
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Markeri genetici cu predicție în supraviețuirea grefei la pacienții cu transplant renal

Doctorand **Luminița-Ioana Iancu (căs. Loga)**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Horea-Vladi Matei**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Organizarea generală a complexului major de histocompatibilitate (MHC)	17
1.1. Structura MHC	17
1.2. Genele HLA de clasa I și de clasa a II-a	18
1.3. Moleculele HLA	20
1.3.1. Moleculele HLA de clasa I	20
1.3.2. Moleculele HLA de clasa a II-a	20
1.3.3. Moleculele HLA de clasa a III-a	21
1.4. Polimorfismul HLA	21
1.4.1. Polimorfismul HLA și legătura sa cu bolile renale	22
1.4.2. Polimorfismul HLA și semnificația sa în transplantul renal	22
2. Răspunsul imun împotriva grefei în transplant	25
2.1. Imunitatea înăscută și dobândită	25
2.2. Căi de alorecunoaștere a celulelor T	26
2.3. Celulele B și răspunsul umoral	28
3. Rolul celulelor natural ucigașe (NK) și al receptorilor KIR în transplant	31
3.1. Celulele NK	31
3.2. Genele KIR	32
3.3. Polimorfismul genelor KIR	34
3.4. Rolul KIR în transplant	36
4. Teste și noi biomarkeri pentru succesul transplantului renal	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1. Asocieri între antigenele HLA și boala renală cronică la pacienții luați în evidență la Institutul Clinic de Urologie și Transplant Renal, Cluj-Napoca	55
3.1. Introducere	55
3.2. Obiective	55
3.3. Materiale și metode	56
3.4. Rezultate	58
3.5. Discuții	68
3.6. Concluzii	70
4. Studiul 2. Frecvența genelor KIR și a haplotipurilor KIR la pacienții cu grefă renală	71
4.1. Introducere	71
4.2. Obiective	73

4.3. Materiale și metode	73
4.4. Rezultate	76
4.5. Discuții	84
4.6. Concluzii	86
5. Studiul 3. Evaluarea supraviețuirii grefei renale în funcție de asocierea dintre genele KIR ale primitorului și liganzii HLA de la donatorii de greafă renală	87
5.1. Introducere	87
5.2. Obiective	87
5.3. Materiale și metode	88
5.4. Rezultate	89
5.5. Discuții	103
5.6. Concluzii	104
6. Concluzii generale	107
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei de doctorat	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: antigen leucocitar uman (HLA), receptori ai celulelor natural ucigașe (KIR), rejet cronic, transplant renal, biomarkeri, frecvența alelelor HLA

INTRODUCERE

Transplantul renal ca metodă eficientă de terapie, este un tratament salvator al pacienților suferinzi de insuficiență renală cronică în stadiul terminal. Succesul pe termen lung al unui transplant depinde de selecția atentă a candidaților, managementul riguros post-transplant și complianța pacienților la imunosupresie deci o abordare multidisciplinară, incluzând nefrologi, chirurghi, imunologi și alte specialități medicale pentru a asigura rezultate optime pentru acești pacienți. În acest context, compatibilitatea imunologică dintre donator și receptor joacă un rol crucial în succesul pe termen lung al transplantului renal.

Două dintre cele mai importante sisteme imunologice care influențează această compatibilitate sunt sistemul HLA (Human Leukocyte Antigen) și sistemul KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors). Compatibilitatea HLA este esențială pentru reducerea riscului de rejet imun mediat de celulele T și de către anticorpi. De asemenea interacțiunea complexă dintre receptorii KIR și moleculele HLA poate influența activitatea celulelor natural ucigașe (Natural Killer, NK) și rezultatele pe termen lung ale grefei transplantate. Înțelegerea profundă a acestor interacțiuni imunologice permite o selecție mai bună a perechilor donator-receptor și dezvoltarea de strategii imunosupresoare personalizate. Prin analiza markerilor genetici HLA și KIR specifici unui transplant, a testelor specifice imunologice se pot formula unele recomandări fundamentate pe baze genetice solide pentru îmbunătățirea protocoalelor aplicate în clinică care să contribuie la îmbunătățirea practicilor medicale.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Organizare generală a complexului major de histocompatibilitate

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) cu multiplele lui polimorfisme mononucleotidice reprezintă unul dintre cele mai importante sisteme genetice implicate în răspunsul imun. Cunoașterea detaliată a acestor polimorfisme este crucială pentru transplantul de organe, deoarece compatibilitatea HLA între donator și receptor este un factor determinant în succesul pe termen lung al transplantului. Studii recente au arătat că riscul de respingere crește odată cu creșterea numărului de mismatch-uri HLA.

Astfel, înțelegerea MHC-ului și a diversității sale este esențială nu doar pentru imunologie și transplantologie, ci și pentru antropologie genetică, epidemiologie și medicina personalizată. Datorită rolului critic pe care aceste gene îl joacă în răspunsul imun și în susceptibilitatea din insuficiența renală cronică, polimorfismul HLA în bolile renale reprezintă un domeniu de cercetare care a fost și va fi studiat.

2. Răspunsul imun împotriva grefei în transplant

Sistemul imunitar înăscut prin componentele sale strâns interconectate se pot activa reciproc inducând un proces proinflamator în procesul de respingere acută și cronică a grefei renale. Aceste antigene specifice grefei, care sunt expuse sistemului imunitar al receptorului în situații de deteriorare a țesuturilor, a inflamației cauzate de ischemie-reperfuzie și respingerea transplantului pot conduce la formarea de autoanticorpi. Celulele B joacă de asemenea un rol crucial în răspunsul imun prin producerea anticorpilor, ca proteine circulante care se leagă specific de antigenul responsabil de producerea lor, ceea ce poate conduce la respingere acută sau cronică mediată de anticorpi. Rejetul umoral acut este generat prin expunerea anterioară la antigeni HLA sau alți antigeni aduși de alogrefă și apare de la câteva zile până în primele șase săptămâni după transplant. Rejetul umoral cronic este caracterizat printr-un proces lung și progresiv de pierdere a funcției grefei, se manifestă la un an după transplant, având trăsături histopatologice ce includ glomerulopatia de transplant, depunerea de material fibrilar în subendoteliu și depunerea de C4d.

