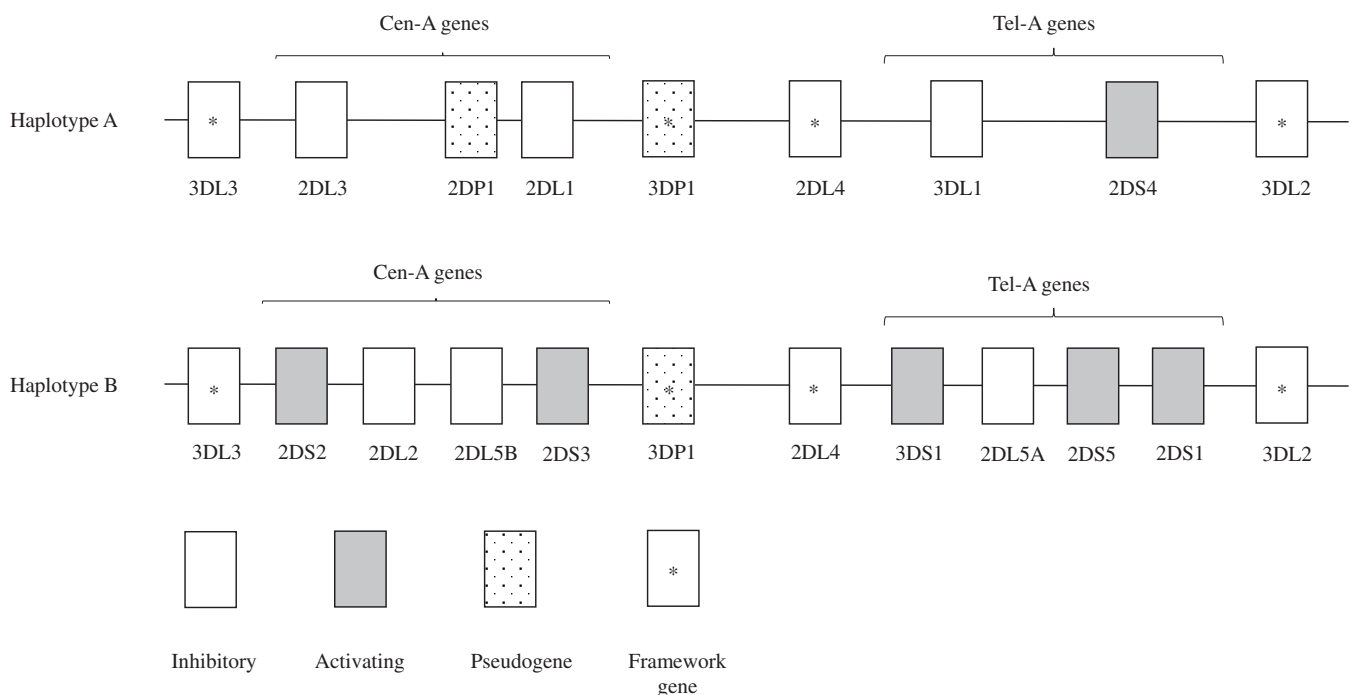


FIGURE 1 Representative KIR A and B haplotype combinations

individuals. These genes, known as framework genes, are KIR3DL3 and KIR3DP1, which delimit the centromeric region, and KIR2DL4 and KIR3DL2, which delimit the telomeric region. The largest contributor to the diversity of the KIR region is its large number of single nucleotide polymorphisms. The ImmunoPolymorphism Database contains data on 977 KIR alleles (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>; Release 2.8.0 November 30, 2018).^{21,22} The gene diversity observed between populations is due to the high organizational complexity of this cluster.²³

Functionally speaking, HLA class I molecules are classified into different categories based on the amino acid sequence determining the KIR-binding epitope. These categories are based on the products of these three distinct genes, HLA-A, HLA-B, and HLA-C. HLA-C is further divided into HLA-C group 1 (C1) and HLA-C group 2 (C2) depending on the amino acid located at position 80 of the alpha-1 domain of the alpha helix.²⁴ The inhibitory receptors KIR2DL2 and KIR2DL3 and the activating receptor KIR2DS2 bind to HLA-C1, while the inhibitory receptor KIR2DL1 and the activating receptor KIR2DS1 bind to HLA-C2. HLA-A23/-A24 and -A32 alleles only presents Bw4 motif, on the other hand, HLA-B may have Bw4 or Bw6 epitopes, although only HLA-Bw4 serves as a ligand for KIR3DL1.²⁵ Bw4 motifs with isoleucine at position 80 (Bw480I) have a higher affinity for KIR compared with the motifs with a threonine in the same position (Bw480T).²⁶ Finally, constitutive KIR3DL2 binds to HLA-A3 and HLA-A11.²⁷ The complexity of the KIR-ligand binding goes even further, as, for example, the affinity of 2DL2/L3/S2 recognizing HLA-C1/C2 may be variable, there are different HLA allotypes recognized by 2DS4, and also, there are non-HLA ligands interacting with several KIR.

Considering the high diversity of KIR loci and the important role that KIR-HLA ligand interactions have in the human immune system, characterization studies of healthy individuals from different populations are essential for guiding studies on NK cells. Few studies have analyzed the content of KIR genes and their corresponding HLA in the Spanish population. In this study, the first of its kind, we analyzed the distribution of KIR genotypes/haplotype combinations in a large number of unrelated Catalan blood donors and investigated high-resolution genotypes of corresponding HLA class I ligands. We also compared our results with those for other populations in the Iberian Peninsula.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Population characteristics

Catalonia is a region in northeast Spain with a surface area of 32 113 km² and a population of 7 543 825 inhabitants

according to the 2018 census and is home to about 16% of Spain's total population. In 1900, the population of Catalonia was near 1 million people and in 1970 it was near 5 million. The sizeable increase of the population was due to the demographic boom in Spain during the 60s and early 70. In Catalonia, that wave of internal migration arrived from several regions of Spain, especially from Andalusia, Murcia and Extremadura. Many immigrants that now reside in Catalonia came from Africa and Latin America while smaller populations came from Asia and Eastern Europe (www.idescat.cat). Catalonia is bordered by France and Andorra to the north, Aragon to the west, Valencia to the south, and the Mediterranean Sea to the east. KIR and HLA class I genotyping was performed using 445 DNA samples from unrelated blood donors resident in Catalonia registered in the Barcelona Blood and Tissue Bank (BST) between 2017 and 2018. There was a similar proportion of female and male donors (236 females, 53.03% vs 209 males, 46.97%) and their ages ranged from 18 to 60 years (mean \pm SD 34.8 \pm 9.8).

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local research ethics committee. All participants provided written informed consent.

2.2 | KIR-HLA class I genotyping

Blood samples of 4 mL from unrelated healthy individuals representing the Catalan population were obtained from the blood donation and sent to the BST's Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory for analysis. The QIA Symphony DNA kit (Qiagen) was used for genomic DNA extraction following the manufacturers' instructions. Genomic DNA was genotyped for the presence or absence of the following KIR genes: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DP1, and KIR3DP1. HLA class I molecules (HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes) were genotyped at high resolution. Both loci were genotyped simultaneously by multiplex long-range PCR (LR-PCR) using a previously described next-generation sequencing method designed by our group.²⁸ LR-PCR amplifications were performed in a Veriti Thermal Cycler using the SequalPrep Long PCR Kit with dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). One μ L of each PCR product was screened for amplicons on 1% agarose gel and visualized by SYBR safe staining. The library was prepared (enzymatic fragmentation, adapter ligation, and barcoding) from the PCR pools using the NGSgo kit (GenDx, Utrecht, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The final denatured library was sequenced using a NextSeq or MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA,

USA). KIR genotype analysis was performed by in-silico hybridization of specific virtual probes using a previously validated method.²⁸ HLA class I genotype determination was performed with NGSengine 2.9.1 software (GenDx) using the IMGT 3.31.0 database as a reference.

2.3 | Assignment of KIR gene content and KIR haplotype combinations

Carriers and non-carriers of KIR-2DL2, -2DL5, -3DS1, -2DS1, -2DS2, -2DS3, and -2DS5 were classified as B and A profile carriers, respectively. Genotype IDs for each sample were obtained from the Allele Frequency Net Database (AFND) (<http://www.allelefrequencies.net>), which assigns IDs according to the combination of KIR genes present.

2.4 | Statistical analysis

The frequency of each KIR gene in the study population was determined by direct counting of positive and negative loci. KIR-ligand correlations were calculated using SPSS software version 25.0. Differences in carrier frequencies between the Catalan and other Iberian Peninsula populations analyzed were calculated using Spearman's rank correlation coefficients and the χ^2 test of independence in the native

stats package in R. All statistical measures were considered significant at $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | KIR gene frequencies in the Catalan cohort

We calculated genotype frequencies for all KIR genes (including two pseudogenes) and estimated combination of haplotypes and frequencies of HLA-Bw4, HLA-C1, HLA-C2, and HLA-A3/11 ligands. The genotype data for the 445 samples analyzed will be submitted to the freely accessible AFND²⁹ under the name Catalan KIR. There were 109 AA haplotype combination carriers (24.49%), 336 BX carriers (75.51%). KIR ligand and gene carrier frequencies are shown in Figure 2A,B, respectively. Inhibitory genes were more common than activating genes, which is consistent with general findings for the Caucasian population. With the exception of KIR2DS4 (with a frequency of 95.96%), all the activating genes were present at a low frequency, ranging from 34.83% for KIR2DS3 to 60.22% for KIR2DS2. Again, as reported for other Caucasian populations, KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3, and the KIR3DP1 pseudogene were detected in all individuals analyzed. Thirty-eight of the 625 KIR genotypes listed in the AFND were detected, and the most common genotypes

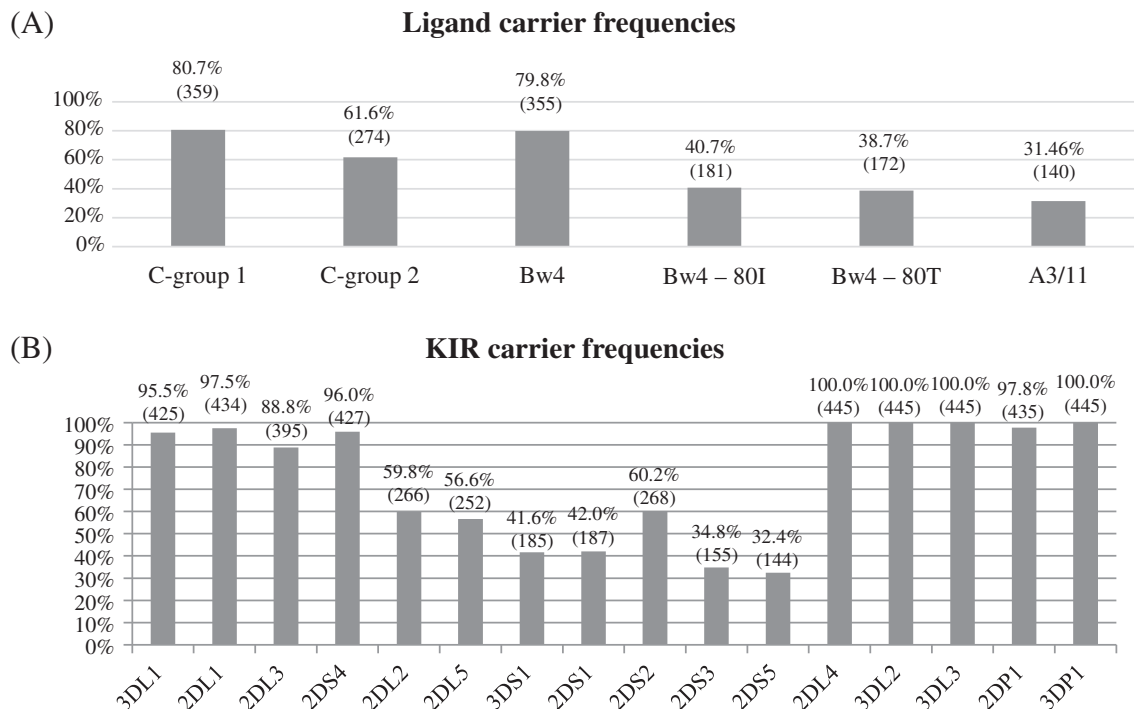


FIGURE 2 A) Percentage and number of individuals carrying known KIR ligands. B) Percentage and number of individuals carrying of KIR genes in the Catalan population

TABLE 1 Distribution of KIR gene profiles in the Catalan population (N = 445)

3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	Haplotype	Genotype	Carrier frequency	N
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	AA	1	24.49%	109
1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	4	15.96%	71
1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	2	11.01%	49
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	5	9.21%	41
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	3	7.42%	33
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	6	6.74%	30
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	7	4.49%	20
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	71	3.82%	17
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	90	1.80%	8
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	BX	72	1.57%	7
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	73	1.57%	7
0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	70	1.57%	7
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	8	1.35%	6
0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	BX	69	1.12%	5
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	11	0.90%	4
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	13	0.90%	4
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	94	0.45%	2
0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	154	0.45%	2
0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	159	0.45%	2
1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	89	0.45%	2
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	9	0.45%	2
1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	BX	204	0.22%	1
1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	118	0.22%	1
1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	BX	106	0.22%	1
1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	391	0.22%	1
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	28	0.22%	1
0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	81	0.22%	1
1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	15	0.22%	1
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	BX	86	0.22%	1
0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	117	0.22%	1

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

3DL1	2DL1	2DL3	2DL4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	Haplotype	Genotype	Carrier frequency	N
1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	12	0.22%	1
1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	27	0.22%	1
1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	10	0.22%	1
1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	BX	188	0.22%	1
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	91	0.22%	1
1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	BX	76	0.22%	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	BX	93	0.22%	1
0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	BX	80	0.22%	1

Note: Gray shades represent presence of the gene.

are concentrated in only eight genotypes, which represent the 83.15% of the individuals analyzed. Genotype 1 was the most frequent genotype (present in 109 individuals, 24.49%). Thirty individuals carried all 16 KIR genes (genotype ID 6) (Table 1).

3.2 | KIR-ligand combinations in the Catalan cohort

We detected 46 HLA-A alleles, 63 HLA-B alleles, and 40 HLA-C alleles. No new HLA class I variants were discovered. On calculating the frequencies of HLA ligands recognized by KIR genes, we found no significant correlations between specific KIR genes and HLA ligands. In total, 42.25% of individuals were heterozygous for C1/C2, 38.43% homozygous for C1, and 19.33% homozygous for C2. The Bw4 epitope was present in 79.7% of donors and the A3/11 in 31.46%. The most frequent KIR-ligand pair was KIR3DL1-Bw4+ (present in 75.73% of cases). There were 320 carriers of KIR2DL3 and its ligand C1 (71.91%), and 31.46% of individuals positive for KIR3DL2 (all the individuals analyzed) also carried its corresponding ligand (*HLA-A*03, A*11*) (Table 2). As expected, all individuals bore at least one KIR-ligand pair. The most common combination (24.49%) was 2DL1 + C2 // 2DL2/3 + C1 // 3DL1 + Bw4. No individuals had 3DL1 + Bw4 // 3DL2 + A3/11 as the only combination. Finally, 35 individuals (7.87%) had all the KIR-ligand pairs analyzed (Table 3).

3.3 | KIR gene frequencies comparison between Iberian Peninsula populations

The comparison of KIR gene frequencies between our Catalan cohort and five other Iberian Peninsula populations in the AFND (Portugal, Granada and Seville [south Spain] and Basque Country and Cantabria [north Spain]) is shown in Table 4. All the pairwise comparisons showed a high degree of correlation (Spearman Rho >0.88) (Figure 3). However, comparison of activating KIR gene frequencies between Catalonia and Basque Country and Cantabria by means of the χ^2 test showed a certain degree of divergence that neared statistical significance (P = .09 and 0.07, respectively).

4 | DISCUSSION

Assessment of KIR gene content and the presence of corresponding ligands in large healthy cohorts of different populations is essential to guide further research into

TABLE 2 Number and frequency of KIR-ligand pairs in the Catalan population

KIR/LIGAND	+,+ N (%)	+,- N (%)	-,+ N (%)	-,- N (%)
2DL1/C2	267 (60)	167 (37.52)	7 (1.57)	4 (0.89)
2DL2/C1	209 (46.96)	57 (12.80)	150 (33.70)	29 (6.51)
2DL3/C1	320 (71.91)	75 (16.85)	39 (8.76)	11 (2.47)
2DS1/C2	109 (24.49)	78 (17.52)	165 (37.07)	93 (20.89)
3DL1/Bw4	337 (75.73)	87 (19.55)	17 (3.82)	3 (0.67)
3DL2/A3/11	140 (31.46)	305 (68.53)	0 (0.00)	0 (0.00)
2DS2/C1	210 (47.19)	58 (13.03)	149 (33.48)	28 (6.29)
3DS1/Bw4	151 (33.93)	34 (7.64)	204 (45.84)	56 (12.58)

TABLE 3 Number and type of inhibitory KIR /HLA ligand pair combinations in the Catalan population (N = 445)

	KIR + HLA ligand pairs	Number (%) of individuals (frequency)	
1	2DL1 + C2	11 (2.47%)	52 (11.68)
	2DL2/3 + C1	23 (5.18%)	
	3DL1 + Bw4	17 (3.83%)	
	3DL2 + A3/11	1 (0.22%)	
2	2DL1 + C2 // 2DL2/3 + C1	20 (4.49%)	196 (44.04)
	2DL1 + C2 // 3DL1 + Bw4	49 (11.01%)	
	2DL1 + C2 // 3DL2 + A3/11	9 (2.02%)	
	2DL2/3 + C1 // 3DL1 + Bw4	92 (20.67%)	
	2DL2/3 + C1 // 3DL2 + A3/11	26 (5.84%)	
	3DL1 + Bw4 // 3DL2 + A3/11	0 (0.00%)	
	3	2DL1 + C2 // 2DL2/3 + C1 // 3DL1 + Bw4	
	2DL1 + C2 // 2DL2/3 + C1 // 3DL2 + A3/11	20 (4.49%)	
	2DL2/3 + C1 // 3DL1 + Bw4 // 3DL2 + A3/11	33 (7.42%)	
4	2DL1 + C2 // 2DL2/3 + C1 // 3DL1 + Bw4 // 3DL2 + A3/11	35 (7.87%)	35 (7.87)

the role of KIR genes in immune surveillance. In the absence of precise characterization of KIR-ligand pairs in healthy populations, there is a risk that certain haplotype combinations or genotype profiles could be mistakenly

linked to specific diseases. The high-throughput potential of the genotyping method used in this study reaches the acquisition of the KIR-HLA result of an entire 96-well-plate in 3 working days,²⁸ highlighting the capacity of this genotyping method used for efficient analysis of KIR-ligand data in large-scale studies.

Our study is the first to analyze the distribution of KIR genes, genotypes, and haplotype combinations in a Catalan cohort. As predicted, gene and ligand frequencies were similar to those reported for other Caucasian populations in Spain and other parts of Europe. We observed no significant differences with findings for five other Iberian Peninsula cohorts in the AFND, although near-significant differences were observed for activating KIR gene frequencies between the Catalan population and populations in the Basque Country and Cantabria, which have historically been the most geographically isolated populations in the Iberian Peninsula.

The KIR and HLA clusters, located respectively on chromosomes 19 and 6, segregate independently, explaining why individuals expressing certain KIR receptors may lack the corresponding ligands. This divergence may also explain the increased diversity of KIR-HLA combinations in humans.³⁰ In the Catalan cohort, like most Caucasian cohorts, activating KIR genes showed more heterogeneous frequencies and lower presence/absence values compared with inhibitory genes. These differences in frequency are probably due to stronger natural selection³¹ and the more recent origin of activating KIR genes, which may originate from an ancestor inhibitory gene.³² A haplotype combinations were also more frequent than B, supporting previous findings for Caucasian populations.^{20,33,34} This similarity was also observed for KIR gene content-based genotype IDs, with genotype 1 being the most common.³⁵

The KIR-ligand analysis performed in this study did not go into much detail regarding the variable affinity of ligands nor the differentiation of the different allotypes recognized by KIR2DS4. Even though, we detected no significant

TABLE 4 Carrier frequencies of KIR genes in the Catalan population and five other Iberian Peninsula populations in the Allele Frequency Net Database

F	Basque country (N = 71)	Cantabria (N = 230)	Granada (N = 100)	Seville (N = 278)	Catalonia (N = 445)	Portugal (N = 65)
3DL1	88.7	92.2	91.0	95.0	95.51	90.8
2DL1	98.6	98.3	94.0	95.3	97.53	100.0
2DL3	95.8	88.7	85.0	85.6	88.76	89.2
2DS4	90.1	91.7	91.0	95.0	95.96	92.3
2DL2	62.0	46.5	57.0	59.4	59.78	57.5
2DL5	56.3	59.1	52.0	54.7	56.63	53.80
3DS1	62.0	46.1	39.0	41.4	41.57	40.6
2DS1	54.9	46.5	39.0	41.4	42.02	36.90
2DS2	63.4	46.1	58.0	59.4	60.22	56.9
2DS3	26.8	30.4	34.0	31.7	34.83	30.80
2DS5	45.1	39.1	26.0	35.6	32.36	27.70
2DL4	100.0	99.6	100.0	100.0	100.00	100.00
3DL2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00	100.00
3DL3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00	100.00
2DP1	98.6	98.3	94.0	95.3	97.75	96.90
3DP1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00	100.00

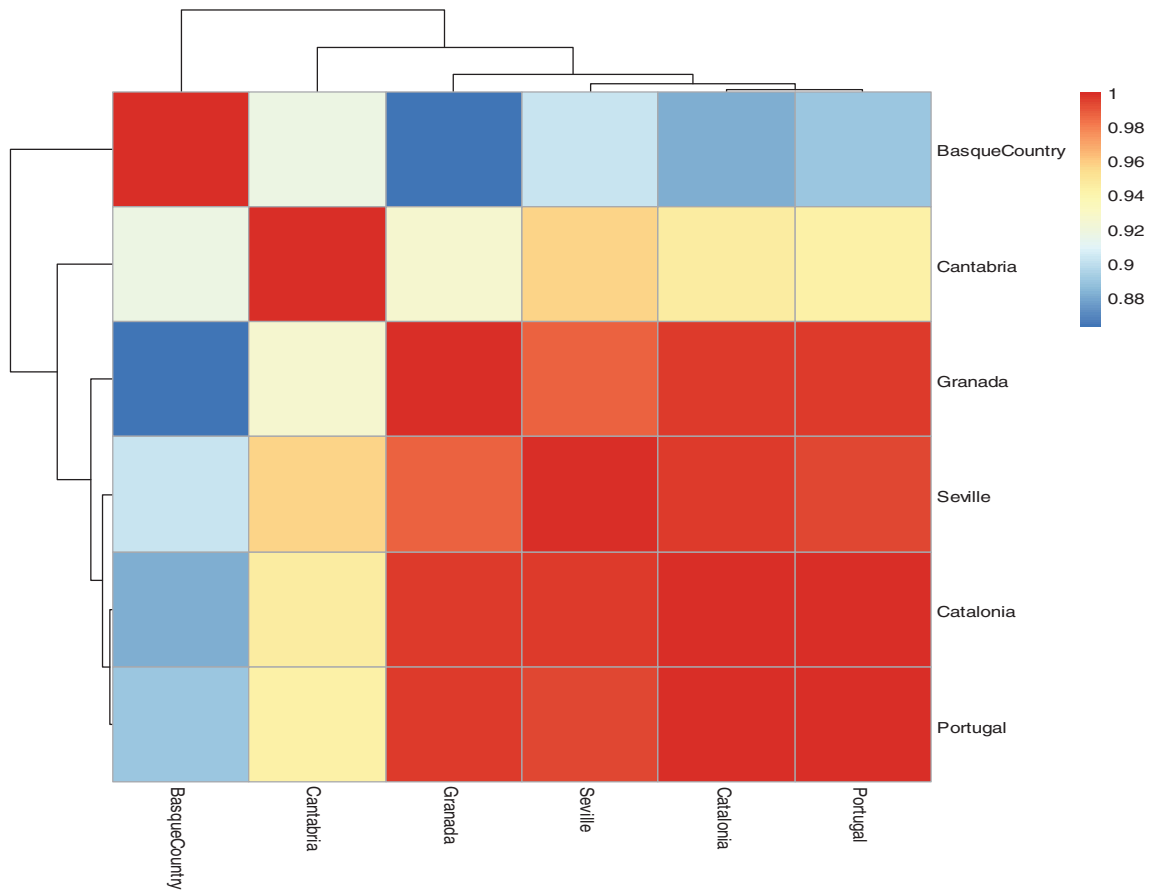


FIGURE 3 Two-dimensional clustered heatmap based on carrier frequencies for the activating KIR loci in the 5 Iberian Peninsula populations included in this study. All the pairwise comparisons showed a high degree of correlation. The greatest distances were observed for the Basque Country and Cantabria

correlations between KIR genes and their corresponding receptor ligands for any of the pairs analyzed, supporting previous findings for other populations.³⁵ As mentioned, this lack of correlation could be due to the fact that the loci are positioned on different chromosomes and segregate independently. KIR3DL1/Bw4 was present in 337 individuals in our cohort (75.73%). KIR3DL1/Bw4 is the most frequent KIR-ligand pair detected in almost all cohorts, and in most populations, about 75% of individuals have a cognate ligand for the KIR3DL1 receptor.^{11,36} The four framework genes were, as expected, present in 100% of our population, supporting previous reports for Caucasian,^{20,33,37} African,³⁸ and Asian^{38,39} populations. However, the KIR3DL2 ligands (HLA-A3 and HLA-A11), were only carried by 9.53% and 6.45% of individuals, respectively.

All the individuals had at least one KIR-ligand pair and over 80% had two or three (Table 3). Again, these results are not surprising, as all HLA-C encode a KIR ligand and these receptors recognize those ligands in a reasonably high frequency. Moreover, the inhibitory KIRs are more common than activating KIRs and the four framework genes are all inhibitory, the likelihood of not having any inhibitory KIR-ligands is reduced.

In conclusion, we have shown that the distribution of KIR-ligands in a Catalan cohort is similar to that in other Caucasian cohorts. Finally, all the data collected for this study will be used as control data for disease-association studies at our center.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Laila Closa  <https://orcid.org/0000-0001-8007-5077>

Francisco Vidal  <https://orcid.org/0000-0001-8089-4945>

REFERENCES

- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376.
- Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:5736-5741.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 2004;305:872-874.
- Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics.* 2010;62:767-771.
- Ghanadi K, Shayanrad B, Ahmadi SA, Shahsavari F, Eliasy H. Colorectal cancer and the KIR genes in the human genome: a meta-analysis. *Genomics Data.* 2016;10:118-126.
- Chazara O, Moffett A. Association of maternal KIR and fetal HLA-C genes with the risk of preeclampsia in the Chinese Han population, long et al. *Placenta.* 2015;36:967.
- Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301-323.
- Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:149-176.
- Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244.
- Gregoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007;220:169-182.
- Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens.* 2013;82:363-373.
- Yokoyama WM. Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol.* 1993;5:67-73.
- Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today.* 1996;17:86-91.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997;7:753-763.
- Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol.* 1994;55:341-380.
- Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev.* 1997;155:127-133.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:359-393.
- Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD—the immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:D863-D869.
- Ordóñez D, Meenagh A, Gomez-Lozano N, Castano J, Middleton D, Vilches C. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes. *Genes Immun.* 2008;9:431-437.
- Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation.* 1999;68:1784-1789.
- Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol.* 2002;168:2307-2315.
- Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol Rev.* 1997;155:183-196.
- Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. 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.* 2012;367:800-811.
- Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev.* 2001;181:158-169.

25. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008;112:708-710.
26. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol*. 2005;175:5222-5229.
27. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*. 2004;34:1673-1679.
28. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Design and validation of a multiplex KIR and HLA class I genotyping method using next generation sequencing. *Front Immunol*. 2018;9:2991.
29. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Melo Dos Santos EJ, et al. Allele frequency net database. *Methods Mol Biol*. 2018;1802:49-62.
30. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol*. 2011;46:216-228.
31. Abi-Rached L, Parham P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *J Exp Med*. 2005;201:1319-1332.
32. Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics*. 2006;7:209.
33. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*. 2001;52:195-205.
34. Toneva M, Lepage V, Lafay G, et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens*. 2001;57:358-362.
35. Burek MK, Grubic Z, Stingl K, Zunec R. Distribution of KIR genes in the Croatian population. *Hum Immunol*. 2013;74:952-956.
36. Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet*. 2007;39:1092-1099.
37. Niokou D, Spyropoulou-Vlachou M, Darlamitsou A, Stavropoulos-Giokas C. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Hum Immunol*. 2003;64:1167-1176.
38. Norman PJ, Carrington CV, Byng M, et al. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and south Asian populations. *Genes Immun*. 2002;3:86-95.
39. Yawata M, Yawata N, McQueen KL, et al. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics*. 2002;54:543-550.

How to cite this article: Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Distribution of human killer cell immunoglobulin-like receptors and ligands among blood donors of Catalonia. *HLA*. 2019;1-10. <https://doi.org/10.1111/tan.13754>

3. ARTICLE 3. HIGH-THROUGHPUT GENOTYPING OF *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* AND *MICB* AND ANALYSIS OF FREQUENCY DISTRIBUTIONS IN HEALTHY BLOOD DONORS FROM CATALONIA

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro

En revisió, [HLA](#)

Resum

Igual que les molècules HLA de classe I, algunes molècules no clàssiques HLA de classe I així com MICA i MICB, actuen com a lligands dels receptors KIR i del receptor NKG2D de les cèl·lules NK. Tot i que aquests gens són menys polimòrfics que HLA de classe I, alguns estudis n'han analitzat la seva associació amb diverses malalties. Per determinar la seva distribució al món, cal informació sobre les seves respectives freqüències al·lèliques en donants sans de diferents poblacions. Aquest estudi és el primer a analitzar en alta resolució les freqüències de *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB* utilitzant una nova estratègia mitjançant NGS. Hem analitzat 96 DNA de donants de sang no emparentats residents a Catalunya. Utilitzant els primers dos camps de la nomenclatura HLA, hem detectat sis al·lells de *HLA-G* i dos de *HLA-F*. Els al·lells més freqüents van ser *HLA-G*01:01* (77.08%) i *HLA-F*01:01* (84.90%). Quan es van analitzar els quatre camps, es van detectar 16 i 10 al·lells diferents, respectivament. Dinou al·lells es van detectar en el cas de MICA i 10 en el cas de MICB. Els més freqüents van ser *MICA*008:01* (16.15%) i *MICB*005:02* (46.84%). Totes les freqüències es trobaven en equilibri Hardy Weinberg menys MICA. A més a més, també vam estimar les freqüències haplotípiques i calcular el corresponent desequilibri de lligament (LD), el qual apareix en alguns pocs al·lells. Finalment, es va observar un fort LD entre *MICA* i *HLA-B* (utilitzant dades d'un estudi previ). Aquestes dades seran útils per dur a terme futures investigacions avaluant el rol funcional d'aquests gens en diferents malalties i poblacions.

High-throughput genotyping of *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* and *MICB* and analysis of frequency distributions in healthy blood donors from Catalonia

Non-classical HLA class I genotyping by NGS

Laia Closa,^{1,2} Francisco Vidal,^{2,3,4} Maria J. Herrero,¹ and Jose L. Caro,^{2,5}

¹ *Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain,* ² *Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute- Autonomous University of Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona, Spain,* ³ *Congenital Coagulopathy Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain,* ⁴ *CIBER of Cardiovascular Diseases, Spain* ⁵ *Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.*

Communicating author: Jose Luis Caro, jlcaro@clinic.cat , Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Similarly to HLA class I molecules, certain non-classical *HLA class I* genes and MHC class I polypeptide-related sequences A and B (*MICA* and *MICB*) act as ligands for KIR and NKG2D natural killer receptors. Although these genes are less polymorphic than *HLA class I*, few studies have analyzed their association with diseases. Information on allele frequencies in healthy donors is needed to map their distribution worldwide. This study is the first to analyze high-resolution *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* allele frequencies using a novel high-throughput next generation-sequencing method. We analyzed DNA samples from 96 unrelated blood donors resident in Catalonia, Spain and registered in the Barcelona Blood and Tissue Bank. Using the first two fields of the HLA nomenclature, we detected six *HLA-G* and two *HLA-F* alleles. The most frequent alleles were *HLA-G*01:01* (77.08%) and *HLA-F*01:01* (84.90%). When the four fields were analyzed, we detected 16 and 10 alleles, respectively. Nineteen alleles were detected for *MICA* and 10 for *MICB*. The most frequent alleles in these cases were *MICA*008:01* (16.15%) and *MICB*005:02* (46.84%). All frequencies were in Hardy Weinberg equilibrium except *MICA*. We also estimated maximum-likelihood haplotype frequencies and calculated corresponding linkage disequilibrium (LD) values and found that few allele pairs were in disequilibrium. Strong LD between *MICA* and *HLA-B* (using data from a previous study) was observed. Our findings will be useful for guiding further research evaluating the functional role of these genes in different diseases and populations.

Keywords: non-classical HLA class I, MICA, MICB, NGS, frequencies

INTRODUCTION

The major histocompatibility complex (MHC), with over 200 closely linked genes, contains the most polymorphic genes, the most gene dense parts, and the highest diversity of functional gene clusters of the human genome.(1) Genes at the classical human HLA class I and II loci are probably some of the best known of all MHC genes, as they have an important role in peptide presentation to antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells. These loci are also extraordinarily polymorphic,(2,3) explaining the considerable variations observed in allele and haplotype frequencies between populations. Non-classical HLA class I loci (*HLA-E*, *HLA-G*, and *HLA-F*), and MHC class I polypeptide-related sequences A and B (*MICA* and *MICB*), also located on chromosome 6, are notably less polymorphic than their classical counterparts and have different functions. Interestingly, *MICA* alleles have a strong linkage disequilibrium with *HLA-B*, as this locus is located 46 kb centromeric of the *HLA-B* locus (Figure 1).(4) The latest version of the IMGT HLA database lists 80 *HLA-G* alleles encoding 21 proteins, 44 *HLA-F* alleles encoding six proteins, 223 *MICA* alleles encoding 104 proteins, and 138 *MICB* alleles encoding 37 proteins (IPD-IMGT/HLA release 3.41, July 2020).(5,6)

Structurally, *HLA-G* consists of six protein-coding exons: exon 1 encoding the leader peptide, exons 2 and 3 encoding the α 1 and α 2 peptide-binding domains, exon 4 encoding the α 3 domain, exon 5 encoding the transmembrane region, and exon 6 encoding the cytoplasmic tail.(5,7) Similarly to the classical HLA class I molecules, HLA-G forms heterodimers with β 2 microglobulin. Moreover, it can form functionally active homodimers or tetramers, which bind with stronger affinity than monomers.(8,9) In healthy subjects, the expression of HLA-G is restricted to specific tissues, such as trophoblasts, thymic epithelium, corneal keratocytes, and erythroid and endothelial precursors.(10,11) In trophoblasts, HLA-G molecules suppress local immune responses in the placenta, contributing to maternal-fetal tolerance and preventing the recognition of the fetus as non-self tissue.(12) HLA-G is also expressed in response to viral infections, autoimmune diseases, and transplanted organs.(13-15)

HLA-F has seven exons. Exon 1 encodes the leader peptide, exons 2, 3, and 4 the immunoglobulin-like α domains, exon 5 the transmembrane domain, and exons 6 and 7 the cytoplasmic tail. Similarly to HLA-G and certain classical HLA molecules, HLA-F can form complexes with β 2 microglobulin. It is expressed by B-cell lines,

RESULTATS

B-cell-containing tissues, embryonic tissues (including extravillous trophoblasts), and spermatozooids.(16-18) While HLA-F is mostly located within cells, it has been detected on the surface of activated B, T, and natural killer (NK) cells. The presence of HLA-F on activated lymphocytes but not on regulatory T cells (Tregs) suggests a role in invoking the tolerogenic function of Tregs upon the secretion of anti-inflammatory factors.(19,20)

MICA and *MICB* are located on chromosome 6 between HLA class I and III genes.(21) They have a similar α -chain domain organization to HLA class I molecules, with the leader peptide encoded by exon 1, three extracellular globular domains encoded by exons 2, 3, and 4, the transmembrane domain encoded by exon 5, and the cytoplasmic tail encoded by exon 6 (Figure 2). Despite their similarity to classical *HLA* genes, they do not present peptides and are not expressed on the surface of human leukocytes, but in fibroblasts and endothelial, epithelial, and tumor cells.(22) They act as NKG2D receptor ligands, which play an important role in immune surveillance by activating NK cells and co-stimulating T-cell subsets.(23,24) Their expression is highly regulated and induced by cellular stress (infection, transformation, or oxidation). While *MICA* and *MICB* do not seem to be diverse as classical *HLA* genes, numerous alleles have been described: 109 for *MICA* and 47 for *MICB*.(6) Various studies have examined the association between *MICA/B* polymorphisms and susceptibility to various diseases, including cancers, viral infections, and autoimmune diseases.(25-27) The *MICA*129Met/Val dimorphism, for example, which is encoded by the single-nucleotide polymorphism rs1051792, has received attention as it differentiates *MICA* alleles into those with high affinity (Met) for the NKG2D receptor and those with low affinity (Val). This dimorphism has also been implicated in different diseases.(28)

Considering the diversity of non-classical HLA class I and II genes and their potential role in the human immune system, characterization of healthy individuals from different populations is essential for gene-disease association studies. We present the first high-resolution next-generation sequencing analysis of these genes in a large southern European cohort. We genotyped *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* and investigated the distribution of their alleles in a sample of unrelated blood donors from Catalonia. Moreover, using data from a previous study of HLA class I genes in the same sample, we also investigated the linkage disequilibrium (LD) between *MICA* and *HLA-G*.

MATERIALS AND METHODS

Donors

The study was performed using 96 DNA samples from unrelated blood donors resident in Catalonia and registered in the Barcelona Blood and Tissue Bank (BST) between 2017 and 2018. There were a similar proportion of female and male donors (47.8% vs 52.2%) and their ages ranged from 18 to 60 years (mean \pm SD 34.8 \pm 9.8 years).

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local research ethics committee. All participants provided written informed consent.

Non-classical HLA class I, MICA, and MICB genotyping

HLA-G, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* were genotyped at high resolution. All loci were genotyped simultaneously using an in-house multiplex long-range PCR (LR-PCR) assay and NGS strategy that sequences the entire *HLA-G* and *HLA-F* genes in a single amplicon. In addition, *MICA* and *MICB* were amplified simultaneously in the same tube using primers designed in conserved sequences for both genes and in three different amplicons covering all the coding regions (Figure 2). LR-PCR amplifications were performed using the SequelPrep Long PCR Kit with dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) in a Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). The PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and visualized with SYBR Safe DNA gel stain to verify the absence of non-specific bands and ensure that amplicon sizes were as expected. The library was prepared (enzymatic fragmentation, adapter ligation, and barcoding) using PCR pools in the NGSgo kit (GenDx, Utrecht, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The final denatured library was sequenced using a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). Taking into account the low number of polymorphism of these genes, this strategy was validated using 15 DNA samples from IHWG Cell and Gene Bank, and 15 DNA from donors that we previously genotyped by SBT, representing the most common alleles in Caucasian populations. The concordance between previous genotypes and those obtained with our strategy were 100%.

HLA-B genotypes were obtained from a previous frequency study performed in the same cohort.(29)

RESULTATS

All genotypes were assigned using NGSengine 2.16.2 software (GenDx) and the IMGT 3.38.0 reference database.

Statistical analysis

Allele frequencies were obtained by direct counting. Deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for two-field allele frequencies were tested in the Arlequin software package (version 3.5.2.2).⁽³⁰⁾ Maximum-likelihood haplotype frequencies were also estimated in Arlequin using an Expectation–Maximization algorithm for multilocus genotype data when the gametic phase was not known.^(30,31) LD between all pairs of loci was estimated using the same software package.

RESULTS

Allele frequencies

We detected six *HLA-G* alleles within the first two fields of the *HLA* nomenclature (Table 1). The most frequent allotype was *HLA-G*01:01* (77.08%), followed at some distance by *HLA-G*01:04* (8.33%), *HLA-G*01:06* (6.77%), and *HLA-G*01:03* (5.73%). *HLA-G*01:05N* was detected in just three individuals, and *HLA-G*01:08* in one. Sixteen *HLA-G* alleles were observed on analyzing the four *HLA* nomenclature fields (Table 2). For *HLA-F*, the least polymorphic gene analyzed in this study, we detected just two allotypes in the first two fields of the *HLA* nomenclature: *F*01:01*, present in 84.90% of the cohort, and *F*01:03*, present in 14.06% (Table 3). This number increased to 10 when the four fields were analyzed (Table 4). On analyzing the first two fields for *MICA* (we had only sequenced the coding region), we detected 19 allotypes, the most common being *MICA*008:01* (16.15%), followed closely by *MICA*004* (14.06%). *MICA*015* was detected in just one individual (Table 5). Ten *MICB* allotypes were observed. *MICB*005:02*, present in almost half of the cohort, was the most frequent (Table 6). The *HLA-B* allotypes identified within the first two fields (based on our previous study) are reported in Table 7. Allele frequency data will be submitted in the near future to the freely accessible Allele Frequency Net Database.(32)

Estimated haplotype frequencies

As *HLA-F* and *HLA-G* are more than 5 Mbp apart from *MICA* and *MICB*, we have estimated a total of 203 haplotypes with presence of different *MICA* and *MICB* alleles, without taking into account *HLA-F* and *HLA-G* loci. The most common haplotype was *MICA*004/MICB*005:02*, with an estimated frequency of 0.106347, followed by *MICA*00801/ MICB*008*, with an estimated frequency of 0.067416. The 5 most frequent haplotypes identified are summarized in Table 8.

HWE test

The allele frequencies observed for *HLA-G*, *HLA-F* and *MICB* ($p=0.1571$, $p=1$, $p=0.769$, respectively) but not *MICA* ($p=0.03920$) were in HWE.

Linkage disequilibrium

LD was calculated between pairs of genes. All allele pairs with a frequency of over 1% are shown with their LD values in Table S1. *F*01:03-MICA*008:02* and

RESULTATS

*MICA**001-*MICB**005:02 were in complete positive LD ($D'=1.0000$; $P < 0.01$), while *MICA**007:01-*MICB**005:02 and *MICA*011-*MICB*005:02 were in significant LD ($D' > 0.75$; $P < 0.05$). *MICA* and *HLA-B* haplotypes with a frequency of over 1% are shown with their LD values in Table 9.

DISCUSSION

The aim of this study was to genotype *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* alleles in a healthy cohort of 96 blood donors resident in Catalonia, Spain. The lack of data on the distribution of non-classical *HLA* alleles in healthy individuals represents a serious handicap when conducting gene-disease association studies.

We sequenced the four loci simultaneously using a new strategy consisting of multiplex amplification of the coding regions of *MICA* and *MICB* (using three amplicons) and of the entire genes in the case of *HLA-G* and *HLA-F*. The amplification reactions were designed to be compatible with a novel high-throughput screening assay developed by our laboratory to simultaneously sequence *KIR* and *HLA* class I genes.(33,34) This assay is a powerful tool capable of genotyping NK receptors and their respective ligands, as it includes primers for sequencing the polymorphic 3'UTR region of *KLRK1*, which encodes the NKG2D activating NK receptor. Our ultimate goal is to analyze associations between NK receptor-ligands and hematological diseases and to do this, we need better characterization of non-classical *HLA* genes in a well-defined control group.

We analyzed the distribution of *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* alleles and estimated haplotype frequencies in our study population and also calculated the LD between all allele pairs present in over 1% of the cohort.

As expected, the frequencies observed for *MICA* were similar to those described by Lucas et al(4) for a population in southeastern Spain. The only exception was *MICA*011*, which was detected in nine individuals in our population but absent in the population of Lucas et al. This difference is probably due to a technical issue, as we sequenced and analyzed the entire coding region of the gene, whereas Lucas *et al*/used PCR-sequence-specific oligonucleotide probes. Our study is also the first to determine the frequencies of *MICB* alleles in Spain, providing important data that will facilitate the investigation of associations between these loci and different diseases in Spanish populations. In addition, the allele frequencies observed for *MICA*, *MICB*, and *MICA*011* are very similar to previous reports for Europe.(35)

We calculated two- and four-field allele frequencies for *HLA-G* and *HLA-F* as we sequenced the entire genes. Although the NGS *HLA-G* genotyping is not entirely unusual, the IMGT/HLA database only contains 80 *HLA-G* alleles and frequencies

RESULTATS

are generally low worldwide.(36-40) The frequencies observed in our population are similar to those previously reported, with the exception of *HLA-G*01:08*, which was present in one individual in our study but absent from other studies of *HLA-G* conducted in Spain. *HLA-G*01:08*, has, however, been described in other Caucasian populations.(36,41) Few studies have analyzed the allelic variability of *HLA-F* and even fewer have analyzed four-field frequencies.(42) Although *HLA-F* is known to exhibit few polymorphisms, gene-disease association studies in this setting are lacking. However, some laboratories have started to analyze its allelic variability in healthy individuals.(43,44) The *HLA-F* frequencies observed in our cohort are consistent with previous reports, although the comparison was limited to two-field frequency data due to the lack of four-field studies.(41,42)

The allele frequencies for all loci except *MICA* were in HWE. The small deviation observed for *MICA* alleles could be due to our limited size, as small populations can cause random changes in allele frequencies.(45)

To add to the little information available on interactions between *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* and *MICB*, and it has to be taken into account that the sample size of this study is limited, we have reported the most common haplotypes identified in the estimation together with their LD values. *F*01:03-MICA*008:02* and *MICA*001-MICB*005:02* were found to be in complete LD, which is an important consideration for future gene-disease association studies. It should be noted, however, that there is a large distance between *HLA-F* and *MICA*, and that more studies are required to support this result.

We used *HLA-B* genotype data from a previous study by our group(29) to analyze, for the first time, the LD between *MICA* and *HLA-B* in our population, and found it to be significant. This finding was expected as they are located near to each other on chromosome 6 and it is also consistent with previous reports.(46,47) *MICA*008-HLA-B*44:02* was the only haplotype in our analysis of haplotypes with a frequency of over 1% that did not reach significance. Sixty-four percent of the inferred haplotypes had D' values close to 1.0, showing the strength of LD between these two loci in our population and also supporting reports for other Caucasian studies.(48)

Regarding the developed strategy, even though in this study we have not find any new alleles regarding these loci probably due to the limited number of samples analyzed, we can confirm the detection of 4 new alleles (2 *HLA-G* and 2 *HLA-F*) in

another study performed by our group using this same strategy. Moreover, even though the most polymorphic exons of *MICA* and *MICB* are exons 2,3 and 4,(5) in this short-reads strategy we are able to sequence the entire coding regions. However, this high-throughput strategy presents the disadvantage of not being able to phase the exon 1 and 6 with the MICAB amplicon B (Figure 2). In this study we have not detected any ambiguity regarding phase, but it will be certainly interesting to develop a new strategy able to sequence these genes using long-reads sequencing technologies, such as Oxford Nanopore or PacBio platforms to avoid possible errors.

In conclusion, it is important to determine the distribution of non-classical *HLA* and *MIC* allele frequencies in different regions of the world to gain a better understanding of their global distribution. We have shown that the distribution of the genes of interest is similar to that reported for other populations. Moreover, we have demonstrated the enormous capacity of NGS technologies for studying extensive gene panels in large populations at a low cost. Finally, all the data collected for this study will be used as control data for disease-association studies at our center.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

1. Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(12):889-899.
2. Marsh SG. HLA class II region sequences, 1998. *Tissue antigens*. 1998;51(4 Pt 2):467-507.
3. Mason PM, Parham P. HLA class I region sequences, 1998. *Tissue antigens*. 1998;51(4 Pt 2):417-466.
4. Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R, et al. Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Human immunology*. 2008;69(10):655-660.
5. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in immunology*. 2001;22(7):378-385.
6. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic acids research*. 2020;48(D1):D948-D955.
7. Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9145-9149.
8. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. 2008;111(10):4862-4870.
9. Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, et al. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(15):10439-10447.
10. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *Journal of immunology*. 2003;171(3):1376-1384.
11. Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early pregnancy*. 2001;5(1):67-69.
12. Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Human immunology*. 2007;68(4):244-250.

13. Yan WH, Lin A, Chen BG, Chen SY. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(5):820-826.
14. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Human immunology*. 2006;67(8):561-567.
15. Crispim JC, Duarte RA, Soares CP, et al. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Transplant immunology*. 2008;18(4):361-367.
16. Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human immunology*. 1990;29(2):131-142.
17. Le Bouteiller P, Lenfant F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Research in immunology*. 1996;147(5):301-313.
18. Fiszer D, Ulbrecht M, Fernandez N, Johnson JP, Weiss EH, Kurpisz M. Analysis of HLA class Ib gene expression in male gametogenic cells. *European journal of immunology*. 1997;27(7):1691-1695.
19. Lee N, Ishitani A, Geraghty DE. HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes. *European journal of immunology*. 2010;40(8):2308-2318.
20. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26491.
21. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(14):6259-6263.
22. Risti M, Bicalho MD. MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? *Frontiers in immunology*. 2017;8:179.
23. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-729.
24. Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*. 1998;48(3):163-173.

RESULTATS

25. Zuo J, Mohammed F, Moss P. The Biological Influence and Clinical Relevance of Polymorphism Within the NKG2D Ligands. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1820.
26. Pollock RA, Chandran V, Pellett FJ, et al. The functional MICA-129 polymorphism is associated with skin but not joint manifestations of psoriatic disease independently of HLA-B and HLA-C. *Tissue antigens*. 2013;82(1):43-47.
27. Isernhagen A, Malzahn D, Bickeboller H, Dressel R. Impact of the MICA-129Met/Val Dimorphism on NKG2D-Mediated Biological Functions and Disease Risks. *Frontiers in immunology*. 2016;7:588.
28. Steinle A, Li P, Morris DL, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001;53(4):279-287.
29. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Distribution of human killer cell immunoglobulin-like receptors and ligands among blood donors of Catalonia. *Hla*. 2020;95(3):179-188.
30. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*. 2007;1:47-50.
31. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 1996;76 (Pt 4):377-383.
32. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Melo Dos Santos EJ, et al. Allele Frequency Net Database. *Methods in molecular biology*. 2018;1802:49-62.
33. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2991.
34. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Distribution of Human Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and Ligands Among Blood Donors Of Catalonia. *Hla*. 2019.
35. Klussmeier A, Massalski C, Putke K, et al. High-Throughput MICA/B Genotyping of Over Two Million Samples: Workflow and Allele Frequencies. *Frontiers in immunology*. 2020;11:314.

36. Suarez MB, Morales P, Castro MJ, et al. A new HLA-G allele (HLA-G*0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics*. 1997;45(6):464-465.
37. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(3):369-395.
38. Simoes RT, Goncalves MA, Castelli EC, et al. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009;22(8):1075-1082.
39. Vargas RG, Sarturi PR, Mattar SB, et al. Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. *Human immunology*. 2011;72(6):479-485.
40. Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, et al. Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes and immunity*. 2014;15(2):95-106.
41. Carlini F, Ferreira V, Buhler S, et al. Association of HLA-A and Non-Classical HLA Class I Alleles. *PloS one*. 2016;11(10):e0163570.
42. Paganini J, Ramdane A, Gouret P, Chiaroni J, Di Cristofaro J. Validation of new HLA-F alleles assigned by next-generation sequencing. *Hla*. 2019;93(2-3):131-132.
43. Ishigami S, Arigami T, Okumura H, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. *Anticancer research*. 2015;35(4):2279-2285.
44. Harada A, Ishigami S, Kijima Y, et al. Clinical implication of human leukocyte antigen (HLA)-F expression in breast cancer. *Pathology international*. 2015;65(11):569-574.
45. Wang J, Shete S. Testing Departure from Hardy-Weinberg Proportions. *Methods in molecular biology*. 2017;1666:83-115.
46. Yamakawa RH, Saito PK, Gelmini GF, da Silva JS, Bicalho MDG, Borelli SD. MICA diversity and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in renal-transplant candidates in southern Brazil. *PloS one*. 2017;12(4):e0176072.

RESULTATS

47. Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M. Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. *Human immunology*. 2006;67(3):152-158.
48. Cambra A, Munoz-Saa I, Crespi C, et al. MICA-HLA-B haplotype diversity and linkage disequilibrium in a population of Jewish descent from Majorca (the Balearic Islands). *Human immunology*. 2009;70(7):513-517.

Table 1. Frequency of alleles at the HLA-G locus (two fields)

<i>Allele</i>	<i>N</i>	<i>Percentage</i>
G*01:01	148	77.08%
G*01:04	16	8.33%
G*01:06	13	6.77%
G*01:03	11	5.73%
G*01:05N	3	1.56%
G*01:08	1	0.52%

Table 2. Frequency of alleles at the HLA-G locus (four fields)

<i>Allele</i>	<i>N</i>	<i>Percentage</i>
G*01:01:01:01	46	23.96%
G*01:01:02:01	31	16.15%
G*01:01:01:04	24	12.50%
G*01:01:01:05	19	9.90%
G*01:01:03:03	14	7.29%
G*01:06	13	6.77%
G*01:03:01:02	11	5.73%
G*01:04:01:01	9	4.69%
G*01:01:01:08	8	4.17%
G*01:04:04	7	3.65%
G*01:05N	3	1.56%
G*01:01:22:01	3	1.56%
G*01:01:01:06	1	0.52%
G*01:01:02:02	1	0.52%
G*01:08:02	1	0.52%
G*01:01:12	1	0.52%

RESULTATS

Table 3. Frequency of alleles at the HLA-F locus (two fields)

Allele	N	Percentage
F*01:01	164	85.41%
F*01:03	28	14.59%

Table 4. Frequency of alleles at the HLA-F locus (four fields)

Allele	N	Percentage
F*01:01:01:08	50	26.04%
F*01:01:01:01	45	23.44%
F*01:01:01:09	29	15.10%
F*01:03:01:01	19	9.90%
F*01:01:02:09	14	7.29%
F*01:01:01:18	11	5.73%
F*01:03:01:03	8	4.17%
F*01:01:02:04	7	3.64%
F*01:01:02:07	6	3.13%
F*01:01:02:08	3	1.56%

Table 5. Frequency of alleles at the MICA locus

<i>Allele</i>	<i>N</i>	<i>Percentage</i>
MICA*008:01	31	16.15%
MICA*004:01	27	14.06%
MICA*002:01	19	9.90%
MICA*009:01	18	9.38%
MICA*007:01	11	5.73%
MICA*017	10	5.21%
MICA*008:04	9	4.69%
MICA*016	9	4.69%
MICA*011:01	9	4.69%
MICA*001	9	4.69%
MICA*049:01	8	4.17%
MICA*018:01	7	3.65%
MICA*009:02	7	3.65%
MICA*019:01	6	3.13%
MICA*010:01	4	2.08%
MICA*012:01	3	1.56%
MICA*008:02	2	1.04%
MICA*027:01	2	1.04%
MICA*015	1	0.52%

Table 6. Frequency of alleles at the MICB locus

<i>Allele</i>	<i>N</i>	<i>Percentage</i>
MICB*005:02	89	46.36%
MICB*002:01	32	16.66%
MICB*004:01	22	11.46%
MICB*008:01	15	7.82%
MICB*003:01	11	5.72%
MICB*005:03	8	4.16%
MICB*005:06	6	3.12%
MICB*005:01	5	2.60%
MICB*013:01	3	1.57%
MICB*024:01	1	0.52%

Table 7. Frequency of alleles at the HLA-B locus

<i>Allele</i>	<i>N</i>	<i>Percentage</i>
B*44:03	40	20.41%
B*08:01	32	16.33%
B*07:02	28	14.29%
B*18:01	22	11.22%
B*14:02	16	8.16%
B*44:02	14	7.14%
B*51:01	8	4.08%
B*35:01	7	3.57%
B*38:01	5	2.55%
B*49:01	4	2.04%
B*15:01	3	1.53%
B*50:01	3	1.53%
B*27:05	2	1.02%
B*35:03	2	1.02%
B*57:01	1	1.02%
B*53:01	1	0.51%
B*39:01	1	0.51%
B*13:02	1	0.51%
B*40:01	1	0.51%
B*15:03	1	0.51%

RESULTATS

Table 8. The 5 most common estimated haplotypes for *MICA*, and *MICB*.

