

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**

Studijní program: Anatomie, histologie a embryologie



**NKG2D a KIR receptory a jejich role u alogenní  
transplantace krvetvorných buněk u pacientů s akutní  
myeloidní leukémií**

**NKG2D and KIR receptors and their role in allogeneic  
hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute  
myeloid leukemia**

**Disertační práce**

**Školitel: Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.**

**Konzultantka: Mgr. Monika Holubová, Ph.D.**

**Plzeň, 2023**

**Mgr. Alena Machuldová**



## ABSTRAKT

NK buňky (z anglického Natural Killer = přirození zabíječi) hrají důležitou roli v boji proti virovým infekcím či nádorovým onemocněním. Tyto imunitní buňky jsou schopné rozeznávat i buňky bez přítomných HLA (human leukocyte antigen) proteinů a na rozdíl od T lymfocytů tak dokáží eliminovat buňky, které se snaží uniknout imunitnímu dohledu internalizací těchto molekul. Toho jsou schopné například leukemické kmenové buňky, které jsou považovány za buňky zodpovědné za relaps leukemie.

Aktivita NK buněk je řízena pomocí inhibičních a aktivačních receptorů. Mezi nejlépe prostudované patří KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) receptory, které mohou být jak inhibiční, tak aktivační a jejichž ligandy jsou primárně HLA molekuly. Nejvýznamnějším aktivačním receptorem je NKG2D (natural killer group 2-D), jehož ligandy jsou stresem indukované proteiny MICA a MICB (MHC class I-related chain-A nebo -B) a ULBP (human cytomegalovirus Unique Long 16-binding protein).

V první části této práce jsme si dali za cíl popsat, jestli česká populace odpovídá frekvencí alel a polymorfismů receptorů KIR a NKG2D a ligandů MICA a MICB dalším populacím kavkazského původu. V obou případech jsme pozorovali stejné výsledky jako v jiných pracích.

V druhé části jsme se zaměřili na studium přítomnosti specifického polymorfismu MICA, MICB či NKG2D, respektive HLA-KIR shodu a vliv těchto změn/interakcí na výsledek transplantace. Pozorovali jsme, že štěp od dárce s alespoň jednou alelou MICA-14 Gly je statisticky signifikantně spojen se zhoršeným celkovým přežitím pacienta. Sledovali jsme také negativní efekt alely MICB-58 Glu na přežití bez relapsu. Výsledek s MICB-58 nebyl statisticky signifikantní v multivariantské analýze. Na druhou stranu jsme nepozorovali žádný vliv již známých polymorfismů MICA-129, MICB-98 a HNK/LNK (high NK/low NK) u NKG2D na výsledek transplantace.

V rámci analýzy shody a neshody receptoru KIR s ligandem HLA jsme pozorovali, že čím vyšší shoda mezi KIR a HLA v inhibičních receptorech (2-3 vs. 5), tím vyšší je riziko relapsu a horší celkové přežití pacientů. Po porovnání všech jednotlivých KIR, které měli dostatečné množství HLA pro statistickou analýzu jsme sledovali, že shoda KIR2DL1-HLA vede k vyššímu riziku relapsu. Efekt se nicméně nepromítl do celkového přežití, byť byl pozorován stejný trend jako v případě přežití bez relapsu.

Naše práce prokázala vliv polymorfismů MICA a MICB a míru shody mezi KIR a HLA na výsledek transplantace hematopoetických buněk. Znalosti polymorfismů receptorů NK buněk mohou sloužit jako další kritérium pro výběr dárce a v budoucnu přispět k lepším výsledkům transplantace.

# ABSTRACT

NK cells (from Natural Killer) play an important role in the fight against viral infections or cancer. These immune cells are also able to recognize cells without HLA (human leukocyte antigen) proteins and, unlike T cells, can eliminate cells that try to escape immune surveillance by internalizing these molecules. For example, leukaemia stem cells, which are thought to be responsible for leukaemia relapse, are able to do this.

The activity of NK cells is controlled by inhibitory and activating receptors. Among the best studied are the KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) receptors, which can be both inhibitory and activating and whose ligands are primarily HLA molecules. The most prominent activating receptor is NKG2D (natural killer group 2-D), whose ligands are the stress-induced proteins MICA and MICB (MHC class I-related chain-A or -B) and ULBP (human cytomegalovirus Unique Long 16-binding protein).

In the first part of this study, we aimed to describe whether the Czech population corresponds in allele frequency and polymorphisms of KIR and NKG2D receptors and MICA and MICB ligands to other populations of Caucasian origin. In both cases we observed the same results as in other studies.

In the second part, we focused on studying the presence of specific MICA, MICB or NKG2D polymorphisms or HLA-KIR matching and the effect of these changes/interactions on transplant outcome. We observed that a graft from a donor with at least one MICA-14 Gly allele was statistically significantly associated with worse overall patient survival. We also observed a negative effect of the MICB-58 Glu allele on relapse-free survival. The result with MICB-58 was not statistically significant in multivariate analysis. On the other hand, we observed no effect of the already known MICA-129, MICB-98 and HNK/LNK (high NK/low NK) polymorphisms in NKG2D on transplantation outcome.

In the analysis of KIR receptor matching and mismatch with HLA ligand, we observed that the higher the match between KIR and HLA in inhibitory receptors (2-3 vs. 5), the higher the risk of relapse and the worse the overall survival of patients. After comparing all individual KIRs that had sufficient HLA for statistical analysis, we observed that KIR2DL1-HLA matching led to a higher risk of relapse. However, the effect did not translate into overall survival, although the same trend as for relapse-free survival was observed.

Our study demonstrated the effect of MICA and MICB polymorphisms and the degree of matching between KIR and HLA on the outcome of hematopoietic cell transplantation. Knowledge of NK cell receptor polymorphisms may serve as an



additional criterion for donor selection and contribute to better transplantation outcomes in the future.

## **PŘEDMLUVA A PROHLÁŠENÍ**

Tato práce byla vytvořena na pracovištích Ústavu histologie a embryologie a Laboratoře nádorové biologie a imunoterapie Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze, a Hemato-onkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni, pod vedením Mgr. Pavla Pituleho, PhD a Mgr. Moniky Holubové, PhD. a za pomoci cenných rad MUDr. Pavla Jindry, PhD. Prohlašuji, že dizertační práci jsem vypracovala samostatně a všechny literární zdroje jsou řádně citovány. Předkládaná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. V textové části byly použity části předchozích článků autorky, jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce. Teoretický úvod slouží k přehledu současné klasifikace, diagnózy a typů léčby akutní myeloidní leukémie s důrazem na NK buňky a transplantaci kostní dřeně. V experimentální části jsou vedle populační analýzy KIR, NKG2D, MICA a MICB popsány polymorfismy ligandů pro NK buňky, které v našem souboru měly vliv na prognózu pacienta po transplantaci kostní dřeně a role shody KIR a HLA na výsledek transplantace.

V Plzni dne .....

.....

# Obsah

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>PŘEDMLUVA A PROHLÁŠENÍ</b> .....	<b>4</b>
<b>1 SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>7</b>
<b>2 TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
2.1 LEUKÉMIE .....	10
2.2 AML A JEJÍ VZNIK .....	11
2.3 LÉČBA AML .....	13
2.3.1 <i>Indukce</i> .....	13
2.3.2 <i>Konsolidace</i> .....	14
2.3.3 <i>HSCT</i> .....	15
2.3.4 <i>Léčba relapsu</i> .....	15
2.4 ALOGENNÍ TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK .....	15
2.4.1 <i>Výběr dárce</i> .....	16
2.4.1.1 HLA .....	16
2.4.1.2 Další parametry .....	17
2.4.2 <i>Přípravný režim</i> .....	18
2.4.3 <i>Imunosuprese</i> .....	18
2.4.4 <i>Rekonstituce buněk po HSCT</i> .....	19
2.4.4.1 Rekonstituce NK buněk .....	19
2.4.5 <i>Komplikace po HSCT</i> .....	20
2.4.5.1 Relaps .....	20
2.4.5.2 GVHD .....	20
2.4.5.3 Infekce .....	21
2.5 NK BUNĚKY .....	23
2.5.1 <i>Vývoj a edukace NK buněk</i> .....	23
2.5.2 <i>Populace NK buněk</i> .....	23
2.5.3 <i>Receptory NK buněk</i> .....	24
2.5.3.1 NCR (natural cytotoxicity receptors) .....	26
2.5.3.2 CD94/NKG2 .....	28
2.5.4 <i>NKG2D receptor</i> .....	29
2.5.4.1 Ligandy NKG2D receptoru .....	29
2.5.4.1.1 Regulace NKG2D ligandů .....	30
2.5.4.1.2 Rodina MIC .....	30
2.5.4.1.3 Rodina ULBP .....	32
2.5.4.1.4 Polymorfismy NKG2D ligandů a jejich vliv na stav pacienta po transplantaci .....	32
2.5.5 <i>KIR receptory</i> .....	33
2.5.5.1 Role haplotypu a polymorfismů KIR receptorů při HSCT .....	36
2.5.5.2 KIR – HLA shoda a neshoda (match a mismatch) .....	37
<b>3 CÍLE, HYPOTÉZY A OTÁZKY DIZERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>40</b>
3.1 HYPOTÉZY, OTÁZKY .....	40
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>41</b>
4.1 MICA, MICB A NKG2D .....	41
4.2 ŠTUDOVANÁ POPULACE, POPIS KLINICKÝCH PARAMETRŮ PRO KIR .....	42
4.3 IZOLACE DNA .....	43
4.4 ANALÝZA NKG2D, MICA A MICB – SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ .....	44

4.5 ANALÝZA KIR – NGS SEKVENOVÁNÍ .....	46
4.6 ANALÝZA ZÍSKANÝCH SEKVENCÍ – MICA, MICB A NKG2D .....	53
4.7 ANALÝZA ZÍSKANÝCH SEKVENCÍ – KIR .....	54
4.8 PŘÍPRAVA DAT K ANALÝZE VLIVU KIR-HLA SHODY NA HSCT .....	56
4.9 STATISTICKÉ ANALÝZY SOUBORŮ .....	56
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>57</b>
5.1 VÝSLEDKY – POPULAČNÍ ANALÝZA .....	57
5.1.1 KIR.....	57
5.1.2 MICA a MICB – distribuce alel .....	59
5.1.3 MICA a MICB – distribuce polymorfismů .....	59
5.1.4 NKG2D – distribuce polymorfismů .....	60
5.2 DISKUZE – POPULAČNÍ ANALÝZA.....	61
5.2.1 Distribuce alel KIR.....	61
5.2.2 Distribuce alel MICA a MICB.....	62
5.2.3 Distribuce známých polymorfismů MICA a MICB a NKG2D .....	63
5.3 VÝSLEDKY – FUNKČNÍ ANALÝZA .....	63
5.3.1 Vliv shody KIR a HLA na výsledek HSCT .....	63
5.3.2 Vliv polymorfismů NKG2D, MICA a MICB na HSCT .....	69
5.4 DISKUZE – FUNKČNÍ ANALÝZA .....	76
5.4.1 Vliv (ne)shody KIR a HLA na výsledek HSCT .....	76
5.4.2 Vliv polymorfismů NKG2D, MICA a MICB na HSCT .....	77
<b>6 ZÁVĚRY PRÁCE .....</b>	<b>79</b>
<b>7 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>80</b>
<b>8 PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>93</b>
<b>9 SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>94</b>
<b>10 PŘÍLOHY .....</b>	<b>95</b>
10.1 DATA – PŘÍLOHA 1 .....	95
10.2 PŘEHLEDOVÉ A PŮVODNÍ PRÁCE .....	96

# 1 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
aGVHD	akutní reakce štěpu proti hostiteli
ALL	akutní lymfoidní leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
APC	antigen prezentující buňky
ATG	protilátka proti thymocytárnímu globulinu
BM	kostní dřeň
BU	busulfan
BZLF1	BamHI Z fragment leftward open reading frame 1
C	cytosin
CD4+	pomocné T lymfocyty
CD8+	cytotoxické T lymfocyty
cGVHD	chronická reakce štěpu proti hostiteli
CI	konfidenční interval
CLL	chronická lymfoidní leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CMV	cytomegalovirus
CNV	copy number variation
CR	kompletní remise
CsA	cyklosporin A
CY	cyklofosfamid
D	aspartát
DFS	přežití bez nemoci
DLI	infúze dárcovských lymfocytů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRI	Disease Risk Index
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELN	European Leukemia Net
FAB	francouzsko-americko-britská klasifikace AML
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
FLU	fludarabin
G	guanin
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor
Glu	kyselina glutamová nebo glutamát
Gly	glycin
GPI	glycosylphosphatidylinositol

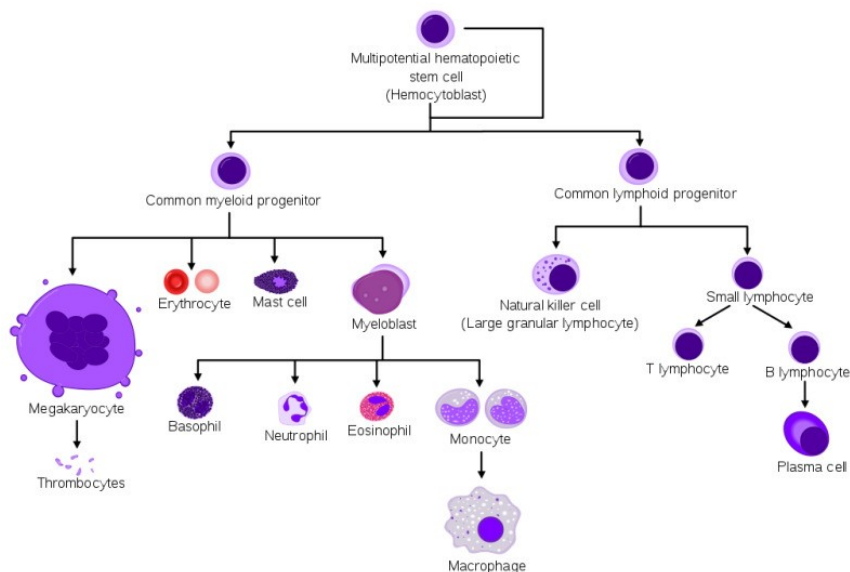
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
GVL	reakce štěpu proti leukémii
HCT-CI	Hematopoietic Cell Transplantation – Comorbidity Index
HLA	human leukocyte antigens
HNK	high NK
HR	hazard ratio, poměr rizik
HSCT	alogenní transplantace kmenových buněk
Ig	imunoglobulin
IL-	interleukin-
Ile	isoleucin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
K	lysine
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptors
KIR-L	KIR s dlouhou intracelulární částí proteinu
KIR-S	KIR s krátkou intracelulární částí proteinu
KLRK1	killer cell lectin like receptor K1
LNK	low NK
LR PCR	long range PCR
MDS	myelodysplastický syndrom
MEL	melfalan
Met	methionin
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC class I-related chain
MMF	mykofenolát mofetil
MMP	matrix metalloproteinase
MRD	minimální reziduální nemoc
NCR	natural cytotoxicity receptors
NGS	next generation sequencing
NK	natural killer
NKG2	natural killer group 2
NRM	nerelapsová mortalita
OS	celkové přežití
PARP1	poly-ADP-ribóza polymeráza 1
PBSC	periferní kmenové krevní buňky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI-PLC	phosphoinositide phospholipase C
PTCY	post-transplantační cyklofosfamid
R	arginin
RAET	retinoic acid early transcript
RFS	přežití bez relapsu
RNA	ribonukleová kyselina
T	thymin

Tacro	takrolimus
TBI	celotělové ozáření
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Th-17	prozánětlivé pomocné T lymfocyty
TM	transmembránový
Trp	tryptofan
ULBP	human cytomegalovirus Unique Long 16-binding protein
Val	valin
VZV	varicella-zoster virus způsobující plané neštovice
WHO	světová zdravotnická organizace
WT	wild type (nemutovaný)

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Leukémie

Leukémie jsou nádorová onemocnění krvetvorby, která se vyskytují primárně v kostní dřeni. Z hlediska vývojové linie, ze které pocházejí, lze dělit na leukémie myeloidní a lymfoidní (obrázek 1).