3. Rolul celulelor natural ucigăse (NK) și al receptorilor KIR în transplant

Celulele NK, componente ale sistemului imunitar înăscut, joacă un rol important nu doar în reglarea acceptării sau respingerii allogrefei ci și în dezvoltarea vasculopatiei de transplant, iar funcțiile lor sunt reglate de un complex de molecule receptoare(KIR) exprimate la suprafața lor, care sunt receptori specifici pentru moleculele HLA de clasă I (liganzi). Familia de 16 gene KIR se caracterizează printr-un nivel ridicat de diversitate datorat prezenței/absenței unor gene KIR, variațiilor numărului de copii al acestora, precum și polimorfismului alelic. Activarea celulelor NK este strict reglementată printr-un echilibru integrat al semnalizării prin intermediul receptorilor inhibitori și activatori KIR. Deoarece receptorii KIR și liganzii HLA sunt extrem de polimorfici, receptorii KIR de pe suprafața celulelor NK ale primitorului unui transplant poate genera aloreactivitatea celulelor NK împotriva organului transplantat. Prin urmare echilibrul între semnalele activatoare și inhibitoare este crucial pentru reglarea funcțiilor celulelor NK. Introducerea receptorilor de tip KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) în diagnosticul de transplant reprezintă o inovație promițătoare în managementul transplanturilor de organe.

4. Teste și noi biomarkeri pentru succesul transplantului renal

Funcția grefei renale este evaluată prin determinarea nivelurilor de creatinină și uree serică, analiza sedimentului urinar și biopsia renală. Dintre testele uzuale utilizate înaintea unui transplant menționăm crossmatch-ul serologic (compatibilitatea directă), tipizarea HLA realizată prin tehnici moleculare, prezența anticorpilor împotriva moleculelor HLA (anticorpi citotoxici). Biomarkerii sunt utilizați în diagnosticarea rețetului mediat umoral sau celular, în evoluția grefei și pentru a detecta imediat o leziune renală cronică în stadiile incipiente sunt evidențiați în probe de biopsie renală, urină, sânge integral și/sau plasmă. Dintre biomarkeri amintim tipizarea KIR, ADN-ul liber derivat de la donator (dd-cf DNA), biomarkerii transcriptomici, proteomici non-invazivi, metabolomici, celulari iar evaluarea constantă a tuturor acestor parametri ar putea preveni episoadele de rețet acut și leziunile renale. În acest mod, atât biomarkerii răspunsului imun, cât și cei ai distrugerii tisulare sunt esențiali pentru supraviețuirea pe termen lung a pacienților cu transplant renal.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiective

Investigarea markerilor genetici KIR și HLA care pot influența supraviețuirea unei grefe și deci reușita pe termen lung a unui transplant de rinichi au fost obiectivele celor trei studii cuprinse în teza de doctorat. Nu este de omis rolul evaluării pretransplant al candidaților pentru un transplant renal cu identificarea altor factorilor genetici, medicali, chirurgicali și psiho-sociali, care pot influența supraviețuirea pe termen lung a pacientului și a grefei. Scopul prezentei teze este de a identifica alelele HLA specifice populației din Transilvania, stabilirea frecvenței și a haplotipurilor lor, realizarea unui profil genetic al subiecților cu potențială patologie renală și a riscului de-a dezvolta o anumită patologie renală, identificarea unor noi asocieri între markeri genetici HLA și KIR cu riscul apariției unui rețet la transplantarea renală care să susțină diagnosticul clinic.

Metodologie generală

Obiectivele principale ale acestei teze din perspectiva experimentelor pe care le-am derulat au fost:

- Obținerea unui ADN concentrat și pur, secvențierea ADN în porțiunea HLA, urmată de identificarea alelelor prezente la toți participanții în studii (din grupurile caz, cât și la cele din grupurile martor);
- Stabilirea profilelor ADN prin tiparea HLA metoda PCR-SSP/PCR-SSO și electroforeza produșilor PCR;
- Identificarea celor mai frecvente alele HLA (alele specifice) și combinații de alele (haplotipuri) prezente la subiecții cu risc în declanșarea patologiei renale cât și la subiecții din grupul martor;
- Stabilirea genotipării KIR și prezența sau absența mismatchurilor genelor KIR-HLA ligand adică a combinațiilor genotipării KIR de la recipient cu moleculele HLA clasa I de la donator;
- Identificarea haplotipurilor KIR implicate în rețetul de greafă renală;
- Evaluarea gradului de compatibilitate HLA dintre donator și primitorul de greafă renală;

➤ Analiza supraviețuirii grefelor renale în funcție de prezența sau absența mismatch-urilor genelor KIR-HLA ligand, adică a combinațiilor genotipării KIR de la recipient cu moleculele HLA clasa I de la donator folosind programe statistice avansate în vederea identificării predominanței unei anumite gene/alele în toate grupurile și subgrupurile subiecților care au participat la toate studiile.

Studiul 1. Asocieri între antigenele HLA și boala renală cronică la pacienții luați în evidență la Institutul Clinic de Urologie și Transplant Renal Cluj-Napoca(ICUTR)

Polimorfismele alelice HLA sunt asociate cu o varietate de boli. Studii genetice asociază genele HLA cu diferite boli renale, evidențiind nevoia de a colecta date moleculare pentru a identifica pacienții cu risc ridicat și a îmbunătăți supraviețuirea grefei după transplantul renal. Succesul transplantului este determinat de răspunsul imun celular și umoral, ambele depinzând de alelele HLA. Sistemul HLA contribuie, de asemenea, la inducerea răspunsului imun, controlul acestuia și selecția repertoriului de celule T. Genele HLA sunt unele dintre cele mai polimorfice gene din genomul uman. Subseturile de peptide codificate de aceste gene și specificitățile de legare a moleculelor HLA sunt importante pentru înțelegerea diferențelor de răspuns imun între indivizi.