HF	Estimated Haplotypes	
0.104167	<i>MICA</i> *004	<i>MICB</i> *00502
0.072916	<i>MICA</i> *00801	<i>MICB</i> *008
0.072916	<i>MICA</i> *00701	<i>MICB</i> *00502
0.052083	<i>MICA</i> *00801	<i>MICB</i> *00502
0.041667	<i>MICA</i> *001	<i>MICB</i> *00502

Abbreviation: HF, haplotype frequency

Table 9. MICA–HLA-B haplotype frequencies and relative LD values (D') for haplotypes with a frequency exceeding 3%.

MICA*-HLA-B*	HF	D'	P value
00801-0702	0.1302	0.7690	<0.0001
004-4403	0.1042	1.0	<0.0001
001-1801	0.0625	1.0	<0.0001
008-0801	0.0469	1.0	<0.0001
009-5101	0.0469	1.0	<0.0001
008-4402	0.0416	0.8560	n.s.
002-3801	0.0312	0.9020	<0.0001
002-3501	0.0312	1.0	<0.0001

*Only haplotypes with a frequency of over 3% are listed. Abbreviations: HF, haplotype frequency; D', relative linkage disequilibrium parameter; n.s. = not significant.

RESULTATS

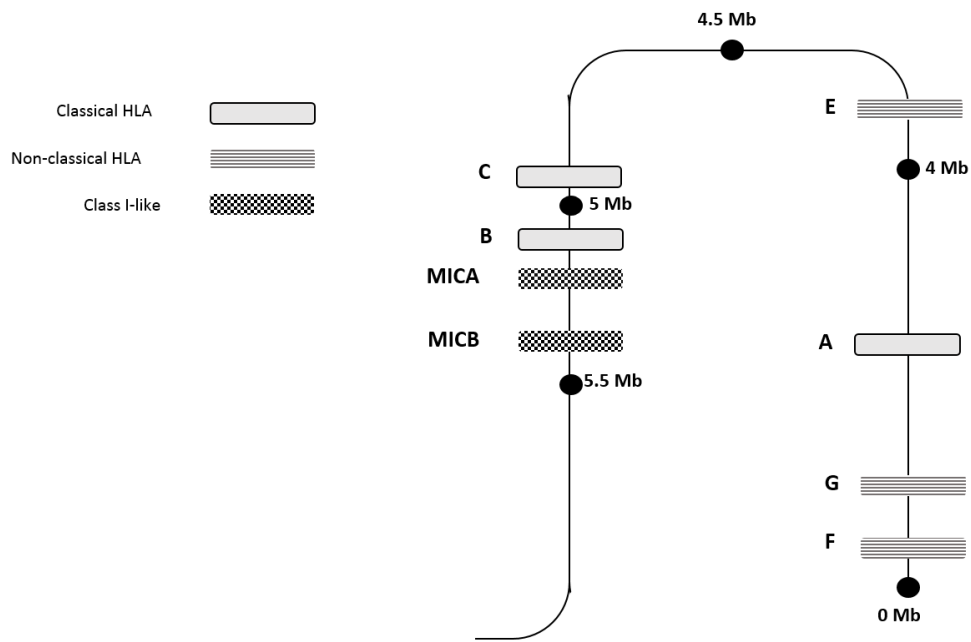


Figure 1. Organization of classical HLA class I, non-classical HLA, and class I-like genes on chromosome 6. (The figure is not drawn to scale).

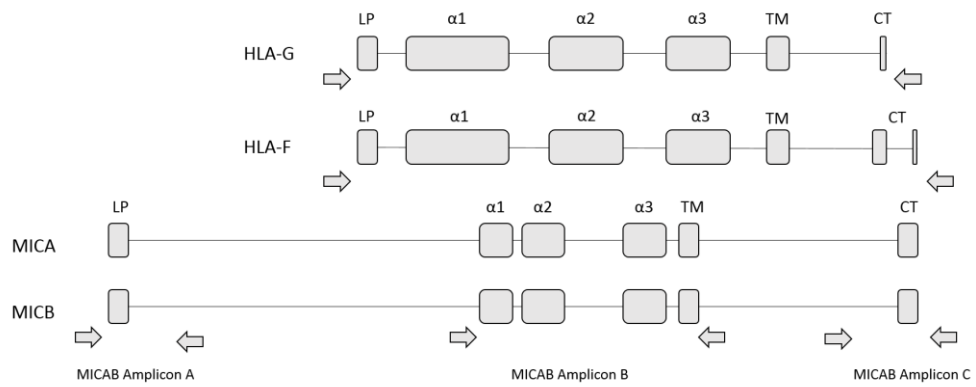


Figure 2. Long-range multiplex PCR strategy designed to allow high-throughput sequencing of *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB*. Coding domains for the four genes are noted. / Abbreviations: LP, leading peptide; α , extracellular domain; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail.

RESULTATS

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1. Haplotype frequencies and relative LD values (D') for haplotypes with a frequency exceeding 1%.

Haplotype	HF	D'	P value
<i>G*01:01-MICA*004</i>	0.10417	0.4008097	0.262986
<i>G*01:01-MICA*008:01</i>	0.11458	0.0100334	0.975015
<i>G*01:02-MICA*007:01</i>	0.05729	1	0.064073
<i>G*01:03-MICA*001</i>	0.03646	1	0.134699
<i>G*01:04-MICA*009:01</i>	0.06250	0.0301442	0.842916
<i>G*01:05-MICA*002:01</i>	0.06250	0.0948012	0.517303
<i>G*01:06-MICA*017</i>	0.01563	0.4180865	0.058146
<i>G*01:07-MICA*008:04</i>	0.03125	1	0.173604
<i>G*01:08-MICA*011</i>	0.02604	0.3211009	0.118497
<i>G*01:09-MICA*018:01</i>	0.02604	0.0948012	0.691861
<i>G*01:10-MICA*009:02</i>	0.01563	0.3211009	0.179463
<i>G*01:11-MICA*016</i>	0.03125	0.1513761	0.461759
<i>G*01:12-MICA*049</i>	0.03125	1	0.173604
<i>G*01:13-MICA*010:01</i>	0.01042	0.3211009	0.276404
<i>G*01:14-MICA*012:01</i>	0.01563	1	0.295233
<i>G*01:15-MICA*019:01</i>	0.01042	0.4568807	0.0822942
<i>G*01:16-MICA*027</i>	0.01042	1	0.394379
<i>G*01:17-MICA*008:02</i>	0.01042	1	0.394379
<i>G*01:06-MICB*008</i>	0.01563	0.0106952	0.901222
<i>G*01:01-F*01:01</i>	0.06250	0.2396	0.028000
<i>G*01:06-F*01:01</i>	0.06250	0.4618	0.472900
<i>G*01:03-F*01:01</i>	0.05208	0.0374	0.785900
<i>G*01:04-F*01:01</i>	0.03646	0.4843	0.678590
<i>G*01:05N-F*01:01</i>	0.01042	1	0.520900
<i>G*01:01-F*01:03</i>	0.09375	0.2396	0.028000
<i>G*01:06-F*01:03</i>	0.00521	0.4618	0.472900
<i>G*01:03-F*01:03</i>	0.01042	0.0374	0.785900
<i>G*01:04-F*01:03</i>	0.05208	0.4843	0.846270
<i>F*01:01-MICA*004</i>	0.11979	0.6884211	0.147323
<i>F*01:01-MICA*008:01</i>	0.14583	0.7426087	0.080620
<i>F*01:01-MICA*007:01</i>	0.05208	0.3422222	0.632930
<i>F*01:01-MICA*001</i>	0.03646	1	0.259572
<i>F*01:01-MICA*009:01</i>	0.06250	0.1405343	0.220287
<i>F*01:01-MICA*002:01</i>	0.07292	0.1176152	0.286491
<i>F*01:01-MICA*017</i>	0.04688	1	0.221690
<i>F*01:01-MICA*008:04</i>	0.01563	0.2780488	0.160623
<i>F*01:01-MICA*011</i>	0.04688	0.26	0.733193
<i>F*01:01-MICA*018:01</i>	0.03125	0.0133333	0.988007
<i>F*01:01-MICA*009:02</i>	0.03125	0.0133333	0.988007
<i>F*01:01-MICA*016</i>	0.04688	0.26	0.733193
<i>F*01:01-MICA*049</i>	0.02604	0.0373984	0.850324
<i>F*01:01-MICA*010:01</i>	0.01563	0.097561	0.660827
<i>F*01:01-MICA*012:01</i>	0.01042	0.197832	0.442566
<i>F*01:01-MICA*019:01</i>	0.01563	0.2780488	0.160623
<i>F*01:01-MICA*027</i>	0.01042	1	0.520919

<i>F*01:03-MICA*009:01</i>	0.02604	0.1405343	0.220287
<i>F*01:03-MICA*002:01</i>	0.02604	0.1176152	0.286491
<i>F*01:03-MICA*008:04</i>	0.01042	0.2780488	0.160623
<i>F*01:03-MICA*019:01</i>	0.01042	0.2780488	0.160623
<i>F*01:03-MICA*008:02</i>	0.01042	1	0.001587
<i>G*01:01-MICB*005:02</i>	0.36979	0.3675214	0.016423
<i>G*01:01-MICB*008</i>	0.05729	0.0512821	0.911735
<i>G*01:01-MICB*003</i>	0.01563	0.4908257	0.017020
<i>G*01:01-MICB*004:01</i>	0.09375	0.3303167	0.386543
<i>G*01:01-MICB*002:01</i>	0.10417	0.1953789	0.060510
<i>G*01:01-MICB*005:06</i>	0.01563	0.1853211	0.480947
<i>G*01:01-MICB*005:03</i>	0.03125	0.3675214	0.582492
<i>G*01:01-MICB*013</i>	0.01042	1	0.394379
<i>G*01:06-MICB*003</i>	0.02604	0.459854	0.000002
<i>G*01:06-MICB*004:01</i>	0.01042	0.0756419	0.469166
<i>G*01:06-MICB*002:01</i>	0.01563	0.1104433	0.420262
<i>G*01:03-MICB*005:02</i>	0.03125	0.097561	0.721747
<i>G*01:04-MICB*005:02</i>	0.01563	0.5194805	0.066856
<i>F*01:01-MICB*005:02</i>	0.42188	0.7309091	0.000323
<i>F*01:01-MICB*008</i>	0.07292	0.5066667	0.409115
<i>F*01:01-MICB*003</i>	0.05208	1	0.189831
<i>F*01:01-MICB*004:01</i>	0.05208	0.4337637	0.000025
<i>F*01:01-MICB*002:01</i>	0.11458	0.2661157	0.002003
<i>F*01:01-MICB*005:06</i>	0.03125	1	0.305094
<i>F*01:01-MICB*005:03</i>	0.02604	0.1978320	0.272493
<i>F*01:01-MICB*013</i>	0.01042	1	0.520919
<i>F*01:01-MICB*005:01</i>	0.02604	1	0.360661
<i>F*01:03-MICB*005:02</i>	0.01563	0.7309091	0.000323
<i>F*01:03-MICB*004:01</i>	0.05729	0.4337637	0.000025
<i>F*01:03-MICB*002:01</i>	0.06250	0.2661157	0.002003
<i>F*01:03-MICB*005:03</i>	0.01042	0.1978320	0.272493
<i>MICA*004-MICB*005:02</i>	0.10417	0.7150193	0.000198
<i>MICA*008:01-MICB*005:02</i>	0.05729	0.1225296	0.566206
<i>MICA*007:01-MICB*005:02</i>	0.05208	0.799458	0.005807
<i>MICA*001-MICB*005:02</i>	0.03646	1	0.005314
<i>MICA*009:01-MICB*005:02</i>	0.03125	0.1991342	0.482360
<i>MICA*002:01-MICB*005:02</i>	0.03646	0.1030303	0.705696
<i>MICA*011-MICB*005:02</i>	0.04688	0.7743902	0.012067
<i>MICA*010:01-MICB*005:02</i>	0.01042	0.097561	0.825489
<i>MICA*012:01-MICB*005:02</i>	0.01042	0.398374	0.437146
<i>MICA*019:01-MICB*005:02</i>	0.02604	0.6390244	0.105164
<i>MICA*009:01-MICB*002:01</i>	0.03125	0.2136954	0.075258
<i>MICA*002:01-MICB*002:01</i>	0.03646	0.2661157	0.021357

*Only haplotypes with a frequency of over 1% are listed. D' values higher than 0.75 and with significant P values are shown in bold. Abbreviations: HF, haplotype frequency; D', relative linkage disequilibrium parameter.

4. ARTICLE 4. NK CELL RECEPTORS AND LIGAND VARIANTS MODULATE THE RESPONSE TO TYROSINE KINASE INHIBITORS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Laia Closa, Blanca Xicoy, Lurdes Zamora, Natalia Estrada, Dolors Colomer, Maria J. Herrero, Francisco Vidal, Alberto Alvarez-Larrán, Jose L. Caro

En revisió

Resum

La leucèmia mieloide crònica (CML) és una neoplàsia mieloproliferativa que es tracta amb inhibidors de tirosina cinasa (ITC). Tot i que les taxes de supervivència han millorat, la resposta a aquests tractaments són molt heterogènies. Les variacions en les respostes poden ser degudes a causes diverses, com mutacions en *BCR-ABL1*, l'evolució clonal, l'amplificació de *BCR-ABL1*, etc., i també es considera que la resposta immunològica innata pot tenir-hi un paper molt important i, en concret, l'activitat de les cèl·lules NK a través dels seus receptors i lligands podria ser determinant.

L'objectiu d'aquest estudi retrospectiu va ser explorar el paper dels diferents gens KIR activadors i inhibidors, així com també el paper de les variants del receptor NKG2D i dels gens que codifiquen pels seus lligands, *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-G*, *-F*, *MICA* i *MICB*, en l'evolució de 190 pacients amb CML i tractats en dos hospitals de Barcelona entre l'any 2000 i 2019. Es van correlacionar la resposta molecular primerenca (EMR), la resposta molecular major (MMR) i la resposta molecular profunda (DMR). Com a mostres control, es van analitzar les freqüències dels gens d'estudi de donants de sang sans del Banc de Sang de Barcelona.

La presència de *KIR2DL2/KIR2DS2* es va associar amb l'obtenció de EMR, MMR i DMR. A més a més, els portadors de la variant activadora de NKG2D, i el lligand *MICA*009:01*, també tenien més probabilitats d'obtenir tant RMM com RMP. La diferència més notable entre les freqüències gèniques entre el grup control i la cohort de pacients va ser una major freqüència de la variant inhibidora del NKG2D als pacients de CML.

RESULTATS

En resum, aquests resultats mostren com els fenotips activadors dels receptors NK podrien ajudar als pacients amb CML i tractats amb ITC a obtenir EMR, MMR i DMR.

NK cell receptors and ligand variants modulate response to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia

Laia Closa,^{1,2} Blanca Xicoy,⁸ Lurdes Zamora,⁸ Natalia Estrada,⁸ Dolors Colomer,⁶ Maria J. Herrero,¹ Francisco Vidal,^{2,3,4} Alberto Alvarez-Larrán,⁷ Jose L. Caro,^{2,5*}

¹ *Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain,* ² *Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute- Autonomous University of Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona, Spain,* ³ *Congenital Coagulopathy Laboratory, Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain,* ⁴ *CIBER of Cardiovascular Diseases, Spain,* ⁵ *Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain,* ⁶ *Hematopathology Section, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERONC, Barcelona,* ⁷ *Hematology Department, Hospital Clínic, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain,* ⁸ *Department of hematology, Institut Català d'Oncologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukemia Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain*

*Corresponding author: Jose Luis Caro, jlcaro@clinic.cat

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Although survival rates have improved, response to these treatments is highly heterogeneous. Variations in responses may be due to innate immune response, and specifically, due to NK cell activity through their receptors and ligands.

The aim of this retrospective study was to explore the role of different *KIR* genes as well as the activating NKG2D receptor, present in NK cells, and also their respective ligands, *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-G*, *-F*, *MICA* and *MICB*, in the evolution of 190 patients with CML and treated at two hospitals from Barcelona. Early molecular response (EMR), major molecular response (MMR) and deep molecular response (DMR) were correlated. As controls, healthy donors from the Barcelona Blood Bank were analyzed.

The presence of *KIR2DL2/KIR2DS2* was associated with the achievement of EMR, MMR and DMR. Carriers of the activating NKG2D variant, and *MICA*009:01* were also likely to achieve MMR. The most remarkable difference between CML patients and controls was a higher frequency of the inhibitory NKG2D variant in CML patients.

In summary, our results showed that activating NK receptor phenotypes might help to achieve MMR and DMR in CML patients treated with TKIs.

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm with an annual incidence of 1-2 cases per 100 000 individuals; it accounts for approximately 10-15% of all adult leukemias. Prognosis has been greatly improved by the introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), the current treatment of choice in CML. Between 40% and 50% of patients treated with TKIs achieve a prolonged deep molecular response (DMR), making them candidates for treatment discontinuation.(1) Despite these good results, variations in response rates have been observed between patients. These variations are due to different causes (treatment adherence, mutations in the *BCR-ABL1* gene, clonal evolution, amplification of the *BCR-ABL1* gene etc.,) but also due to other less explored factors, such as levels of innate immune response and, among others, different variants of natural killer (NK) cell receptors.(2-4) Moreover, residual *BCR-ABL1* expression could remain detectable in some patients, as TKIs do not eliminate leukemic stem cells. Immune system, in particular NK cells, may also have an important role in the elimination of this residual leukemic stem cells.

Although the antitumor effect of the innate immune system has been well characterized, little is known about the role of NK cells and their respective receptors and ligands in CML. NK cell activity, which is mostly cytotoxic against tumor cells, seems to decrease gradually as the disease progresses.(5) The NK cell receptor repertoire prevents NK cell autoreactivity against healthy cells, enabling the killing of target cells with altered HLA class I expression and upregulated stress-inducible antigens.(6) Several studies focusing largely on killer cell immunoglobulin receptors (KIR) and their HLA class I ligands have suggested that CML onset and progression may be influenced by the number and combination of NK receptors. Nonetheless, these studies have produced heterogeneous results and have not analyzed the other KIR ligands, *HLA-G* and *HLA-F*.(7-9) Moreover, tumor cells usually express activating receptor NKG2D ligands, such as MHC class I chain-related genes A and B (*MICA* and *MICB*). It is thought that the interaction between NKG2D and its ligands may enhance the antitumor activity of NK cells.(10)

KIR, classical *HLA class I*, and *MICA* and *MICB* genes are highly polymorphic, while *HLA-G* and *HLA-F* (the non-classical *HLA class I* genes) are moderately polymorphic. *KIR* genes encode eight inhibitory receptors (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*,

RESULTATS

KIR2DL3, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*) and six activating receptors (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*) that each code for their corresponding receptors.(11) Their structural variation creates multiple gene-content haplotypes responsible for the significant diversity observed within and between populations. This variable gene content has been organized into two haplotypes: A and B. Haplotype A is invariant in terms of gene content and has just one activating *KIR* gene (*KIR2DS4*), while haplotype B is more variable and has more activating *KIR* genes.(12,13) Both haplotypes have four *KIR* genes, the so-called *framework* genes (*KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* and *KIR3DL2*), that are present in almost all individuals.

Serological typing has been used to divide HLA class I molecules into different functional categories based on the amino acid sequence that determines the KIR-binding epitope. *HLA-C* alleles, for example, are classified as *HLA-C* group 1 (C1) or *HLA-C* group 2 (C2) depending on the amino acid located at position 80 of the alpha-1 domain of the alpha chain.(14) The inhibitory receptors *KIR2DL2* and *KIR2DL3* and the activating receptor *KIR2DS2* bind *HLA-C1* ligands, while the inhibitory *KIR2DL1* and the activating *KIR2DS1* receptors bind *HLA-C2* ligands. *HLA-B* alleles, in turn, together with *HLA-A23/-A24* and *-A32*, harbor the Bw4 or Bw6 epitopes. *HLA-Bw4* is the only serological group that serves as a ligand for *KIR3DL1*.(15) Moreover, Bw4 molecules with an isoleucine at codon 80 (Bw480I) have been reported to have a higher affinity for KIR than those with a threonine at the same position (Bw480T).(16) Finally, constitutive *KIR3DL2* binds *HLA-A3* and *HLA-A11*,(17) while *HLA-G* and *HLA-F* molecules bind *KIR2DL4* and *KIR3DS1*, respectively.(18,19)^{169,170}

The *NKG2D* activating receptor is encoded by the *KLRK1* gene, located on chromosome 12. This gene has a single nucleotide polymorphism (SNP), rs1049174, located in the 3'-untranslated region (3'UTR) that enables the distinction of two alleles: HNK, with higher NK cytotoxicity and associated with a lower risk of cancer, and LNK, with lower NK cell cytotoxicity and associated with a higher risk of cancer.(20)

MICA and *MICB* molecules are the most polymorphic ligands for *NKG2D* receptors and are expressed only on the surface of infected or tumor-stressed cells.(21) In June 2019, the Immuno Polymorphism Database contained 109 *MICA* alleles and 47 *MICB* alleles.(22)

The possible effects of this high genetic variability of NK receptors and ligands on immune surveillance are not well understood. The aim of this study was to investigate the role of genes coding for NK receptor polymorphisms (*KIR* and *KLRK1*) and for receptor ligands (*HLA class I*, *HLA-F*, *HLA-G*, *MICA*, *MICB*) in different types of molecular response in a cohort of CML patients treated with first- or second-generation TKIs.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We conducted a multicenter, retrospective study of 190 *BCR-ABL1* positive CML patients from two hospitals in Barcelona, Spain: 98 from Institut Català d'Oncologia and 92 from Hospital Clínic Barcelona. Patients were eligible for inclusion if they had been treated with a TKI for at least 3 months and undergone assessment of molecular response (MR). Patients diagnosed before 2000, previously treated with interferon alpha, and who had blast-phase CML at diagnosis were excluded. A total of 445 healthy donors from the Barcelona Blood and Tissue Bank (BST) were used as controls to obtain *KIR* and classic *HLA class I* genes frequencies,(23) and 96 for *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* and *MICB*. *KLRK1* SNP rs1049174 frequencies from Iberian Peninsula healthy donors were obtained from 1000 Genomes Project.

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local research ethics committee. All participants provided written informed consent.

Target gene genotyping

KIR, *HLA class I*, *MICA*, and *MICB* genotyping

DNA samples from all patients were sent to the Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory at the BST. Genomic DNA was genotyped for the presence or absence of the 14 *KIR* genes using a previously described next-generation sequencing method.(24) *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* were simultaneously amplified by multiplex long-range PCR (LR-PCR) and genotyped at high resolution. Briefly, LR-PCR amplifications were performed using the SequelPrep Long PCR Kit with dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) The library preparation (enzymatic fragmentation, adapter ligation, and barcoding) was performed using the PCR pools in the NGSgo®-LibrX and NGSgo-IndX kits (GenDx, Utrecht, The Netherlands) according to the manufacturer instructions. The final denatured library was sequenced on NextSeq or MiSeq instruments (Illumina, San Diego, CA, USA). The data analysis for *KIR* genotyping was performed by means of *in silico* hybridization of specific virtual probes.(24) Classic *HLA class I*, *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* genotypes were assigned using NGSengine 2.16.2 (GenDx) and the IMGT 3.38.0 reference database.

NKG2D genotyping

For NKG2D genotyping, the 3'-UTR region was amplified (300 bp) and, in the same PCR run, indexes and adaptor sequences (Single Direction 384 Barcode for Illumina, Fluidigm, San Francisco, United States) were added to the target amplicons obtained with the universal CS1 and CS2 tags (Fluidigm). The samples were then pooled, purified using the MinElute Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), and sequenced by NGS on the MiSeq platform (Illumina) with a 500-cycle MiSeq Reagent Kit (Illumina). Finally, detection of the SNP rs1049174 was performed using CLC Genomics Workbench software (Qiagen).

Real-time quantitative PCR

BCR-ABL1 mRNA expression was measured by real-time quantitative PCR according to the European LeukemiaNet 2020 recommendations.⁽²⁵⁾ Molecular response was calculated using the International Scale and reported as a percentage of the ratio of *BCR-ABL1* transcripts to *ABL1* transcripts. Three levels of response were assessed: early molecular response (EMR) (*BCR-ABL1* transcript level $\leq 10\%$ within 3 months of treatment initiation), major molecular response (MMR) or MR3.0 (*BCR-ABL1* transcript level $\leq 0.1\%$), and deep molecular response (DMR) or MR4.0 (*BCR-ABL1* transcript level $\leq 0.01\%$).

Statistical analyses

Associations between EMR and genotypes were analyzed using the Chi-square test. Time-to-event curves were estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test for comparisons. MR3.0 was assessed at 12 months of follow-up and MR4.0 at 5 years. Factors that were significant ($p < 0.05$) in the univariate analysis were included in a Cox proportional hazards model to assess the independent effect of each covariate with adjustment for other variables. The statistical analysis was performed in R software 4.0.2 version.

Associations between treatment responses and genotypes were analyzed in two groups according to biological criteria: 1) KIR genes and their ligands and 2) *KLRK1* genotypes and alleles. In the first group we analyzed the 14 *KIR* genes, *KIR*-ligand pairs, *KIR* haplotypes, and specific *KIR* ligands (*HLA class I* alleles present at least in up to 5% of the cohort analyzed at each section). In the second group, we analyzed: *KLRK1* genotypes (HNK-HNK, LNK-HNK and LNK-LNK) and

RESULTATS

alleles (HNK and LNK), and; *KLRK1* ligands, *MICA* and *MICB*, present at least in up to 5% of the cohort analyzed at each section.

All analysis were performed considering the entire CML cohort. In addition, after verifying that there were no significant differences in the genotypes between the group treated with imatinib and the patients treated with other TKI (Table S1), the effects on response were specifically explored in the subgroup of patients treated with imatinib.

RESULTS

Cohort description

The main clinical characteristics of the patients are summarized in Table 1. Mean follow-up time was 107 ± 57.38 months. Supporting previous results, a high Sokal score (a risk score for CML) and detectable *e13a2* (*b2a2*) transcripts were associated with a lower likelihood of MR, whereas faster responses were observed with second-generation TKIs.

No differences were found between CML patients and controls for the frequencies of *KIR*, *KIR* haplotypes, or *KIR*-ligand pairs. The *HLA-B*51:01* allele was less common in CML patients ($p=0.01882$), suggesting a protective effect. By contrast, *C*04:01*, *C*07:02*, and *C*16:01* were more common in the CML cohort ($p=0.006815$, $p=0.03993$, $p=0.00422$). The frequency of *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* alleles in patients and controls were similar. The *LNK-LNK* genotype was more common in CML patients, suggesting a possible role as a risk factor ($p=0.02481$).

KIR-HLA class I results of the extended CML cohort

Of the 149 patients with data available for at least 3 months, 102 (68.45%) achieved EMR. This early response was associated with the presence of *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* ($p=0.0354$). Neither the *KIR2DL2/KIR2DS2* genes nor the C1 ligand alone had a significant influence on EMR, suggesting an additive effect for this genotype (Table 2). No associations were observed between EMR and any of the *HLA* alleles.