Obrázek 1 – Hematopoéza a rozdělení linií buněk na myeloidní a lymfoidní<sup>1</sup>

Oba typy pak lze dále dělit na akutní (tj. akutní myeloidní – AML – nebo akutní lymfoidní leukémii – ALL) a chronické (chronická myeloidní – CML – a chronická lymfoidní leukémie – CLL). Obecně se dá říci, že akutní leukémie mají velmi rychlý průběh a v případě, že nejsou léčeny, končí rychlým úmrtím pacienta v rámci několika dnů, maximálně měsíců od diagnózy. S chronickou leukémií lze bez léčby teoreticky přežít i několik let.<sup>2</sup>

Tyto dva typy leukémií se neliší jen z hlediska prognózy, ale také výskytem v populaci a způsobem léčby. Zatímco chronické leukémie se objevují prakticky pouze u dospělých, ALL má vrcholy výskytu dva, a to u pacientů starších 50 let a u dětí.<sup>2</sup> AML je pak nejčastější akutní leukémií dospělých (až 80 %), jejíž výskyt se zvyšuje s věkem.<sup>1</sup> Současně s tím má AML z leukémií nejkratší celkové přežití.<sup>3</sup> Jedná se o nejčastější diagnózu, která je indikována k alogenní transplantaci kostní dřeni (viz kapitola 2.4 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk).<sup>4</sup>



## 2.2 AML a její vznik

AML se vyznačuje klonální proliferací myeloidních buněk v různém stádiu diferenciaci, což vede nejen ke kumulaci nádorových buněk, ale také k neefektivní hematopoéze.<sup>1</sup> Od toho se pak odvíjí příznaky AML, jakými jsou utlačování zdravé krvetvorby a s tím související pancytopenie nebo naopak méně častá leukocytóza, anémie vedoucí k únavě, časté infekce, zvětšení mízních uzlin, nevysvětlitelné horečky, ztráta hmotnosti, noční pocení a další.<sup>5</sup> AML vznikají primárně de-novo, ale mohou vznikat i sekundárně, kdy se mohou vyvinout z předchozího myelodysplastického syndromu nebo jako odpověď na předchozí radioterapii či chemoterapii pro jiné nádorové onemocnění.<sup>1</sup>

Základní diagnostika probíhá na základě morfologie, imunofenotypizace a následně i molekulárně genetických vyšetření. Při podezření na hematologické onemocnění je pacientovi provedena sternální punkce (odběr kostní dřeně ze sternu). Výhodou tohoto vyšetření oproti trepanobiopsii je jeho menší bolestivost a menší náročnost, nevýhodou je, že neposkytuje informaci o struktuře kostní dřeně a je tak možné určit pouze procentuální zastoupení buněk v kostní dřeni. Proto se odebírá také trepanobiopsie z lopaty kosti kyčelní, při které je získán váleček kostní dřeně a je tedy možné provést hlubší histologické vyšetření.

Morfologická diagnóza AML odpovídá přítomnosti 20 % blastů v kostní dřeni (a to blastů jakéhokoliv typu). Podtyp AML je pak určen imunofenotypizací přítomných blastů, kdy základními markery pro AML jsou HLA-DR, CD33, CD13 a CD34 a jednotlivé podtypy se liší procentuálním zastoupením těchto markerů a také přítomností nebo absencí dalších markerů, jako je například slabá exprese CD45.<sup>6</sup> Imunofenotypizace také dokáže detekovat velmi vzácné leukemické kmenové buňky, které jsou považovány za zodpovědné za relaps. Tyto buňky jsou totiž rezistentní k chemoterapii i k imunitnímu dohledu.<sup>7</sup> Dle buněčné diferenciaci se pak AML dělí na základě francouzsko-americko-britské (FAB) klasifikace na subtypy M0-M7 (tabulka 1).<sup>8</sup>

Subtyp dle FAB	Název
M0	Akutní myeloblastická leukémie (AML) s minimální diferenciací
M1	AML bez vyžívání
M2	AML s vyžíváním
M3	Akutní promyelocytární leukémie
M4	Akutní myelomonocytární leukémie
M4eo	Akutní eozinofilní leukémie
M5	Akutní monocytární leukémie
M6	Akutní erytroidní leukémie
M7	Akutní megakaryoblastická leukémie

Tabulka 1 – FAB klasifikace AML<sup>8</sup>

Vedle morfologického a imunofenotypizačního vyšetření je také důležité provedení cytologického vyšetření, protože jsou u AML velmi běžné chromozomální abnormality, a to až u 50 % pacientů. Tyto abnormality hrají roli v klasifikaci onemocnění, ale i jakožto prognostické kritérium. V tabulce 2 jsou uvedené jednotlivé abnormality s jejich rizikovostí dle skupiny European Leukemia Net (ELN).<sup>9</sup>

Riziková skupina	Cytogenetické a molekulární nálezy
Příznivá	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	mutovaný NPM1 bez FLT3-ITD nebo s FLT3-ITD <sup>low</sup> (mut/wt < 0,5)
	bialelická mutace CEBPA
Střední	mutovaný NPM1 s FLT3-ITD <sup>high</sup> (mut/wt ≥ 0,5)
	nemutovaný NPM1 bez FLT3-ITD nebo s FLT3-ITD <sup>low</sup> (mut/wt < 0,5) (bez negativních cytogenetických abnormalit)
	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A
	cytogenetické abnormality neklasifikované jako příznivé nebo nepříznivé
Nepříznivá	inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1)
	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	t(v;11)(v;q23); KMT2A přestavba
	t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL1
	-5 nebo del(5q); -7; -17/abn(17p)
	komplexní karyotyp, monozomální karyotyp
	nemutovaný NPM1 a FLT3-ITD <sup>high</sup> (mut/wt ≥ 0,5)
	mutace v RUNX1 (bez příznivých genetických abnormalit)
	mutace v ASXL1 (bez příznivých genetických abnormalit)
	mutace v TP53

Tabulka 2 – ELN prognostická stratifikace de novo AML, 2017. Mut – mutovaný, wt – wild type<sup>9</sup>

Součástí vyšetření jsou také vyšetření molekulárně genetická, která zkoumají přítomnost známých mutací či fúzních genů. Vyšetření lze provádět jak pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), tak sekvenací dle Sangerovy metody či pomocí next generation sequencing (NGS). Výsledná znalost pak pomáhá spolu s chromozomálními abnormalitami ke klasifikaci onemocnění, jak je uvedeno v tabulce 2. O genetické změny se opírá i klasifikace AML dle WHO, dělíci AML na

AML s rekurentními genetickými abnormalitami, AML s dysplastickými změnami, s léčbou související AML a dále nespecifikovaná AML.<sup>10</sup>

I po provedené terapii je možné uvedené metody používat pro monitoring samotného onemocnění. Kontrola absence minimální reziduální nemoci (MRD) nebo relapsu (či záchyt incipientního relapsu) probíhá klasickou mikroskopickou analýzou odebraného vzorku kostní dřeně, ale také pomocí průtokové cytometrie (přítomnost/absence povrchových znaků typických pro daný subtyp AML). V případě, že byly vstupně u pacienta zjištěny některé z mutací, je možné provádět monitoring stavu onemocnění sledováním přítomnosti/absence těchto mutací ve vzorku pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) či sekvenace.

## 2.3 Léčba AML

AML je v současné době vyléčitelná u 30-45 % pacientů ve věku do 60 let, ale se stoupajícím věkem vyléčitelnost klesá až na 15-5 %. Nižší vyléčitelnost starších pacientů souvisí jak s parametry daného pacienta (performance status dle ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group, či komorbidit), tak také s parametry nemoci, jako je vyšší kumulace genetických změn nebo absolvování dřívější cytotoxické terapie pro jiné nádorové onemocnění apod. U takových pacientů je pak potřeba zvážit poměr rizika a přínosu použití intenzivní terapie.<sup>11</sup>

Cílem léčby je dosažení kompletní remise (CR) a to včetně eradikace tzv. leukemických kmenových buněk, kdy CR je definována jako < 5 % blastů v kostní dřeni, nepřítomnost blastů v periferní krvi a nepřítomnost blastů s Auerovými tyčemi, nepřítomnost extramedulární choroby, absolutní počet neutrofilů  $\geq 1,0 \times 10^9/l$  a trombocytů  $\geq 100 \times 10^9/l$ , ideálně bez MRD.<sup>9</sup>

Léčba AML se skládá z několika kroků. V případě, že pacient není vhodný pro intenzivní či aktivní léčbu, volí se terapie s cílem optimalizovat kvalitu života a snížit výskyt komplikací souvisejících s cytopénií, ať už transfúzí, podpůrnou péčí či včasnou volbou paliativní terapie.<sup>12</sup> Nicméně u pacientů, jejichž stav to umožňuje, se volí indukční chemoterapie následovaná konsolidací a případně udržovací léčbou a u vhodných pacientů se přistupuje také k alogenní transplantaci kmenových buněk (HSCT).<sup>12</sup> Až 70 % pacientů je schopných dosáhnout CR po indukční terapii a 50 % pak zůstává v dlouhodobé CR po konsolidaci. Vhodný pacient je tak definován jednak rizikem časného relapsu (dle tabulky 2), tak ale i stavem onemocnění – dosažení CR či přítomnost aktivního onemocnění.<sup>13</sup>

### 2.3.1 Indukce

Základními prvky indukční terapie jsou antracykliny (daunorubicin, doxorubicin či idarubicin) s cytarabinem. Případně lze použít fludarabin spolu s cytarabinem, granulocytární kolonie stimulujícím faktorem (G-CSF) s idarubicinem nebo využít

režimy založené na mitoxantronu.<sup>12</sup> U pacientů s mutací v genu FLT3 je pak už dnes standardem použití midostaurinu.<sup>12</sup> V brzké době nicméně můžeme předpokládat i další rozšíření indukční léčby o další FLT3 inhibitory, gemtuzumab ozogamycin (humanizovaná protilátka anti-CD33 kovalentně navázaná na cytotoxickou látku N-acetyl-gamakalicheamicin), IDH1/2, CPX-351 (lipozomální kombinace cytarabinu s daunorubicinem) a také o venetoklax.<sup>14</sup> Při terapii rozlišujeme CR1, kompletní remisi dosaženou během dvou po sobě následujících indukčních chemoterapií a CR2(3), kompletní remisi dosaženou záchrannou chemoterapií po prvním (či druhém) relapsu.<sup>15</sup>

### 2.3.2 Konsolidace

Po dosažení CR je přistoupeno ke konsolidační léčbě, která zpravidla spočívá v další chemoterapii založené na cytarabinu a jejímž cílem je udržení a prodloužení remise. Další postup je pak u pacienta volen dle míry rizika časný progres. U pacientů se středním a vysokým rizikem relapsu (více než 35% riziko), v případech dovolujícího zdravotního stavu pacienta, je vždy k chemoterapii ještě zvažována HSCT.

Míru rizikovosti onemocnění lze posoudit na základě stavu onemocnění (aktivní nebo CR) a na základě cytogenetiky. Se samotným posouzením rizika pomáhá Disease Risk Index (DRI) Assignment nástroj (<https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/Statistical/Tools/Pages/DRI.aspx>), který řadí rizikovost onemocnění do 4 kategorií (low-intermediate-high-very high risk).<sup>16</sup>

Pro posouzení toho, zda je vůbec pacient schopen podstoupit HSCT se používá kalkulátor HCT-CI, který bere v potaz kardiovaskulární, cerebrovaskulární, psychické, jaterní, gastroenterologické a další komorbidity pacienta, <http://www.hctci.org/Home/Calculator>.<sup>17</sup>

Zásadní je ale také to, zda je možné najít vhodného dárce a v jakém čase. Pacienti, kteří jsou transplantováni v remisi totiž dosahují výrazně lepších výsledků než pacienti transplantovaní v době aktivního onemocnění.<sup>17</sup>

Pro predikci samotného výsledku transplantace se používá EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) skórovací nástroj, který sleduje riziko úmrtí související s HSCT dle věku pacienta, stádia nemoci (časný, pokročilý, pozdní), čas mezi diagnózou a transplantací, typem dárce (HLA shodný příbuzný, nepříbuzný dárce), pohlavím dárce (žena dárkyně pro mužského pacienta vs ostatní kombinace). Výsledek není specifický pro AML a skóring lze použít i pro jiné diagnózy vedoucí k HSCT.<sup>18</sup>

### 2.3.3 HSCT

HSCT je volena primárně z důvodu snížení rizika relapsu, ukazuje se totiž, že samotná chemoterapie není schopná eradikovat všechny leukemické subpopulace a že zakládající kmenová leukemická buňka je schopna přežít a následně se vyvinout do relapsového (sub)klonu.<sup>19</sup> Leukemické kmenové buňky navíc vykazují schopnost na svém povrchu nevystavovat receptory potřebné k odpovědi imunitního systému a unikat tak nejen chemoterapii, ale i imunitnímu dohledu.<sup>20</sup> Samotné transplantaci se věnuje kapitola 2.4 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk.

### 2.3.4 Léčba relapsu

V případě že selhala primární léčba a dochází k relapsu, je volena nestandardizovaná léčba. U pacientů bez předchozí transplantace může být k transplantaci přistoupeno, případně je snaha pacienta zařadit do klinické studie. Přežití pacientů po relapsu je nicméně bohužel již velmi nepříznivé a souvisí s časností relapsu (3leté přežití dosahují 4 % pacientů, kteří zrelabovali v prvním půlroce, 12 % u pacientů, kteří zprogredovali od půl roku do dvou let po transplantaci a 26 % u pacientů, kteří zprogredovali mezi 2. a 3. rokem).<sup>21, 22</sup>

## 2.4 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je proces, při kterém jsou pacientovi intravenózně podány hematopoetické kmenové buňky za účelem obnovení zdravé hematopoézy a s cílem léčit hematologické nebo (hemato)onkologické onemocnění, ale i onemocnění metabolická.<sup>13, 23</sup> Transplantaci je možné provádět odběrem ze spina iliaca posterior superior kosti kyčelní (BM – bone marrow) nebo získem hematopoetických buněk z periferní krve (PBSC – peripheral blood stem cells) za předchozího podávání granulocytárního růstového faktoru (granulocyte-stimulating factor, G-CSF, filgrastim) či lze transplantovat kmenové buňky z pupečnickové krve, tento přístup se ale v ČR příliš nepoužívá.<sup>17, 24</sup> Jednotlivé druhy štěpů se liší i v buněčném složení. PBSC štěp vede k časnějšímu přihojení štěpu a časnějšímu obnovení krvetvorby. Obsahuje méně erytrocytů oproti BM, ale více lymfocytů a progenitorů jednotlivých vývojových řad. Transplantace PBSC je tak považována za méně nebezpečnou s ohledem na infekční a krvácivé komplikace po HSCT. Vede ale častěji k rozvoji reakce štěpu proti hostiteli (GVHD).<sup>25, 26</sup>

Transplantovat lze buňky získané přímo od pacienta, tj. takzvaně autologně, ale i od dárce, ať už příbuzného nebo nepříbuzného, tj. alogenně. Autologní

transplantace se ale u AML téměř nikdy neprovádí a proto se tato práce věnuje transplantaci alogenní.<sup>24</sup>

## 2.4.1 Výběr dárce

Primárním cílem při výběru dárce je přihojení štěpu a minimalizace rizika rozvoje GVHD, a proto je snaha hledat dárce co nejvhodnějšího. Výběr pacienta je tak založen na více parametrech, od věku přes pohlaví po přítomnost cytomegaloviru (CMV) a další, nicméně tím prvním kritériem je maximální možná shoda v MHC (major histocompatibility complex) systému, u člověka nazývaného HLA (human leukocyte antigens).