Studiul a explorat asocierea dintre antigenul leucocitar uman și insuficiența renală cronică(IRC) dacă polimorfismul alelic joacă un rol în dezvoltarea acestui tip de afecțiune. Interacțiunea dintre factorii genetici și de mediu poate, de asemenea, juca un rol în dezvoltarea bolilor renale. În acest studiu analitic retrospectiv am înrolat 5666 subiecți, 2392 subiecți diagnosticați cu IRC de diferite etiologii și 3274 subiecți sănătoși, studiul care a fost efectuat prin culegere de date de tip eșantion reprezentativ, având ca referință frecvența acestor alele în populația europeană, comparând genotipurile diferiților subiecți pe grupe populaționale. Am studiat alelele din regiunea HLA clasa I (A, B) și regiunea HLA clasa II (DR) pentru a detecta acele alele care conferă susceptibilitate sau protecție împotriva IRC. Din datele culese, am urmărit și etiologia bolilor care au dus la IRC. Probele de sânge ale tuturor subiecților au fost prelucrate în laboratorul HLA al ICUTR ,conform protocoalelor laboratorului. Am analizat doar alelele identificate la cel puțin un membru al fiecărui grup.

În plus, pentru fiecare alelă, am analizat dacă subiecții homozigoți au avut un risc crescut de a dezvolta IRC în comparație cu subiecții heterozigoți. Am folosit fie testul Chi², fie testul exact al lui Fisher și am calculat OR și CI de 95%. Subiecții cu IRC care au fost testați pentru HLA, au fost împărțiți în 22 de grupuri, în funcție de boala principală care a condus la această afecțiune, cea mai comună fiind glomerulonefrita cronică (GNC). La analiza univariată în cele două grupuri am identificat aceleași 64 de alele, și anume 19 alele din grupul HLA-A, 32 alele HLA-B și 13 alele HLA-DRB1. Cele mai comune alele pe locusul HLA-A au fost *HLA-A*02*, *HLA-A*01*, *HLA-A*24* și *HLA-A*03*, cu o frecvență mai mare de 10% în ambele grupuri. *HLA-A*74* a fost găsit doar în grupul de control, iar *HLA-A*36* a fost găsit doar în grupul subiecților cu IRC. În total, 32 de alele pe locusul HLA-B au fost detectate în cele două grupuri; dintre acestea, frecvența *HLA-B*18* și *HLA-B*35* a fost mai mare de 10% în ambele grupuri. *HLA-B*54* a fost prezent numai în grupul de control, în timp ce *HLA-B*70* și *HLA-B*78* au fost prezente numai în grupul cu IRC. Un total de 13 alele aparținând locusului *HLA-DRB1* au fost detectate în grupul cu IRC, unde primele trei alele au fost *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*16* și *HLA-DRB1*03*, iar în grupul de control cu o frecvență mai mare de 10% am observat o alela *HLA-DRB1*13*.

Datele analizei de regresie logistică multivariată arată faptul că grupul de alele HLA-

*A*11* ($p = 0,027$), *HLA-A*34* ($p = 0,017$), *HLA-A*69* ($p = 0,012$), *HLA-B*41* ($p < 0,001$), *HLA-B*50* ($p = 0,004$), *HLA-DRB1*10* ($p = 0,027$) și *HLA-DRB1*14* ($p = 0,004$) au fost asociate pozitiv cu IRC ($OR > 1$) pe când grupul *HLA-A*30* ($p < 0,001$), *HLA-B*44* ($p < 0,001$), *HLA-B*48* ($p = 0,018$), *HLA-DRB1*07* ($p < 0,001$), *HLA-DRB1*08* ($p = 0,005$) și *HLA-DRB1*13* ($p < 0,001$) au avut efect protectiv împotriva IRC ($OR < 1$). La analiza fiecărei alele la subiecții cu IRC următoarele alele, în forma lor homozigotă, au fost factori de risc pentru boala renală: *HLA-A*23* ($OR = 11,25$, $p = 0,006$), *HLA-A*24* ($OR = 1,65$, $p = 0,023$), *HLA-B*08* ($OR = 1,94$, $p = 0,021$), *HLA-B*27* ($OR = 5,13$, $p = 0,011$), *HLA-DRB1*11* ($OR = 1,9$, $p = 0,021$), *HLA-DRB1*14* ($OR = 3,05$, $p = 0,019$) și *HLA-DRB1*16* ($OR = 2,17$, $p = 0,001$). Nici o alelă HLA nu a avut un efect protector semnificativ statistic împotriva bolii cronice de rinichi atunci când era într-o formă homozigotă.

Analizând frecvențele haplotipurilor HLA-A-B-DRB1 folosind algoritmul Expectation-Maximization implementat prin funcția haplo.em a pachetului haplo.stats, am generat frecvențe relative și așteptate pentru toate haplotipurile posibile în cele două grupuri a arătat că *HLA-A*24-B*18-DR*11* este haplotipul de risc cel mai frecvent în grupul care au dezvoltat IRC, frecvența sa în grupul de cazuri fiind de 12,01‰, în timp ce frecvența în grupul de control a fost de 7,76‰, ceea ce este semnificativ mai mică decât frecvența la subiecții cu IRC ($p < 0,05$). Dintre haplotipurile care conțin una sau mai multe alele statistic semnificative ca fiind asociate cu IRC, haplotipul *HLA-A*02-B*41-DRB1*03*, conținând alela *HLA B*41*, a fost puternic asociat cu IRC ($p < 0,001$, $OR = 3,15$). Acest studiu este primul din nordul României (Transilvania) care analizează asocierea diferitelor alele și haplotipuri HLA cu IRC. Distribuțiile alelelor și haplotipurilor variază în funcție de locația geografică și grupurile etnice.