MR3.0 at 12 months was achieved by 41% of patients. Interestingly, presence of *KIR2DL2/KIR2DS2* was significantly associated with MR3.0 either in the presence and the absence of the C1 ligand ($p=0.029$ and $p=0.032$, respectively). Patients without *KIR2DL3* were also more likely to achieve MR3.0 ($p=0.025$) (Table 3). No *KIR* haplotype was associated with any of the MRs analyzed, but patients with *HLA-A*01:01* were more likely to achieve MR3.0 (Table S2). The genotypes significantly associated with MR3.0 are shown in Figure 1.

MR4.0 at 5 years was achieved by 58% of patients. The likelihood of this response was significantly higher in patients with *KIR* and *KIR*-ligand pairs *KIR2DL2/KIR2DS2* and *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* ($p=0.02$ and $p=0.021$,

RESULTATS

respectively) (Table 3). The *KIR* haplotypes (A and B) were not associated with a higher probability of achieving MR4.0. No *HLA class I* alleles was significantly associated with a higher likelihood of MR4.0. Significant results are summarized in Figure 2.

KLRK1-MICA/B results of the extended CML cohort

Neither the *KLRK1* genotype nor its ligands were associated with EMR or MR3.0. Patients harboring the HNK allele were more likely to achieve MR3.0 by month 12 than those harboring the LNK allele ($p=0.004$). Nor *KLRK1* genotype neither *KLRK1* allele was associated with MR4.0. Finally, presence of *MICA*009:01*, a ligand for *KLRK1*, was associated with an increased likelihood of MR4.0 ($p=0.02$) (Figure 3) (Table S2).

KIR-HLA class I results of the Imatinib cohort

Of the 133 patients in the imatinib cohort with data available for at least 3 months, 84 (63%) achieved EMR. As in the overall CML cohort, EMR achievement was associated with the presence of *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* ($p=0.03395$). *HLA-A*11:01* was significantly associated with EMR ($p=0.033$).

Overall, 41% of patients treated with imatinib achieved MR3.0 by 12 months. This response was associated with *KIR2DL2/KIR2DS2* ($p=0.03237$ and $p=0.006781$ with and without C1 ligand, respectively). As in the CML cohort, achievement of MR3.0 was also associated with absence of *KIR2DL3* ($p=0.035$). The associations with the *KIR* haplotype and the specific *KIR* ligand *HLA* alleles were non-significant.

At 5 years, MR4.0 was achieved by 57% of the patients. Again, the associations were similar to those observed for the entire CML cohort, with significant results observed for *KIR2DL2/KIR2DS2* and *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* ($p=0.035$ and $p=0.043$, respectively).

KLRK1-MICA/B results of the Imatinib cohort

Time to event curves observed for the imatinib cohort were similar to that calculated for the overall CML cohort. No significant associations were observed between the *KLRK1* genotype and EMR, MR3.0, or MR4.0. Presence of the HNK allele was associated with both MR3.0 ($p=0.008$) and MR4.0 ($p=0.045$). Similar to

the extended CML cohort, *MICA*009:01* was associated with an increased likelihood of MR4.0 ($p=0.04$).

Multivariate analysis

Variables significantly associated with EMR, MR3.0, and MR4.0 in the univariate analysis were included in multivariate models adjusted for TKI, Sokal risk, and transcripts. *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* lost its significance in EMR, whereas *KIR2DL2/KIR2DS2* with ($p=0.032$) and without the C1 ligand ($p=0.048$) retained their significance as independent predictors for MR3.0. The same effect was observed for *KLRK1* ($p=0.0124$) but not for *KIR2DL3*. *KIR2DL2/KIR2DS2* and *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* retained its significance in the MR4.0 model ($p=0.023$ and $p=0.035$, respectively) and *MICA*009:01* lost its significance (Table 4).

DISCUSSION

The use of drugs capable of inhibiting *BCR-ABL1* tyrosine-kinase activity has revolutionized the treatment of CML in the last 2 decades. The only truly curative treatment for CML is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, but the introduction of TKIs led to the definition of an “operational” cure, as long-term treatment-free remission may occur after 2 or more years of DMR.(26)

Imatinib was the first TKI developed and is currently the front-line treatment for CML. It is relatively well tolerated and induces long-term remission in most cases. Accordingly, the prevalence of CML has, increased due to the increased patients survival. The authors of a US study published in 2012, for example, predicted that the prevalence of CML would increase six fold over a period of 20 years, placing increasing pressure on healthcare systems worldwide.(27) Long-term treatment may also result in impaired quality of life due to adverse effects.

The findings of recent clinical studies suggest that approximately 40% of CML patients who achieve an optimal response to TKI treatment can stop treatment and remain in remission without detectable *BCR-ABL1* transcripts.(28) The mechanisms involved, however, are mostly unknown and therefore a greater understanding of the biological basis for successful discontinuation is crucial.

Unlike T cells, which require interaction with antigen-presenting cells, NK cells use a diverse set of inhibitory and activating receptors for target cell recognition and lysis without prior antigen stimulation or clonal expansion.(29) NK cells have been shown to be capable of detecting and eliminating tumor cells that have lost the expression of MHC class I molecules or stress-induced ligands.(30,31) CML patients with an optimal response to imatinib have been found to have a normal NK cell phenotype, suggesting that treatment restores cell function.(32)

Various recent reports suggest a potential role for KIR receptors in the development of CML and response to TKI treatment, although the studies included relatively small number of samples and reported contrasting findings.(33-36)

We recruited 190 patients with chronic-phase CML treated with TKIs and *KIR* genes, the *KLRK1* SNP (rs1049174), and KIR ligand genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA*, and *MICB* were genotyped to characterize the effects on molecular response of NK receptors and their respective ligands in this population. Apart from assessing *KIR* gene variability, we were interested in learning more

about the network of NK receptors and ligands that characterize the action of NK cells. As imatinib is the most widely used treatment for CML patients worldwide, we also analyzed separately the 152 CML patients who received only imatinib.

The results for the overall group of patients as well as for only those who were treated with imatinib revealed a protective effect for *KIR2DL2/KIR2DS2* in terms of achievement of EMR, MR3.0 and MR4.0. In the case of MR3.0 and MR4.0, the effect was seen whether the ligand was present or absent. Contrasting with previous findings in studies with a lower number of individuals and controls recruited,(7,36) we observed no significant associations between the presence or absence of *KIR2DL2/KIR2DS2* and CML on comparing patients with the 445 individuals from the control group, demonstrating no link between *KIR2DL2/KIR2DS2* and disease development. As these genes are in strong linkage disequilibrium, it is difficult to determine which gene (*KIR2DL2* or *KIR2DS2*) is responsible for the enhanced response observed. Thus, considering the overall results of our study, it is reasonable to assume that is the activating receptor *KIR2DS2*, due to its ability to enhance the cytotoxicity of NK cells and immune surveillance,(37) might be the responsible for a better response.

In the extended CML cohort, the *KIR* haplotype was not significantly associated with the achievement of EMR, MR3.0, or MR4.0, contrasting with findings from smaller studies that have reported a higher likelihood of complete MR in patients with the AA haplotypes.(33)

We also observed that absence of the inhibiting gene *KIR2DL3* was associated with MR3.0, and interestingly, this gene has never been previously linked to enhanced response to TKI therapy in CML, maybe due to a bigger number of patients present in this cohort in contrast with previous studies.(34)

In the case of the specific KIR ligands (the *HLA* class I alleles), carriers of *HLA-A*01:01* were more likely to achieve MR3.0 by month 12 than non-carriers. Moreover, *C*04:01*, *C*07:02*, and *C*16:01* alleles were significantly more common in CML patients than controls. To our knowledge, this is the first time that an association between these alleles and CML has been reported. By contrast, in our cohort, *HLA-A*02* and *HLA-B*35*, which have been previously identified as a protective and risk factors respectively for CML in a meta-analysis study,(38) were not significantly associated with worse treatment response, probably due to the heterogeneity of the samples recruited in this kind of studies. No *HLA-G* neither

RESULTATS

HLA-F were associated with worse nor better response to treatment, although is important to emphasize that no studies exist regarding variants of these genes and CML.

Regarding *KLRK1*, this is the first study to analyze the effect of SNP rs1049174 and NKG2D ligands in the TKI response of CML patients. None of the genotypes analyzed were associated with EMR, MR3.0, or MR4.0. When we analyzed the specific *KLRK1* alleles, however, we found that the activating HNK allele was associated with a higher likelihood of MR3.0 achievement. Moreover, compared with controls, the inhibiting genotype LNK-LNK was significantly more common in CML patients, suggesting its possible involvement in disease onset or progression. Finally, *MICA*009:01* was associated with a higher likelihood of MR4.0 achievement and again, this is the first such report.

Our findings for NK receptors in patients with CML reinforce the hypothesis that response to TKI treatment is enhanced when NK cells receive activating signals that increase their cytotoxicity and production of cytokines.(39)

The results obtained for the overall group and the imatinib group are very similar, supporting the extended cohort results.

Taken together, our results support the hypothesis that NK cells, which had already been shown to play a fundamental role in response acquirement, are stronger effectors of immune response when elicited by activating receptors. In fact, early clinical trials demonstrated that antibodies blocking inhibitory KIR in other hematological malignancies may help patients achieve MR and subsequently discontinue treatment.(40) In conclusion, activated NK cells are capable of both killing tumor cells and enhancing adaptive immune responses against leukemia,(32) thus, patients with *KIR2DL2/KIR2DS2* and the activating *KLRK1* genotype, may respond faster and more effectively to treatment, and can be considered an indicator of good response.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Kennedy JA, Hobbs G. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic-Phase CML: Strategies for Frontline Decision-making. *Current hematologic malignancy reports* 2018 Jun; **13**(3): 202-211.
2. Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *The New England journal of medicine* 2005 Aug 4; **353**(5): 487-497.
3. Rychter A, Jerzmanowski P, Holub A, Specht-Szwoch Z, Kalinowska V, Tegowska U, *et al.* Treatment adherence in chronic myeloid leukaemia patients receiving tyrosine kinase inhibitors. *Medical oncology* 2017 Jun; **34**(6): 104.
4. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta haematologica* 2002; **107**(2): 76-94.
5. Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lenvik T, Soignier Y, Miller JS. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood* 2003 May 1; **101**(9): 3527-3533.
6. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue antigens* 2013 Dec; **82**(6): 363-373.
7. Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004 Dec; **18**(12): 2002-2007.
8. Marin D, Gabriel IH, Ahmad S, Foroni L, de Lavallade H, Clark R, *et al.* KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia* 2012 Feb; **26**(2): 296-302.
9. Kreutzman A, Jaatinen T, Greco D, Vakkila E, Richter J, Ekblom M, *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene profile predicts good molecular response to dasatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Experimental hematology* 2012 Nov; **40**(11): 906-913 e901.

RESULTATS

10. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999 Jul 30; **285**(5428): 727-729.
11. Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annual review of genomics and human genetics* 2006; **7**: 277-300.
12. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997 Dec; **7**(6): 753-763.
13. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 1999 Dec 15; **68**(11): 1784-1789.
14. Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunological reviews* 2001 Jun; **181**: 158-169.
15. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 2008 Aug 1; **112**(3): 708-710.
16. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *Journal of immunology* 2005 Oct 15; **175**(8): 5222-5229.
17. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, *et al.* Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European journal of immunology* 2004 Jun; **34**(6): 1673-1679.
18. Garcia-Beltran WF, Holzemer A, Martrus G, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR, *et al.* Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nature immunology* 2016 Sep; **17**(9): 1067-1074.
19. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc

- receptor gamma protein. *Journal of immunology* 2005 Apr 1; **174**(7): 3859-3863.
20. Hara R, Onizuka M, Matsusita E, Kikkawa E, Nakamura Y, Matsushita H, *et al.* NKG2D gene polymorphisms are associated with disease control of chronic myeloid leukemia by dasatinib. *International journal of hematology* 2017 Nov; **106**(5): 666-674.
21. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Advances in immunology* 2000; **76**: 1-60.
22. Robinson J, Halliwell JA, Marsh SG. IMGT/HLA and the Immuno Polymorphism Database. *Methods in molecular biology* 2014; **1184**: 109-121.
23. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Distribution of Human Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and Ligands Among Blood Donors Of Catalonia. *Hla* 2019 Nov 7.
24. Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing. *Frontiers in immunology* 2018; **9**: 2991.
25. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020 Apr; **34**(4): 966-984.
26. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology* 2010 Nov; **11**(11): 1029-1035.
27. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer* 2012 Jun 15; **118**(12): 3123-3127.
28. Campiotti L, Suter MB, Guasti L, Piazza R, Gambacorti-Passerini C, Grandi AM, *et al.* Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients

RESULTATS

- with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *European journal of cancer* 2017 May; **77**: 48-56.
29. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008 Aug 1; **112**(3): 461-469.
 30. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986 Feb 20-26; **319**(6055): 675-678.
 31. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001 Sep 25; **98**(20): 11521-11526.
 32. Ilander M, Olsson-Stromberg U, Schlums H, Guilhot J, Bruck O, Lahteenmaki H, *et al.* Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2017 May; **31**(5): 1108-1116.
 33. La Nasa G, Caocci G, Littera R, Atzeni S, Vacca A, Mulas O, *et al.* Homozygosity for killer immunoglobulin-like receptor haplotype A predicts complete molecular response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients. *Experimental hematology* 2013 May; **41**(5): 424-431.
 34. Ureshino H, Shindo T, Kojima H, Kusunoki Y, Miyazaki Y, Tanaka H, *et al.* Allelic Polymorphisms of KIRs and HLAs Predict Favorable Responses to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML. *Cancer immunology research* 2018 Jun; **6**(6): 745-754.
 35. Varbanova VP, Mihailova S, Naumova E, Mihaylova AP. Certain Killer Immunoglobulin-Like Receptor (KIR)/KIR HLA Class I Ligand Genotypes Influence Natural Killer Antitumor Activity in Myelogenous Leukemia but Not in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Case Control Leukemia Association Study. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology* 2019 Nov 18; **36**(4): 238-246.

36. Middleton D, Diler AS, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. *Tissue antigens* 2009 Jun; **73**(6): 553-560.
37. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008 Oct 6; **27**(45): 5932-5943.
38. Naugler C, Liwski R. Human leukocyte antigen class I alleles and the risk of chronic myelogenous leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & lymphoma* 2010 Jul; **51**(7): 1288-1292.
39. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual review of immunology* 2013; **31**: 227-258.
40. Vey N, Bourhis JH, Boissel N, Bordessoule D, Prebet T, Charbonnier A, *et al.* A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood* 2012 Nov 22; **120**(22): 4317-4323.

RESULTATS

Table 1. Main clinical characteristics of 190 patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors

Patient Characteristics	
Sex-n (%)	
Male	109 (57.36)
Female	81 (42.63)
Age at diagnosis in years	
Median	61.5
Range	20-92
Hospital-n (%)	
Institut Català d'Oncologia	98 (51.57)
Hospital Clinic Barcelona	92 (48.42)
Sokal risk score at diagnosis-n	
Low	92 (48.42)
Intermediate	50 (26.31)
High	25 (13.15)
Unknown	23 (12.10)
Transcript-n (%)	
e13a2 (b2a2)	60 (31.57)
e14a2 (b3a2)	107 (56.31)
Unknown	23 (12.10)
First line Treatment-n (%)	
Imatinib	152 (80.0)
Nilotinib	16 (8.42)
Dasatinib	13 (6.84)
Bosutinib	9 (4.74)

Table 2. Associations between KIR genes and KIR-ligands pairs with the achievement of early molecular response (EMR) in 149 chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors.

<i>Early molecular response</i>				
<i>Gene</i>	<i>+/- n(%)</i>	<i>OR</i>	<i>95 % CI</i>	<i>P value</i>
<i>KIR2DL1</i>	+101 (99.01) - 1 (0.98)	2.23	0.28 17.36	p = 0.380
<i>KIR2DL2</i>	+ 57 (55.88) -45 (44.11)	1.47	0.69 3.15	p = 0.285
<i>KIR2DL3</i>	+ 99 (97.05) - 3 (2.94)	1.09	0.27 3.78	p = 1
<i>KIR2DL5</i>	+ 48 (47.05) - 54 (52.94)	0.80	0.37 1.70	p = 0.598
<i>KIR2DP1</i>	+ 100 (98.03) - 2 (1.96)	2.23	0.28 17.36	p = 0.380
<i>KIR2DS1</i>	+ 37 (36.27) - 65 (63.72)	0.76	0.35 1.63	p = 0.479
<i>KIR2DS2</i>	+ 56 (54.90) - 45 (45.09)	1.47	0.69 3.15	p = 0.285
<i>KIR2DS3</i>	+ 31 (30.39) - 71 (69.60)	1.30	0.57 3.06	p= 0.571
<i>KIR2DS4</i>	+ 99 (97.05) - 3 (2.94)	0.42	0.09 3.94	p = 0.665
<i>KIR2DS5</i>	+ 31 (30.39) - 71 (69.60)	0.67	0.31 1.47	p = 0.353
<i>KIR3DL1</i>	+ 97 (95.09) - 5 (4.90)	1.32	0.19 7.13	p = 0.707
<i>KIR3DS1</i>	+ 38 (37.25) - 64 (62.74)	0.8	0.37 1.71	p = 0.592
<i>KIR2DL1_C2</i>	+ 61 (59.80) - 41 (40.19)	1.07	0.48 2.37	p = 0.852
<i>KIR2DL2_C1</i>	+ 48 (47.05) - 54 (52.94)	2.16	1.01 4.80	p = 0.0354*
<i>KIR2DL3_C1</i>	+ 85 (83.33) - 17 (16.66)	1.06	0.44 2.44	p = 1
<i>KIR2DS1_C2</i>	+ 24 (26.53) - 78 (76.47)	0.92	0.42 2.08	p = 0.852
<i>KIR3DL1_BW4</i>	+ 78 (76.47) - 24 (26.53)	0.59	0.22 1.46	p = 0.311
<i>KIR3DL1_BW4i</i>	+ 34 (33.33) - 68 (66.66)	0.95	0.44 2.05	p = 1
<i>KIR3DL2_A311</i>	+ 27 (26.47) - 75 (73.53)	1.95	0.79 5.07	p = 0.166
<i>KIR2DS2_C1</i>	+ 48 (47.05) - 54 (52.94)	2.16	1.001 4.80	p = 0.0354*
<i>KIR3DS1_BW4</i>	+ 30 (29.41) - 72 (70.58)	0.53	0.24 1.18	p = 0.126
<i>KIR3DS1_BW4i</i>	+ 15 (14.70) - 87 (85.29)	0.54	0.19 1.51	p = 0.223

RESULTATS

Abbreviations: +. Presence; -. Absence; CI. confidence interval; KIR. killer immunoglobulin-like receptors; OR. odds ratio. Values with significant p values (< 0.05) are shown in bold. Associations between EMR and genotypes were analyzed using the Chi-square test.

Table 3. Achievement of MR3.0 and MR4.0 according to different KIR genes and KIR-ligand pairs in 190 patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors.

Gene	Mean time to MR3.0 (N=78)				Mean time to MR4.0 (N=110)			
	+/- n (%)	Mean	95 % CI	P-Value	+/- n (%)	Mean	95 % CI	P value
KIR2DL1	+ 74 (95)	8.8	6.2 11.4	p = 0.33	+ 103 (93.63)	18.2	16.3 24.3	p = 0.52
	- 4 (5)	8.3	6.7 10.9		- 7 (6.36)	15.1	12.0 18.4	
KIR2DL2	+ 54 (69.23)	9.8	6.8 12.3	p = 0.029*	+ 75 (68.18)	18.4	16.2 26.7	p = 0.02*
	- 24 (30.76)	7.8	6.5 10.3		- 35 (31.81)	17.0	15.6 26.6	
KIR2DL3	+ 67 (85.89)	5.7	4.5 8.5	p = 0.025*	+ 99 (90)	18.4	16.2 24.3	p = 0.68
	- 11 (14.10)	7.5	6.7 9.9		- 11 (10)	15.8	12.0 21.8	
KIR2DL5	+ 45 (57.69)	7.5	6.6 8.6	p = 0.15	+ 57 (51.81)	17.8	15.6 26.2	p = 0.92
	- 33 (42.30)	8.6	6.5 12.1		- 53 (48.18)	17.3	16.0 26.7	
KIR2DP1	+ 74 (94.87)	7.6	6.8 9.7	p = 0.33	+ 104 (94.54)	18.2	16.3 24.3	p = 0.52
	- 4 (5.12)	7.4	6.2 8.8		- 6 (5.45)	15.1	12.0 22.5	
KIR2DS1	+ 36 (46.15)	8.3	6.8 11.6	p = 0.15	+ 43 (39.09)	17.0	13.5 24.3	p = 0.69
	- 42 (53.84)	7.5	6.5 9.7		- 67 (60.90)	18.7	16.2 26.7	
KIR2DS2	+ 54 (69.23)	9.8	6.8 12.3	p = 0.029*	+ 75 (68.18)	18.4	16.2 26.7	p = 0.02*
	- 24 (30.76)	7.8	6.5 10.3		- 35 (31.81)	17.0	15.6 26.6	
KIR2DS3	+ 29 (37.17)	8.6	7.1 11.5	p = 0.11	+ 36 (32.72)	17.8	16.2 26.2	p = 0.6
	- 49 (62.82)	6.8	6.3 7.9		- 74 (67.27)	16.4	12.4 31.1	
KIR2DS4	+ 75 (96.15)	6.2	5.8 6.6	p = 0.78	+ 105 (95.45)	37.4	6.5 48.2	p = 0.84
	- 3 (3.84)	6.8	6.0 9.8		- 5 (4.54)	17.3	16.2 21.4	
KIR2DS5	+ 27 (34.61)	7.5	6.5 10.1	p = 0.77	+ 34 (30.90)	17.8	14.1 28.4	p = 0.9
	- 51 (65.38)	7.6	6.6 10.3		- 76 (69.09)	17.3	16.1 26.6	
KIR3DL1	+ 35 (44.87)	7.6	7.1 9.8	p = 0.69	+ 104 (94.54)	24.7	6.5 37.8	p = 0.92
	- 43 (55.12)	6.9	6.4 8.3		- 6 (5.45)	17.8	16.2 21.4	
KIR3DS1	+ 26 (33.33)	7.5	6.3 9.9	p = 0.21	+ 42 (38.18)	16.4	12.4 24.3	p = 0.49
	- 52 (66.66)	7.9	6.8 11.6		- 68 (61.81)	19.0	16.3 26.7	
KIR2DL1_C2	+ 52 (66.66)	8.4	6.3 10.1	p = 0.62	+ 73 (66.36)	18.9	16.4 26.2	p = 0.81
	- 26 (33.33)	7.9	5.8 9.8		- 37 (33.63)	16.3	12.6 29.1	
KIR2DL2_C1	+ 45 (57.69)	9.6	6.7 12.1	p = 0.032*	+ 63 (57.27)	18.4	16.2 27.0	p = 0.021*
	- 33 (42.30)	7.6	6.3 10.4		- 47 (42.72)	17.0	15.6 26.6	
KIR2DL3_C1	+ 58 (74.35)	7.2	6.3 9.4	p = 0.72	+ 84 (76.36)	18.2	16.2 24.3	p = 0.95
	- 20 (25.64)	6.6	5.6 8.9		- 26 (23.63)	17.3	12.7 30.4	
KIR2DS1_C2	+ 29 (37.17)	8.5	7.3 10.1	p = 0.15	+ 35 (31.81)	17.0	13.5 24.3	p = 0.5
	- 49 (62.82)	7.3	6.2 9.6		- 75 (68.18)	18.4	16.3 26.7	
KIR3DL1_BW4	+ 58 (74.35)	7.8	6.5 10.3	p = 0.59	+ 85 (77.27)	17.0	16.0 21.2	p = 0.17
	- 20 (25.64)	6.6	6.1 8.5		- 25 (22.72)	26.2	16.4 50.5	
KIR3DL1_BW4i	+ 33 (42.30)	6.8	6.1 7.8	p = 0.4	+ 42 (38.18)	18.2	14.1 26.7	p = 0.5
	- 45 (57.69)	5.9	5.6 6.7		- 68 (61.81)	17.3	16.2 26.2	
KIR3DL2_A311	+ 24 (30.76)	7.5	6.0 9.8	p = 0.49	+ 33 (30)	20.2	16.2 37.4	p = 0.28
	- 54 (69.23)	7.4	6.5 10.2		- 77 (70)	16.8	15.6 21.2	
KIR2DS2_C1	+ 45 (57.69)	9.6	6.7 12.1	p = 0.032*	+ 63 (57.27)	18.4	16.2 27.0	p = 0.021*

RESULTATS

	- 33 (42.30)	7.6	6.3 10.4		- 47 (42.72)	17.0	15.6 26.6	
<i>KIR3DS1_BW4</i>	+ 28 (35.89)	6.9	6.4 8.3	p = 0.13	+ 33 (30)	15.6	10.8 18.4	p = 0.35
	- 50 (64.10)	7.5	6.3 9.9		- 77 (70)	20.2	16.6 27.9	
<i>KIR3DS1_BW4i</i>	+ 15 (19.23)	7.4	6.8 11.6	p = 0.14	+ 13 (11.81)	12.1	9.5 28.4	p = 0.13
	- 63 (80.76)	6.2	5.9 8.1		- 97 (88.18)	19.0	16.4 26.6	

Abbreviations: +. Presence; -. Absence; CI. confidence interval; KIR. killer immunoglobulin-like receptors; MR3.0. molecular response; MR4.0. deep molecular response. Values with significant p values (< 0.05) are shown in bold. TKI: tyrosine kinase inhibitor. Time to MR3 and MR4 was calculated by Kaplan-Meier method and long rank test for comparisons. Mean time to molecular response and 95% confidence intervals are expressed in months.

Table 4. Multivariate analysis of factors influencing the achievement of MR3.0 and MR4.0 in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors.

	Variables	HR	95 % CI	P-Value
MR3.0	<i>KIR2DL2/KIR2DS2</i>	2.04	1.05 3.48	0.032*
	<i>KIR2DL2/KIR2DS2-C1</i>	2.19	1.16 3.87	0.048*
	<i>KIR2DL3</i>	1.88	0.86 5.68	0.735
	<i>KLRK1 (HNK)</i>	1.39	0.43 3.86	0.012*
	<i>SOKAL(High versus other)</i>	2.35	1.45 4.65	0.012*
	<i>TKI (second generation versus imatinib)</i>	1.35	0.56 3.54	0.203
	<i>Transcript (b3a2 versus b2a2)</i>	1.95	1.35 3.89	0.042
MR4.0	<i>KIR2DL2/KIR2DS2</i>	2.08	1.10 3.90	0.023*
	<i>KIR2DL2/KIR2DS2-C1</i>	1.03	0.58 1.8	0.035*
	<i>MICA*009:01</i>	1.59	1.06 6.97	0.352
	<i>SOKAL(High versus other)</i>	2.83	1.64 4.86	0.033*
	<i>TKI (second generation versus imatinib)</i>	1.65	0.67 4.03	0.184
	<i>Transcript (b3a2 versus b2a2)</i>	1.86	1.17 3.68	0.046*

Abbreviations: MR. molecular response. All variables were adjusted for tyrosine kinase inhibitor, Sokal risk and transcript levels.