### 2.4.1.1 HLA

HLA proteiny, které jsou kódované geny na chromosomu 6, se nachází na povrchu buněk a ovlivňují interakci mezi cílovými buňkami a buňkami imunitního systému. Tyto proteiny (a jejich geny) řadíme do tří skupin, HLA třídy I, třídy II a třídy III. V transplantologii je pozornost upřena pouze ke třídám I a II.<sup>27</sup>

#### *HLA třídy I*

HLA třídy I jsou proteiny přítomné téměř na všech jaderných buňkách, které na svém povrchu prezentují peptidy, které se nacházely uvnitř buňky a dohromady tvoří HLA-I komplex.<sup>27</sup> HLA-I komplex je pak rozeznáván cytotoxickými T lymfocyty, a pokud není prezentovaný peptid vnímán imunitním systémem jako ohrožující, nedojde k žádné reakci. Poněkud matoucí pak může být použitá nomenklatura pro HLA, kdy jsou ligandy označeny jako HLA-Bw4. V tomto případě se totiž nejedná o skupinu HLA-B, ale o epitop (který se liší od epitopu HLA-Bw6). HLA-Bw4 se může nacházet i na molekulách HLA-A, které mají epitop HLA-Bw4. Na všech HLA-B se nachází buď HLA-Bw4 nebo HLA-Bw6.<sup>28</sup> Distribuci epitopů v rámci HLA proteinů lze nalézt na <http://hla.alleles.org/antigens/bw46.html>. V seznamu ligandů jsou také HLA-C molekuly, hlavní ligandy pro KIR2D, rozdělené do dvou skupin. Skupina 1 má na pozici 80 asparagin (HLA-Cw01, 03, 07, 08, 09, 10, 12, 14), skupina 2 pak na stejné pozici lysin (HLA-Cw02, 04, 05, 06, 15).<sup>29</sup> Oblast třídy I obsahuje vedle klasických genů HLA-A, HLA-B a HLA-C také geny neklasické, jakými jsou HLA-E, -F, -G, -J, -X, ale i MICA, MICB, MICC, MICD a MICE.<sup>27, 30</sup> Rutinně se pro transplantaci testují geny klasické.

#### *HLA třídy II*

HLA-II proteiny se nacházejí na antigen-prezentujících buňkách a jejich hlavní rolí je prezentovat extracelulární peptidy (k jejichž pohlcení došlo například fagocytózou). Takto vystavené cizí peptidy aktivují pomocné T lymfocyty (v případě, že jsou vystaveny tělu vlastní peptidy, je další reakce naopak regulována regulačními T lymfocyty), ty pak následně aktivují B-lymfocyty. HLA-II řadíme do tří

rodin, DR, DP a DQ, kde rodina DR obsahuje geny DRA a DRB (1-9), DP a DQ rodiny pak obsahují DQA1 a DQB1 geny a DPA1 a DPB1 geny.<sup>30</sup>

### *HLA třídy III*

Oblast chromosomu nesoucí genetickou informaci pro třídu III obsahuje komponenty komplementu či geny pro tumor necrosis faktory a další, ale neobsahuje geny pro molekuly HLA.<sup>27</sup>

### *Výběr dárce na základě HLA*

HLA systém se ukazuje jako velice polymorfní, v současné době (červenec 2023) obsahuje 

databáze	IPD-IMGT/HLA
----------	--------------

 (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>) 25844 alel HLA třídy I a 10970 alel HLA třídy II. Z HLA-I je nejpolymorfnější gen HLA-B (9386 alel), z HLA-II gen DRB1 s 4465 alelami.<sup>31</sup> V takovém případě by se mohlo zdát, že najít shodného dárce je v podstatě nemožné. Celá MHC oblast je ale do další generace přenášena jako tzv. haplotyp, jeden od matky, druhý od otce. Na základě pravidel dědičnosti tak má nemocný s jedním sourozencem 25% šanci, že bude jeho sourozenec mít shodné oba haplotypy a 50% šanci, že mu bude moci být sourozenec haploidentickým dárce (haploidentický dárce je shodný v 5 z 10 HLA znaků, případně může být i 6/10 nebo 7/10 v případě, že jsou některé HLA znaky shodné na nesdíleném haplotypu).<sup>27</sup> Čím větší shoda mezi dárce a pacientem v HLA znacích, tím je menší riziko rozvoje reakce hostitele proti štěpu i riziko rejekce štěpu.

V případě, že není dostupný HLA shodný příbuzný, vybírá se dárce nepříbuzný, ideálně shodný v 10 HLA znacích, tj. v HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1, případně v 8 znacích, tj. HLA-A, -B, -C, -DRB1. Roli hraje ale i neshoda v DPB1, a to hlavně nepermisivní. Ta vyvolává totiž, ve srovnání s permissivní, silnou T buněčnou reakci, což vede k vyššímu riziku rozvoje akutní GVHD stupně II-IV.<sup>32</sup> Typ neshody lze vyhodnotit například za použití IPD-IMGT/HLA databáze: [https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb\\_v1/](https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb_v1/). Permissivní neshody je možné najít i v rámci HLA-DQB1 nebo HLA-C (C\*03:03 vs C\*03:04). Tím, že jsou permissivní nevedou k nežádoucím efektům při transplantaci.<sup>33</sup> V případě, že není možné najít plně shodného (10/10, 9/10, kdy se jedná o permissivní neshodu v DQB1) HLA nepříbuzného dárce, je před neshodným nepříbuzným dárce preferovaná volba haploidentického příbuzného dárce, i když je HLA neshoda větší.<sup>34</sup>

### **2.4.1.2 Další parametry**

Při výběru dárce se mimo HLA shody vyhodnocují také další parametry na straně dárce nebo dle kombinace parametrů jak na straně pacienta, tak dárce. Takovou kombinací může být například CMV status. CMV reaktivace vede ke zvýšené nerelapsové mortalitě (NRM), a to nejen probíhající infekcí, ale také rozvojem GVHD.<sup>35</sup> Pro pacienta, který je CMV negativní je tak logicky lepší volbou dárce

rovněž negativní. Překvapující pak může být, že v případě, že je pacient CMV pozitivní, je pro něj lepším dárce osoba CMV pozitivní než CMV negativní. Ukazuje se, že takový pacient má pak nižší riziko NRM.<sup>36-38</sup> Dalším kombinačním faktorem je pohlaví pacienta, speciálně v případě, kdy dárkyní je žena a pacientem muž.<sup>33</sup> Faktorem na straně dárce je pak věk s preferencí mladších dárců.<sup>33</sup>

Mimo tyto parametry jsou pak také dnes do typizace zařazovány i další proteiny vedle HLA-I a HLA-II. Jedná se o receptory NK buněk KIR a výjimečně také receptor NKG2D a jeho ligandy MICA a MICB. Těm je prostor věnován v kapitolách 2.5.4 NKG2D receptor a 2.5.5 KIR receptory.

Pečlivý výběr dárce na základě všech těchto faktorů by měl vést k co největší reakci štěpu proti leukémii a tím k minimalizaci rizika relapsu, a zároveň co nejmenšímu riziku nerelapsových komplikací, kam se na první místo řadí GVHD spolu s infekcemi.

## 2.4.2 Přípravný režim

Aby mohla HSCT úspěšně proběhnout, je volen přípravný režim tak, aby bylo dosaženo optimální imunosuprese, což vede k lepšímu přijetí nového štěpu, nižšímu riziku reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), ale také aby byl připraven prostor pro nové dárce kmenové buňky v kostní dřeni pacienta.

Přípravný režim má dva primární cíle – myelodepleční (eradikace hostitelských buněk) a lymfodepleční (cílení na lymfatický systém pacienta).<sup>39</sup> Samotné účinné látky melfalan (MEL) a busulfan (BU) jsou primárně myeloablativní, zatímco fludarabin (FLU) a cyklofosfamid (PTCY, CY) jsou lymfoablativní.<sup>39</sup> Vedle těchto látek se používají i fotemustin, etoposid, cytarabin či protilátka proti thymocytárnímu globulinu (ATG) nebo také celotělové ozáření (TBI – total body irradiation), zvláště v případě haploidentické transplantace.<sup>39</sup>

Dle stavu pacienta je volen režim buď myeloablativní nebo redukovaný. Rozdíl mezi nimi spočívá v trvání dosažené cytopénie. Pro myeloablativní režim je cytopénie nevratná a následující HSCT je nevyhnutelná. Po redukovaném režimu dojde k obnově buněčné populace a proto je možné se v případě nutnosti HSCT vyhnout.<sup>39</sup> Další rozdíl spočívá v různé kombinaci účinných látek a také jejich dávce.<sup>40</sup>

## 2.4.3 Imunosuprese

Pro snížení rizika reakce štěpu proti hostiteli je pak podávána imunosupresivní léčba, někdy také označována jako profylaktická s ohledem na GVHD. Ta je jednak necílená (steroidy nebo metotrexát), ale také cílená proti T lymfocytům (cyklosporin, takrolimus, sirolimus, mykofenolát, ATG).<sup>41</sup> ATG nicméně necílí pouze na T lymfocyty, ale její podání vede i ke změně povrchových molekul leukocytů obecně



a stimuluje apoptózu B lymfocytů.<sup>41</sup> Imunosupresivní režim je volen dle typu transplantace a liší se u pacientů, kteří jsou transplantováni dárce HLA shodnými nebo shodnými v 8-9 znacích z 10 a u pacientů, jejichž dárce je haploidentický. Režim použitý u haploidentických transplantací se skládá zpravidla z cyklofosfamidu (Cy) v kombinaci s mykofenolát mofetilem (MMF) a s cyklosporinem A (CsA) nebo takrolimem (Tacro), a to bez ohledu na to, jestli byla použita jako zdroj buněk kostní dřeň nebo buňky z periferní krve. U pacientů, jejichž dárce byli buď plně shodní nebo měli neshodu v jednom HLA znaku, se používá cyklosporin A s metotrexátem. V případě, že byly dárcovské T lymfocyty při přípravě k transplantaci eliminovány nebo byl jejich počet snížen, případně nebyl jejich efekt dostatečný a dochází k relapsu, je možné v pozdější době pacientovi podat dárcovské lymfocyty (DLI) a tím aktivitu T lymfocytů obnovit/přidat.<sup>42</sup>

## 2.4.4 Rekonstituce buněk po HSCT

Po přípravném režimu dochází v kostní dřeni pacienta k život ohrožující tzv. anaplastické fázi, která je specifická závažnou neutropenií a absencí i dalších imunitních buněk. I přes okamžité podání dárcovských buněk ale nedochází k rekonstituci buněk hned. Jako první se objevují neutrofilové v závislosti na tom, z jakého typu štěpu buňky pocházejí. Pokud pochází ze štěpu z PBSC, pak k rekonstituci neutrofilů dochází zhruba po 14 dnech, z BM po 21 dnech a u štěpu z pupečnickové krve dokonce až po 30 dnech od HSCT. Ostatní buňky se objevují pomaleji, jako první z lymfocytů se pak objevují NK buňky po 30 – 100 dnech od HSCT, T lymfocyty po více než 100 dnech a B lymfocyty dokonce až po 1 – 2 letech.<sup>43</sup>

### 2.4.4.1 Rekonstituce NK buněk

První NK buňky se sice objevují již po měsíci, ale svou plnou a kompletní funkci získávají minimálně půl roku. Primárním zdrojem NK buněk je dozrávající progenitorová buňka, ale dalším zdrojem jsou i dělící se maturované NK buňky ze štěpu.

CD56<sup>bright</sup> NK buňky, které jsou prekurzory CD56<sup>dim</sup> NK buněk se do tří měsíců po HSCT objevují ve výrazně vyšším množství oproti situaci u zdravého člověka (40-50 % NK buněk oproti 5-10 %).<sup>44</sup> Tyto buňky také na svém povrchu nesou výrazně více inhibičních receptorů NKG2A (90 % oproti 50 % u zdravých osob). Až poté se dále vyvíjejí a získávají další receptory, včetně aktivačních, což trvá 3-6 měsíců, někdy i více.<sup>44</sup>

Na rekonstituci NK buněk mají vliv i T lymfocyty, ale tento přesný vliv je těžké určit, protože jejich rekonstituci ovlivňuje i volba imunosupresivní terapie.<sup>44</sup> CsA totiž snižuje proliferaci méně maturovaných NK buněk (CD56<sup>bright</sup>), ale snižuje proliferaci CD56<sup>dim</sup> NK buněk a zároveň ovlivňuje výskyt receptorů přítomných na

NK buňkách (zvyšuje množství NKp30 a snižuje množství NKp44 a NKG2D) a ovlivňuje tak jejich interakci s dalšími buňkami a tím i rozvoj GVHD.<sup>45</sup>

Roli ve funkcionalitě NK buněk hraje i jejich edukace. Není ale jisté, zda roli v edukaci NK buněk hrají i buňky příjemce. Nicméně ukazuje se, že i v případě, že nejsou NK buňky edukovány pro chybějící buňky dárce, mohou být aktivovány i tak, a to díky stimulaci prozánětlivými cytokiny nebo reaktivací CMV.<sup>44</sup>

## **2.4.5 Komplikace po HSCT**

### **2.4.5.1 Relaps**

S ohledem na přítomnost leukemických kmenových buněk, které díky tomu, že našly způsob, jak obejít imunitní systém, a navíc nereagují na chemoterapii, patří mezi nejzávažnější komplikace po HSCT relaps. K tomu dochází u většiny pacientů (až 90 %), kteří zrelabují, do dvou let od transplantace. U pacientů v relapsu je možné volit terapii spočívající v podání chemoterapie, aplikaci DLI nebo lze zvážit druhou HSCT.<sup>12</sup> Jako další možná terapie se jeví aplikace NK buněk. Role NK buněk při samotném relapsu není přesně známa, nicméně bylo popsáno, že štěp, který obsahoval větší množství NK buněk poukazoval na trend směrem k lepšímu OS a nižšímu riziku relapsu.<sup>46</sup> Vedle toho se výzkum věnoval také podání samotných NK jakožto prevence relapsu. Tento výzkum přinesl slibné výsledky a bylo by vhodné ho v režimu léčby zvážit jakožto prevenci relapsu.<sup>46</sup>

### **2.4.5.2 GVHD**

GVHD lze popsat jako příliš prudkou reakci lymfocytů na pro ně cizí antigeny na povrchu buněk, která může vést až k úmrtí 15 % pacientů.<sup>47</sup> GVHD dělíme na dva typy, akutní (aGVHD) a chronickou (cGVHD), které se liší nejen časem výskytu, ale také patofyziologicky.