Studiul 2. Frecvența genelor KIR și a haplotipurilor KIR la pacienții cu grefă renală

Se cunoaște faptul că răspunsurile imune în cazul transplantului sunt influențate de numeroși factori, inclusiv compatibilitatea între sistemul imunitar al primitorului și organul donat. Interacțiunile dintre receptorii KIR și antigenele HLA joacă un rol esențial în răspunsul imun al primitorului în modul în care aceste interacțiuni afectează reactivitatea celulelor NK, care poate modifica drastic mediul imunologic post-transplant. Anumite interacțiuni KIR-HLA au fost asociate fie cu riscuri crescute de respingere acută, fie cu o supraviețuire îmbunătățită a grefei, subliniind necesitatea unei potriviri genetice meticuloase în procesele de selecție a donatorilor.

Abordarea inovatoare a acestui studiu a constat în identificarea corelațiilor și interacțiunilor dintre potrivirile/nepotrivirile antigenelor HLA între primitor și donator dar și a prezenței/absenței interacțiunilor KIR-ligand HLA în evoluția grefei renale la un grup de subiecți beneficiari ai unui transplant renal în cadrul Centrului de Transplant al ICUTR Cluj-Napoca. Studiul de tip caz-control a evaluat un lot de 84 de subiecți care au beneficiat de transplant împărțiți în două grupuri: 68 cu funcție stabilă a grefei și 16 care au suferit un rejet cronic al grefei. Lotul de control a fost compus din 97 subiecți sănătoși. Alelele HLA și genotipurile KIR au fost tipizate prin metoda PCR-SSP din sânge periferic. Caracteristici demografice ale lotului includ vârsta, sexul, tipul de donator, nepotrivirile HLA, nivelul panelului de anticorpi reactivi și nivelurile serice de creatinină la un an, trei ani și cinci ani post-transplant. În urma analizelor moleculare, biochimice și statistice în cadrul acestui studiu am constatat faptul că nu există o diferență semnificativă în nivelurile de nepotrivire

HLA de clasa I care să afecteze rezultatele grefei dar subliniază importanța luării în considerare atente a vârstei primitorului și a unei potriviri meticuloase a HLA la alocarea unei grefe, în special pe locusul HLA de clasa a II-a, pentru a îmbunătăți rezultatele transplantului. De asemenea monitorizarea regulată a nivelurilor serice de creatinină poate ajuta la intervenția timpurie și la gestionarea potențialei respingeri a grefei.

Am investigat genele KIR ale primitorilor și anume am descoperit ca fiind statistic semnificativ gena *KIR3DL1* la subiecții fără rejet (95.58%), comparativ cu cei cu rejet (75%, $p = 0.007$). Gena *KIR3DL1* este cunoscută pentru efectele sale inhibitoare care ar putea conferi beneficii protectoare împotriva respingerii grefei. *KIR2DS5* ($p = 0.001$) în studiul de față joacă un rol activator la primitori, cu o frecvență mai mare la primitorii cu rejet cronic, comparativ cu subiecții cu funcție stabilă a grefei. O asociere notabilă cu o valoare a p de 0.001 pentru perechea *KIR2DS5* a primitorului și ligandul HLA-C2 de la donator sugerează o legătură puternică între acest cuplu receptor-ligand activator și respingerea grefei. Lipsa diferențelor semnificative în frecvențele majorității genelor KIR sugerează că, deși genele KIR individuale nu pot prezice independent supraviețuirea grefei, echilibrul lor colectiv și interacțiunea cu tipurile HLA ar putea fi esențiale. Subiecții cu haplotipuri B-X, care conține un amestec de gene activatoare și inhibitoare, par să aibă un risc ușor mai ridicat de respingere cronică. Prezența haplotipuri B-B pot oferi protecție împotriva respingerii grefei. În ceea ce privește corelarea interacțiunilor KIR-ligand HLA este nevoie de studii pe loturi mai largi pentru a putea obține date semnificativ statistice.

Studiul 3. Evaluarea supraviețuirii grefei renale în funcție de asocierea dintre genele KIR ale primitorului și liganzii HLA de la donatorii de greafă renală

În acest studiu, am evaluat supraviețuirea grefelor renale la pacienții transplantați la ICUTR, urmărind pe parcursul a cinci ani post-transplant evoluția lor. În studiul de față am identificat unii dintre markerii genetici KIR implicați în răspunsul imun al acestor pacienți, corelat cu markerii HLA de la donatorii lor. În literatură s-a studiat rolul interacțiunilor dintre genele KIR și liganzii HLA de clasa I de la donator în ceea ce privește evoluția transplantului și supraviețuirea grefei. Având în vedere aceste considerente am considerat de interes să analizez acești markeri, luând în considerare interacțiunile KIR/HLA.

Am evaluat date ale subiecților legate de vârstă, sex, cauza IRC, tipul de dializă, data intrării pe lista de așteptare, data începerii dializei, comorbidități, statusul serologic pentru hepatită și citomegalovirus (CMV); datele donatorului: vârsta, tipul (donator aflat în moarte cerebrală sau viu); datele despre transplant: data transplantului, numărul de transplanturi, timpul de ischemie, nepotrivirea HLA, terapia de inducție, infecția cu poliomavirus BK, rezultatul anatomopatologic, respingerea celulară, respingerea umorală, funcționarea întârziată a grefei; datele de urmărire: data ultimei vizite, data și cauza pierderii grefei.