RESULTATS

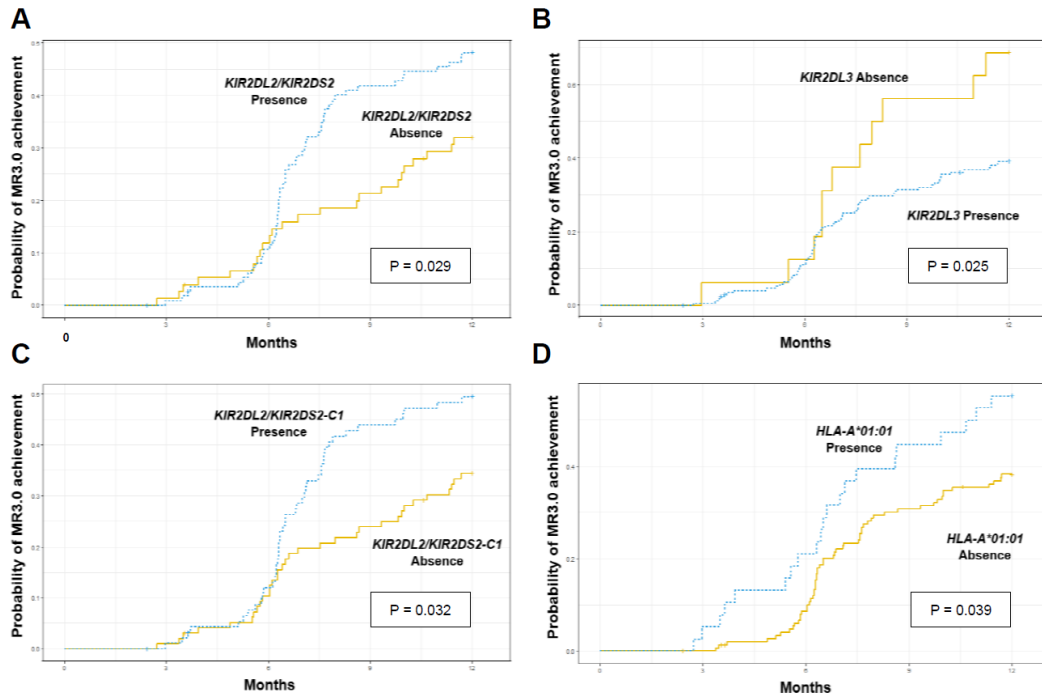


Figure 1. Time to MR3.0 according to the presence or not of certain genotypes in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. 1A: Time to MR3.0 according to the presence or not of *KIR2DL2/KIR2DS2* genes. 1B: Time to MR3.0 according to the presence/absence of *KIR2DL3* gene. 1C: Time to MR3.0 according to the presence/absence of *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* genotypes. 1D: Time to MR3.0 according to the presence or not of *HLA-A*01:01* allele.

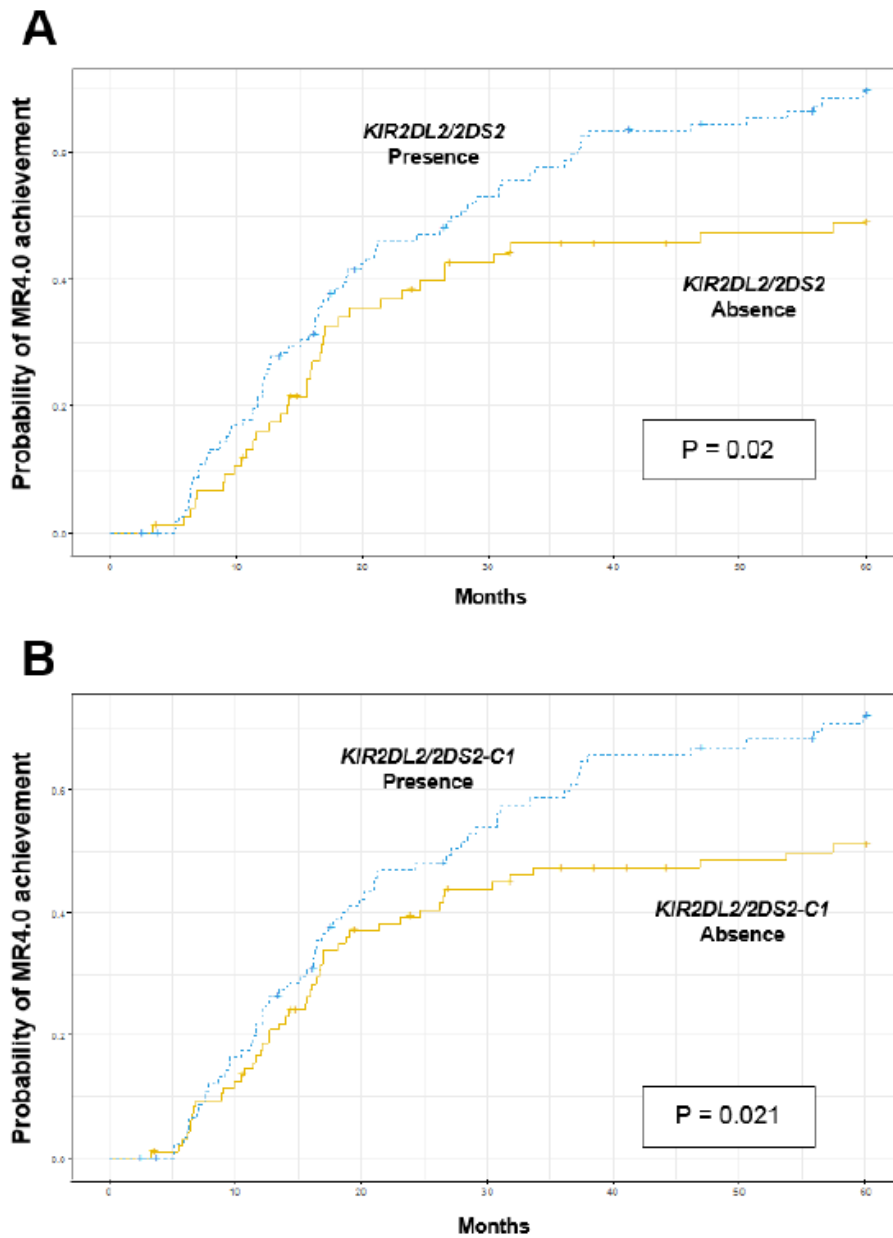


Figure 2. 2A: Time to MR4.0 according to the presence or not of *KIR2DL2/KIR2DS2* and **2B:** *KIR2DL2/KIR2DS2-C1* genotypes in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors.

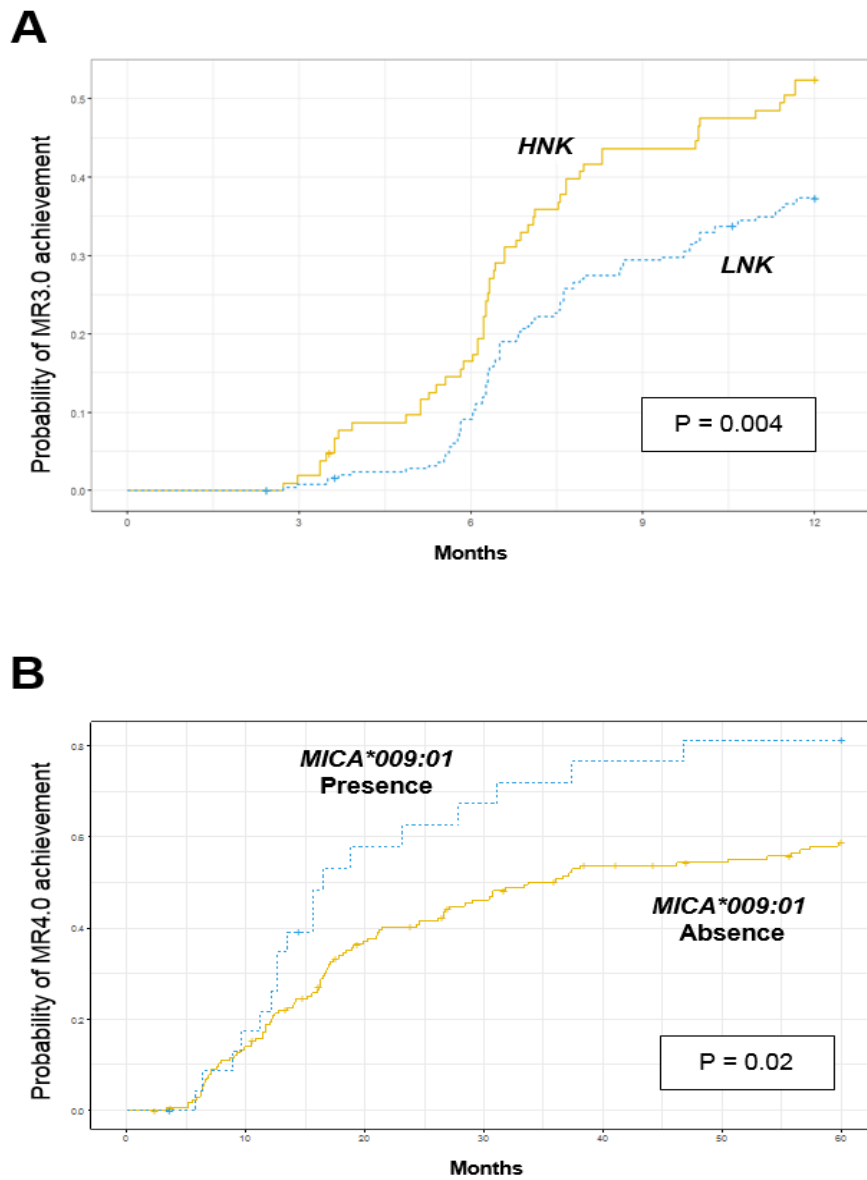


Figure 3. *KLRK1* alleles and ligands associated with response achievement in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. 3A: Time to MR3 according to HNK/LNK alleles. 3B Time to MR4 according to the presence/absence of *MICA*009:01* allele.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

S1. KIR genes and KIR-ligand pairs comparison between patients treated with imatinib and patients treated with other tyrosine kinase inhibitors.

KIR genotypes between patients treated with imatinib(N=152) and other TKI(N=38)

<i>Gene</i>	im/oth N(%)	OR	95 % CI	P value
<i>KIR2DL1</i>	im 147(96.71)	0.39	0.07 2.69	p = 0.21
	oth 35(92.10)			
<i>KIR2DL2</i>	im 100(65.78)	1.13	0.49 2.65	p = 0.84
	oth 26(68.42)			
<i>KIR2DL3</i>	im 127(83.55)	1.14	0.52 2.48	p = 0.86
	oth 31(81.58)			
<i>KIR2DL5</i>	im 76(50.00)	0.96	0.34 2.73	p = 1
	oth 20(52.63)			
<i>KIR2DP1</i>	im 150 (98.68)	0.70	0.07 33.84	p = 0.53
	oth 33 (86.84)			
<i>KIR2DS1</i>	im 71 (46.71)	0.86	0.13 3.68	p = 0.25
	oth 12 (31.57)			
<i>KIR2DS2</i>	im 100(65.78)	1.13	0.49 2.65	p = 0.84
	oth 26(68.42)			
<i>KIR2DS3</i>	im 52 (34.21)	0.78	0.32 1.79	p = 0.57
	oth 11 (28.94)			
<i>KIR2DS4</i>	im 146(96.05)	0.37	0.07 2.76	p = 0.27
	oth 35(92.10)			
<i>KIR2DS5</i>	im 58 (38.15)	0.43	0.16 1.05	p = 0.18
	oth 8 (25.00)			
<i>KIR3DL1</i>	im 147 (96.71)	0.94	0.12 44.06	p = 1
	oth 35 (92.10)			
<i>KIR3DS1</i>	im 38 (25.00)	0.80	0.29 1.98	p = 0.67
	oth 8(21.05)			
<i>KIR2DL1_C2</i>	im 113 (74.34)	0.74	0.32 1.79	p = 0.54
	oth 26 (68.42)			
<i>KIR2DL2_C1</i>	im 71 (46.71)	0.92	0.42 2.01	p = 0.86
	oth 17 (44.73)			
<i>KIR2DL3_C1</i>	im 51 (33.55)	0.80	0.33 1.84	p = 0.70
	oth 11 (28.94)			
<i>KIR2DS1_C2</i>	im 71 (46.71)	1.14	0.52 2.47	p = 0.72
	oth 19 (50.00)			
<i>KIR3DL1_BW4</i>	im 133 (78.69)	0.69	0.27 1.68	p = 0.43
	oth 14 (70.00)			
<i>KIR3DL1_BW4i</i>	im 68 (40.23)	0.63	0.19 1.87	p = 0.4
	oth 6 (30)			
<i>KIR3DL2_A31I</i>	im 48 (28.40)	0.63	0.15 2.09	p = 0.59
	oth 4 (20.00)			
<i>KIR2DS2_C1</i>	im 71 (46.71)	0.92	0.42 2.01	p = 0.86
	oth 17 (44.73)			
<i>KIR3DS1_BW4</i>	im 40 (26.31)	0.63	0.21 1.62	p = 0.40
	oth 7(20.00)			
<i>KIR3DS1_BW4i</i>	im 23 (15.13)	0.85	0.23 2.52	p = 1
	oth 5 (13.15)			

RESULTATS

Abbreviations: im. Imatinib; oth. Other TKI; CI. confidence interval; KIR. killer immunoglobulin-like receptors; OR. odds ratio. Associations between treatment received and genotypes were analyzed using the Chi-square test.

S2. Achievement of MR3.0 and MR4.0 according to different alleles in 190 patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors.

Gene	Mean time to MR3.0 (N=78)				Mean time to MR4.0 (N=110)			
	+/- n (%)	Mean	95 % CI	P-Value	+/- n (%)	Mea n	95 % CI	P value
A*02:01	+23(29.48)	6.2	5.1 7.8	p = 0.53	+41(37.27)	18.0	13.9 24.3	p = 0.55
	-55(70.52)	6.8	5.4 8.1		-69(62.73)	15.6	12.0 18.4	
A*29:02	+18(23.07)	7.8	6.3 8.9	p = 0.23	+27(24.54)	20.2	16.2 26.7	p = 0.64
	-60(76.92)	6.6	5.3 8.0		-83(75.45)	17.0	15.6 26.6	
A*01:01	+21(26.92)	5.3	4.1 9.3	p=0.039*	+18(16.36)	18.4	16.2 24.3	p = 0.15
	-57(73.07)	7.8	5.4 9.9		-92(83.63)	15.8	12.0 21.8	
A*24:02	+16(20.51)	8.4	7.1 9.2	p = 0.25	+20(18.18)	17.8	15.6 26.2	p = 0.32
	-62(79.48)	7.9	6.4 9.5		-90(81.81)	17.3	16.0 26.7	
A*03:01	+13(16.67)	9.6	8.2 11.3	p = 0.68	+17(15.45)	18.2	16.3 24.3	p = 0.81
	-65(83.33)	7.8	6.1 9.8		-93(84.54)	15.1	12.0 22.5	
A*11:01	+12(15.38)	7.3	6.8 11.6	p = 0.92	+18(16.36)	17.0	13.5 24.3	p = 0.25
	-66(84.61)	7.5	6.5 9.7		-92(83.63)	18.7	16.2 26.7	
B*44:03	+19(24.35)	9.8	6.8 12.3	p = 0.52	+27(24.54)	18.4	16.2 25.6	p = 0.36
	-59(75.64)	7.8	6.5 10.3		-83(75.45)	17.0	15.6 26.6	
B*08:01	+11(14.10)	8.6	7.1 11.5	p = 0.69	+16(14.54)	17.8	16.2 26.2	p = 0.47
	-67(85.89)	6.8	6.3 7.9		-94(85.45)	16.4	12.4 31.1	
B*07:02	+10(12.82)	6.2	5.8 6.6	p = 0.45	+12(10.90)	17.4	10.5 28.2	p = 0.81
	-68(87.17)	6.8	6.0 9.8		-98(89.10)	17.3	16.2 21.4	
B*18:01	+11(14.10)	7.5	6.5 10.1	p = 0.62	+14(12.72)	17.8	14.1 28.4	p = 0.22
	-67(85.89)	7.6	6.6 10.3		-96(87.27)	17.0	16.1 26.6	
C*04:01	+24(30.76)	6.9	7.1 9.8	p = 0.74	+30(27.27)	18.2	6.5 37.8	p = 0.35
	-54(69.23)	7.8	6.4 8.3		-80(72.73)	17.3	16.2 21.4	
C*07:01	+22(28.20)	7.5	6.3 9.9	p = 0.91	+24(21.81)	17.0	12.4 24.3	p = 0.56
	-56(71.80)	7.3	6.8 11.6		-86(78.19)	18.4	16.3 26.7	
C*16:01	+16(20.51)	7.8	6.1 11.3	p = 0.92	+23(20.90)	17.0	16.4 26.2	p = 0.28
	-62(79.48)	6.6	6.1 9.8		-87(79.10)	26.2	12.6 29.1	
C*05:01	+13(16.67)	6.8	6.2 11.4	p = 0.49	+19(17.27)	18.2	16.2 27.0	p = 0.46
	-65(83.33)	5.9	6.7 10.9		-91(82.73)	17.3	15.6 26.6	
C*06:02	+11(14.10)	7.5	6.8 12.3	p = 0.81	+18(16.36)	20.2	16.2 24.3	p = 0.38
	-67(85.89)	7.4	6.5 10.3		-92(83.64)	16.8	12.7 30.4	
C*12:03	+14(17.94)	9.6	8.1 11.9	p = 0.72	+19(17.27)	18.4	13.5 24.3	p = 0.56
	-64(82.05)	7.6	6.7 9.9		-91(82.73)	17.0	16.3 26.7	
C*07:02	+9(11.53)	6.9	6.3 8.9	p = 0.35	+12(10.90)	15.6	16.0 21.2	p = 0.81
	-69(88.46)	7.5	5.3 8.0		-98(89.10)	20.2	16.4 50.5	
G*01:01	+73(93.58)	7.6	5.4 9.3	p = 0.51	+102(92.72)	17.3	14.1 26.7	p = 0.23

RESULTATS

	-5(6.41)	7.4	5.5 8.9		-8(7.28)	17.8	16.2 26.2	
G*01:04	+21(26.92)	8.3	6.0 9.8	p = 0.12	+27(24.54)	15.1	16.2 37.4	p = 0.25
	-57(73.07)	7.5	5.5 10.7		-83(75.45)	17.0	15.6 21.2	
G*01:06	+13(16.67)	7.5	5.7 11.1	p = 0.51	+12(10.90)	18.4	16.2 27.0	p = 0.79
	-65(83.33)	7.4	6.3 10.4		-98(89.10)	17.0	15.6 26.6	
F*01:03	+12(15.38)	7.4	7.1 9.8	p = 0.95	+16(14.54)	17.4	10.8 18.4	p = 0.90
	-66(84.61)	7.6	6.4 8.3		-94(85.45)	17.0	11.6 25.9	
MICA*008:01	+33(42.30)	5.9	4.3 9.9	p = 0.62	+43(39.10)	16.8	9.5 24.4	p = 0.46
	-45(57.70)	6.7	5.8 11.6		-67(60.90)	18.4	16.4 26.6	
MICA*004	+29(37.17)	7.6	6.1 11.3	p = 0.74	+37(33.63)	17.3	16.3 24.3	p = 0.16
	-49(62.82)	7.4	6.1 9.8		-73(66.37)	17.8	12.0 18.4	
MICA*002:01	+18(23.07)	8.3	6.2 11.4	p = 0.91	+28(25.45)	17.0	16.2 26.7	p = 0.24
	-60(76.92)	7.5	6.7 10.9		-82(74.54)	18.2	15.6 26.6	
MICA*009:01	+12(15.38)	9.8	6.8 12.3	p = 0.22	+18(16.36)	16.8	16.2 24.3	p = 0.02*
	-66(84.61)	7.8	6.5 10.3		-92(83.63)	18.9	12.0 21.8	
MICB*005:02	+58(74.35)	7.8	7.1 9.8	p = 0.53	+80(72.72)	17.3	15.6 26.2	p = 0.74
	-20(25.64)	7.3	6.4 8.3		-30(27.28)	18.2	16.0 26.7	
MICB*002:01	+22(28.20)	7.5	5.3 9.9	p = 0.98	+36(32.72)	17.5	16.3 24.3	p = 0.35
	-56(71.79)	7.4	5.8 11.6		-74(67.28)	17.0	12.0 22.5	
MICB*004:01	+23(29.48)	9.6	7.1 11.3	p = 0.65	+26(23.63)	18.1	13.5 24.3	p = 0.97
	-55(70.51)	7.6	6.1 9.8		-84(76.37)	16.9	16.2 26.7	
MICB*008	+10(12.82)	7.6	6.2 10.4	p = 0.45	+16(14.54)	18.3	16.2 26.7	p = 0.28
	-68(87.17)	6.9	5.7 10.9		-94(85.46)	18.7	15.6 26.6	

Abbreviations: +. Presence; -. Absence; CI. confidence interval; MR3.0. molecular response; MR4.0. deep molecular response. Values with significant p values (< 0.05) are shown in bold. Time to MR3 and MR4 was calculated by Kaplan-Meier method and long rank test for comparisons. Mean time to molecular response and 95% confidence intervals are expressed in months.



RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

1. INFORME DELS DIRECTORS

Barcelona, 13 de octubre de 2020

Títol de la Tesi: Paper dels receptors de les cèl·lules Natural Killer i dels seus lligands, estudiats mitjançant tecnologia NGS, en l'evolució de pacients amb neoplàsies mieloides

Autora: Laia Closa Gil

Directors: Dr. José Luis Caro Oleas i Dr. Francisco Vidal Pérez

Des de la seva incorporació al laboratori, la Doctora Laia Closa ha estat molt constant i eficient en el seu treball al laboratori. Ha tingut una gran iniciativa per proposar nous experiments i estudis a realitzar i gràcies això, la producció científica durant la seva tesi s'ha incrementat amb la incorporació d'estudis no coberts pels objectius inicials i que ha permès enriquir la producció científica amb obres com l'article 2: "*Distribution of Human Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Ligands among Blood Donors of Catalonia*" (ja publicat) i l'article 3: "*High-throughput genotyping of HLA-G, HLA-F, MICA and MICB and analysis of frequency distributions in healthy blood donors from Catalonia*" (en revisió).

Cal destacar també que, durant aquests anys, ha pogut dur a terme les seves tasques de forma independent, ràpida i amb notable precisió. Això ha permès que la major part del treball d'experimentació, així com l'anàlisi i redacció de resultats, l'hagi dut a terme la doctoranda, sempre amb el suport, ajuda i assessorament de directors de tesi, personal tècnic i facultatiu, així com altres col·legues amb experiència en el camp de la biologia molecular i la immunologia.

La memòria de la tesi doctoral "Paper dels receptors de les cèl·lules Natural Killer i dels seus lligands, estudiats mitjançant tecnologia NGS, en l'evolució de pacients amb neoplàsies mieloides" es presenta com un compendi de quatre articles

RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

científics, dos dels quals han estat publicats en revistes internacionals, un d'ells està en premsa i el quart està actualment sotmès a publicació.

La contribució de la doctoranda Laia Closa Gil a cada una de les publicacions, conjuntament amb el factor d'impacte i la categorització de cada revista, s'especifica detalladament a continuació:

ARTICLE 1

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro. *Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing*. Frontiers in Immunology. 2018 Dec 19;9:2991 doi: [10.3389/fimmu.2018.02991](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02991)

Índex d'impacte: IF₂₀₁₈: 4.716. 1r tercil (T1) de la categoria *Immunology* (30/155)

Contribució de l'estudiant de doctorat a l'article:

Aquest és el primer article publicat per Laia Closa. La seva participació i implicació es va dur a terme des de la seva incorporació al laboratori coincidint amb l'inici del projecte i va consistir en dissenyar, desenvolupar i optimitzar una estratègia basada en NGS per genotipar el clúster de gens KIR que poden estar presents en les cèl·lules NK de qualsevol individu. Aquest objectiu es va desenvolupar d'acord amb les següents tasques específiques:

- Disseny dels primers per a l'amplificació de gens KIR amb les eines informàtiques adequades. El genoma d'un individu pot contenir fins a 16 gens KIR diferents.
- Realitzar l'amplificació dels diferents gens KIR per separat.
- Analitzar els resultats amb eines informàtiques específiques (CLC Bio i d'altres).
- Multiplexació de la PCR i amplificació de tots els gens KIR en un sol tub conjuntament amb el gens HLA de classe I.
- Redisseny de la estratègia, addició de nous primers i re-anàlisi dels resultats amb les eines informàtiques descrites anteriorment.
- Validació de la tècnica amb un gran nombre de mostres prèviament genotipades per KIR.
- Optimització dels protocols.
- Anàlisi dels resultats.
- Redacció i publicació del treball.

ARTICLE 2

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro. Distribution of Human Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Ligands among Blood Donors of Catalonia. HLA. 2019;1–10. doi: 10.1111/tan.13754

Índex d'impacte: IF₂₀₁₉: 2.955. 1r tercil (T1) de la categoria *Pathology* (22/78)

L'objectiu d'aquest segon treball ha estat l'estudi de la distribució genotípica dels gens KIR en poblacions sanes residents a Catalunya. Fins a la publicació d'aquest article no hi havia cap altre treball que hagués estudiat les freqüències d'aquests gens i els seus lligands al nostre entorn. Tanmateix, això ens ha permès disposar d'un grup control molt valuós per a la realització d'estudis d'associació del gens KIR amb diverses patologies, com ara els estudis en pacients amb malalties hematològiques.

Contribució de l'estudiant de doctorat a l'article:

- Recollida de mostres de donants sans.
- Genotipat dels gens KIR i HLA.
- Anàlisi de resultats.
- Redacció del manuscrit i publicació dels resultats.

ARTICLE 3

Laia Closa, Francisco Vidal, Maria J. Herrero, Jose L. Caro. High-throughput genotyping of HLA-G, HLA-F, MICA and MICB and analysis of frequency distributions in healthy blood donors from Catalonia. En premsa a HLA.

De manera similar a l'estudi dels gens KIR, hem de conèixer les freqüències d'aquests altres gens indicats en el títol de l'article i els seus lligants, molt poc estudiats, per dur a terme els estudis plantejats en els objectius en pacients amb malalties hematològiques.

Contribució de l'estudiant de doctorat a l'article:

- Dissenyar els primers per a l'amplificació de cadascun d'aquests gens per separat.
- Multiplex la PCR i obtenir l'amplificació de tots els gens en un sol tub.
- Redisseny, addició d'imprimacions i reanàlisi dels resultats amb les eines informàtiques descrites anteriorment.
- Validació de la tècnica.
- Recollida de mostres de donants sans.
- Anàlisi de resultats, elaboració del manuscrit i publicació de l'article.

ARTICLE 4

Laia Closa, Blanca Xicoy, Lurdes Zamora, Natalia Estrada, Dolors Colomer, Maria J. Herrero, Francisco Vidal, Alberto Alvarez-Larrán, Jose L. Caro. *NK cell receptors and ligand variants modulate response to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia.* (En revisió).

En aquest treball s'aplica la bateria de les eines moleculars dissenyades i validades que s'han descrit en els articles anteriors i que estan disponibles per a l'estudi del paper del gens d'interès a diferents patologies hematològiques. En concret, l'estudi presentat en aquest treball investiga el paper dels diferents receptors de cèl·lules NK provats i els seus lligands en l'evolució i resposta farmacològica d'una cohort de pacients amb Leucèmia Mieloide Crònica (CML) tractats amb inhibidors de la tirosina-cinasa (ITC).

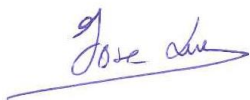
Contribució de l'estudiant de doctorat a l'article:

- Recopilació de dades clíniques i creació d'una base de dades que faciliti la manipulació de la informació clínica i molecular dels pacients de la cohort.
- Realització d'estudis de genotipat dels diferents gens inclosos a l'estudi de la cohort de pacients amb CML.
- Anàlisi descriptiva i estadística dels resultats.
- Discussió clínica i extracció de les conclusions.
- Elaboració del manuscrit.

Finalment, corroborar explícitament que cap coautor dels articles publicats o pendents de publicació, ha utilitzat els resultats d'aquests treballs per a la realització d'una tesi doctoral.

Fdo:Dr. Jose Luis Caro

Dr. Francisco Vidal



2. RESUM DELS RESULTATS

Les cèl·lules *Natural Killer* (NK) són essencials, tant a la resposta immunitària innata, com per la seva participació en la resposta immunitària adaptativa. Les funcions citotòxiques o reguladores d'aquestes cèl·lules s'exerceixen mitjançant uns receptors presents en membrana que són capaços d'identificar cèl·lules diana. D'entre aquest ventall de receptors, destaca: el paper dels receptors KIR, que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines; i dels seus lligands, les molècules d'histocompatibilitat de classe I clàssiques, que tenen la capacitat d'activar o inhibir les funcions de les NK. De l'equilibri d'aquestes accions d'activació i d'inhibició en resultarà l'efecte final de les cèl·lules NK, bé desenvolupant les seves funcions citotòxiques i/o secretores o bé bloquejant-les.