Akutní GVHD se rozvíjí jako reakce na poškození tkání přípravným režimem pro transplantaci. Po transplantaci se aktivují APC (dárcovské i pacientské), které způsobí aktivaci T lymfocytů dárce, které dále poškozují cílovou tkáň a stimulují další buňky k produkci cytokinů, které tím aktivují další T lymfocyty, ale i NK buňky.<sup>48</sup> S tím pak souvisejí i projevy aGVHD, jakými jsou dermatitidy, puchýře, průjmy, nechutenství, krev ve stolici, žloutenka, či zvýšené hladiny bilirubinu. Rozsah poškození popisují stádia typická pro daný orgán (0-4 jednotlivě pro kůži, játra a střeva) a kombinace stádií pak definuje stupeň aGVHD od stupně I do stupně IV.<sup>49</sup> Zpravidla se aGVHD projeví během prvních 100 dní po transplantaci, ale může to být i později a záleží na symptomech, jestli se jedná o aGVHD nebo cGVHD. V případě, že k rozvoji aGVHD i přes profylaktickou imunosupresi dojde, je primárně voleno zvýšení imunosuprese použitím kortikosteroidů.<sup>50</sup> Pacienti s GVHD rezistentním ke kortikoterapii mají bohužel velmi omezené léčebné možnosti a GVHD tak bývá u těchto pacientů často fatální.<sup>51</sup> Zvýšením imunosuprese pak ale

dochází ještě ke zvýšení rizika infekce, která v oslabeném organismu často probíhá velmi turbulentně a nemusí být možné infekci zvládnout.

Chronická GVHD je oproti aGVHD více heterogenní a působí na více orgánů (kůže, ústa, oči, gastrointestinální trakt, játra, plíce, genitál a kloubní systém).<sup>52</sup> Ačkoliv se zpravidla vyskytuje více než sto dní po transplantaci, pro klasifikaci cGVHD tato informace nestačí. Patofyziologicky je rozvoj cGVHD spojen se třemi stádii. Stejně jako u aGVHD začíná poškozením tkáně, díky čemuž dojde k aktivaci imunitních efektorových buněk, a to jak T, tak B lymfocytů, u kterých pak dochází k produkci protilátek. Ty mohou dále podporovat imunitní odpověď a vést k dalšímu poškození tkáně. Postupně při cGVHD dochází také k poškození buněk v thymu. Tamní dendritické a epitelální buňky jsou napadány aloreaktivními T lymfocyty a s jejich úbytkem dochází ke ztrátě centrální tolerance. Tím dochází k produkci autoreaktivních CD4+ T lymfocytů. Ačkoliv regulační lymfocyty T reg a B reg, které produkují interleukin 10 (IL-10) a transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), limitují rozvoj cGVHD a podílejí se na hojení tkáně, tak také stimulují fibroblasty a tím dochází k tvorbě tkáně fibrotické, která tak ztrácí svou plnou funkci. Z imunitní kontroly uniklé Th17 jsou pak zodpovědné za stálou stimulaci směrem k zánětu, který tak podporuje opakování uvedeného scénáře.<sup>53</sup> Existuje několik klasifikačních systémů pro cGVHD, souhrnně popsanych Helene Schoemans a kolektivem.<sup>54</sup> Naše pracoviště používá Seattle klasifikaci, tj. limitovaný a extensivní rozsah cGVHD.<sup>55</sup>

Role NK buněk na rozvoj GVHD není stále plně známa, nicméně se ukazuje, že se NK buňky podílejí jak na prevenci GVHD, tak na jejím rozvoji. Preventivně NK buňky působí jak přímo, tak nepřímo. Nepřímo tím, že zabíjí APC a tím pádem nedochází ke stimulaci T lymfocytů. Přímo působí tak, že zabíjí aktivované T lymfocyty, které na svém povrchu vystavují ligandy pro aktivační receptor NKG2D.<sup>56</sup> GVHD naopak NK buňky indukují produkci prozánětlivých cytokinů, které mohou jednak přímo poškozovat tkáně, tak také nepřímo zvyšovat poškození tkáně aktivovanými T lymfocyty.<sup>56</sup>

### **2.4.5.3 Infekce**

Vedle akutní i chronické GVHD je největším nerelapsovým ohrožením pacienta infekce. Rizikové faktory můžeme rozdělit na samotné onemocnění, pro jaké je pacient léčen, typ přípravného režimu, HLA shoda mezi dárce a pacientem, typ transplantace (HSCT je rizikovější, než autologní transplantace) a i samotná přítomnost GVHD.<sup>57</sup>

AML navíc sama o sobě způsobuje sníženou funkci imunitního systému, primárně neutropénií způsobenou útlakem kostní dřeně blasty. To může vést i k reaktivaci dočasně potlačených infekcí, a proto by měly před samotnou transplantací být infekty maximálně zaléčené. Před, v průběhu transplantace i po ní, jsou proto podávána preventivně antibiotika, antimykotika a antivirotika.<sup>57</sup>

S ohledem na to, že cílem myeloablačního režimu je maximální eliminace imunitního systému pacienta (pro přijetí štěpu) a také nádorových buněk, dochází rovněž k neutropénii a zvýšené citlivosti pacienta pro infekční onemocnění. Proto je u ohrožených pacientů volen redukovaný režim.<sup>58</sup>

Zásadní roli hraje i samotná GVHD, a to jak mechanicky, kdy dochází k poškození tkání, které jsou přirozenou bariérou pro vstup infekcí (kůže, gastrointestinální trakt), tak i zvýšeným rizikem prodloužené hospitalizace, která je spojená s nosokomiálními, velmi často k antibiotikům rezistentními, infekcemi.<sup>59</sup>

V případě akutní GVHD navíc hraje roli i volba léčby, kdy kortikosteroidy ještě dále prohlubují imunosupresivní efekt léčby preventivně podávané standardně při a po transplantaci. Chronická GVHD pak poškozuje i samotnou buněčnou imunitu a může vést i ke snížené funkci sleziny, díky čemuž je opět riziko infekcí zvýšené.<sup>57</sup>

Také HLA neshoda se podílí na zvýšeném riziku infekce, a to díky potřebě zvolit silnější imunosupresivní léčby. Rizikovější s ohledem na infekce se pak zdá být transplantace kostní dřeně oproti PBSC.<sup>60</sup>

Časově lze rizika dělit na tři období, na dobu před přihojením štěpu, dobu 30-100 dní po přihojení štěpu a dobu, kdy je štěp již přihojen dlouhodobě.<sup>61</sup>

Doba před přihojením štěpu je typická dlouhodobou neutropénií, poškozenými imunitními bariérami přípravným režimem a přítomností centrálního žilního katetru. Nejběžněji se v této době objevují reaktivace herpesvirů, kvasinkové infekce a aspergilóza. V době, kdy je štěp přihojen krátkodobě již dochází ke znovuobjevení populace neutrofilů, nicméně funkce T a B lymfocytů ještě nebyla plnohodnotně obnovena, navíc je zde stále riziko akutní GVHD a často se v této době objevují primárně virové infekty, jakými jsou CMV, plané neštovice či reaktivace Epstein-Barr viru. V případě štěpu přihojeného již dlouhodobě, by měla být plně obnovena imunitní funkce organismu, nicméně se může objevovat chronická GVHD a mimo CMV, Epstein-Barr viru a planých neštovic se může objevovat i pozdní aspergilóza a infekce způsobené bakteriemi s kapsulou.<sup>61</sup>

Chronická i akutní GVHD jsou potenciálně život ohrožující a snaha je tudíž upřená k jejich potlačení za udržení co nejmenší imunosuprese, aby nedocházelo k infekcím. S tím souvisí různá manipulace s T lymfocyty a snaha o nalezení způsobu, jak přes minimalizaci GVHD maximalizovat efekt reakce štěpu proti leukémii. Vhodným nástrojem se v tomto případě zdají NK buňky. S ohledem na jejich inhibici v případě přítomnosti HLA-I by neměly reagovat na buňky, které na svém povrchu HLA-I nesou a nezpůsobovat tak GVHD. Leukemické buňky naopak HLA-I často ze svého povrchu eliminují, aby se nestaly terčem útoku T lymfocytů a tím se stávají vhodným cílem pro NK buňky.<sup>62</sup>

## 2.5 NK buňky

### 2.5.1 Vývoj a edukace NK buněk

NK buňky (natural killer, přirození zabíječi) jsou velké granulární lymfocyty na pomezí mezi přirozenou a adaptivní imunitou se schopností zabít nádorově změněné nebo virem napadené buňky bez předchozí aktivace.<sup>63</sup> Vyvíjejí se z hematopoetických kmenových buněk (CD34+) primárně v kostní dřeni, jejich další vývoj ale probíhá v dalších tkáních (sekundárních lymfoidních tkáních, kam patří zvláště lymfatické uzliny, ale i v dalších, jakými je například i periferní krev či játra).<sup>64</sup> Na vývoji buněk a jejich přeměně v buňky efektorové se podílí cytokiny, hlavně IL-2 a IL-15<sup>65</sup>, ale i IL-21<sup>66</sup>, IL-7<sup>67</sup>, IL-4<sup>68</sup>, IL-12<sup>69</sup> a IL-18<sup>70</sup>. Svou cytotoxicitu realizují granulemi, které obsahují serinové proteázy – granzymy a cytolytické proteiny – perforiny). NK buňky jsou ale také schopné regulace dalších imunitních buněk, ať už regulací samotného počtu buněk vlastní cytotoxicitou, tak produkcí cytokinů.<sup>71, 72</sup>

NK buňky jsou řízeny aktivačními a inhibičními receptory. Každá maturovaná NK buňka má svůj set receptorů sestavený tak, aby obsahoval vždy alespoň jeden inhibiční receptor, který je specifický pro vlastní HLA-I haplotyp. Prvním exprimovaným inhibičním receptorem ve vývoji NK buněk je CD94/NKG2A, jehož počet se na buněčném povrchu s vývojem buňky snižuje. S maturací buňky jsou naopak stále více exprimovány KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor).<sup>73</sup> Postupně dochází k tzv. edukaci NK buňky, která spočívá v interakci receptorů s HLA-I a která ovlivňuje schopnost buněk cytotoxické aktivity, ale také ovlivňuje produkci cytokinů.<sup>74</sup> Existují tři hypotézy, jak tato edukace probíhá. První předpokládá, že NK buňky jsou na počátku „nelicencované“ a nejsou schopné aktivity. Po setkání s HLA-I dochází k jejich licencování a buňky získávají schopnost cytotoxické aktivity a zároveň schopnost inhibice při setkání s HLA-I.<sup>75</sup> Druhá hypotéza vychází z opačného pohledu, kdy je původně reaktivní buňka trvalým kontaktem s receptorem, který by ji aktivoval, nadále nereaktivní. Za příklad může posloužit aktivační receptor NKG2D, u kterého, pokud je stále vystavován signálům svých ligandů, dochází k jeho internalizaci a snížení funkce NK buněk.<sup>76</sup> Třetí hypotéza, tzv. reostatová, říká, že odpověď NK buňky je řízená počtem inhibičních receptorů a silou jejich afinity k HLA-I ligandům. Vychází z toho, že buňka s více inhibičními receptory může reagovat na aktivaci silněji, protože je jistější, že nepůjde o reakci ke zdravé, tělu vlastní, buňce.<sup>77</sup>

### 2.5.2 Populace NK buněk

Dle výskytu a funkce rozlišujeme primárně dvě základní populace NK buněk, a to CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> (populaci s vysokou expresí CD56) jejíž rolí je primárně produkce imunoregulačních cytokinů, zvláště interferonu-gamma (IFN- $\gamma$ ) a tumor necrosis

factor-alfa (TNF- $\alpha$ ), a jejíž cytotoxicita je nízká. Vyskytují se primárně v lymfatických uzlinách a tonsilách, zhruba 10 % z nich pak v krvi.<sup>78, 79</sup>

Druhou populací je CD56<sup>dim</sup> CD16+ (nízká exprese CD56) primárně se vyskytující v periferní krvi a slezině, jejíž hlavní rolí je cytotoxicita a její schopnost produkovat cytokiny je naopak nízká.<sup>78, 79</sup>

Tyto dvě populace jsou klasifikovány jako již maturované (CD56<sup>dim</sup> CD16+ ještě více než CD56<sup>bright</sup> CD16-) a vývojová cesta k nim vede přes progenitorovou NK buňku (stádium 1), která se vyvíjí ze společného progenitora pro lymfoidní buňky (T, B a NK buňky). Dále se progenitorová NK buňka vyvíjí v pre-NK buňku, která si stále nese schopnost vývoje do T lymfocytu nebo do dendritické buňky (stádium 2a) nebo která už se může vyvinout pouze ve vrozenou lymfoidní buňku, kam NK patří (stádium 2b). Stádium 3 zahrnuje buňky, které už na svém povrchu nesou aktivační NK receptor. Dalším vývojem získává buňka schopnost rozeznávat buňky tělu vlastní (self-tolerance). Mimo jiné získává CD94, která tvoří dimer s C-type lektinovými receptory (NKG2). Objevuje se také již zmíněný protein CD56 (stádium 4, s dalším vývojem pak stádium 5).<sup>80</sup> Byly popsány i paměťové NK buňky, které žijí oproti ostatním NK buňkám déle a po setkání s již známým antigenem vedou k rychlejší proliferaci, produkci cytokinů a cytotoxicitě.<sup>81-83</sup> Poměrně důležitou roli při HSCT pak hrají takzvané nekonvenční CD56<sup>dim</sup> CD16- NK buňky, které vykazují větší toxicitu, než samotné CD56<sup>bright</sup> CD16- a CD56<sup>dim</sup> CD16+ buňky. Výskyt těchto buněk byl popsán u pacientů, kteří podstoupili haploidentickou HSCT po 2-4 týdnech od transplantace. U těchto pacientů se podílely na obnově imunitního systému, ale i na protinádorové cytotoxicitě.<sup>84</sup>

### 2.5.3 Receptory NK buněk

Receptory NK buněk hrají zásadní roli při regulaci odpovědi NK buněk na podnět a z výše uvedeného vyplývá, že NK buňky na svém povrchu mohou nést více typů inhibičních i více typů aktivačních receptorů. Inhibiční receptory zajišťují, že NK buňka nebude reagovat na zdravé buňky, zatímco aktivační receptory buňce zprostředkovávají signál, že se setkala s buňkou pozměněnou, kterou je třeba z organismu eliminovat.

Receptory lze mimo jejich schopnost aktivace nebo inhibice dělit také podle toho, zda mají za ligandy HLA proteiny nebo jiné molekuly (tabulky 3 a 4).