Analizând curbele de supraviețuire Kaplan-Meier în transplantul de rinichi, stratificate după compatibilitatea/incompatibilitatea ligandului KIR/HLA am remarcat probabilitatea că supraviețuirea grefei renale este influențată de factori precum potrivirile și nepotrivirile liganzilor HLA corespunzători genelor KIR. Acest studiu sugerează că, în timp ce *KIR2DS5*/HLA-C2 poate avea un impact negativ asupra supraviețuirii grefei, alte perechi nu par să aibă o influență semnificativă în lotul de 84 subiecți transplantați la ICUTR. Supraviețuirea grefei nu este influențată la un an de la transplant de acești factori genetici. La trei ani, o supraviețuire mai bună am observat în cazul incompatibilității KIR-ligand

pentru perechile KIR2DL3/HLA-C1, KIR2DS5/HLA-C2, KIR2DS3/HLA-C1, KIR3DS1/HLA-Bw4. Studiul deschide căi pentru investigații mai detaliate asupra mecanismelor prin care compatibilitățile KIR/HLA afectează toleranța imună. Cercetări suplimentare ar putea explora efectele de interacțiune cu alți markeri genetici sau factori non-genetici, cum ar fi vârsta pacientului, comorbiditățile și diferențele în regimurile de tratament imunosupresor. Rezultatele acestui studiu retrospectiv ar trebui interpretate ca asocieri între KIR și HLA care necesită validare suplimentară.

Concluzii generale și originalitatea tezei

Din această teză de doctorat se conturează câteva concluzii, utile în practica clinică a unui transplant de succes, și pe care le menționez succint. Am demonstrat că anumite gene HLA pot fi utilizate ca markeri prognostici pentru IRC. Prin analizele efectuate am identificat alelele *HLA-A*11*, *HLA-A*34*, *HLA-A*69*, *HLA-B*41*, *HLA-B*50*, *HLA-DRB1*10* și *HLA-DRB1*14* ca fiind asociate cu un risc crescut de a dezvolta IRC. Haplotipul *HLA-A*02-B*41-DRB1*03*, care conține o alelă cu risc (*HLA-B*41*), a fost considerat cel mai susceptibil pentru IRC. Aceste constatări subliniază potențialul genotipurilor HLA în evaluarea riscului de boală renală cronică. Studiile multicentrice ar putea oferi informații mai bune despre riscurile asociate alelelor HLA specifice. Pentru prima dată, am stabilit că interacțiunea dintre markerii genetici HLA și KIR influențează semnificativ supraviețuirea pe termen lung a grefei renale la pacienții transplantați. Am identificat haplotipurile *KIR B-B* ca fiind asociate cu funcția renală stabilă și pot servi drept factori cu rol protector împotriva rejetului cronic. Am argumentat faptul că genotipurile *HLA-A*23*, *HLA-B*08* și *HLA-DRB1*16* în forma lor homozigotă acționează ca factori de risc pentru IRC. Am confirmat că anumite combinații între genele KIR și moleculele HLA, cum ar fi *KIR2DS5/HLA-C2* sunt factori de risc pentru respingerea grefei renale. Am stabilit că prezența genei *KIR3DL1* conferă beneficii protectoare împotriva respingerii grefei, având un impact asupra succesului transplantului. Gena *KIR2DS5* conferă susceptibilitate la respingerea grefei. Am demonstrat că nu toate variantele genelor KIR individuale pot fi utilizate ca markeri predictivi pentru succesul transplantului dar echilibrul lor colectiv și interacțiunile cu liganzii HLA ar putea fi esențiale, subliniind necesitatea extinderii unor astfel de studii. Totodată sunt necesare cercetări suplimentare pe loturi extinse pentru a stabili corelațiile între diverse polimorfisme genetice și succesul pe termen lung al transplanturilor renale.

SUMMARY OF PHD THESIS

Genetic markers predictive of graft survival in renal transplant patients

PHD student **Luminița-Ioana Iancu (căs. Loga)**

Scientific coordinator Prof. Dr. **Horea-Vladi Matei**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. General organization of the major histocompatibility complex (MHC)	17
1.1. MHC structure	17
1.2. Class I and Class II HLA genes	18
1.3. HLA molecules	20
1.3.1. Class I HLA molecules	20
1.3.2. Class II HLA molecules	20
1.3.3. Class III HLA molecules	21
1.4. HLA polymorphism	21
1.4.1. HLA polymorphism and its link to kidney diseases	22
1.4.2. HLA polymorphism and its significance in kidney transplantation	22
2. Immune response against the graft in transplantation	25
2.1. Innate and acquired immunity	25
2.2. Pathways of T cell allorecognition	26
2.3. B cells and humoral response	28
3. Role of natural killer (NK) cells and KIR receptors in transplantation	31
3.1. NK cells	31
3.2. KIR genes	32
3.3. KIR gene polymorphism	34
3.4. Role of KIR in transplantation	36
4. Tests and new biomarkers for kidney transplant success	39
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Objectives	45
2. General methodology	47
3. Study 1. Associations between Human Leukocyte Antigen and End-Stage Renal Disease in patients from Transylvania	55
3.1. Introduction	55
3.2. Objectives	55
3.3. Materials and methods	56
3.4. Results	58
3.5. Discussion	68
3.6. Conclusions	70
4. Study 2. Frequency of KIR genes and KIR haplotypes in patients with kidney grafts	71
4.1. Introduction	71

4.2. Objectives	73
4.3. Materials and methods	73
4.4. Results	76
4.5. Discussion	84
4.6. Conclusions	86
5. Study 3. Evaluation of kidney graft survival based on the association between recipient KIR genes and donor HLA ligands in kidney transplant donors	87
5.1. Introduction	87
5.2. Objectives	87
5.3. Materials and methods	88
5.4. Results	89
5.5. Discussion	103
5.6. Conclusions	104
6. General conclusions	107
7. Originality and innovative contributions of the doctoral thesis	109
REFERENCES	111

Keywords: human leukocyte antigen (HLA), killer-cell immunoglobuline-like receptors (KIR), chronic rejection, kidney transplantation, biomarkers, HLA allele frequency

INTRODUCTION

Kidney transplantation, as an effective therapeutic method, is a life-saving treatment for patients suffering from end-stage chronic kidney failure. The long-term success of a transplant depends on the careful selection of candidates, rigorous post-transplant management, and patient compliance with immunosuppression, necessitating a multidisciplinary approach that includes nephrologists, surgeons, immunologists, and other medical specialties to ensure optimal outcomes for these patients. In this context, immunological compatibility between donor and recipient plays a crucial role in the long-term success of kidney transplantation.