Els gens que codifiquen pels receptors KIR són extremadament polimòrfics. Fins a finals de 2017, s'havien descrit 907 al·lels diferents de gens KIR, segons l'última versió (2.7.0) de la base de dades del *International ImMunoGeneTics information System* (IMGT). És previsible que, amb les noves tecnologies de seqüenciació de segona i tercera generació, el nombre de nous al·lels descrits s'incrementi exponencialment. L'expressió d'aquests receptors a les cèl·lules NK no és homogènia en cada individu i, per tant, cada clon NK pot expressar un o uns pocs receptors KIR, però no tots alhora. Basant-se al contingut de gens, s'han descrit dos tipus d'haplotips KIR: l'haplotip A, el qual conté majoritàriament receptors inhibidors; i l'haplotip B, més abundant en receptors activadors.

En els últims anys, s'han obert nous camps d'estudi pel que fa a la relació entre els gens KIR i diferents condicions clíniques. Cada cop hi ha més evidències que els genotips KIR poden tenir una gran rellevància en el trasplantament de progenitors hematopoètics quan en la selecció d'un donant no emparentat es busca un efecte antileucèmic de l'empelt. Per tant, disposar d'una bona estratègia d'obtenció del tipatge KIR en alta resolució constituiria una eina molt valuosa per augmentar i millorar la informació molecular de qualitat dels milers de nous donants adults de progenitors hematopoètics que es registren a REDMO (Registre Espanyol de Donants de Medul·la Òssia) cada any i dels cordons que es recullen i emmagatzemen al Banc de Sang de Cordó, així com per altres grups de recerca.

D'altra banda, un dels avenços més remarcables i que han fet ampliar la noció que tenim sobre la immunovigilància de les cèl·lules NK vers el càncer, ha estat el

descobriments del receptor activador NKG2D (*Natural-killer group 2, member D*), i dels seus lligands MIC (*MHC I chain-related molecule*), expressats en cèl·lules humanes tumorals. Inicialment, NKG2D va ser identificat a la superfície de les NK com un receptor activador propi d'aquestes cèl·lules. Més tard, també es va descriure la seva presència a la superfície de totes les cèl·lules T CD8⁺ i en alguns subtipus de T $\gamma\delta$.

El gen que codifica per NKG2D és *KLRK1*, que es troba a 12p13.2 flanquejat centromèricament per *KLRD1* (CD94) i telomèricament per *KLRC4* (NKG2F). Imai *et al.*⁸² van observar, en un estudi que va durar més d'una dècada, com la incidència de càncer era significativament menor en individus que presentaven limfòcits amb alta activitat citotòxica comparant-ho amb aquells que presentaven baixa activitat. Amb el temps, altres estudis van demostrar que aquesta diferència en l'activitat citotòxica de les NK estava associada amb variants genètiques específiques de NKG2D. Els autors van determinar, que l'haplotip que van anomenar HNK es trobava relacionat amb un menor risc de desenvolupar alguns tipus de càncers (presentant més citotoxicitat). Per altra banda, l'haplotip anomenat LNK es correlacionava amb major risc. Ambdós haplotips poden ser distingits per l'SNP rs1049174, localitzat a la regió 3'UTR del gen.

Si bé el gen *KLRK1* és poc polimòrfic, el receptor que codifica reconeix un divers ventall de lligands que codifiquen per nombrosos gens molt polimòrfics. Els lligands de NKG2D rarament es troben expressats en teixits sans, són induïts principalment en cèl·lules infectades amb bacteris intracel·lulars o virus i també en cèl·lules tumorals de diferents classes. En humans, NKG2D reconeix les proteïnes codificades pels locus *MICA* i *MICB*, localitzats al complex d'histocompatibilitat principal (MHC) al cromosoma 6, prop del locus *HLA-B*. Actualment, s'han identificat més de 100 al·lels de *MICA* i més de 40 de *MICB* en diferents poblacions humanes.

Les cèl·lules NK tenen un paper clau en els mecanismes d'immunovigilància i control del càncer. La CML és un càncer hematològic caracteritzat per la fusió en una cèl·lula mare hematopoètica dels gens *ABL1* i *BCR*, expressant l'oncoproteïna BCR-ABL1. Els pacients que presenten aquesta translocació recíproca són

tractats amb ITC que són capaços de bloquejar l'activitat d'aquesta oncoproteïna. Tot i que els ITC han augmentat significativament la supervivència dels qui pateixen aquesta malaltia, la resposta d'aquests pacients vers aquesta teràpia és altament heterogènia. En estudis anteriors, s'ha observat com les cèl·lules NK es troben més elevades en aquells pacients que, tractats amb ITC, arriben més ràpidament a presentar una resposta molecular.

En aquesta tesi doctoral es presenta el disseny i validació d'una estratègia capaç de detectar presència i absència dels gens KIR, variants del gen que codifica per NKG2D, així com variants HLA de classe I clàssics, *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB*. S'utilitza aquesta estratègia per estudiar una gran cohort de donants de sang de Catalunya per estudiar les freqüències dels gens KIR i respectius lligands en la població sana així com un estudi amb una cohort més petita on s'estudia la distribució de HLA classe I no clàssics *HLA-F* i *HLA-G*, i *MICA* i *MICB*. També, utilitzant aquesta estratègia, s'estudia la relació entre els receptors de les cèl·lules NK i els respectius lligands i l'heterogeneïtat en les respostes que presenten els pacients de CML que són tractats amb ITC.

L'estratègia dissenyada es basa en una PCR llarga múltiple on s'amplifiquen tots els gens KIR i els gens HLA de classe I en un sol tub utilitzant un total de 16 encebadors dissenyats per poder obtenir dos amplicons per cada gen KIR i un pels HLA (**Figura 14**).

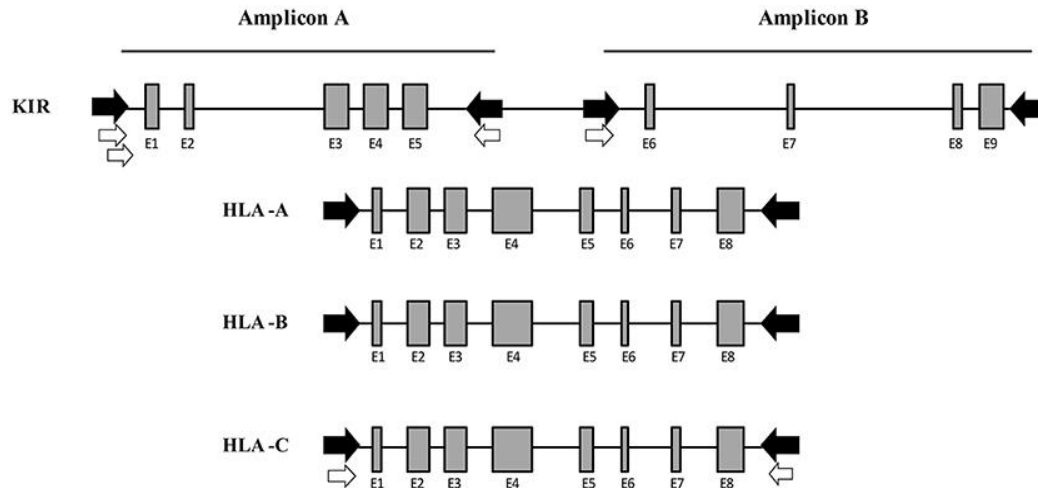


Figura 14. PCR llarga en un sol tub per l'amplificació dels gens KIR i HLA de classe I. Es van dissenyar 4 encebadors genèrics per tots els gens KIR (negre) per poder obtenir dos amplicons, la mesura dels quals fos similar a la dels gens HLA de classe I. Utilitzant aquest mètode, l'intró 5 dels gens KIR és l'única regió que no queda completament coberta. D'altra banda, es van dissenyar quatre encebadors més (blanc), aquest cop específics de certs gens KIR, després de comprovar que l'amplificació genèrica fallava en alguns casos a causa de certes inespecificitats en els punts d'unió dels encebadors. Finalment, es van dissenyar 6 encebadors més per amplificar HLA de classe I. Obtinguda de l'Article 1.

Per dur a terme la validació de l'estratègia dissenyada, es van seleccionar a la base de dades del Banc de Sang i Teixits 192 mostres de les quals es tingué el tipatge previ de KIR i HLA de classe I. Amb aquestes mostres es van preparar 4 carreres de seqüenciació, 2 utilitzant la plataforma MiSeq d'Illumina i el *kit* de 300 cicles (2x150 pb), i 2 més utilitzant la plataforma NextSeq i el *kit* de 500 cicles (2x300 pb). Els indicadors de qualitat de l'experiment de seqüenciació van ser adequats en els quatre casos i la quantitat de lectures realitzades van ser suficients en nombre per cobrir sobradament tots els gens que preteníem tipar. Per analitzar quins gens KIR es trobaven presents a cada mostra, es van seleccionar 4 seqüències específiques, que vam anomenar "sondes virtuals", de cada gen KIR i es van buscar en les lectures de seqüenciació utilitzant una *pipeline* desenvolupada *in-house*.

La concordança entre el resultat previ obtingut mitjançant PCR-SSO i el resultat obtingut utilitzant aquesta nova estratègia va ser molt elevada, un 97,84%, trobant diferències en 4 de les 186 mostres analitzades. Aquestes quatre mostres van ser analitzades mitjançant PCR-SSP, una altra tècnica prèviament validada, donant el mateix resultat que mitjançant la NGS. En aquest sentit, vam considerar que

l'estratègia desenvolupada, en el cas dels gens KIR, proveeix d'una concordança del 100% comparat amb altres tècniques ja validades. Amb una mitja de 4299 sondes virtuals trobades per mostra utilitzant el *kit* de 300 cicles, i 5984 sondes virtuals amb el *kit* de 500 cicles, vam poder limitar el nombre de lectures a analitzar al 50% sense afectar el resultat i disminuint notablement el temps d'anàlisi. A més a més, comparant el nombre de sondes trobades en cada amplicó de cada gen, vam poder veure com en tots estaven ben balancejats menys en els gens *KIR2DP1*, *KIR2DS4*, i *KIR2DL4*, en els quals un dels dos amplicons es veu incrementat en cobertura a causa d'una amplificació desequilibrada. Tot i així, el nombre de sondes que trobem en l'amplicó menys representat d'aquests gens és suficient per detectar la seva presència.

Pel que fa als gens HLA de classe I, tots van quedar suficientment coberts i presentaren una bona profunditat (una mitjana de 378). La concordança va ser del 99.46%, amb una sola diferència: *HLA-B*07:05:01:01*, el qual s'havia obtingut mitjançant la tècnica SBT, va ser detectat per NGS com a *HLA-B*07:06:01*. Estudiant aquesta discordança, es va detectar com el canvi nucleotídic entre *HLA-B*07:05:01:01* i *HLA-B*07:06:01* es troba localitzat a l'exó 5, el qual, mitjançant la tècnica SBT, no es té en compte. És per aquest motiu que es va decidir donar per correcte el genotip determinat mitjançant la NGS.

Aquests bons resultats, pel que fa a la concordança enfront dels mètodes validats prèviament, han permès substituir-los per una estratègia de molt més alt rendiment i que permet un guany tant a nivell de temps de manipulació del personal de laboratori com a nivell de cost per mostra. Això permetrà, a diferència de les dues tècniques *gold-standard*, dur a terme estudis clínics on es puguin analitzar un gran nombre d'individus en menys temps i invertint-hi menys diners.

En aquest sentit, i per tenir una bona cohort de controls sans per poder procedir amb els estudis clínics, es van genotipar utilitzant aquesta estratègia 445 donants de sang de Catalunya. Es van calcular les freqüències al·lèliques de tots els gens KIR i dels dos pseudogens, també dels genotips i dels haplotips, així com les freqüències dels lligands HLA-Bw4, HLA-C1, HLA-C2, i HLA-A3/11 i de les parelles receptor-ligand. Pel que fa als gens KIR, el 24,49% dels individus presenten l'haplotip AA, i el 75,51% l'haplotip BX. Com passa en la majoria de poblacions caucàsiques, els gens inhibidors són molt més presents que els gens activadors. Amb l'excepció de *KIR2DS4* (amb una freqüència de 95,96%), la resta

dels gens activadors són menys freqüents que els inhibidors, des d'un 34,83% en el cas de *KIR2DS3* fins a un màxim de 60,22% en el de *KIR2DS2*. A més a més, com s'ha descrit en la gran majoria de poblacions, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR3DP1* van ser detectats en tots els individus analitzats. Trenta-vuit dels 625 genotips publicats a la Base de Dades de Freqüències Al·lèliques (AFND) van ser detectats, tot i que els més comuns es concentren en només 8 genotips, els quals presenten un 83.15% de tots els individus analitzats. El més freqüent és el genotip ID 1, present en 109 individus. Finalment, 30 individus presenten tots els gens KIR, l'anomenat genotip ID 6.

Pel que fa als lligands dels gens KIR, HLA de classe I, el 42,25% dels individus són heterozigots per C1/C2, 38,43% homozigots per C1, i el 19,33% homozigots per C2. L'epítip Bw4 es troba present en un 79,7% dels donants i A3/11 en un 31.46%. La parella més freqüent de receptor lligand és *KIR3DL1*-Bw4+ (present en un 75,73% dels casos) i la combinació de receptors-ligands més freqüent *KIR2DL1* + C2 // *KIR2DL2/3* + C1 // *KIR3DL1* + Bw4, en un 24,49% dels individus. Finalment, 35 individus presentaren totes les parelles KIR-ligand analitzats.

Per finalitzar amb l'anàlisi d'aquesta cohort, es van comparar les freqüències dels gens KIR trobats en la cohort de donants de sang de Catalunya amb altres 5 poblacions de la península i descrits a l'AFND (Portugal, Granada, Sevilla, País Basc i Cantabria). Totes les comparacions evidenciaren un alt nivell de correlació, tot i que quan es van comparar els gens KIR activadors (els més variables a nivell de presència i absència), s'observa un cert nivell de divergència quasi estadísticament significativa entre el País Basc i Cantabria amb Catalunya.

Pel que fa al segon estudi de freqüències, es van analitzar *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB* després d'incloure'ls en el panell de gens d'estudi de 96 individus de la cohort utilitzada anteriorment (**Figura 15**).

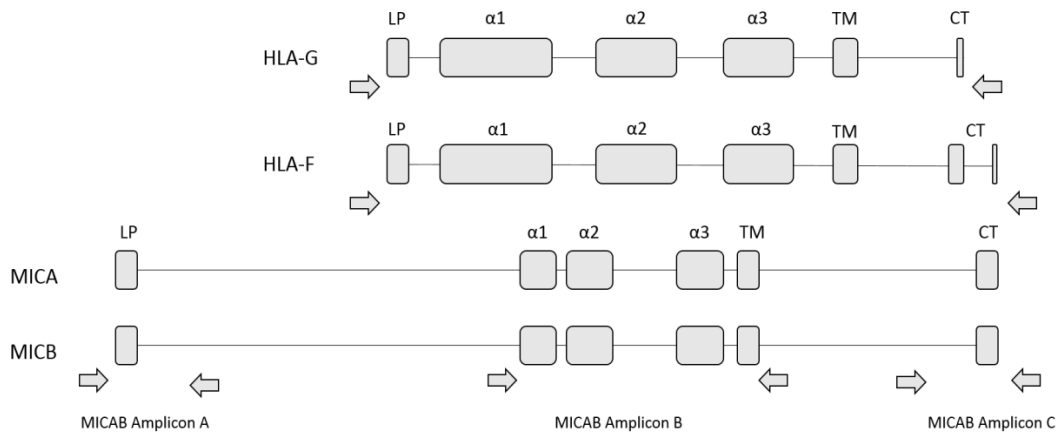


Figura 15. Estratègia dissenyada per amplificar a la vegada HLA-G, HLA-F, MICA i MICB en una PCR en un mateix tub. S'indiquen els dominis codificants per tots els gens. Obtinguda de l'Article 3.

Aquest estudi era indispensable per poder arribar a aplicar el panell a futurs estudis clínics, ja que no es tenia informació sobre les freqüències d'aquests gens a la nostra regió. Tenint en compte els primers dos camps de nomenclatura HLA, es van detectar sis al·lels diferents d'*HLA-G* i dos d'*HLA-F*, sent els més freqüents *HLA-G*01:01* (77,08%) i *HLA-F*01:01* (84,90%). Pel que fa als al·lels detectats tenint en compte els quatre camps, se'n van detectar 16 en el cas d'*HLA-G* i 10 en el cas de *HLA-F*. Els al·lels dels gens MIC més freqüents detectats a la cohort van ser *MICA*008:01* (16,15%) i *MICB*005:02* (46,84%). Les freqüències genotípiques de tots els gens es trobaven en equilibri Hardy-Weinberg menys les de *MICA*, degut segurament al baix nombre de mostres analitzades per un gen tan polimòrfic. A més a més, també vam estimar les freqüències haplotípiques i calcular el corresponent desequilibri de lligament (LD), el qual apareix en els al·lels *F*01:03-MICA*008:02* i *MICA*001-MICB*005:02*. Es va observar un fort LD entre *MICA* i *HLA-B* (utilitzant dades de l'estudi previ). Finalment, es van comparar les freqüències obtingudes amb altres estudis realitzats en poblacions Caucàsiques per corroborar els resultats.

Un cop es van caracteritzar tots els gens a estudiar en cohorts de donants no emparentats i sans, es va procedir a caracteritzar les variants dels gens del panell a 190 pacients de Leucèmia Mieloide Crònica de l'Hospital Clínic de Barcelona i

de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Altrament, es va caracteritzar a part un SNP present a la regió 3'UTR del gen *KLRK1* que codifica pel receptor NKG2D de cèl·lules NK i es va comparar amb poblacions control reportades prèviament en bases de dades d'accés públic. L'objectiu de l'estudi era investigar l'existència d'alguna correlació entre les variants dels gens codificants de receptors NK i els seus lligands amb el tipus de resposta que presenten els pacients als inhibidors de la tirosina cinasa.

Es van analitzar dues cohorts: la cohort sensera tenint en compte els 190 pacients tractats amb diferents inhibidors de tirosina cinasa, i una cohort més reduïda tenint en compte només els pacients tractats amb imatinib, per corroborar els resultats. La presència dels gens *KIR2DL2/KIR2DS2* ajuden a l'obtenció d'EMR, MR3.0 i MR4.0, al contrari de l'efecte que produeix la presència de l'inhibidor *KIR2DL3*. Pel que fa al receptor NKG2D, els pacients amb l'haplotip activador HNK presenten més probabilitats d'obtenció de MR, així com aquells que presenten la variant *MICA*009*. La diferència més remarcable entre el grup de pacients i el grup de controls sans va ser una més alta freqüència de l'haplotip inhibidor LNK del receptor NKG2D.

Aquests resultats demostren com la presència de receptors activadors NK ajuden a l'obtenció de EMR, MR3.0 i MR4.0 a pacients tractats amb ITC. Per tant, estudiar el panell d'aquests gens a pacients recentment diagnosticats pot ajudar a la selecció del tractament. Els pacients sense comorbiditats i amb un perfil NK activador podrien ser tractats amb imatinib sense haver de patir les toxicitats dels ITC de segona generació i tenir moltes probabilitats d'obtenció de resposta.



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La tardor de 1958, Peter C. Nowell i David A. Hungerford, de la Universitat de Pensilvania (Filadèlfia), van descobrir un diminut cromosoma acrocèntric derivat del cromosoma 22 en cultius de cèl·lules de pacients amb leucèmia mieloide crònica (LMC), el que avui es coneix com a Cromosoma Filadèlfia, responsable de la patologia.^{171,172} Aquesta observació no hagués estat possible sense la contribució de Joe-Hin Tjio i Albert Levan, els quals, utilitzant mètodes innovadors en citogenètica, havien descrit només dos anys abans el nombre i les característiques normals dels cromosomes humans.¹⁷³ L'any 1972, Janet Rowley, la primera dona nord-americana genetista, descrivia el cromosoma Filadèlfia com la translocació recíproca entre el cromosoma 9 i el 22.⁷ No va ser fins més de 10 anys després com, amb noves tècniques moleculars, es va poder identificar el transcrit BCR-ABL i es va establir que era la causa de la malaltia.¹⁷⁴ L'any 1996, Brian Druker va descobrir l'imatinib mesilat, inhibidor de la tirosina cinasa ABL. Aquesta molècula, ocupa el lloc d'unió de l'ATP a la cinasa BCR-ABL i atura el senyal de l'oncoproteïna inactivant-la i ha revolucionat el tractament de la LMC, augmentant de manera espectacular la supervivència dels pacients.²¹

Des de la perspectiva actual, s'evidencia el limitat progrés a nivell de coneixements dut a terme durant el segle dinou, quan ja es coneixia el concepte de Leucèmia, comparat amb totes les millores dutes a terme a l'última meitat del segle vint, definint les bases citogenètiques i moleculars de la CML gràcies a les innovacions tecnològiques que s'han anat aplicant en la recerca de la malaltia.

Tenint en compte les dades presentades en diferents treballs recentment publicats on es descriuen alteracions en el nombre de cèl·lules NK en pacients en fase crònica d'aquesta malaltia,^{175,176} un dels objectius del nostre treball va consistir en caracteritzar les variants dels receptors de cèl·lules NK en pacients de CML. No obstant això, per dur a terme l'estudi en una gran cohort de pacients, calia desenvolupar un mètode de tipatge de més alt rendiment que la PCR-SSO, la tècnica *gold-standard* que s'utilitzava en aquell moment al Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST per caracteritzar la presència dels gens KIR, i que encara s'utilitza actualment a la majoria de laboratoris d'aquest àmbit.

DISCUSSIÓ

Durant els últims anys, la seqüenciació massiva de segona generació ha demostrat el seu gran potencial, augmentant el rendiment i disminuint el cost per mostra mentre que permet assolir una major resolució en el genotipat dels gens HLA. Gràcies a tots aquests avantatges, ja s'ha integrat en moltes rutines diagnòstiques d'anàlisi genètica. Al Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST, en col·laboració amb el Laboratori de Coagulopaties Congènites, es va implementar el tipatge per NGS de l'HLA basat en un desenvolupament propi l'any 2015, dos anys abans de l'inici d'aquesta tesi doctoral. L'augment del nombre total de determinacions que es van poder dur a terme al llarg d'un any va créixer de 40.000 a 110.000 (**Figura 16**), i la NGS va passar a substituir gairebé completament les tècniques prèviament utilitzades (**Taula 1**).

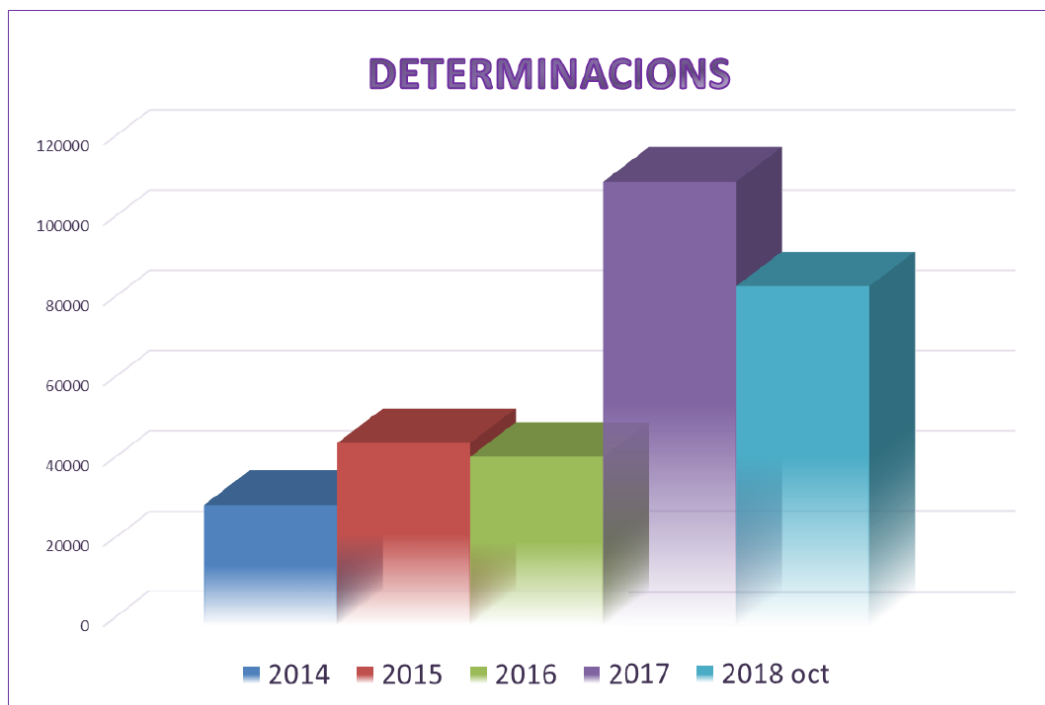


Figura 16. Nombre de determinacions HLA dutes a terme al Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del Banc de Sang i Teixits des del 2014 fins a l'Octubre de 2018. Obtinguda de la Base de dades del Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST.

En vista de les magnituds de les cohorts reclutades pel desenvolupament dels estudis i amb els bons resultats obtinguts amb la implementació del tipatge HLA per NGS al laboratori, es va decidir dissenyar una estratègia per poder caracteritzar els gens KIR i els seus lligands HLA utilitzant la plataforma MiSeq

d'Illumina i, d'aquesta manera, poder dur a terme els estudis amb pacients per extreure conclusions més robustes, relacionant la presència o absència d'aquests gens en neoplàsies hematològiques.

Taula 1. Determinacions HLA al Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del Banc de Sang i Teixits per tècnica i any. Font: Elaboració pròpia.

	2014	2018
PCR-SSO	77%	8%
PCR-SBT	23%	2%
NGS	-	90%

En el moment en el qual es va iniciar aquest projecte, només hi havia publicats dos articles on es descrivia un mètode per dur a terme el tipatge KIR en alta resolució utilitzant les plataformes NGS de Illumina. En el primer treball (Norman *et al.*), es descriu el desenvolupament d'un mètode de captura i seqüenciació que permet analitzar tots els gens KIR i els gens *HLA-A*, *-B* i *-C* a partir d'una mostra de DNA genòmic.¹⁷⁷ A més, també van desenvolupar una eina bioinformàtica per determinar els al·lels específics de KIR i el nombre de còpies, tenint en compte la profunditat de lectura o la cobertura diferencial dels diferents gens.¹⁷⁷ Un any després, Manianguou *et al.* van publicar un mètode basat en l'amplificació de tots els gens KIR individualment i posterior seqüenciació i anàlisi mitjançant una eina bioinformàtica, desenvolupada pel mateix equip, que permetia el tipatge a nivell al·lèlic.¹⁷⁸ Ambdós laboratoris van utilitzar les mateixes línies cel·lulars, obtingudes del Taller Internacional d'HLA i KIR, per comparar els resultats obtinguts.¹⁷⁹

Una dificultat inherent al desenvolupament d'una tècnica per a l'estudi molecular dels gens KIR és la gran quantitat de seqüències inacabades o parcials dels diferents al·lels que es recullen a la base de dades IPD-KIR. Amb el temps i, sobretot els darrers anys, aquestes s'han anat completant amb noves aportacions i progressivament la base de dades conté més seqüències, més fidedignes i amb la seqüència completa de la major part d'al·lels. La gran homologia que presenten els gens KIR entre ells, però alhora l'alt grau de polimorfisme, també va suposar un dificultat pel disseny de encebadors capaços d'amplificar-los a la vegada. Finalment, cal assenyalar que l'obstacle principal en els inicis del projecte va ser l'escassetat de programes bioinformàtics específics, comercials o de lliure accés, per poder analitzar fàcilment els resultats. La dificultat d'anàlisi d'aquests gens per

part dels *software* que hi ha disponibles actualment pot ser deguda a l'alta homologia entre diferents KIR. En aquest sentit, l'estratègia de seqüenciació mitjançant la plataforma Illumina de lectures curtes pot no ser la idònia per poder arribar a determinar al·lels KIR. Les plataformes de tercera generació amb lectures de llargues extensions podrien solucionar aquest problema.