Inhibiční receptory NK buněk	Ligandy
KIR2DL1	HLA-C skupiny 2
KIR2DL2/3	HLA-C skupin 1 i 2
KIR2DL5A/B	Neznámé
KIR3DL3	Neznámé
KIR3DL1	HLA-A a HLA-B alely kódující epitop Bw4

KIR3DL2	HLA-A*03 a HLA-A*11
CD94/NKG2A	HLA-E
LILRB1 (leukocyte immunoglobulin like receptor B1)	HLA třídy I
LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3)	HLA třídy II
KLRG1 (killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1)	Kadheriny
SIGLECS (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins)	Kyselina sialová, gangliosid DSGb5
KLRB1 (killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1)	LLT1 (lectin-like transkript-1)
PD-1 (programmed death-receptor)	PD-L1, PD-L2 (programmed death-ligand)
CD300A	$\alpha$ -Herpes virus, pseudorabide virus, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin
Tactile	PVR (poliovirus receptor)
IL1RAPL1 (X-linked interleukin-1 receptor accessory protein-like 1)	IL-37
TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)	PVR (poliovirus receptor)
HAVCR2 (Hepatitis A virus cellular receptor 2)	Galectin-9, fosfatidylserin, HMGB1 (high mobility group box 1 protein), CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)

Tabulka 3 – Inhibiční receptory NK buněk a jejich ligandy. Dle Boudreau et al., 2018 a Sivori et al., 2019.<sup>85, 86</sup>

<b>Aktivační receptory NK buněk</b>	<b>Ligandy</b>
KIR2DS1	HLA-C skupiny 2
KIR2DS2	Neznámé
KIR2DS3	Neznámé
KIR2DS5	HLA-C skupiny 2
KIR3DS1	HLA-F
KIR2DS4	Několik HLA-C a HLA-A*11
KIR2DL4	HLA-G
CD94/NKG2C	HLA-E
CD94/NKG2E	HLA-E
CD16 (FcyRIII)	Fc část protilátky

CD94/NKG2D	MICA, MICB, ULBP1-6
CD226 (DNAM-1)	Nectin-2 a PVR (poliovirus receptor)
CD58	LFA-2 (lymphocyte-function antigen-2)
NKp30	NCR3LG1 (natural killer cell cytotoxicity receptor 3 ligand 1), HCMV-pp65 (human cytomegalovirus tegument protein pp65), heparin sulfát
NKp44	MML5 (monomethyl lysine-5), virový hemagglutinin, PCNA (proliferating cell nuclear antigen)
NKp46	Komplementový faktor P, virový hemagglutinin, heparin sulfát
NKp65	KACL (keratinocyte-associated C-type lectin)
NKp80	AICL (activation-induced C-type lectin)

Tabulka 4 – Aktivační receptory NK buněk a jejich ligandy. Dle Boudreau et al., 2018 a Sivori et al., 2019.<sup>85, 86</sup>

Z tabulek vyplývá, že HLA třídy I slouží jako ligand třem základním skupinám receptorů – KIR, LIR a NKG2. Tyto můžou být jak receptory inhibiční, tak aktivační. V případě KIR receptorů vznikly aktivační verze receptorů duplikací genu pro inhibiční KIR, a proto sdílí i stejné ligandy (pro příklad KIR 2DL1 a 2DS1 oba váží HLA-C skupiny 2). Liší se ale intracelulárním motivem, který je v případě inhibičních receptorů ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) a u aktivačních receptorů ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif). Může se zdát matoucí, že existují aktivační KIR receptory zaměřené proti vlastním HLA, tyto aktivační receptory se ale zpravidla váží k samotnému HLA-I s nižší afinitou, než receptory inhibiční a jejich existenci lze dát do souvislosti s peptidy, které tyto HLA-I mohou nést v komplexu. U KIR2DS4 byl například jako ligand objeven bakteriální epitop RecA, který byl v komplexu s HLA-C\*05:01.<sup>87</sup>

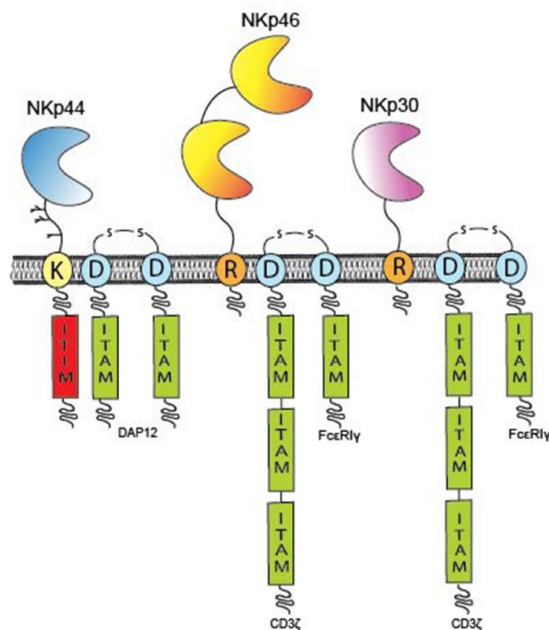
Za hlavní NK receptory jsou považovány NCR, receptory KIR a NKG2.

### **2.5.3.1 NCR (natural cytotoxicity receptors)**

Do NCR rodiny patří tři typy receptorů, NKp46, NKp44 a NKp30, které byly pojmenovány podle své váhy v kDa.

NCR receptory tvoří typ I transmembránových (TM) proteinů (tj. směřují N koncem vně buňky a C koncem do buňky), kdy je jejich extracelulární část tvořena immunoglobulin (Ig)-like doménami (tj. podobným protilátkám) a jejich TM část obsahuje pozitivně nabitě reziduum aminokyseliny (buď arginin, R nebo lysin, K), která je schopná tvořit můstek s reziduem odpovídající aminokyseliny aspartátu (D) a tím se vázat na TM doménu adaptorů ITAM (CD3ζ, FcRγ, DAP12). NKp44 obsahuje intracelulárně ještě na svém cytoplasmatickém konci ITIM (obrázek 2).





Obrázek 2 – Struktura NCR. Převzato z Barrow et al., 2019.<sup>88</sup>

NKp46, největší z nich, je tvořen dvěma Ig-like doménami a ve své TM oblasti má navázán ITAM, který je spojen se signálními adaptory CD3ζ nebo FcRγ. Gen pro NKp46 je kódován, na rozdíl od zbylých dvou, na chromosomu 19. NKp46 je exprimovaný na obou typech maturovaných buněk, CD56<sup>dim</sup> CD16+ i CD56<sup>bright</sup> CD16-.<sup>89</sup>

NKp44 je tvořen pouze jednou Ig-like doménou a jeho TM doména se váže k adaptoru DAP12 obsahujícím ITAM. Tvoří tři isoformy, NKp44-1, NKp44-2 a NKp44-3, kdy isoforma NKp44-1 kóduje na svém cytoplasmatickém konci také ITIM a je díky přítomnosti ITAM i ITIM schopná fungovat jako aktivační i jako inhibiční receptor.<sup>90</sup> Gen pro NKp44 je kódován na chromosomu 6 a NKp44 je exprimovaný primárně na CD56<sup>bright</sup> CD16-.<sup>91</sup>

NKp30, nejmenší z NCR, má s NKp44 společnou oblast, kde je kódován, expresi na aktivovaných i neaktivovaných maturovaných buňkách a také je tvořen jednou Ig-like doménou. S NKp46 má naopak společnou strukturu TM oblasti (ITAM s CD3ζ nebo FcRγ).

Každý receptor z této skupiny interaguje s velkým množstvím různých non-HLA molekul, ať už jde o proteiny bakteriální, virové nebo parazitární, nebo o proteiny přítomné na nádorových buňkách, jak bylo detailně popsáno v práci Barrow et al. z roku 2019.<sup>88</sup>

NKp30 přítomný u NK buněk hraje klíčovou roli jak u dozrávání dendritických buněk, tak u likvidace jejich nezralých forem.<sup>71, 92</sup> Podobný jev byl pozorován u NKp46.<sup>93</sup> Jelikož dendritické buňky hrají důležitou roli při rozvoji GVHD<sup>94</sup>, je tato schopnost považována za klíčovou u HSCT.<sup>95</sup> Ghadially s kolektivem tak vyslovili myšlenku,

že pacienti s hematopoetickými buňkami od dárců s vyšší hladinou NKp46, by mohli mít méně závažné GVHD.<sup>95</sup> V další práci pak nízký výskyt NCR u pacientů s AML vedl k horšímu celkovému přežití<sup>96</sup> a to i u pacientů, kteří podstoupili HSCT.<sup>97</sup>

### **2.5.3.2 CD94/NKG2**

NKG2 (natural killer group 2) receptory jsou transmembránové molekuly typu II (tj. směřují C koncem vně buňky a N koncem do buňky) s doménou lektinového typu C, které mohou (ale nemusí) dimerizovat s proteinem CD94 na buněčném povrchu. Bylo popsáno 7 typů těchto receptorů, NKG2A, B, C, D, E, F a H, které se nacházejí na chromosomu 12.<sup>98, 99</sup> Jsou schopné fungovat jako aktivační i jako inhibiční receptory dle toho, jestli je u nich na cytoplasmatickém konci přítomný motiv ITIM nebo jestli jejich transmembránová oblast obsahuje nabitě reziduum aminokyseliny, které asociuje s ITAM. Tato rodina proteinů je přítomná na NK buňkách, ale i na CD8+ a CD4+ T lymfocytech.<sup>98, 100, 101</sup>

NKG2A a NKG2B jsou receptory inhibiční. Tyto dvě molekuly vznikají díky alternativnímu sestřihu stejného genu a tvoří komplex s CD94. Obě dvě také sdílejí stejný ligand, HLA-E. Za zmínku určitě stojí, že HLA-E tvoří komplex s peptidy z dalších klasických HLA molekul první třídy, tj. s HLA-A, B, C, a neklasického HLA-G. Inhibiční buňky tak zajišťuje kontakt s celým komplexem. Na druhou stranu, pokud je na HLA-E navázán peptid z proteinu BZLF-1 viru Epstein-Barr<sup>102</sup> nebo z heat shock proteinu 60 (jehož zvýšená hladina poukazuje na buněčný stres)<sup>103</sup>, k inhibici buňky nedojde. Záleží tudíž i na samotném proteinu navázaném na HLA-E. Valés-Gómez s kolegy pak popsali, že vazba inhibičního CD94/NKG2A je zhruba 10x silnější, než vazba aktivačního CD94/NKG2C, což by ukazovalo na regulaci NK buněk spíše směrem k jejich inhibici.<sup>104</sup> Kaiser s kolegy popsali, že o síle vazby rozhoduje navázaný peptid na HLA-E.<sup>105</sup>

Ostatní receptory z této rodiny jsou aktivační. NKG2C, NKG2E a NKG2H heterodimerizují s CD94 (na rozdíl od NKG2F a NKG2D), a všechny až na NKG2D mají ITAM spojený s molekulou DAP12.<sup>106-108</sup> NKG2D je pak propojen s DAP10.<sup>109</sup> NKG2E a NKG2H jsou pak, podobně jako NKG2A a NKG2B, produktem alternativního sestřihu stejného genu.<sup>108</sup> Stejně tak sdílí i stejný ligand, a to HLA-E. NKG2E nicméně není přítomen na buněčném povrchu a je tudíž považován za intracelulární protein.<sup>106</sup> V tom se liší od NKG2H, který byl pozorován na povrchu T i NK buněk s čtenějším výskytem u T lymfocytů.<sup>110</sup>

HLA-E slouží jako ligand i pro receptor NKG2C.<sup>98</sup> Ligand pro receptor NKG2F není v současnosti znám.<sup>111</sup>

## 2.5.4 NKG2D receptor

NKG2D receptor, kódovaný genem KLRK1, se nachází na povrchu NK buněk,  $\gamma\delta$  T buněk, CD8+ i CD4+ T buněk.<sup>112-114</sup> Jedná se o nejvýznamnější aktivační receptor NK buněk.

Gen se skládá z 10 exonů (1A, 1B a 2-9) a 9 intronů. Exony 2-4 kódují intracelulární a transmembránovou oblast, zatímco exony 5-9 oblast extracelulární.<sup>115</sup> Receptor NKG2D vykazuje poměrně malou genetickou variabilitu. Byly popsány čtyři alely, které tvoří dva typy haplobloků, které mají vliv na cytotoxicitu buňky. Jedná se o alely LNK1, LNK2, HNK1 a HNK2. To, jestli je alela LNK1 nebo HNK1 je určeno na základě SNP (single nucleotide polymorphism) rs1049174, kdy se na této pozici nachází buď C nebo G. Oproti tomu je LNK2 vs HNK2 určeno polymorfismem rs2255336 (G  $\rightarrow$  A). Jak již název napovídá (LNK – low NK), spouští LNK alela oproti HNK (high NK) alele nízkou cytotoxicitu. Haplotyp Hb-1 obsahuje LNK1 a HNK1, které se mohou dle kombinatoriky nacházet u jedince ve třech kombinacích – LNK1/LNK1, HNK1/HNK1 a LNK1/HNK1 a stejně tak u haplotypu Hb-2 jde o kombinace LNK2/LNK2, HNK2/HNK2 a LNK2/HNK2.<sup>116</sup> Hayashi s kolektivem popsali, že kombinace HNK1/HNK1 vede ke sníženému riziku rozvoje nádorového onemocnění oproti kombinaci LNK1/LNK1.<sup>116</sup> Espinoza s kolektivem došli k podobnému výsledku u HSCT, kdy pacienti se štěpem od dárců s HNK1/HNK1 dosahovali lepšího celkového přežití a nižší mortalitě související s transplantací.<sup>117</sup>

### 2.5.4.1 Ligandy NKG2D receptoru

NKG2D receptor rozeznává ligandy MICA, MICB a ULBP1-6, které jsou exprimované na buňkách v případě, že buňky zažívají buněčný stres (tepelný šok, oxidativní stres, radiace, chemoterapie), virovou infekci nebo nádorovou přeměnu.<sup>101</sup> Tyto ligandy se mohou vyskytovat i na zdravých buňkách (proliferující buňky, myeloidní progenitorové buňky či zdravé intestinální epitelální buňky a buňky opravující poškozenou tkáň<sup>101</sup>), ale v takovém případě se předpokládá, že samotná přítomnost ligandu není pro reakci buněk s NKG2D receptorem dostatečná a chybí další aktivační signál, nebo převažuje signál inhibiční.<sup>118</sup>

Ligandy MICA a MICB patří do rodiny MIC (MHC class I-related chain), ULBP1-6 do rodiny ULBP/RAET (human cytomegalovirus Unique Long 16-binding protein/Retinoic acid early transcript). Obě tyto rodiny jsou příbuzné s HLA-I proteiny, ale na rozdíl od nich neasociují s  $\beta$ 2-mikroglobulinem a není o nich známo, že by měly možnost prezentovat antigen.<sup>119</sup> Proto žádný antigen neovlivňuje způsob jejich vazby na receptor tak, jak je to popsáno například u NKG2 receptorů vázajících HLA-E. NKG2D ligandy hrají tak zásadní roli v regulaci imunitní reakce, že se cílové buňky naučily různým způsobem ovlivňovat jejich přítomnost na svém povrchu.

#### 2.5.4.1.1 Regulace NKG2D ligandů

Regulace exprese ligandů na cílové buňce probíhá na několika úrovních a může jich být přítomno více najednou. Můžeme je dělit na ovlivňování transkripce, translace a post-translačních úprav ligandů.<sup>101</sup>

Transkripce může být ovlivňována poly-ADP-ribóza polymerázou 1 (PARP1), díky které cílové buňky potlačují transkripci daného ligandu. PARP inhibitory jsou tak potenciálním léčivem, které by mohlo být použito, například i u pacientů s AML.<sup>120-123</sup>

Na již transkribovanou mRNA pak mohou nasedat microRNA, čímž znemožní jejich translaci. U nádorových onemocnění v souladu s touto informací dochází ke zvýšené expresi microRNA specificky cílící NKG2D ligandy.<sup>124, 125</sup>

Během transkripce může docházet k alternativnímu sestřihu. Ten například vede k produkci proteinu, který postrádá kotvící část, díky čemuž se po expresi uvolňuje z povrchu buňky do prostředí.<sup>126, 127</sup> V takovém případě může dojít k navázání ligandu na receptor bez přítomnosti buňky, NK buňka tak sice dostává aktivační signál, ale bez dalších signálů nutných k aktivaci NK buňky. Díky tomu je přítomná pozměněná buňka v bezpečí. Při přílišném množství takovýchto signálů také dochází k efektu vyčerpání NKG2D receptoru a jeho zanoření zpět do buňky.<sup>128, 129</sup>

Toho buňky využívají a vedle alternativního sestřihu přišly s podobným mechanismem, tzv. sheddingem. Shedding je způsob, jakým se buňky uvolňují do prostředí nechtěné ligandy za pomoci dvou rodin proteáz, a to ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)<sup>130</sup> a MMP (matrix metalloproteinase)<sup>130, 131</sup>. Zdá se, že jako odpověď na tuto schopnost se vyvinula existence alel, které nejsou v buňce ukotvené transmembránově, ale díky GPI-kotvě. To znemožňuje její odštěpení proteázami.