Two of the most important immunological systems influencing this compatibility are the Human Leukocyte Antigen (HLA) system and the Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) system. HLA compatibility is essential for reducing the risk of immune rejection mediated by T cells and antibodies. Additionally, the complex interaction between KIR receptors and HLA molecules can influence the activity of NK cells and the long-term outcomes of the transplanted graft. A deep understanding of these immunological interactions enables better selection of donor-recipient pairs and the development of personalized immunosuppressive strategies. By analyzing the specific HLA and KIR genetic markers involved in a transplant, as well as specific immunological tests, some recommendations based on solid genetic foundations can be formulated to improve clinical protocols, thereby contributing to the enhancement of medical practices.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. General organization of the major histocompatibility complex (MHC)

The major histocompatibility complex (MHC), with its multiple single nucleotide polymorphisms, represents one of the most important genetic systems involved in the immune response. A detailed understanding of these polymorphisms is crucial for organ transplantation, as HLA compatibility between donor and recipient is a determining factor in the long-term success of transplantation. Recent studies have shown that the risk of rejection increases with the number of HLA mismatches. Thus, understanding the MHC and its diversity is essential not only for immunology and transplantology but also for genetic anthropology, epidemiology, and personalized medicine. Due to the critical role these genes play in immune response and susceptibility chronic kidney failure, HLA polymorphism in kidney diseases is a field of research that has been and will continue to be studied.

2. Immune response against the graft in transplantation

The innate immune system, through its closely interconnected components, can mutually activate each other, inducing a pro-inflammatory process in the acute and chronic rejection of the kidney graft. These graft-specific antigens, which are exposed to the recipient's immune system in situations of tissue damage, inflammation caused by ischemia-reperfusion, and graft rejection, can lead to the formation of autoantibodies. B cells also play a crucial role in the immune response by producing antibodies, i.e. circulating proteins that specifically bind to the antigen responsible for their production, which can lead to acute or chronic antibody-mediated rejection. Acute humoral rejection is generated by prior exposure to HLA antigens or other antigens introduced by the allograft and occurs a few days up to six weeks after transplantation. Chronic humoral rejection is characterized by a long and progressive process of graft function loss, manifesting one year after transplantation, with histopathological features that include transplant glomerulopathy, fibrillar material deposition in the subendothelium, and C4d deposition.

3. Role of natural killer (NK) cells and KIR receptors in transplantation

NK cells, which are components of the innate immune system, play an important role not only in regulating the acceptance or rejection of the allograft but also in the development of transplant vasculopathy. Their functions are regulated by a complex of receptor molecules (KIR) expressed on their surface, which are specific receptors for class I HLA molecules (ligands). The family of 16 KIR genes is characterized by a high level of diversity due to the presence/absence of certain KIR genes, copy number variations, as well as allelic polymorphism. NK cell activation is strictly regulated through an integrated balance of signaling via inhibitory and activating KIR receptors. Since KIR receptors and HLA ligands are highly polymorphic, KIR receptors on the surface of the NK cells of a transplant recipient can generate NK cell alloreactivity against the transplanted organ. Therefore, the balance between activating and inhibitory signals is crucial for regulating NK cell functions. The introduction of KIR in transplant diagnostics represents a promising innovation in the management of organ transplants.

4. Tests and new biomarkers for the success of kidney transplantation

Kidney graft function is evaluated by determining serum creatinine and urea levels, analyzing urinary sediment, and performing kidney biopsies. The usual tests performed

before transplantation include crossmatching (direct compatibility), HLA typing using molecular techniques, and the detection of antibodies against HLA molecules (cytotoxic antibodies). The biomarkers used in the diagnosis of humoral or cellular rejection, graft evolution, and the immediate detection of the early stages of chronic kidney damage are highlighted in kidney biopsy samples, urine, whole blood, and/or plasma. Such biomarkers include KIR typing, donor-derived free DNA (dd-cfDNA), non-invasive transcriptomic, proteomic, metabolomic, and cellular biomarkers. Constant evaluation of all these parameters could prevent episodes of acute rejection and kidney damage. In this way, both immune response biomarkers and tissue damage biomarkers are essential for the long-term survival of kidney transplant patients.

PERSONAL CONTRIBUTION

Objectives

The objectives of the three studies included in this doctoral thesis were to investigate KIR and HLA genetic markers that can influence graft survival and thus the long-term success of a kidney transplant. The role of pre-transplant evaluation of renal transplant candidates, including the identification of other genetic, medical, surgical, and psychosocial factors that may influence the long-term survival of both the patient and the graft, should not be overlooked. The aims of this thesis were to identify the specific HLA alleles in the population of Transylvania, to determine their frequency and haplotypes, to create a genetic profile of subjects with potential kidney pathology and risk of developing certain kidney diseases, and to identify new associations between HLA, KIR genetic markers and the risk of rejection in kidney transplant recipients, for supporting clinical diagnosis and preventive measures in at-risk populations.

General methodology

The main objectives of this thesis from the perspective of the experiments I conducted were:

- to obtain concentrated and pure DNA, sequencing the DNA in the HLA region, followed by the identification of the alleles present in all study participants (both in the case and control groups);
- to establish DNA profiles through HLA typing using the PCR-SSP/PCR-SSO method and PCR product electrophoresis;
- to identify the most frequent HLA alleles (specific alleles) and combinations of alleles (haplotypes) present in subjects at risk of developing kidney pathology and in control group subjects;
- to determine KIR genotyping and the presence or absence of KIR-HLA ligand gene mismatches, i.e., combinations of KIR genotyping from a recipient with class I HLA molecules from donor;
- to identify KIR haplotypes involved in kidney graft rejection;
- to assess HLA compatibility between donor and kidney graft recipient;

➤ to analyze kidney graft survival based on the presence or absence of KIR-HLA ligand gene mismatches, i.e. combinations of KIR genotyping from a recipient with class I HLA molecules from donor, using advanced statistical programs to identify the predominance of certain genes/alleles in all groups and subgroups of subjects who participated in the studies.