L'anàlisi de les seqüències obtingudes amb la tècnica dissenyada es va dur a terme mitjançant els dos programes desenvolupats pels grups de Stanford i Nantes esmentats anteriorment, havent obtingut prèviament les mateixes línies cel·lulars que s'havien utilitzat en els seus estudis. Amb el programa de Norman *et al.*, allotjat a la plataforma GitHub (<https://github.com/n0rmski/PING>), la concordança a nivell al·lèlic només va ser d'un 60% i, per tant, es va descartar. D'altra banda, utilitzant el programa desenvolupat pel grup de Nantes, la concordança va ser del 90%, tot i que aquest últim no era de lliure accés. L'augment de concordança utilitzant el programa del grup francès pot ser degut al fet que ha estat dissenyat per analitzar seqüències obtingudes mitjançant una metodologia molt semblant a l'estratègia dissenyada pel nostre grup, contràriament al mètode desenvolupat pel grup americà, que es basava en la captura per sondes. D'aquesta manera, tot i que no podent obtenir la màxima informació possible, podem informar sobre el tipatge KIR a nivell de presència i absència, així com l'alta resolució dels seus principals lligands.

Un cop realitzada la validació del tipatge KIR-HLA, es va treballar per incorporar altres gens codificants de lligands de receptors NK al panell, incloent-hi *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB*, tots ells podent-se analitzar fins a nivell d'al·lel mitjançant el mateix programari comercial amb el qual el laboratori analitza els gens HLA. A

L'ús del mètode desenvolupat, a part de servir per dur a terme els estudis clínics plantejats al principi d'aquesta tesi doctoral i estudiar les freqüències de la població de Catalunya, també s'ha transformat en una eina assistencial fonamental del laboratori. Actualment, el laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST, realitza la determinació dels gens KIR en resposta a la demanda de clíniques de fertilitat i reproducció assistida i també per trasplantament haploideu.

Aquestes dues aplicacions de les tècniques desenvolupades no formen part fonamental dels resultats presentats a la tesi però, per tal de transmetre la seva rellevància i implicacions del treball desenvolupat en aspectes assistencials, crec

adient incloure a continuació una breu discussió sobre la base científica que sustenta el tipatge KIR i HLA en aquestes especialitats mèdiques.

En el cas de les clíniques de fertilitat, existeixen estudis que han demostrat com certes combinacions KIR-*HLA-C* es troben en més alta proporció en parelles no-fèrtils.¹⁸⁰⁻¹⁸² Durant la gestació, el sistema immunològic matern reconeix els antígens fetals i s'estableix un equilibri entre les defenses de la integritat de l'úter i el fetus.¹⁸³ Així doncs, aquest equilibri depèn de la tolerància dels leucòcits materns envers els antígens expressats a les cèl·lules del fetus. Les característiques de les cèl·lules immunològiques de la decídua (nom donat a l'endometri a partir de la implantació de l'òvul en la mucosa uterina) i especialment els receptors de membrana de les cèl·lules NK, que són una de les subpoblacions cel·lulars més importants en la implantació, es relacionen en el manteniment de l'homeòstasis entre la integritat uterina i la nutrició fetal. D'entre aquests receptors, s'han analitzat especialment els receptors KIR, els lligands dels quals es troben expressats en les cèl·lules del trofoblast, i on certes combinacions de receptors i lligands s'ha associat a problemes de fertilitat.¹⁸⁴ Això ha derivat cap a un interès creixent durant els últims anys en el seu tipatge en l'estudi de la infertilitat femenina.

D'altra banda, el trasplantament de progenitors hematopoètics (TPH) restableix la funció hematopoètica i immunitària, permetent curar o millorar la supervivència en pacients d'un ampli ventall de malalties. Des dels primers trasplantaments als anys 60, el millor coneixement dels gens HLA, i la millora dels nous protocols de trasplantament han augmentat enormement la seva aplicació. El nombre de trasplantaments realitzats a pacients adults a Espanya l'any 2019, va ser de 3173 i, com es pot observar a la **Figura 17**, no ha parat de créixer els darrers anys.

El trasplantament hematopoètic haploidèntic, consisteix a realitzar un trasplantament entre un donant i un receptor que comparteixen només un haplotip sencer HLA.^{185,186} Aquest tipus de trasplantament ha crescut significativament aquests últims anys en adults, en detriment del trasplantament de cordó, permetent trobar un donant familiar quan no existeix als registres internacionals un donant no emparentat amb compatibilitat completa (**Figura 18**).

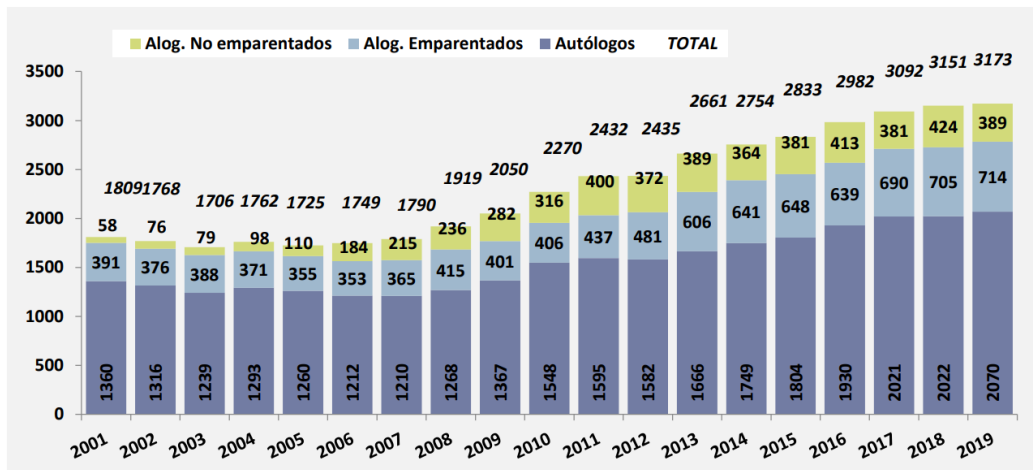


Figura 17. Nombre de TPH en adults (>15 anys) a Espanya entre l'any 2001 i el 2019. Obtinguda de la Organización Nacional de Trasplantes, Memoria de actividad de trasplante de progenitores Hematopoyéticos 2019.

Aquest ja és un procediment que s'ha establert per diverses malalties congènites del sistema hematopoètic, incloent-hi malalties del sistema immunitari i malalties metabòliques.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ En aquest tipus de trasplantament, on es du a terme una depleció de les cèl·lules T per evitar la malaltia de l'empelt contra l'hoste en el post-trasplantament, les cèl·lules NK del donant hi tenen un paper fonamental per l'obtenció d'un bon pronòstic.^{93,190-192} En aquests casos, es busca que hi hagi una incompatibilitat KIR-ligand en direcció donant-receptor, fet que permet que es doni l'efecte empelt contra leucèmia gràcies a l'altre reactivitat de les NK.¹⁹³ Això passa quan el donant presenta el lligand C1/C2 o Bw4, que no es troba present en el receptor. En aquestes condicions, les cèl·lules mare de l'empelt donen lloc a un repertori NK que reconeix com a foranies les cèl·lules canceroses del pacient i reacciona contra elles.¹⁹⁴ Aquest tipus de trasplantament va començar a realitzar-se a l'estat l'any 2012 i no ha parat de créixer des de llavors amb el consegüent increment del nombre de tipatges KIR realitzats pel nostre laboratori.

Per tant, cal destacar que actualment, el laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST, realitza la determinació dels gens KIR mitjançant la metodologia desenvolupada en aquesta tesi doctoral, utilitzant la plataforma de seqüenciació Illumina i permetent fer moltes més determinacions en menys temps i cost.

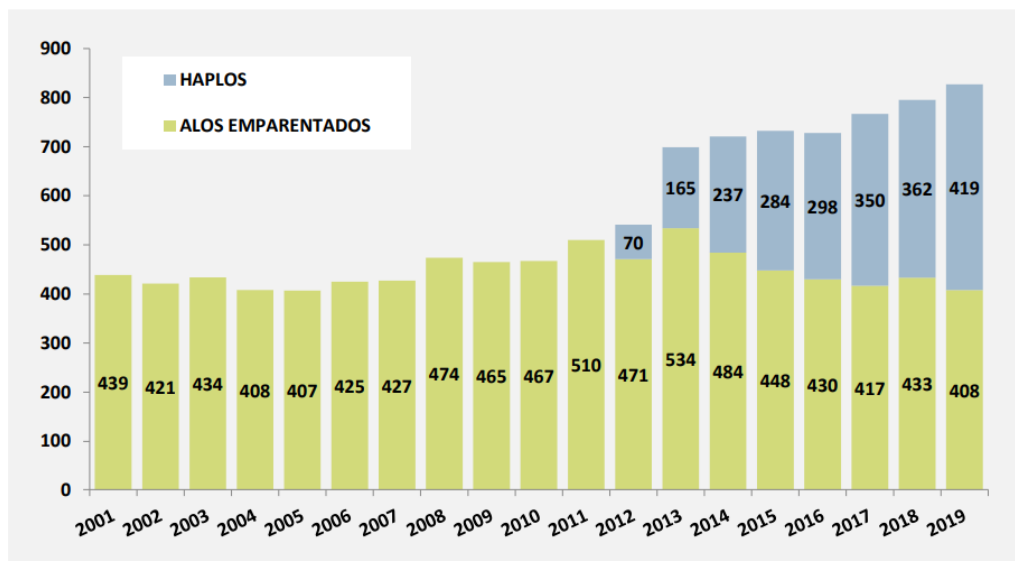


Figura 18. Nombre de TPH al·logènics emparentats haploide a Espanya entre l'any 2001 i el 2019. Obtinguda de la Organización Nacional de Trasplantes, Memoria de actividad de trasplante de progenitores Hematopoyéticos 2019.

Altrament, aquest augment de la capacitat per dur a terme determinacions d'aquests gens podria aprofitar-se per ampliar la informació genètica de l'inventari d'unitats de sang de cordó umbilical (SCU) del Banc Cordó del BST per tal d'augmentar la seva competitivitat internacional. En aquest sentit, destacar que l'ús de la SCU per TPH ha experimentat una important disminució des de l'arribada dels trasplantaments haploide (Figura 19) i per tant, és encara més important incrementar la competitivitat i atractiu de les SCU dotant-les d'una informació genètica més àmplia i de més qualitat.

Com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules NK són un dels components més importants a l'hora d'aconseguir la resposta empelt versus leucèmia, efecte crític per prevenir la recaiguda després d'un TPH al·logènics en neoplàsies hematològiques.⁹³ Els bancs de SCU han donat accés a TPH a molts pacients sense opció de trobar donant amb una compatibilitat HLA completa, sobretot aquells que pertanyen a minories ètniques.¹⁹⁵ Gràcies als requisits menys estrictes en la coincidència HLA, aquest procediment permet escollir d'entre diverses unitats de SCU i permetria, potencialment, la selecció d'unitats que podrien maximitzar la resposta de l'empelt contra la leucèmia basant-se en combinacions KIR i lligands favorables.¹⁹⁶

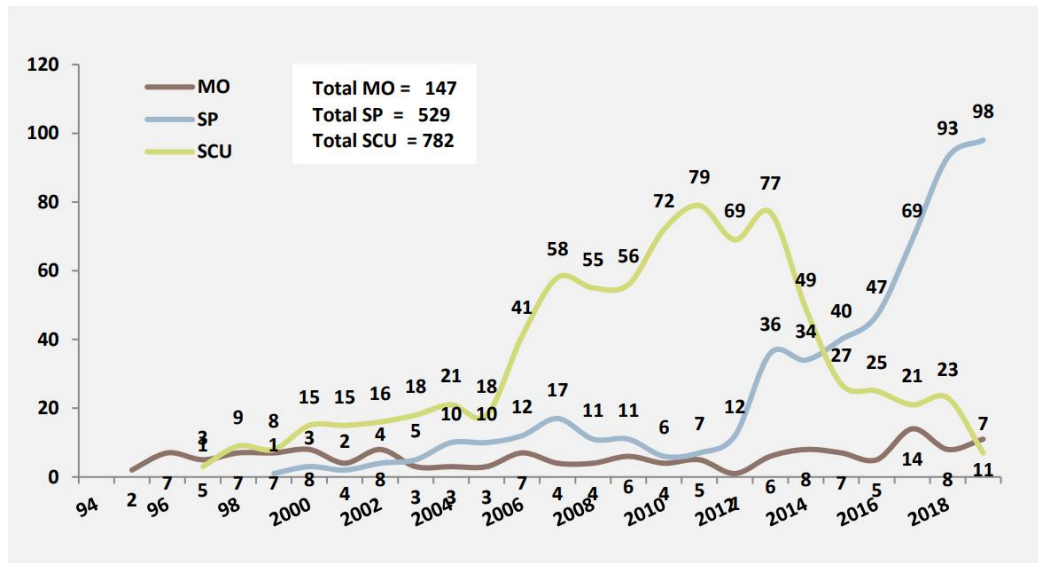


Figura 19. THP realitzats a Espanya a partir de donants espanyols des de l'any 1994 fins al 2019. S'hi aprecia una forta caiguda en la utilització de SCU, així com un increment de la utilització de Sang Perifèrica (SP). Obtinguda de la Organización Nacional de Trasplantes, Memoria de actividad de trasplante de progenitores Hematopoyéticos 2019.

Finalment, un altre ús que se li podria donar a aquesta nova metodologia desenvolupada és el tipatge de pacients per dur a terme immunoteràpies contra la leucèmia dirigides a les cèl·lules NK, on serà imprescindible disposar del tipatge KIR del donant i del receptor (**Figura 20**).

A part de l'ús rutinari que se li pot donar a les noves tècniques i estratègies desenvolupades durant l'execució d'aquesta tesi, l'objectiu principal era aplicar-la a estudis amb cohorts àmplies i molt ben caracteritzades de pacients amb patologies hematològiques. Per investigar una associació gen-malaltia o gen-resposta al tractament, com és el cas d'aquest projecte, és vital conèixer amb exactitud la freqüència al·lèlica i/o genotípica dels gens a estudiar en la població sana.

En el cas de gens tan polimòrfics com els que estudiem en aquesta tesi doctoral, també és imprescindible que la població control sigui de la mateixa regió geogràfica i el més semblant possible a la cohort de pacients que es pretén estudiar. En el cas dels gens KIR, l'estudi dut a terme caracteritzant 445 donants, és el primer a analitzar la distribució dels gens i haplotips KIR en una cohort de

Catalunya i, ara com ara, és l'estudi de freqüències KIR més gran de l'estat, a part de ser l'únic realitzat mitjançant NGS.

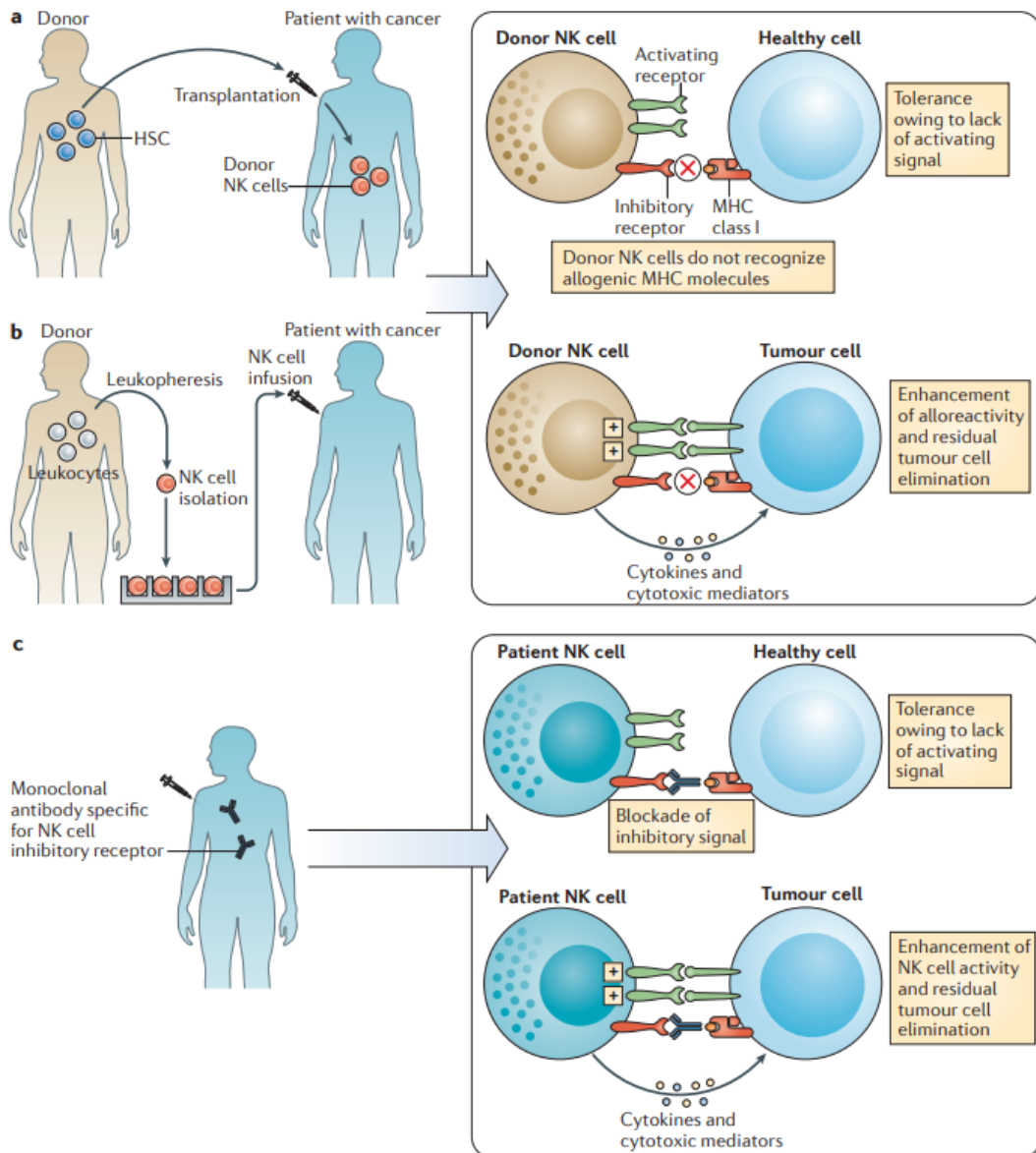


Figura 20. Immunoteràpies contra la leucèmia dirigides a les cèl·lules NK. a) TPH haploidèntic on les cèl·lules NK del donant no reconeixen les molècules HLA de classe I i ataquen aquelles cèl·lules amb lligands dels seus receptors activadors, és a dir, les cèl·lules canceroses. b) Les poblacions de cèl·lules NK poden aïllar-se de donants sans i expandir-se in vitro abans de la infusió en pacient amb càncer. c) Potenciar l'activitat de les cèl·lules NK endògenes tractant els pacients amb anticossos monoclonals específics pels receptors inhibidors expressats per les cèl·lules NK. Obtinguda de Vivier et al.,¹⁹⁷

DISCUSSIÓ

Aquest estudi es detalla a l'article 2 i, tal com s'esperava, les freqüències obtingudes a la nostra població van ser molt similars a d'altres reportades de poblacions Caucàsiques.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

En la cohort de Catalunya, tal com s'observa en la majoria de poblacions caucàsiques, els gens KIR activadors presenten freqüències molt més heterogènies i hi són menys presents que els gens KIR inhibidors. Aquestes diferències en les freqüències poden ser degudes a una selecció natural més forta i/o a un origen més recent, ja que es postula que els gens activadors van originar-se a partir dels KIR inhibidors.^{201,202}

Pel que fa al segon estudi de freqüències recollit a l'article 3, on es van caracteritzar les freqüències al·lèliques d'*HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB*, representa el primer estudi on es caracteritzen aquests gens en alta resolució a l'estat, fet que el fa encara més indispensable per futurs estudis d'associacions. Una de les limitacions trobades a l'hora d'afrontar aquest treball ha estat la manca d'articles o altres treballs publicats sobre les freqüències d'aquests gens en poblacions caucàsiques impeding la possibilitat de fer comparacions i verificar la seva similitud. L'únic article publicat sobre les freqüències del gen *MICA* a l'estat es va publicar el 2008 i se'n van tipificar les mostres mitjançant PCR-SSO.²⁰³ Les freqüències de la cohort de Catalunya són similars a les reportades per aquest grup de Múrcia, amb l'excepció d'un al·lel (*MICA*011*) el qual ha estat detectat en 9 individus i en cap en l'estudi dut a terme mitjançant PCR-SSO. Aquesta diferència pot ser deguda a l'aspecte tècnic, ja que amb la NGS s'ha analitzat tota la seqüència codificant del gen i, per contra, amb la PCR-SSO s'han utilitzat sondes que s'uneixen només als exons on es troben la major part de polimorfismes del gen, sense tenir en compte els minoritaris presents a la resta de regió codificant.

Per estudiar l'impacte de les variants d'aquests receptors i respectius lligands en la resposta als ITC dels pacients amb CML, es va dissenyar un estudi retrospectiu a partir del reclutament de 190 pacients amb CML en fase crònica de l'Hospital Clínic de Barcelona i de Germans Trias i Pujol de Badalona. A part d'analitzar la cohort sencera, també es va analitzar per separat la resposta al tractament de només els 152 pacients que havien rebut imatinib com a únic tractament. Aquest ITC és el més utilitzat arreu en aquest tipus de pacients, i a part de dur a terme anàlisis multivariants on s'estudiava l'efecte dels diferents ITC, es volien

corroborar en aquesta subcohort els resultats obtinguts en l'anàlisi de la cohort completa. Aquest treball es recull a l'article 4.

Els resultats en ambdós grups pel que fa als gens KIR van ser conclouents, revelant un efecte protector dels gens *KIR2DL2/KIR2DS2* en presència del lligand C1 en l'obtenció de EMR, així com en MR3.0 i MR4.0, tant si el gen es trobava en presència del lligand com si no. En estudis previs s'havia vist aquest mateix efecte en relació a l'obtenció de la resposta citogenètica completa, però mai s'havia estudiat a nivell de EMR, MR3.0 ni MR4.0.²⁰⁴ Quan es va comparar el grup control amb els grups d'estudi no s'observava un increment de la presència d'aquests gens KIR en el grup control, com s'havia descrit en altres estudis previs realitzats en cohorts més petites.^{139,205} Tenint en compte que aquest gens presenten un gran desequilibri de lligament, és pràcticament impossible determinar mitjançant l'anàlisi estadística quin dels dos (*KIR2DL2* o *KIR2DS2*) és el que provoca l'efecte observat. Tot i això, considerant els resultats globals de l'estudi, s'ha assumit que és el receptor activador *KIR2DS2* el responsable, a causa de la seva capacitat d'augmentar la citotoxicitat de les cèl·lules NK.²⁰⁶ A més a més, s'ha observat també per primer cop, que l'absència del gen inhibidor *KIR2DL3* augmenta les probabilitats d'obtenció de MR3.0, tot i que aquest efecte perd significació estadística en l'anàlisi multivariant.

Pel que fa als l'haplotips KIR (els anomenats activador BX i inhibidor AA), cap dels dos es trobava associat a l'obtenció de EMR, MR3.0 ni MR4.0, fet que contrasta amb altres estudis, on destaca una alta probabilitat d'arribar a MR en aquells pacients amb l'haplotip inhibidor AA.²⁰⁴ Aquesta diferència pot ser deguda a: la mida mostral, molt més petita que la de l'estudi realitzat en aquesta tesi doctoral; que no es van dividir els pacients per tractament rebut i que van incloure pacients que havien estat tractats prèviament amb INF- α .

Dels al·lels específics d'HLA, només la presència d'*HLA-A*01:01* incrementa de manera significativa la probabilitat d'arribada a MR3.0 al cap de 12 mesos, comparat amb aquells pacients que no el presentaven. Pel que fa a la comparació de pacients amb el grup control, *C*04:01*, *C*07:02*, i *C*16:01* es troben més freqüentment al grup de pacients que als controls. Fins ara, cap d'aquests al·lels ha estat relacionat en altres estudis poblacionals d'aquesta malaltia. De fet, *HLA-A*02* and *HLA-B*35*, que si s'havien identificat com a factors de risc en un estudi previ,²⁰⁷ no es troben més freqüentment en la cohort de pacients que al grup

DISCUSSIÓ

control, ni associats a una pitjor resposta al tractament. Aquest estudi en qüestió aplica el meta-anàlisi per arribar a aquestes conclusions, per la qual cosa la diferència en els resultats pot ser deguda a l'heterogeneïtat intrínseca de les mostres dels diferents estudis inclosos.

En relació amb la variant del gen *KLRK1*, cap dels haplotips es trobava relacionat amb EMR, MR3.0 ni MR4.0. Analitzant els al·lels específics de *KLRK1*, també per primera vegada, es va observar com l'al·lel activador HNK es trobava associat amb una més alta probabilitat d'obtenció de MR3.0 als 12 mesos. A més, pel que fa a la comparació entre pacients i controls, l'haplotip LNK-LNK es va trobar significativament més present en la cohort de pacients, suggerint un possible paper en el desenvolupament de la malaltia. Finalment, dels al·lels dels lligands del receptor NKG2D, *MICA*009:01* es va trobar associat a una més ràpida obtenció de MR4.0. Aquests resultats estan en concordança amb la hipòtesi que la possessió de la variant activadora d'aquest receptor protegeix envers diferents tipus de malalties malignes, com ja s'havia assenyalat en treballs anteriors estudiant altres tipus de càncer.^{83,208,209}

Globalment considerats, tots aquests resultats donen força a la hipòtesi que la resposta al tractament amb ITC és millor quan les cèl·lules NK reben senyals activadors que augmenten la citotoxicitat i la producció de citoquines. De fet, estudis clínics previs han demostrat que anticossos bloquejants dels receptors KIR inhibidors en altres neoplàsies hematològiques ajudaven els pacients a combatre de manera més efectiva les cèl·lules canceroses. Per tant, podrien ajudar també en el cas de la CML per arribar a presentar MR4.0 i, fins i tot, permetre una discontinuació del tractament.²¹⁰ Un aspecte a destacar de l'article 4 d'aquesta tesi és que es tracta del primer estudi que inclou en l'anàlisi els genotips de gens com *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB* en pacients amb CML, analitzant la possible implicació en l'obtenció de resposta al tractament.