GPI ukotvené ligandy ale mohou být odštěpeny za pomoci PI-PLC (Phosphoinositide Phospholipase C).<sup>132</sup> Vedle toho mají ale buňky schopnost „odhodit“ ligandy ještě za pomoci jejich enkapsulace do exosomů.<sup>133</sup> V takovém případě je pro buňku možné se zbavit i proteinů vzniklých z alely MICA\*008<sup>133</sup> a dalších, které jsou ukotveny GPI kotvou.<sup>134</sup>

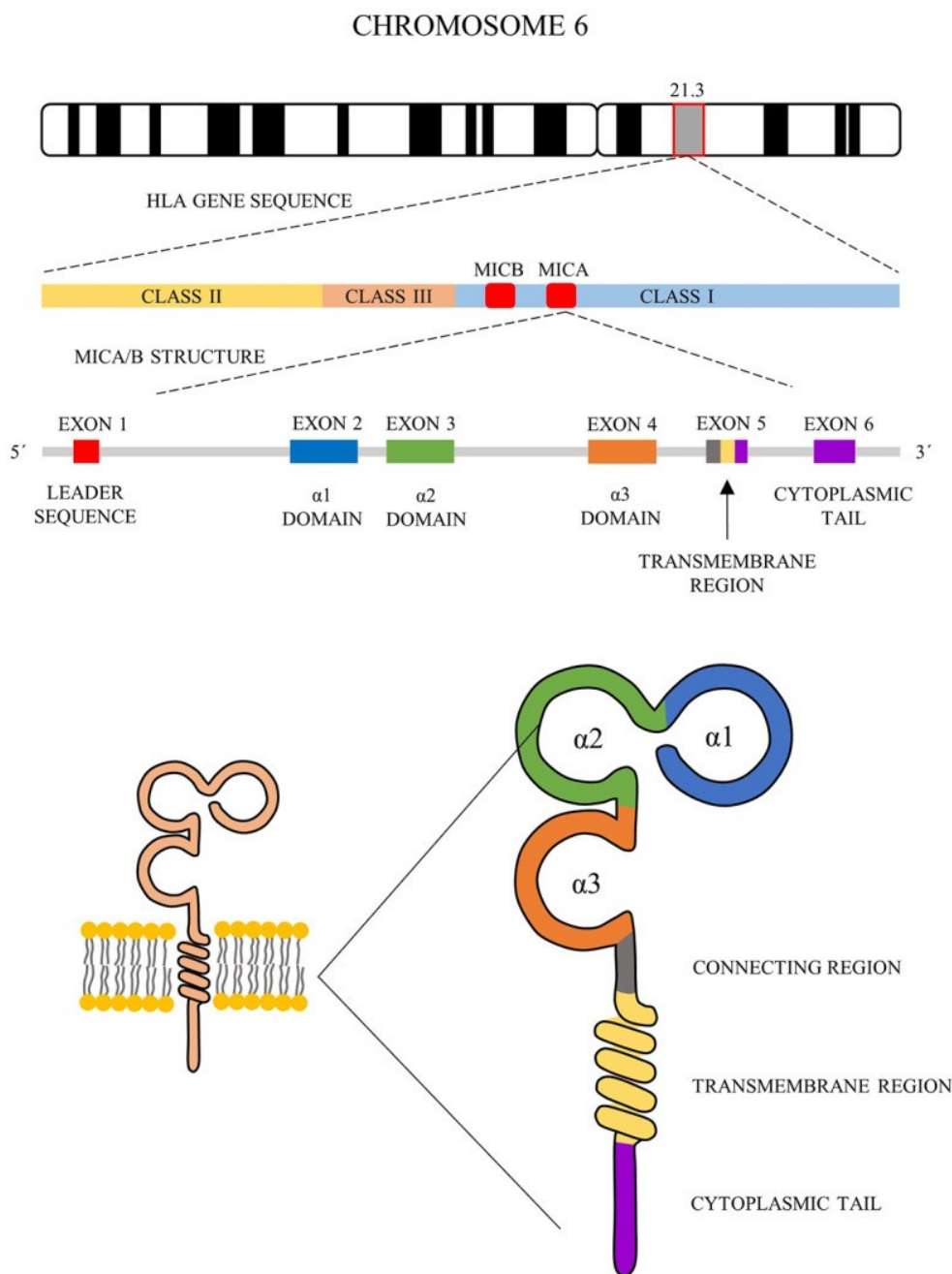
Na úrovni proteinů pak může docházet také k jejich degradaci po navázání ubikvitinových ligáz a k jejich expresi na povrchu buňky vůbec nedochází.<sup>135-137</sup>

Způsob regulace ligandů není ale napříč všemi ligandy stejný a je třeba vzít v potaz, do které rodiny ligand patří.

#### 2.5.4.1.2 Rodina MIC

Ačkoliv rodina MIC ligandů obsahuje 7 genů (MICA-MICG), exprimovány jsou na povrchu buněk pouze první dva, MICA a MICB.<sup>138</sup>

Geny obou ligandů se skládají z vedoucí sekvence, kódované exonem 1, exonů 2-4, které kódují domény  $\alpha$ 1-3 a transmembránovou a cytoplasmatickou část kódují exony 5-6.<sup>138, 139</sup>



Obrázek 3 – Struktura genů a proteinů MICA a MICB. Převzato z Machulová et al., 2021.<sup>101</sup>

Oba geny jsou velmi polymorfní, v červenci 2023 je v databázi sekvencí IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>) 531 alel pro MICA a 244 pro MICB. Alel bude nepochybně přibývat, v roce publikace článku naší pracovní skupiny, tj. v roce 2021 bylo alel MICA 223 a MICB 138.<sup>101</sup>

Poněkud matoucí může být MICA názvosloví, protože existují dva způsoby nomenklatury. Ten první, již poněkud obsoletní, je postaven pouze na exonu 5, který kóduje transmembránovou oblast. Vychází z počtu za sebou jdoucích sekvencí pro alanin (GCT), které dosahují hodnot 4-10. Proto jsou alely pojmenované A4-A10. Výjimku tvoří A5, u které může dojít k inzerci nukleotidu (guanin) za druhým alaninem, které se v tomto případě říká A5.1. Díky tomu dojde k posunu rámce čtení a tím i k předčasnému stop kodonu. To vede k nevytvoření transmembránové části proteinu, který tak musí být ukotven v membráně jinak, pomocí GPI kotvy. V druhém způsobu názvosloví dle WHO se této alele říká MICA\*008. Jak je patrné, druhá nomenklatura tak již kopíruje nomenklaturu HLA (typicky MICA\*008:01:01). Proteiny MICB nemají první zmiňovanou nomenklaturu a používá se pouze WHO názvosloví.

#### *2.5.4.1.3 Rodina ULBP*

Druhou rodinou NKG2D ligandů je ULBP. Podobně jako u MIC rodiny není exprimováno všech 10 proteinů, ale pouze šest (ULBP1-6).<sup>140</sup> Vyjma ULBP5 mají všechny geny 4 kódující exony (první kóduje vedoucí sekvenci, exony 2 a 3 extracelulární domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  a exon 4 transmembránovou oblast, exon 5 u ULBP5 pak kóduje prodloužení cytoplasmatické části molekuly, u ostatních je nekódující).<sup>126, 140</sup>

Oproti MIC ligandům je známo podstatně méně polymorfismů, byť to může vycházet z nižšího zájmu o tyto ligandy. Nejpolymorfnější je ULBP4 s 11 známými alelami, ULBP6 má 7 alel, ULBP2 6 alel, ULBP5 3 alely a ULBP1 a ULBP3 mají pouze jednu alelu.<sup>141, 142</sup>

#### *2.5.4.1.4 Polymorfismy NKG2D ligandů a jejich vliv na stav pacienta po transplantaci*

Jak již bylo uvedeno, hrají NK buňky důležitou roli v transplantaci kostní dřeně a mohou fungovat jak regulačně směrem k buňkám, podílejícím se na rozvoji GVHD, tak mohou účinkovat i ve směru GVL.

Na základě teorie o shodě mezi ligandy a receptory by měla neshoda mezi dárcem a pacientem v NKG2D ligandech vést k neschopnosti NK buněk tyto ligandy rozeznat a tím vést i k nižší reakci štěpu proti leukémii, ale na druhou stranu i k nižšímu riziku rozvoje GVHD.<sup>101</sup>

Tomu ale neodpovídají práce, které popisují, že naopak shoda mezi dárcem a pacientem u MICA vede k nižšímu rozvoji aGVHD<sup>143-145</sup> a stejně tak nižšímu cGVHD.<sup>143</sup> Pravděpodobným vysvětlením tohoto jevu je to, že GVHD je primárně způsobováno aloreaktivními  $\alpha\beta$  T lymfocyty, které neshodné NKG2D ligandy rozeznávají jako alo-antigeny a přistupují k buňkám stejně jako v případě neshody v HLA na antigen-prezentujících buňkách.<sup>144, 146</sup>

U relapsu ovšem nejsou data tak konsistentní. Parmar a Carapito se svými týmy pozorovali v případě neshody mezi dárcem a pacientem v MICA nižší riziko

relapsu.<sup>143, 144</sup> Fuerst s kolektivem naopak pozorovali v případě neshody mezi dárce a pacientem vyšší riziko relapsu. Jejich studie ale byla, na rozdíl od dvou předchozích, které byly postavené na shodě a neshodě jednotlivých MICA alel mezi dárce a pacientem, zaměřena na polymorfismus určující přítomnost valinu nebo methioninu na pozici 129 (MICA-129Val/Met) a jejich shodě mezi dárce a pacientem.<sup>145</sup>

Tento polymorfismus pak byl sledován v dalších pracích, a to nejen v rámci shody a neshody. Ligand MICA, který má na pozici 129 methionin se váže k NKG2D receptoru s vyšší afinitou oproti MICA-129 s valinem, což vede k rozdílné síle i délce trvání odpovědi NK buňky. Zjednodušeně lze říci, že MICA-129Met se naváže silněji, díky čemuž spustí silnější reakci a o to dříve pak dojde k vyčerpání NKG2D receptoru a NK buňky. Homozygotní MICA-129 Met/Met pacienti pak mají z toho důvodu vyšší riziko aGVHD.<sup>147</sup> Naopak, u MICA-129Val je vazba k receptoru slabší, ale o to delší, je tedy vyšší riziko cGVHD, což potvrdil Boukouaci s týmem.<sup>148</sup> Stejný tým také prokázal vliv solubilních MICA na vyšší riziko rozvoje cGVHD.<sup>148</sup>

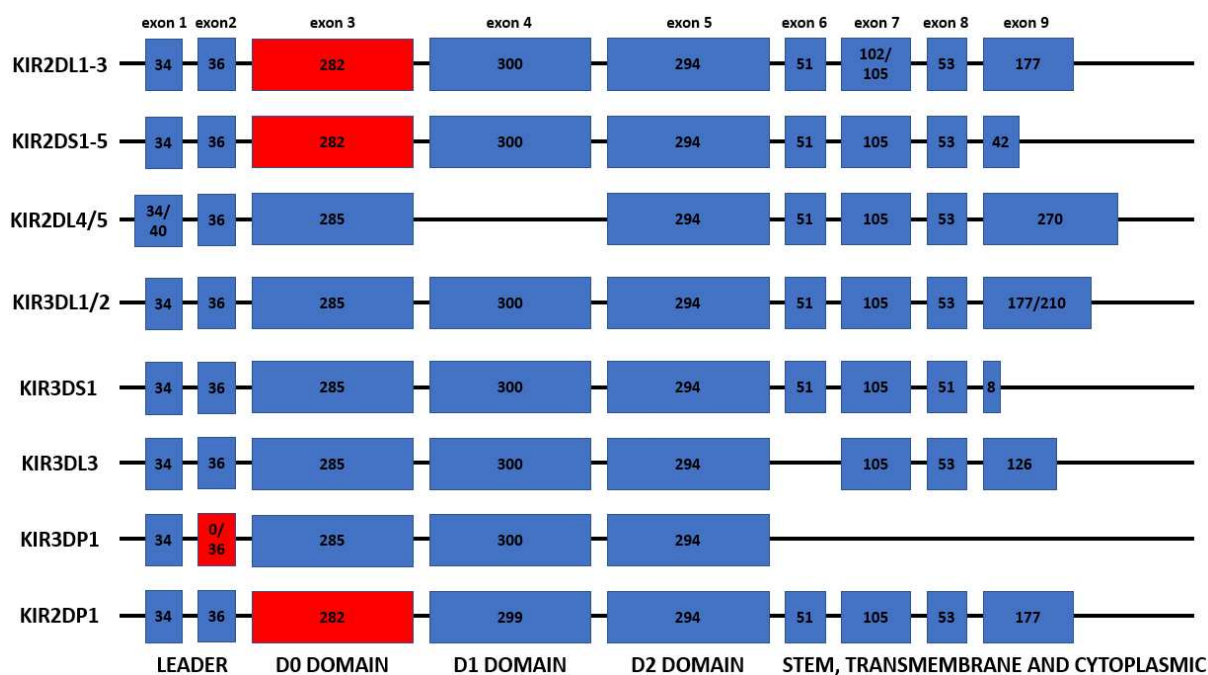
Co se týče MICB, neshoda v rámci polymorfismu na pozici 98 (MICB-98Ile/Met) zvyšuje riziko rozvoje chronického i akutního GVHD v případě, že dárce a příjemce jsou jinak MICA a HLA shodní a pacient je přitom zároveň CMV pozitivní.<sup>149</sup> V případě, že byl pacient CMV negativní, nehrála neshoda takovou roli a v případě shody v MICB-98, nehrál zase roli CMV status pacienta.<sup>149</sup>

U ULBP ligandů byla popsána role v HSCT pouze u ULBP6. Pacienti s alelou ULBP6\*002 měli lepší 8leté přežití bez progresu i celkové přežití oproti pacientům, kteří měli jinou alelu.<sup>150</sup>

## 2.5.5 KIR receptory

KIR receptory neboli killer-cell immunoglobulin-like receptors jsou exprimovány primárně na NK buňkách a v nižším množství také na NKT buňkách.<sup>151</sup> Tyto receptory jsou kódovány celou rodinou KIR genů, které se nacházejí na chromosomu 19. K dnešnímu dni známe 15 KIR genů, konkrétně 2DL1-2DL5 (L1, L2/3, L4, L5A a L5B), 3DL1-3 (L1, L2, L3), 2DS1-5 (S1, S2, S3, S4, S5) a 3DS1, a dále 2 pseudogeny, 2DP1 a 3DP1.