Study 1. Association between Human Leukocyte Antigen and End-Stage Renal Disease in Patients from Clinical Institute of Urology and Renal Transplant ,Cluj-Napoca

HLA allelic polymorphisms are associated with a variety of diseases. Genetic studies associate HLA genes with different kidney diseases, highlighting the need to collect molecular data to identify high-risk patients and improve graft survival after kidney transplantation. The success of a transplant is determined by both cellular and humoral immune responses, both of which depend on HLA alleles. The HLA system also contributes to inducing the immune response, controlling it, and selecting the T cell repertoire. HLA genes are among the most polymorphic genes in the human genome. The subsets of peptides encoded by these genes and the binding specificities of HLA molecules are important for understanding differences in immune responses between individuals.

The study explored the association between human leukocyte antigens and chronic kidney disease (CKD) to determine whether allelic polymorphism plays a role in the development of this condition. The interaction between genetic and environmental factors can also play a role in the development of kidney diseases. In this retrospective analytical study, I enrolled 5,666 subjects: 2,392 subjects diagnosed with CKD of various etiologies and 3,274 healthy subjects. The study was conducted by collecting representative sample data, referencing the frequency of HLA alleles in the European population, and comparing the genotypes of different subjects across population groups. I study alleles from the HLA class I region (A, B) and the HLA class II region (DR) to detect alleles that confer susceptibility or protection against CKD. Data collection also tracked the etiology of the conditions that led to CKD in the patient group. Blood samples from all subjects were processed in the HLA laboratory of the Clinical Institute of Urology and Renal Transplantation (CIURT), according to approved laboratory protocols. I only analyzed alleles identified in at least one member of each group.

Additionally, for each allele, I analyzed whether homozygous subjects had a higher risk of developing CKD compared to heterozygous subjects. We used either the Chi-squared test or Fisher's exact test and calculated the OR and 95% CI. CKD subjects who were tested for HLA were divided into 22 groups, based on the primary disease that led to the condition, the most common being chronic glomerulonephritis (CGN). In the univariate analysis of the two groups, we identified 64 different alleles, 19 alleles in the HLA-A group, 32 HLA-B alleles, and 13 HLA-DRB1 alleles. The most common alleles at the HLA-A locus were *HLA-A*02*, *HLA-A*01*, *HLA-A*24*, and *HLA-A*03*, with a frequency greater than 10% in both groups. *HLA-A*74* was found only in the control group, while *HLA-A*36* was found only in the CKD group. A total of 32 alleles at the HLA-B locus were detected in both groups; among them, the frequency of *HLA-B*18* and *HLA-B*35* was greater than 10% in both groups. *HLA-B*54* was present only in the control group, while *HLA-B*70* and *HLA-B*78* were present only in the CKD group. A total of 13 alleles at the HLA-DR locus were detected in the CKD group, where the top three alleles were *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*16*, and *HLA*-DRB1*03*, while in the

control group, *HLA-DRB1*13* was observed with a frequency greater than 10%.

Data from multivariate logistic regression analysis showed that *HLA-A*11* ($p = 0.027$), *HLA-A*34* ($p = 0.017$), *HLA-A*69* ($p = 0.012$), *HLA-B*41* ($p < 0.001$), *HLA-B*50* ($p = 0.004$), *HLA-DRB1*10* ($p = 0.027$), and *HLA-DRB1*14* ($p = 0.004$) were positively associated with CKD ($OR > 1$), while *HLA-A*30* ($p < 0.001$), *HLA-B*44* ($p < 0.001$), *HLA-B*48* ($p = 0.018$), *HLA-DRB1*07* ($p < 0.001$), *HLA-DRB1*08* ($p = 0.005$), and *HLA-DRB1*13* ($p < 0.001$) had a protective effect against CKD ($OR < 1$).

In the analysis of each allele in CKD subjects, the following alleles, in their homozygous form, were risk factors for kidney disease: *HLA-A*23* ($OR = 11.25$, $p = 0.006$), *HLA-A*24* ($OR = 1.65$, $p = 0.023$), *HLA-B*08* ($OR = 1.94$, $p = 0.021$), *HLA-B*27* ($OR = 5.13$, $p = 0.011$), *HLA-DRB1*11* ($OR = 1.9$, $p = 0.021$), *HLA-DRB1*14* ($OR = 3.05$, $p = 0.019$), and *HLA-DRB1*16* ($OR = 2.17$, $p = 0.001$). No HLA allele had a statistically significant protective effect against chronic kidney disease when in homozygous form. I analyzed the frequencies of HLA-A-B-DRB1 haplotypes using the Expectation-Maximization algorithm implemented through the haplo.em function of the haplo.stats package and we generated absolute and relative expected frequencies for all possible haplotypes in the two groups. It was found that *HLA-A*24-B*18-DRB1*11* was the most frequent risk haplotype in the group that developed CKD, its frequency in the case group being 12.01‰, while the frequency in the control group was 7.76‰, which is significantly lower than the frequency in CKD subjects ($p < 0.05$). Among the haplotypes containing one or more alleles that were statistically significantly associated with CKD, the haplotype *HLA-A*02-B*41-DRB1*03*, containing the *HLA-B*41* allele, was strongly associated with CKD ($p < 0.001$, $OR = 3.15$). This study is the first in northern Romania (Transylvania) to analyze the association of different HLA alleles and haplotypes with CKD. The distributions of alleles and haplotypes vary depending on geographic location and ethnic groups.

Study 2: Frequency of KIR genes and KIR haplotypes in patients with kidney grafts

It is well known that immune responses in transplantation are influenced by numerous factors, including compatibility between the recipient's immune system and the donated organ. Interactions between KIR receptors and HLA antigens play a crucial role in the recipient's immune response, particularly in how these interactions affect the reactivity of NK cells, which can drastically alter the post-transplant immunological environment. Certain KIR-HLA interactions have been associated with either increased risk of acute rejection or improved graft survival, underscoring the necessity of meticulous genetic matching in the donor selection processes.