Considerant l'impacte que tenen les variants dels receptors i certs lligands de les cèl·lules NK, seria molt interessant ampliar aquest estudi amb pacients que hagin discontinuat el tractament per poder determinar si els gens implicats en la millor obtenció de resposta poden considerar-se un factor a tenir en compte en el seguiment dels pacients amb més probabilitats d'aconseguir una discontinuació sense recaiguda. Altrament, seria de gran interès dur a terme estudis funcionals on es demostrés l'increment d'eficàcia pel que fa a l'eliminació de cèl·lules BCR-

ABL1⁺ per part de cèl·lules NK que presentin en membrana els receptors implicats en la resposta al tractament ITC, com KIR2DL2⁺ i KIR2DS2⁺. Finalment, caldria valorar en futurs estudis el paper que hi tenen dels limfòcits T CD8⁺, que poden ser un factor important en l'eliminació de les cèl·lules leucèmiques i que també expressen el receptor NKG2D.²¹¹ A més, s'ha descrit que els ITC no només actuen sobre la inhibició de les cèl·lules Ph⁺, sinó que també poden activar respostes antitumorals per part de les cèl·lules T.²¹²

Actualment, s'està acabant d'estudiant el paper dels gens inclosos al panell de seqüenciació desenvolupat en altres cohorts de pacients amb diferents malalties hematològiques. Estudis previs han demostrat com cohorts de pacients amb malalties autoimmunitàries presenten altes freqüències de receptors activadors de les cèl·lules NK. Per contra, cohorts de pacients amb neoplàsies de diferents tipus en presenten freqüències més baixes.²¹³⁻²¹⁸ Durant el transcurs d'aquest treball, s'ha analitzat una cohort de 100 pacients de MDS de l'Hospital Germans Trias i Pujol, per determinar si existeix alguna variant dels gens a estudiar que augmenti o disminueixi la velocitat d'arribada d'aquests a una AMLs. La hipòtesi que es proposa des del nostre grup, és que pacients amb perfil de receptors NK inhibidors presenten una probabilitat més alta de desenvolupar una AMLs, així com d'arribar-hi amb menys temps a causa d'una immunovigilància de les cèl·lules NK més ineficaç. A més, s'ha realitzat el tipatge d'aquests gens a una cohort de 40 pacients amb hemofília adquirida, un trastorn poc comú provocat per la producció d'autoanticossos en la vida adulta, els quals inactiven el factor VIII de la coagulació. Curiosament, aquesta cohort presentava més altes freqüències de l'al·lel de *KLRK1* LNK, mentre que no presentava cap individu homozigot per HNK. A més, els gens *KIR2DL2/KIR2DS2* presentaven una freqüència més alta que el grup control (no es mostren les dades). Aquests resultats semblen interessants, i caldrà seguir treballant per explicar-los, ja que, en el cas d'una malaltia autoimmunitària, esperàvem trobar un perfil de receptors de cèl·lules NK activador, i que pogués explicar com mitjançant interacció amb altres poblacions cel·lulars, s'afavoreix la resposta immunitària adaptativa que acaba desenvolupant la malaltia.^{219,220}

Tot i que la metodologia desenvolupada ha significat un abans i un després pel Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST pel que fa a la velocitat, preu i fiabilitat dels resultats del tipatge dels gens KIR, ens plantegem seguir

avançant per poder millorar el tipatge dels receptors de les cèl·lules NK i dels seus respectius lligands. És per aquesta raó, que un cop posada a punt la seqüenciació mitjançant la plataforma Illumina, la qual es caracteritza per les seves lectures curtes, hem començat el desenvolupament d'una nova metodologia de tipatge KIR i HLA mitjançant seqüenciació amb la plataforma MinION d'Oxford Nanopore Technologies. La tecnologia NGS ha estat adoptada per molts laboratoris d'Immunogenètica per dur a terme el tipatge HLA.^{221,222} Els resultats de la implementació de la NGS ha disminuït ambigüitats, incrementat el rendiment i produint un augment significatiu de tipificacions de registres de donants.²²³⁻²²⁵ Aquesta metodologia, encara presenta dificultats pel que fa a resoldre ambigüitats que impliquen polimorfismes distants que no es troben en una mateixa lectura de seqüenciació. La seqüenciació per nanoporus del MinION, és l'única tecnologia que seqüencia cadenes de DNA a partir de reaccions químiques independents de síntesi d'àcids nucleics. Té el potencial d'oferir resultats ràpidament, amb un dispositiu de butxaca de baix cost i aconseguir igualment l'alta resolució d'aquests gens solucionant les ambigüitats de fase. Les llargades de les lectures per nanoporus es limiten únicament per les llargades dels fragments de la llibreria, per la qual cosa ens proposem amplificar tots els gens KIR i HLA sencers i en un sol tub. La contínua millora d'aquesta tecnologia pot acabar donant lloc a una plataforma robusta i verstàtil per la tipificació d'aquests gens tan polimòrfics i per la investigació en el camp de la Immunogenètica en general en un futur pròxim.

La present tesi doctoral consta d'una primera part de disseny i desenvolupament d'una nova metodologia per dur a terme la seqüenciació de gens codificants de receptors de les cèl·lules NK i dels seus respectius lligands més polimòrfics. S'ha demostrat la gran eficàcia de la tecnologia NGS a l'hora d'obtenir els tipatges d'aquests gens en comparació amb les alternatives que es trobaven vigents a l'inici d'aquest treball. A la vegada, ha quedat palès que el factor limitant d'aquest tipus d'estratègies es troba en les eines disponibles per dur a terme l'anàlisi de les dades, fet que ens porta a seguir comparant nous programaris que van apareixent per posar a punt el tipatge KIR a resolució al·lèlica. La validació d'aquest mètode no només ha permès dur a terme la segona part d'aquest treball, sinó que també ha permès implementar l'estratègia a l'activitat assistencial del Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del BST.

La segona part de la present tesi es basa en l'aplicació de l'estratègia desenvolupada en un estudi clínic retrospectiu on s'estudia la possible implicació de les variants dels receptors de les cèl·lules NK i dels seus lligands en la resposta de pacients amb CML als tractaments ITC. Per dur-ho a terme, s'ha estudiat la distribució dels polimorfismes d'aquests gens a la nostra població així com a un grup de 190 pacients. Finalment, s'ha acceptat la hipòtesi plantejada a l'inici d'aquest projecte, la qual afirmava que pacients amb CML i amb perfils NK amb receptors activadors presenten més bona resposta als tractaments ITC. Aquests resultats, ens plantegen noves preguntes, que hauran de ser contestades en el futur.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La tecnologia *Next Generation Sequencing* ha permès desenvolupar un protocol per a dur a terme el tipatge dels gens KIR i dels seus respectius lligands, disminuint el preu i el temps emprat en comparació amb les tècniques utilitzades fins al moment.
2. S'ha validat l'eficàcia i fiabilitat del protocol dissenyat mitjançant la tipificació de 192 donants, dels quals es tenia el tipatge previ obtingut per PCR-SSO, i amb l'obtenció d'una concordança de resultats del 100%.
3. Aquesta tecnologia, també ha permès desenvolupar i validar un protocol per seqüenciar la regió 3' UTR del gen *KLRK1* i els seus lligands *MICA* i *MICB*, els quals s'han afegit al mètode de tipatge KIR-ligand.
4. El tipatge KIR i HLA de classe I de 445 donants de sang del Banc de Sang i Teixits mitjançant la nova metodologia, ha permès realitzar el primer estudi de freqüències KIR i parelles KIR-ligand a Catalunya, sent l'estudi de freqüències KIR més gran de l'estat fins ara.
5. El tipatge *HLA-G*, *HLA-F*, *MICA* i *MICB* de 96 donants de sang del Banc de Sang i Teixits mitjançant la nova metodologia, ha permès realitzar el primer estudi de freqüències d'aquests gens a la població de Catalunya, sent l'únic estudi de caracterització d'aquests gens de l'estat fins ara.
6. La caracterització de tots aquests donants de sang del Banc de Sang i Teixits ha permès disposar d'un gran grup control per futurs estudis d'associació gen-malaltia.
7. S'ha demostrat que un polimorfisme funcional en la regió 3'UTR del gen *KLRK1* (rs1049174) i la presència de *MICA*009* modulen la resposta als inhibidors de la tirosina cinasa en pacients amb Leucèmia Mieloide Crònica pel que fa a la probabilitat d'obtenció de resposta molecular així com d'aparició de la malaltia.
8. S'ha demostrat que en pacients de Leucèmia Mieloide Crònica, la presència de *KIR2DL2/KIR2DS2* augmenta la probabilitat d'obtenció de Resposta Primerenca, Resposta Molecular i Resposta Molecular Profunda als tractaments inhibidors de tirosina cinasa.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Hook R. Micrographia: Or, Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. *London, J Martyn and J Allestry.* 1665;1.
2. Leeuwenhoek Av. Philosophical transactions of the Royal Society. *London.* 1674;9:121–128.
3. A V. Sur la résorption du pus et sur l'altération du sang dans les maladies clinique de persection nenemant. Premier observation. *Revue Medical Francaise et Étrangere.* 1827;2:216-240.
4. Steensma DP. The chronic myeloproliferative disorders: an historical perspective. *Current hematology reports.* 2003;2(3):221-230.
5. Gonon-Demoulian R, Goldman JM, Nicolini FE. [History of chronic myeloid leukemia: a paradigm in the treatment of cancer]. *Bulletin du cancer.* 2014;101(1):56-67.
6. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* 1962;8:65-66.
7. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290-293.
8. Mandanas RA, Leibowitz DS, Gharehbaghi K, et al. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood.* 1993;82(6):1838-1847.
9. Okuda K, Matulonis U, Salgia R, Kanakura Y, Druker B, Griffin JD. Factor independence of human myeloid leukemia cell lines is associated with increased phosphorylation of the proto-oncogene Raf-1. *Experimental hematology.* 1994;22(11):1111-1117.
10. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell.* 1992;70(6):901-910.
11. O'Hare T, Deininger MW, Eide CA, Clackson T, Druker BJ. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2011;17(2):212-221.

BIBLIOGRAFIA

12. Chen CI, Koschmieder S, Kerstiens L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia*. 2012;26(3):465-474.
13. Bachy E, Bernaud J, Roy P, Rigal D, Nicolini FE. Quantitative and functional analyses of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate. *British journal of haematology*. 2011;153(1):139-143.
14. Talpaz M, McCredie KB, Mavligit GM, Gutterman JU. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1983;62(3):689-692.
15. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie KB, Keating MJ, Trujillo J, Gutterman J. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1987;69(5):1280-1288.
16. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*. 1993;82(3):691-703.
17. Ozer H, George SL, Schiffer CA, et al. Prolonged subcutaneous administration of recombinant alpha 2b interferon in patients with previously untreated Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myelogenous leukemia: effect on remission duration and survival: Cancer and Leukemia Group B study 8583. *Blood*. 1993;82(10):2975-2984.
18. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid L, Tura S, Baccarani M, et al. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 1994;330(12):820-825.
19. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994;84(12):4064-4077.
20. Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. *Lancet*. 1995;345(8962):1392-1397.
21. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*. 1996;2(5):561-566.

22. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1031-1037.
23. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer*. 2003;98(12):2636-2642.
24. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(35):6041-6051.
25. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1648-1671.
26. Sakurai M, Kikuchi T, Karigane D, et al. Renal dysfunction and anemia associated with long-term imatinib treatment in patients with chronic myelogenous leukemia. *International journal of hematology*. 2019;109(3):292-298.
27. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-880.
28. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16(11):2190-2196.
29. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9305):487-491.
30. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer research*. 2002;62(15):4236-4243.
31. Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):32214-32219.

BIBLIOGRAFIA

32. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(20):2333-2340.
33. Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, et al. Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114(24):4933-4938.
34. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884.
35. Cortes JE, Jimenez CA, Mauro MJ, Geyer A, Pinilla-Ibarz J, Smith BD. Pleural Effusion in Dasatinib-Treated Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Identification and Management. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2017;17(2):78-82.
36. La Rosee P, Martiat P, Leitner A, et al. Improved tolerability by a modified intermittent treatment schedule of dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to imatinib. *Annals of hematology*. 2013;92(10):1345-1350.
37. Iurlo A, Galimberti S, Abruzzese E, et al. Pleural effusion and molecular response in dasatinib-treated chronic myeloid leukemia patients in a real-life Italian multicenter series. *Annals of hematology*. 2018;97(1):95-100.
38. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30(5):1044-1054.
39. Iurlo A, Orsi E, Cattaneo D, et al. Effects of first- and second-generation tyrosine kinase inhibitor therapy on glucose and lipid metabolism in chronic myeloid leukemia patients: a real clinical problem? *Oncotarget*. 2015;6(32):33944-33951.
40. Constance C, Trudeau L, Jolicoeur EM, et al. Cardiologist's perspective to the European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(3):771-772.
41. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA

- trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(28):3486-3492.
42. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, et al. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(3):231-237.
 43. O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, et al. Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2013;11(11):1327-1340.
 44. Montani D, Bergot E, Gunther S, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation*. 2012;125(17):2128-2137.
 45. Giles FJ, Mauro MJ, Hong F, et al. Rates of peripheral arterial occlusive disease in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase treated with imatinib, nilotinib, or non-tyrosine kinase therapy: a retrospective cohort analysis. *Leukemia*. 2013;27(6):1310-1315.
 46. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American journal of hematology*. 2016;91(2):252-265.
 47. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003;348(11):994-1004.
 48. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809-1820.
 49. Kantarjian H, O'Brien S, Shan J, et al. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: need for new response definitions? *Cancer*. 2008;112(4):837-845.
 50. Cortes J, Quintas-Cardama A, Kantarjian HM. Monitoring molecular response in chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011;117(6):1113-1122.
 51. Cross NC, White HE, Muller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2172-2175.

BIBLIOGRAFIA

52. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(15):1423-1432.
53. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006;107(11):4250-4256.
54. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1029-1035.
55. Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122(4):515-522.
56. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305(5682):399-401.
57. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2010;362(24):2251-2259.
58. Padula WV, Larson RA, Dusetzina SB, et al. Cost-effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Strategies for Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase After Generic Entry of Imatinib in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(7).
59. Chhatwal J, Mathisen M, Kantarjian H. Are high drug prices for hematologic malignancies justified? A critical analysis. *Cancer*. 2015;121(19):3372-3379.
60. Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
61. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer*. 1975;16(2):230-239.

62. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Advances in immunology*. 1989;47:187-376.
63. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*. 1990;11(7):237-244.
64. Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes and infection*. 2003;5(1):31-37.
65. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(7):520-531.
66. Gregoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunological reviews*. 2007;220:169-182.
67. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331-342.
68. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*. 2001;22(11):633-640.
69. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. 2005;106(7):2252-2258.
70. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological reviews*. 2006;214:73-91.
71. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, et al. Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(21):5229-5237.
72. Varchetta S, Gibelli N, Oliviero B, et al. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer research*. 2007;67(24):11991-11999.
73. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:1.
74. Romee R, Foley B, Lenvik T, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 2013;121(18):3599-3608.

BIBLIOGRAFIA

75. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology*. 2017;45:73-81.
76. Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Frontiers in immunology*. 2013;4:499.
77. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12445-12450.
78. Long EO. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Seminars in cancer biology*. 2002;12(1):57-61.
79. Yabe T, McSherry C, Bach FH, et al. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics*. 1993;37(6):455-460.
80. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):6879-6884.
81. Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Current opinion in immunology*. 2002;14(3):306-311.
82. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000;356(9244):1795-1799.
83. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer research*. 2006;66(1):563-570.
84. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature immunology*. 2001;2(3):255-260.

85. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer research*. 2002;62(21):6178-6186.
86. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7(6):753-763.
87. Harel-Bellan A, Quillet A, Marchiol C, DeMars R, Tursz T, Fradelizi D. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(15):5688-5692.
88. Yokoyama WM. Recognition structures on natural killer cells. *Current opinion in immunology*. 1993;5(1):67-73.
89. Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunology today*. 1996;17(2):86-91.
90. Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(1):13-20.
91. Martin MP, Nelson G, Lee JH, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *Journal of immunology*. 2002;169(6):2818-2822.
92. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature genetics*. 2002;31(4):429-434.
93. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100.
94. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101(9):3730-3740.
95. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003;102(3):814-819.

BIBLIOGRAFIA

96. Marsh SG, Parham P, Dupont B, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue antigens*. 2003;62(1):79-86.
97. Gomez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue antigens*. 2002;59(3):184-193.
98. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D1234-1240.
99. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4778-4783.
100. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*. 2002;20:217-251.
101. Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics*. 2000;51(4-5):268-280.
102. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue antigens*. 2002;60(3):254-258.
103. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002;54(4):221-229.
104. Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *Journal of immunology*. 2002;168(5):2307-2315.
105. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *Journal of immunology*. 2001;166(5):2992-3001.

106. Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunological reviews*. 1997;155:183-196.
107. Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature*. 1997;389(6646):96-100.
108. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue antigens*. 2000;56(4):313-326.
109. Lefranc MP, Pommie C, Kaas Q, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Developmental and comparative immunology*. 2005;29(3):185-203.
110. Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunological reviews*. 2001;181:158-169.
111. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008;112(3):708-710.
112. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *Journal of immunology*. 2005;175(8):5222-5229.
113. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European journal of immunology*. 2004;34(6):1673-1679.
114. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(14):6259-6263.
115. Robinson J, Perez-Rodriguez M, Waller MJ, et al. MICA sequences 2000. *Immunogenetics*. 2001;53(2):150-169.
116. Fodil N, Laloux L, Wanner V, et al. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*. 1996;44(5):351-357.
117. Pellet P, Renaud M, Fodil N, et al. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics*. 1997;46(5):434-436.

BIBLIOGRAFIA

118. Michele Berlingerio FB, Silvia Chelazzi, Michele Curcio, Fosca Giannotti, Fabrizio Scatena. Mining HLA Patterns Explaining Liver Diseases. *Proceedings of the 19th IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems*. 2006;1.
119. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(11):2859-2868.
120. Pattengale PK, Sundstrom C, Yu AL, Levine A. Lysis of fresh leukemic blasts by interferon-activated human natural killer cells. *Natural immunity and cell growth regulation*. 1983;3(4):165-180.
121. Lotzova E, Savary CA, Herberman RB. Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leukemia research*. 1987;11(12):1059-1066.
122. Godal R, Bachanova V, Gleason M, et al. Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(5):612-621.
123. Pizzolo G, Trentin L, Vinante F, et al. Natural killer cell function and lymphoid subpopulations in acute non-lymphoblastic leukaemia in complete remission. *British journal of cancer*. 1988;58(3):368-372.
124. Rey J, Fauriat C, Kochbati E, et al. Kinetics of Cytotoxic Lymphocytes Reconstitution after Induction Chemotherapy in Elderly AML Patients Reveals Progressive Recovery of Normal Phenotypic and Functional Features in NK Cells. *Frontiers in immunology*. 2017;8:64.
125. Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lenvik T, Soignier Y, Miller JS. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood*. 2003;101(9):3527-3533.
126. Hughes A, Clarson J, Tang C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017;129(9):1166-1176.
127. Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, Ossenkoppele GJ, Westers TM, Bontkes HJ. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk

- MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. *British journal of haematology*. 2011;153(5):568-581.
128. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*. 2007;109(11):4816-4824.
 129. Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20(3):463-470.
 130. Carlsten M, Jaras M. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2357.
 131. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010;116(19):3853-3864.
 132. Chretien AS, Granjeaud S, Gondois-Rey F, et al. Increased NK Cell Maturation in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in immunology*. 2015;6:564.
 133. Mundy-Bosse BL, Scoville SD, Chen L, et al. MicroRNA-29b mediates altered innate immune development in acute leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(12):4404-4416.
 134. Aggarwal N, Swerdlow SH, TenEyck SP, Boyiadzis M, Felgar RE. Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2016;90(4):349-357.
 135. Martner A, Rydstrom A, Riise RE, et al. Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1041701.
 136. Chretien AS, Fauriat C, Orlanducci F, et al. Natural Killer Defective Maturation Is Associated with Adverse Clinical Outcome in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in immunology*. 2017;8:573.
 137. Salih J, Hilpert J, Placke T, et al. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *International journal of cancer*. 2010;127(9):2119-2128.

BIBLIOGRAFIA

138. Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, et al. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(1):1-13.
139. Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*. 2004;18(12):2002-2007.
140. Marin D, Gabriel IH, Ahmad S, et al. KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia*. 2012;26(2):296-302.
141. Kreutzman A, Jaatinen T, Greco D, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene profile predicts good molecular response to dasatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Experimental hematology*. 2012;40(11):906-913 e901.
142. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-729.
143. Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of immunology*. 2004;172(12):7335-7340.
144. Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC cancer*. 2008;8:16.
145. Stringaris K, Marin D, Barrett AJ, et al. KIR gene haplotype: an independent predictor of clinical outcome in MDS patients. *Blood*. 2016;128(24):2819-2823.
146. Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010;24(2):317-330.
147. Romagne F, Andre P, Spee P, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*. 2009;114(13):2667-2677.

148. Ruggeri L, Urbani E, Andre P, et al. Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica*. 2016;101(5):626-633.
149. Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(4):557-567.
150. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):2959-2964.
151. Sarhan D, Cichocki F, Zhang B, et al. Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer research*. 2016;76(19):5696-5706.
152. Pesce S, Greppi M, Grossi F, et al. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1242.
153. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-264.
154. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. *Methods in molecular biology*. 2010;612:365-375.
155. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 1975;94(3):441-448.
156. Dunn PP. Novel Approaches and Technologies in Molecular HLA Typing. *Methods in molecular biology*. 2015;1310:213-230.
157. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008;452(7189):872-876.
158. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-380.
159. Pearson BM, Gaskin DJ, Segers RP, Wells JM, Nuijten PJ, van Vliet AH. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *Journal of bacteriology*. 2007;189(22):8402-8403.

BIBLIOGRAFIA

160. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53-59.
161. Smith DR, Quinlan AR, Peckham HE, et al. Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies. *Genome research*. 2008;18(10):1638-1642.
162. Wang J, Wang W, Li R, et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature*. 2008;456(7218):60-65.
163. Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, Quake SR. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3960-3964.
164. Harris TD, Buzby PR, Babcock H, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science*. 2008;320(5872):106-109.
165. Haque F, Li J, Wu HC, Liang XJ, Guo P. Solid-State and Biological Nanopore for Real-Time Sensing of Single Chemical and Sequencing of DNA. *Nano today*. 2013;8(1):56-74.
166. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature nanotechnology*. 2009;4(4):265-270.
167. Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nature biotechnology*. 2012;30(4):295-296.
168. Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Scientific reports*. 2017;7(1):18022.
169. Garcia-Beltran WF, Holzemer A, Martrus G, et al. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nature immunology*. 2016;17(9):1067-1074.
170. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *Journal of immunology*. 2005;174(7):3859-3863.
171. Koretzky GA. The legacy of the Philadelphia chromosome. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(8):2030-2032.
172. Nowell PC. Progress with chronic myelogenous leukemia: a personal perspective over four decades. *Annual review of medicine*. 2002;53:1-13.

173. Arnason U. 50 years after--examination of some circumstances around the establishment of the correct chromosome number of man. *Hereditas*. 2006;143(2006):202-211.
174. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-830.
175. Toubert A, Turhan A, Guerci-Bresler A, Dulphy N, Rea D. [NK cells: a major role in the antitumoral immunomodulation in CML]. *Medecine sciences : M/S*. 2018;34(6-7):540-546.
176. Sopper S, Mustjoki S, Gjertsen BT, et al. NK cell dynamics and association with molecular response in early chronic phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP) patients treated with nilotinib. *Leukemia*. 2017;31(10):2264-2267.
177. Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, et al. Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. *American journal of human genetics*. 2016;99(2):375-391.
178. Manianguou B, Legrand N, Alizadeh M, et al. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Frontiers in immunology*. 2017;8:547.
179. Misra MK, Augusto DG, Martin GM, et al. Report from the Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) component of the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop. *Human immunology*. 2018;79(12):825-833.
180. Wilczynska K, Radwan P, Krasinski R, et al. KIR and HLA-C genes in male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2020;37(8):2007-2017.
181. Eli Djulejic AP, Dejan Trajkov, Gligor Dimitrov, Sonja Alabakovska. KIR Gene Frequencies in Women with Infertility Problems. *Immunogenetics*. 2015;200002:2-6.
182. Alecsandru D, Garrido N, Vicario JL, et al. Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Human reproduction*. 2014;29(12):2637-2643.
183. Williams Z. Inducing tolerance to pregnancy. *The New England journal of medicine*. 2012;367(12):1159-1161.

BIBLIOGRAFIA

184. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, et al. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):4102-4110.
185. Velardi A. Haplo-BMT: which approach? *Blood*. 2013;121(5):719-720.
186. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*. 2011;118(23):6006-6017.
187. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006;354(17):1813-1826.
188. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England journal of medicine*. 2007;357(15):1472-1475.
189. Ljungman P, Bregni M, Brune M, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone marrow transplantation*. 2010;45(2):219-234.
190. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994;84(11):3948-3955.
191. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(15):3447-3454.
192. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333-339.
193. Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Aversa F, Christiansen FT. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Current opinion in immunology*. 2009;21(5):525-530.
194. Haas P, Loiseau P, Tamouza R, et al. NK-cell education is shaped by donor HLA genotype after unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(3):1021-1029.

195. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *The New England journal of medicine*. 2004;351(22):2276-2285.
196. Sekine T, Marin D, Cao K, et al. Specific combinations of donor and recipient KIR-HLA genotypes predict for large differences in outcome after cord blood transplantation. *Blood*. 2016;128(2):297-312.
197. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):239-252.
198. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation*. 1999;68(11):1784-1789.
199. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*. 2001;52(3-4):195-205.
200. Toneva M, Lepage V, Lafay G, et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue antigens*. 2001;57(4):358-362.
201. Abi-Rached L, Parham P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(8):1319-1332.
202. Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC genomics*. 2006;7:209.
203. Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R, et al. Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Human immunology*. 2008;69(10):655-660.
204. La Nasa G, Caocci G, Littera R, et al. Homozygosity for killer immunoglobulin-like receptor haplotype A predicts complete molecular response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients. *Experimental hematology*. 2013;41(5):424-431.
205. Middleton D, Diler AS, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of

- their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. *Tissue antigens*. 2009;73(6):553-560.
206. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27(45):5932-5943.
207. Naugler C, Liwski R. Human leukocyte antigen class I alleles and the risk of chronic myelogenous leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*. 2010;51(7):1288-1292.
208. Espinoza JL, Nguyen VH, Ichimura H, et al. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Scientific reports*. 2016;6:39231.
209. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):316-320.
210. Vey N, Bourhis JH, Boissel N, et al. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood*. 2012;120(22):4317-4323.
211. Prajapati K, Perez C, Rojas LBP, Burke B, Guevara-Patino JA. Functions of NKG2D in CD8(+) T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cellular & molecular immunology*. 2018;15(5):470-479.
212. Chen J, Schmitt A, Chen B, et al. Imatinib impairs CD8+ T lymphocytes specifically directed against the leukemia-associated antigen RHAMM/CD168 in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2007;56(6):849-861.
213. Ramirez-De los Santos S, Sanchez-Hernandez PE, Munoz-Valle JF, et al. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with rheumatoid arthritis. *Disease markers*. 2012;33(4):201-206.
214. Agrawal S, Prakash S. Significance of KIR like natural killer cell receptors in autoimmune disorders. *Clinical immunology*. 2020;216:108449.
215. Chou YC, Chen CH, Chen MJ, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and human leukocyte antigen-C (HLA-C) allorecognition patterns in women with endometriosis. *Scientific reports*. 2020;10(1):4897.
216. Barani S, Hosseini SV, Ghaderi A. Activating and inhibitory killer cell immunoglobulin like receptors (KIR) genes are involved in an increased

- susceptibility to colorectal adenocarcinoma and protection against invasion and metastasis. *Immunobiology*. 2019;224(5):681-686.
217. Alomar SY, Alkhuriji A, Trayhyrn P, Alhetheel A, Al-Jurayyan A, Mansour L. Association of the genetic diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and HLA-C ligand in Saudi women with breast cancer. *Immunogenetics*. 2017;69(2):69-76.
218. Alavianmehr A, Mansouri M, Ramzi M, et al. Association of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes with acute myelogenous leukaemia. *International journal of immunogenetics*. 2020.
219. Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010;131(4):451-458.
220. Johansson S, Berg L, Hall H, Hoglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends in immunology*. 2005;26(11):613-618.
221. Gabriel C, Furst D, Fae I, et al. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue antigens*. 2014;83(2):65-75.
222. Barone JC, Saito K, Beutner K, et al. HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Human immunology*. 2015;76(12):903-909.
223. Lange V, Bohme I, Hofmann J, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC genomics*. 2014;15:63.
224. Schofl G, Lang K, Quenzel P, et al. 2.7 million samples genotyped for HLA by next generation sequencing: lessons learned. *BMC genomics*. 2017;18(1):161.
225. Allen ES, Yang B, Garrett J, Ball ED, Maiers M, Morris GP. Improved accuracy of clinical HLA genotyping by next-generation DNA sequencing affects unrelated donor search results for hematopoietic stem cell transplantation. *Human immunology*. 2018;79(12):848-854.