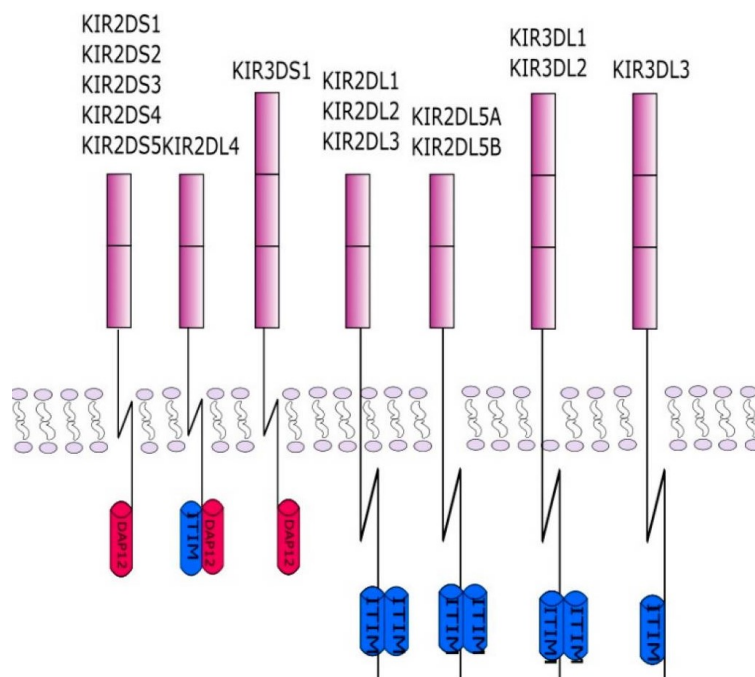
KIR geny se skládají z 9 exonů, exon 1 a 2 kódují vedoucí sekvenci, exon 3 doménu D0, exon 4 doménu 1, exon 5 doménu 2 a exon 6-9 pak transmembránovou a cytoplazmatickou část proteinu. Všechny geny nemusejí mít všechny exony a stejně tak se mohou lišit délky jednotlivých exonů (obrázek 4).



Obrázek 4 – Struktura genů KIR receptorů, upraveno dle <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/about/>.

Názvosloví KIR genů odpovídá jejich proteinové struktuře, kdy 2 nebo 3 značí počet extracelulárních domén a písmena S a L pak délku intracelulární části proteinu (short-krátká/long-dlouhá). S délkou intracelulární části je spojena i funkce proteinu. KIR s L mají na svém konci ITIM a jsou tudíž inhibiční, KIR s S asociují s adaptorovými proteiny obsahujícími ITAM a jsou aktivační (obrázek 5). Jedinou výjimkou je KIR 2DL4, který může být jak inhibiční, tak aktivační. Alel odvozených od KIR genů je dnes (červenec 2023) popsáno 1617 (v roce 2020 jich bylo uvedeno ve stejné databázi IPD-KIR 1100<sup>152</sup>).<sup>31</sup> Nejvíce alel je popsáno u 3DL3 (229 alel kódujících 113 proteinů), ale nejvíce proteinů je tvořeno alelami genu 3DL2 (168 alel a 116 proteinů).





Obrázek 5 – Struktura KIR proteinů. Převzato z Dębska-Zielkowska et al.<sup>152</sup>

KIR geny jsou děděny v tzv. haplotypech, které známe v základu dva, haplotyp A a haplotyp B. Haplotypy jsou složeny vždy z genů ze dvou částí – z telomerové, která se skládá z genů blíže k telomeře chromosomu 19 (Tel) a z centromerové (Cen), kde jsou geny blíže k centromere chromosomu 19.

Oba haplotypy obsahují tzv. framework geny, tj. geny, které rámuji začátek a konec oblasti – 3DL3, 3DP1, 2DL4 a 3DL2.

Haplotyp A se mimo framework geny skládá vždy jen z genů 2DL3, 2DP1 a 2DL1, 3DL1 a 2DS4 (obrázek 6).<sup>153</sup>



Obrázek 6 – Složení genů v haplotypu A dle Pende et al.<sup>153</sup> V červeném rámečku jsou framework geny.

Haplotyp B je vedle přítomnosti framework genů kombinací dalších KIR genů (přítomné mohou, ale nemusí být geny 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL2 a 2DL5), a tedy vždy odlišně od haplotypu A.<sup>154</sup>

2DS4 je jediný aktivační KIR receptor přítomný v haplotypu A. Ne vždy je ale tento protein nakonec exprimován na povrchu buňky a homozygoti pouze s haplotypem A tak na povrchu svých NK buněk nemusejí mít žádný aktivační KIR receptor.<sup>155</sup>

Na první pohled by se mohlo zdát, že haplotyp A je vždy neměnný, na rozdíl od haplotypu B, kde mohou být přítomné různé geny a haplotyp B je tak genově

variabilnější. Variabilita haplotypu A je postavena na alelické heterogenitě tvořící různé proteiny. Nejvíce zatím známých proteinů tvoří frameworkové geny přítomné jak u haplotypu A, tak B – 3DL2 (116 proteinů), 3DL3 (113) a 2DL1 (74), 3DP1 je frameworkový pseudogen, proto proteiny netvoří. Další gen s nejčtenějším počtem proteinů je pak 3DL1, který se podílí na tvorbě haplotypu A i B a který tvoří 94 proteinů. Po něm následuje 2DS5 s 38 proteiny a pak 2DL3, který má 36 proteinů. Ostatní geny kódují mezi 12 a 23 proteiny (červenec 2023).<sup>31</sup>

Stejně jako u dalších genů, ovlivňuje polymorfismus expresi a funkci KIR genů. Již bylo zmíněno, že některé alely 2DS4 nevedou k proteinu exprimovanému na povrchu buňky.<sup>155</sup> Týká se to ale například i 2DL4<sup>156</sup>, 2DL2<sup>157</sup>, 2DL1<sup>157</sup> nebo 3DL1<sup>158</sup>. Některé polymorfismy vedou k předčasnému ukončení překladu při tvorbě proteinu, tj. k tzv. null alelám. Nejvíce null alel, 20, má gen 2DS4 (51 % z celkových 39 alel), následovaný genem 2DL1, který má 7 null alel ze 173 (4 %), 3DL1 s 3 null alelami (1,6 %), 2DS3 s dvěma (2,8 %) a následují 2DL3, 2DL5A, 3DL2, 3DL3 a 3DS1, každý s jednou null alelou.<sup>31</sup> Další polymorfismy pak mohou ovlivňovat hladinu exprese na povrchu buňky, například u 3DL1.<sup>159</sup> A podobně jako v případě MICA-129, ovlivňují polymorfismy v KIR genech sílu jejich vazby k ligandu, jak bylo popsáno u 3DL1.<sup>160</sup>

### **2.5.5.1 Role haplotypu a polymorfismů KIR receptorů při HSCT**

Haplotyp A je složen převážně z inhibičních KIR, zatímco haplotyp B obsahuje více aktivačních KIR, v teoretické rovině by proto měl štěp dárce s haplotypem B vést k silnější reakci štěpu proti leukémii. U pacientů s AML, kteří podstoupili transplantaci s dárce s alespoň jedním B haplotypem, bylo skutečně pozorováno nižší riziko relapsu.<sup>161</sup> Také transplantace štěpů od dárců s nižším zastoupením inhibičních receptorů vedly k nižšímu výskytu relapsů a delšímu přežití.<sup>162</sup>

Roli hrají také jednotlivé alely či polymorfismy daných genů. Protein 2DL1 může mít na pozici 245 buď aminokyselinu arginin, která způsobuje silnější inhibiční funkci tohoto proteinu, nebo aminokyselinu cystein, která naopak vede ke slabší inhibiční aktivitě receptoru. Možná trochu překvapivě měli pacienti, kteří dostali štěp od dárce s 2DL1 se silnější inhibiční funkcí, lepší přežití a nižší riziko relapsu.<sup>163</sup> Autoři dále popisují, že u buněk s 2DL1 s cysteinem pozorovali signifikantně méně degranulace a sekrece IFN- $\gamma$ <sup>164</sup>, což odpovídá tvrzení, že pro silnější aktivitu buňky je potřeba licencování právě skrz inhibiční KIR<sup>165</sup>.

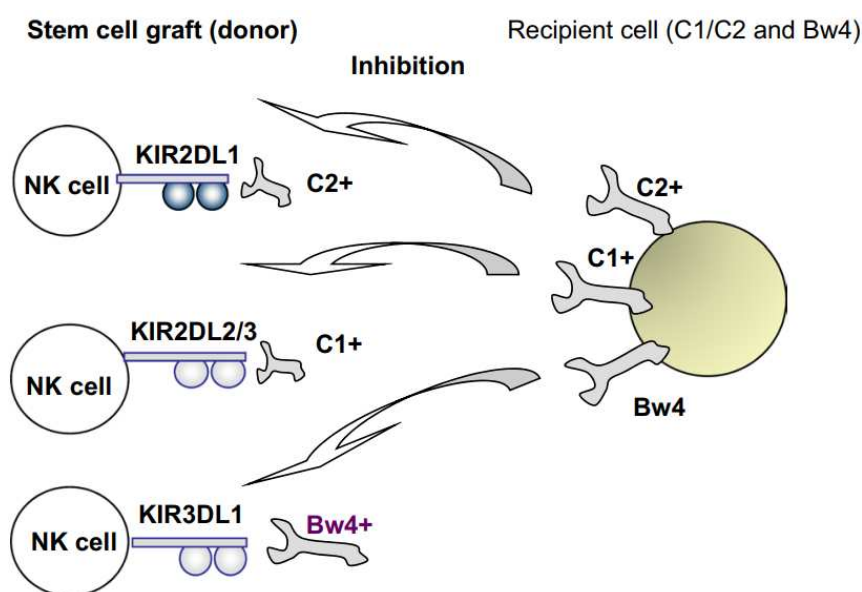
S úplně opačným výsledkem než Bari s kolegy, přišel tým Boudreauho. Ti pozorovali u pacientů se štěpem od dárce s alelami vedoucími k slabé nebo žádné inhibici (\*005, \*007 nebo \*004) signifikantně nižší riziko relapsu a delší OS oproti pacientům se štěpem se silně inhibičními alelami (\*001, \*002) genu 3DL1.<sup>166</sup> Podobných výsledků se dobrali Schaffer et al.<sup>167, 168</sup>

Alely 2DL1\*003 a 2DL3\*003 hrály roli v případě přítomnosti v haploidentickém štěpu pro pacienty s AML. Jejich přítomnost vedla k nižšímu výskytu relapsu.<sup>169</sup>

### 2.5.5.2 KIR – HLA shoda a neshoda (match a mismatch)

KIR – HLA shoda je stav, kdy dárcovské NK buňky na svém povrchu nesou ligandy pro přijetí inhibičního signálu ze strany patientské buňky.

Tento stav je zobrazen na obrázku 7 pro případ dárcovské buňky, která nese KIR 2DL1 (a přijímá tak inhibiční signál od HLA-C skupiny 2, která je v této práci popsána výše), 2DL2/3 (inhibice probíhá přes HLA-C1) a 3DL1 (ligand HLA-Bw4). Díky tomu, že pacientovy buňky mají všechny tři inhibiční ligandy, dojde k inhibici dárcovské NK buňky a nedojde tak k tzv. aloreaktivě.<sup>170</sup> Tento efekt nicméně vede k nižší reakci štěpu proti leukémii a nemusí proto být žádoucí.<sup>62</sup> Diskuze se tedy vede ohledně optimální neshody (tzv. perfect mismatch).<sup>171</sup>



Obrázek 7 – Znázornění KIR – HLA shody dle Becker et al.<sup>170</sup>

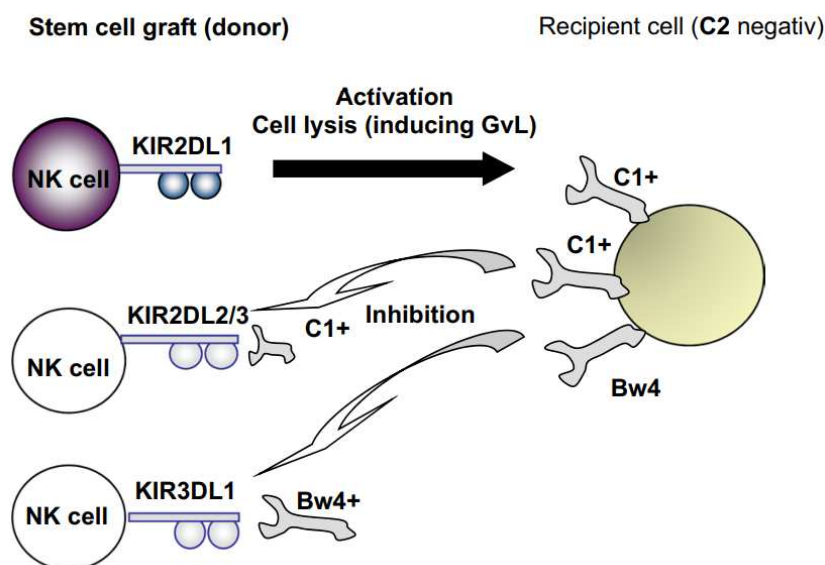
KIR – HLA shodu/neshodu mezi dárcem a pacientem lze posuzovat dle toho, zda dochází k typizaci pouze HLA pacienta, dárce nebo zda je zahrnuta i typizace KIR.<sup>172</sup>

V případě, že máme informaci pouze o HLA pacienta, je využít model „chybějícího ligandu“ (missing ligand), kdy nepřítomnost některého z ligandů (HLA-C1, HLA-C2 či HLA-Bw4) pro inhibiční KIR může vést k aloreaktivě v případě přítomnosti takového KIR u dárce. Jedná se ale pouze o předpoklad, nemáme totiž potvrzeno, že dárce příslušný inhibiční KIR receptor má.<sup>173</sup> Tuto metodu lze využít v případě haploidentických transplantací, kdy dárce nemá kompletní typizaci z důvodu dědičnosti HLA.

Pokud máme informaci o HLA jak dárce, tak pacienta a u pacienta chybí HLA, které je přítomné u dárce, mluvíme o missing-self (nebo také KIR-ligand nebo ligand-ligand missing) neshodě. Pro představu, dárcovský štěp od dárce s HLA-C1 i HLA-

C2 bude postrádat inhibiční signál od pacienta, který má pouze HLA-C1 a dojde tak k aloreaktivitě.<sup>173</sup> Stejně jako v předchozím případě, i zde tuto reakci pouze předpokládáme. Tento model je využíván v nepříbuzenských transplantacích, kde jsou pacienti i dárce pro HLA plně typizováni.