The innovative approach of this study consisted of identifying correlations and interactions between HLA antigen matches/mismatches between donor and recipient, as well as the presence/absence of KIR-HLA ligand interactions in the evolution of kidney grafts in a group of kidney transplant recipients at CIURT, Cluj-Napoca. This case-control study evaluated a cohort of 84 transplant recipients divided into two groups: 68 with stable graft function and 16 who experienced chronic graft rejection. The control group consisted of 97 healthy subjects. HLA alleles and KIR genotypes were typed using the PCR-SSP method from peripheral blood. The demographic characteristics of the cohort included age, sex, donor type, HLA mismatches, panel-reactive antibody levels, and serum creatinine levels at one, three, and five years post-transplant.

Following molecular, biochemical, and statistical analyses, the study found no significant difference in class I HLA mismatches affecting graft outcomes, but it emphasized the importance of carefully considering the recipient's age and meticulously matching class II HLA alleles during graft allocation to improve transplant outcomes. Additionally, regular monitoring of serum creatinine levels may aid in the early intervention and management of potential graft rejection.

I investigated the KIR genes of the recipients and found a statistically significant association of the *KIR3DL1* gene with recipients without rejection (95.58%), compared to those with rejection (75%, $p = 0.007$). *KIR3DL1* gene is known for its inhibitory effects, which may provide protective benefits against graft rejection. In this study, *KIR2DS5* gene ($p = 0.001$) was identified as playing an activating role in recipients, with a higher frequency in patients with chronic rejection compared to those with stable graft function. A notable association with a p -value of 0.001 for the pair recipient *KIR2DS5* and donor HLA-C2 ligand suggests a strong link between this activating receptor-ligand pair and graft rejection. The lack of significant differences in the frequencies of most KIR genes suggests that, while individual KIR genes may not independently predict graft survival, their collective balance and interaction with HLA types may be essential. Subjects with the B-X haplotypes, containing a mix of activating and inhibitory genes, appear to have a slightly higher risk of chronic rejection. The B-B haplotypes are associated with stable graft function. Regarding the correlation between KIR-HLA ligand interactions, larger cohort studies are needed to obtain statistically significant data.

Study 3: Evaluation of kidney graft survival based on the association between recipient KIR genes and donor HLA ligands in kidney graft donors

In this study, I evaluated the survival of kidney grafts in patients transplanted at CIURT by monitoring their progress over five years post-transplant. I identified some of the KIR genetic markers involved in the immune response of these patients, correlated with the HLA markers of their donors. The literature has explored the role of interactions between KIR genes and class I HLA ligands from donors in the evolution of transplants and graft survival. Given these considerations, I found it of interest to analyze these markers, taking into account KIR/HLA interactions.

I evaluated subject data including age, sex, cause of CKD, type of dialysis, date of entry on the waiting list, date of dialysis initiation, comorbidities, serological status for hepatitis and cytomegalovirus (CMV); donor data: age, donor type (brain-dead or living donor); transplant data: date of transplant, number of transplants, ischemia time, HLA mismatch, induction therapy, BK virus infection, histopathology results, cellular rejection, humoral rejection, delayed graft function; and follow-up data: date of last visit, date and cause of graft loss.

By analyzing Kaplan-Meier survival curves in kidney transplantation, stratified by KIR/HLA ligand compatibility/incompatibility, we observed that kidney graft survival was influenced by factors such as HLA ligand matches and mismatches corresponding to KIR genes. This study suggests that while *KIR2DS5*/HLA-C2 may have a negative impact on graft survival, other pairs did not seem to have a significant influence in the cohort of 84 patients transplanted at CIURT. Graft survival at one-year post-transplant was not affected by these genetic factors. At three years, better survival was observed in cases of KIR-ligand incompatibility for the *KIR2DL3*/HLA-C1, *KIR2DS5*/HLA-C2, *KIR2DS3*/HLA-C1,

and KIR3DS1/HLA-Bw4 pairs. This study opens avenues for more detailed investigations into the mechanisms through which KIR/HLA compatibility affects immune tolerance. Further research could explore interaction effects with other genetic markers or non-genetic factors, such as the patient's age, comorbidities, and differences in immunosuppressive treatment regimens. The results of this retrospective study should be interpreted as associations between KIR and HLA that require further validation.

General conclusions and originality of the thesis

This doctoral thesis led to several conclusions that are useful in clinical practice for successful transplants. I have demonstrated that certain HLA genes can be used as prognostic markers for chronic kidney disease (CKD). My analyses identified the *HLA A*11*, *HLA-A*34*, *HLA-A*69*, *HLA-B*41*, *HLA-B*50*, *HLA-DRB1*10*, and *HLA-DRB1*14* alleles as being associated with an increased risk of developing CKD. The *HLA-A*02-B*41-DRB1*03* haplotype, which contains a susceptible allele (*HLA-B*41*), was found to be the most susceptible to CKD. These findings highlight the potential of HLA genotypes to assess the risk of chronic kidney disease. For the first time, I established that the interaction between HLA and KIR genetic markers significantly influences the long-term survival of kidney grafts in transplant patients. I identified the KIR B-B haplotypes are associated with stable graft function as potential protective factors against chronic rejection. I argued that the *HLA-A*23*, *HLA-B*08*, and *HLA-DRB1*16* genotypes in their homozygous form act as risk factors for CKD. I confirmed that certain combinations between KIR genes and HLA molecules, such as KIR2DS5/HLA-C2, are risk factors for kidney graft rejection. I established that the presence of the *KIR3DL1* gene provides protective benefits against graft rejection, thus impacting the success of transplantation. The *KIR2DS5* gene confers susceptibility to graft rejection. I demonstrated that not all individual KIR gene variants can be used as predictive markers for transplant success, although their collective balance and interactions with HLA ligands could be essential, which emphasizes the need to expand such studies. Additionally, further research on larger cohorts is required to establish correlations between various genetic polymorphisms and the long-term success of kidney transplants.