Třetím modelem je model neshody receptoru a ligandu (receptor-ligand mismatch) (obrázek 8). V tomto případě známe HLA pacienta a KIR receptory dárce a minimálně jeden inhibiční KIR zůstává bez příslušného ligandu (například přítomnost KIR2DL1 u dárce, ale absence HLA-C2 u pacienta).<sup>174</sup>



Obrázek 8 – Znázornění KIR – HLA neshody dle Becker et al.<sup>170</sup>

Posledním modelem je „přítomnost aktivačního KIR“. Tento model pracuje s předpokladem, že vedle chybějícího inhibičního signálu je potřeba také přítomnost aktivačního signálu pro aktivaci NK buňky. Zde je tedy třeba znát typ aktivačního KIR a přítomnost jeho ligandu u pacienta.<sup>175</sup>

Jak bylo uvedeno výše, KIR geny se nacházejí na chromosomu 19 a HLA geny na chromosomu 6, nejsou proto děděny společně, a i v případě HLA plně shodného příbuzného dárce je možné, že se KIR dárce a pacienta budou lišit. Ve studii z roku 2005 se autoři věnovali analýze 178 pacientů a jejich příbuzných dárců a zjistili, že 62,9 % z nich se přes HLA shodu liší v KIR genech.<sup>176</sup>

Ve stejné práci také popsali, že pacienti s AML nebo myelodysplastickým syndromem (MDS), kteří měli KIR – HLA neshodu, měli signifikantně delší přežití bez nemoci (disease-free survival, DFS) i OS a nižší riziko relapsu. V případě, že se pacient s dárce navíc neshodovali nejen v jednom, ale ve dvou ligandech, bylo dosahováno ještě lepšího DFS a OS.<sup>176</sup>

Ruggeri s kolektivem pak sledovali 5leté přežití u pacientů s AML, kteří byli transplantováni s nebo bez KIR – HLA neshody a výsledky těchto dvou skupin byly dramaticky odlišné. V případě neshody byla pravděpodobnost 5letého přežití kolem 60 %, v opačném případě to pak bylo méně než 5 %.<sup>62</sup> A podobný efekt sledoval tým Sebastiana Giebela.<sup>177</sup> Ruggeri et al. popsali totéž také u haploidentických transplantací.<sup>174</sup> Wanquet et al. na druhou stranu popsali nižší riziko relapsu u haploidentické HSCT provedené při aktivním onemocnění v případě neshody KIR – HLA, ale už ne u pacientů, kteří tuto transplantaci podstupovali v kompletní remisi.<sup>178</sup>

Ne všechny práce tedy tento efekt potvrdily. Beelen et al. nepozorovali žádný benefit v případě, že byl štěp dárce vůči pacientovi aloreaktivní.<sup>179</sup> Podobně jako Bornhäuser s kolektivem.<sup>180</sup> Rozdíl ve studiích se dá nepochybně vysvětlit rozdílnou populací pacientů, ale efekt by mohla hrát i KIR – HLA neshoda v případě aktivačních KIR, což v těchto pracích nebylo blíže zkoumáno. Aktivační receptory by v případě shody naopak měly protektivní efekt s ohledem na relaps.<sup>181</sup>

Dá se ale říci, že pacient, který exprimuje na svých buňkách všechny 3 HLA-ligandy pro KIR (C1, C2 i Bw4) má vyšší riziko, že bude rezistentní vůči aktivitě NK buněk, než pacient, který všechny tři typy ligandů neexprimuje.<sup>182</sup>

S tím nejspíše souvisí i výsledek práce Weisdorfa s kolektivem, kteří popsali signifikantně nižší riziko relapsu a lepší DFS u pacientů, kteří dostali štěp od dárce s B haplotypem, ale jen za předpokladu, že se jednalo o pacienty pouze s ligandy HLA-C třídy 1.<sup>183</sup>

Ukazuje se tedy, že NK buňky a jejich receptory hrají u HSCT významnou roli.

## **3 CÍLE, HYPOTÉZY A OTÁZKY DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Tato dizertační práce má za cíl tři rozdílné analýzy. První analýza se věnuje popisu výskytu polymorfismů v genech NKG2D, MICA, MICB, ale i výčtu nejčastějších MICA a MICB alel a popisu zastoupení jednotlivých KIR alel v české populaci. Data jsou pak srovnána s dalšími populačními analýzami, které jsou zaměřené nejen na kavkazskou populaci.

Cílem druhé analýzy je nalezení alel či polymorfismů NKG2D, MICA a MICB, které by mohly ovlivňovat stav pacienta po HSCT. Pro tuto analýzu bylo použito klinických dat týkajících se jak dárce, tak pacienta, kdy byla tato data pak byla dána do souvislosti se získanými sekvenačními daty.

Třetí analýza zkoumá, zda mají jednotlivé KIR geny v případě KIR-ligand (HLA) shody vliv na výsledek transplantace. Tak jako u předchozí analýzy byla použita klinická data v kombinaci se sekvenačními daty.

### **3.1 Hypotézy, otázky**

1. Zastoupení jednotlivých alel a polymorfismů by mělo odpovídat jiným populačním studiím provedeným na kavkazské populaci.
2. Známé polymorfismy (MICA-129, MICB-98, NKG2D haplotyp) by měly ovlivňovat výsledek transplantace.
3. Jsme schopní identifikovat zatím neznámé polymorfismy či alely, které ovlivňují výsledek HSCT?
4. Hraje přítomnost inhibičních a/nebo aktivačních KIR, v případě shody s jejich ligandy, roli v HSCT?

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 MICA, MICB a NKG2D

Do populační studie, zkoumající MICA, MICB a NKG2D bylo zahrnuto 612 zdravých dárců, kteří do studie vstoupili po podepsání informovaného souhlasu s využitím jejich biologického materiálu pro účel studie. Informovaný souhlas byl schválen lokální etickou komisí. Jednalo se jak o dárce hematopoetických buněk za účelem transplantace pacienta Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, tak dárce zatím pouze v registru dárců kostní dřeně, nespojené s transplantačním centrem. Podmínkou vstupu do studie byl původ z České republiky a nepřítomnost AML. Dále bylo do populační analýzy zařazeno 164 pacientů s diagnózou AML, kteří byli léčeni na Hemato-onkologickém oddělení FN Plzeň (HOO FN Plzeň). Všichni jedinci byli kavkazského původu, což odpovídá homogenitě české společnosti. Do analýzy funkční, zaměřené na vliv polymorfismů daných genů na výsledek transplantace, bylo zařazeno 124 vzorků dárců a to tak, že byly využity vzorky pacientů po transplantaci, které vykazovaly 100% chimérismus tj. v krvi cirkulovaly pouze buňky pocházející od dárce. Samotná sekvenční data pacientů byla zastoupena v 78 případech a to tam, kde byla dostupná DNA pacienta před transplantací. Nábor dárců a pacientů probíhal v letech 2018-2021. Popis sbíraných klinických dat je možné nalézt v tabulce 5.

<b>Věk pacientů</b>		<b>Typ dárce</b>	
<50	32	Příbuzný (plná shoda)	25
50-65	65	Nepříbuzný dárce	64
>65	27	Haploidentický dárce	35
Medián (roky)	58	<b>Přípravná terapie</b>	
Rozpětí (roky)	23-74	Myeloablativní	23
<b>Pohlaví pacienta</b>		Redukovaná	101
Mužské	72	<b>Profylaxe GVHD</b>	
Ženské	52	S PTCY	34
<b>Diagnóza</b>		Bez PTCY	90
AML	118	<b>aGVHD</b>	
MDS	6	Ano	96
<b>Disease Risk Index (DRI)*</b>		Ne	28
Low (nízký)	5	<b>cGVHD</b>	
Intermediate (střední)	67	Ano	38
High (vysoký)	33	Ne	64
Very high (velmi vysoký)	7	Neznámé	22
Unknown (neznámý)	12	<b>Relaps</b>	
<b>AML jako sekundární malignita**</b>		Ano	41

Ano	37	Ne	82
Ne	87	Neznámé	1
<b>Karyotyp</b>		<b>Stav pacienta k datu analýzy</b>	
Normální karyotyp	58	Mrtvý	62
Komplexní karyotyp***	16	Živý	62
Jiné změny v karyotypu	11	<b>Příčina úmrtí</b>	
Neznámý	39	Relaps	29
<b>Status nemoci v době HSCT</b>		Infekce	16
Aktivní nemoc	43	Orgánové selhání	7
Jakákoliv CR	81	GVHD	6
<b>Zdroj štěpu</b>		Rejekce štěpu	1
Kostní dřev	24	Neznámé	3
Kmenové buňky z periferní krve	100		

Tabulka 5 – Klinická data pacientů, zahrnutých do analýzy vlivu polymorfismu MICA, MICB a NKG2D na výsledek transplantace. \*DRI dle Armand et al.<sup>16</sup>, \*\*AML jako sekundární malignita je definována jako AML po jakékoliv předchozí malignitě. \*\*\*Komplexní karyotyp je definován jako karyotyp s alespoň třemi abnormalitami.

Parametry zahrnuté do klinické analýzy byly vybrány s přihlédnutím na jejich roli v HSCT u AML a jsou blíže diskutovány v úvodu této práce.

## 4.2 Studovaná populace, popis klinických parametrů pro KIR

Do populační studie, která se zabývala distribucí alel KIR genů v české populaci bylo zařazeno celkem 761 vzorků, z toho 607 sekvencí od dárců a 154 patientských. Podmínky pro zařazení do studie byly stejné jako v případě MICA, MICB a NKG2D. I zde probíhal sběr dat 2018-2021, všichni jedinci byli kavkazského původu a všichni také podepsali informovaný souhlas k využití jejich DNA k další typizaci a k využití získaných anonymizovaných výsledků ke studijní analýze.

V analýze efektu KIR alel na výsledek HSCT byly tak, jako u MICA a MICB, použity ty vzorky, pro které byla dostupná kompletní klinická data pacientů. V této analýze byl zkoumán efekt přítomnosti dárcovských KIR při shodě s příjemcovým HLA, proto byl vzorek zmenšen na 71, byla potřeba data jak dárce, tak pacienta. Stejně jako u MICA a MICB byla dárcovská DNA získána až po HSCT a že se jedná o dárcovskou DNA bylo potvrzeno úrovní chimérismu. Popis sbíraných klinických dat je možné nalézt v tabulce 6.

<b>Věk pacientů</b>		<b>Typ dárce</b>	
<50	19	Příbuzný (plná shoda)	10
50-65	39	Nepříbuzný dárce	43



>65	13	Haploidentický dárce	18
Medián (roky)	58	<b>Přípravná terapie</b>	
Rozpětí (roky)	21-72	Myeloablativní	24
<b>Pohlaví pacienta</b>		Redukovaná	47
Mužské	41	<b>Profylaxe GVHD</b>	
Ženské	30	S PTCY	18
<b>Diagnóza</b>		Bez PTCY	53
AML	69	<b>aGVHD</b>	
MDS	2	Ano	57
<b>Disease Risk Index (DRI)*</b>		Ne	14
Low (nízký)	5	<b>cGVHD</b>	
Intermediate (střední)	40	Ano	15
High (vysoký)	20	Ne	56
Very high (velmi vysoký)	6	<b>Relaps</b>	
<b>Karyotyp</b>		Ano	25
Normální karyotyp	28	Ne	46
Komplexní karyotyp**	12	<b>Stav pacienta k datu analýzy</b>	
Jiné změny v karyotypu	31	Mrtvý	36
<b>Zdroj štěpu</b>		Živý	35
Kostní dřev	12	<b>Příčina úmrtí</b>	
PBSC	59	Relaps	20
<b>Status nemoci v době HSCT</b>		Infekce	7
Aktivní nemoc	20	Orgánové selhání	5
Jakákoliv CR	51	GVHD	2
		Neznámé	2

Tabulka 6 – Klinická data pacientů, zahrnutých do analýzy vlivu KIR-HLA na výsledek transplantace. \*DRI dle Armand et al.<sup>16</sup>, \*\*Komplexní karyotyp je definován jako karyotyp s alespoň třemi abnormalitami.

### 4.3 Izolace DNA

Od dárců i pacientů byla odebrána periferní krev do zkumavek Vacuette s antikoagulačním činidlem EDTA. Vzorky byly připravené k extrakci DNA přidáním proteinázy K (30 µL) ke 300 µL krve spolu s 300 µL lyzačního pufru s následnou inkubací při 56 °C na 20 minut. Připravený vzorek pak byl přepipetován do cartridge automatizovaného purifikačního kitu Maxwell Blood DNA od společnosti Promega (WI, USA).

Koncentrace DNA a její čistota pak byly měřeny spektrofotometricky za použití Synergy HTX instrument (BioTek, USA). V případě použití DNA pro NGS byla následně ředěna na výslednou koncentraci 250 ng, u Sangerovy metody nebyla DNA ředěna. DNA byla skladována v -20 °C a při analýzách držena při 4 °C.

## 4.4 Analýza NKG2D, MICA a MICB – Sangerovo sekvenování

Ze získané DNA byla provedena PCR pro získání sekvencí genů MICA a MICB. Pro gen NKG2D byla provedena PCR pouze té oblasti, kde leží polymorfismy rs1049174 (C/G), tj. exon 8, a rs2255336 (G/A), tj. exon 4, a která určuje, zda se jedná o HNK či LNK, a to u haplobloku 1 nebo 2. Sekvence primerů je uvedena v tabulce 7. V tabulce 8 je pak uvedené složení amplifikační PCR reakce a v tabulkách 9 a 10 průběh PCR cyklu.

Sekvence	Délka získané sekvence	PCR primery
NKG2D-Hb1	253 bp	F: TGCGAGGTATTTATGTTCTG R: CAGTTTAGGAATACAGCAC
NKG2D-Hb2	230 bp	F: TAAGGCTGGAGAATAATGC R: TCAGTGAAGGAAGAGAAGG
MICA	1,9 kbp (exony 2-4)	F: CCCCCTTCTTCTGTTTCATCA R: TGA CTCTGAAGCACCAGCAC
MICB	2,1 kbp (exony 2-5)	F: GACAGCAGACCTGTGTGTTA R: AAAGGAGCTTTCCCATCTCC

Tabulka 7 – Primery použité pro amplifikační PCR reakci.

Položka reakce	Množství
DNA (bez ohledu na koncentraci)	2 µL
2x LA Hot Start Master Mix (Top-Bio, Vestec, ČR)	12,5 µL
Forward primer (10 µM)	1 µL
Reverse primer (10 µM)	1 µL
Voda	8,5 µL
<b>Celkem</b>	<b>25 µL</b>

Tabulka 8 – Složení amplifikační PCR reakce.

Amplifikační PCR cyklus pro NKG2D	Teplota	Doba	Opakování
Vstupní denaturace	94 °C	1 minuta	1x
Denaturace	94 °C	15 sekund	
Navázání primerů	58,5 °C	15 sekund	35 x
Elongace	72 °C	60 sekund	
Finální elongace	72 °C	10 minut	1x

Tabulka 9 – Průběh amplifikační PCR pro NKG2D.

Amplifikační PCR cyklus pro MICA a MICB	Teplota	Doba	Opakování
Vstupní denaturace	94 °C	1 minuta	1x
Denaturace	94 °C	15 sekund	
Navázání primerů	61 °C	15 sekund	35 x

Elongace	72 °C	120 sekund	
Finální elongace	72 °C	10 minut	1x

Tabulka 10 – Průběh amplifikační PCR pro MICA a MICB.

Výsledné PCR reakce byly přečištěny 6 µL ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Inkubace byla provedena ve 37 °C po dobu 15 min s následným ohřevem na 80 °C na dalších 15 min.

Přečištěné vzorky byly použity pro sekvenační PCR, jejíž složení je popsáno v tabulce 11, průběh v tabulce 12 a použité primery v tabulce 13 (primery pro NKG2D byly shodné s amplifikační reakcí).

<b>Položka reakce</b>	<b>Množství</b>
DNA z amplifikační PCR (bez ohledu na koncentraci)	2 µL
5x BD Terminator Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	3,5 µL
BD Terminator Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	1 µL
Požadovaný primer (10 µM)	3,1 µL
Voda	10,4 µL
<b>Celkem</b>	<b>20 µL</b>

Tabulka 11 – Složení sekvenační PCR reakce.

<b>Sekvenační PCR cyklus</b>	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Opakování</b>
Vstupní denaturace	96 °C	1 minuta	1x
Denaturace	96 °C	10 sekund	
Navázání primerů	50 °C	5 sekund	25 x
Elongace	60 °C	240 sekund	
Zachlazení	4 °C	neomezeně	1x

Tabulka 12 – Průběh sekvenační PCR.

<b>Sekvence</b>	<b>Sekvenační primery</b>
MICA exon 2	F: TCCTGCCCAGGAAGGTT R: CCTGCTGAGTTCCACTGAC
MICA exon 3	F: AGGAATGGGGGTCAGTGGAA R: GAGGGTTTCCCTGGACACAT
MICA exon 4	F: CTGTTCCCTCTCCCCTCCTTA R: CCATCCCTGCTGTCCCTAC
MICB exon 2	F: GGACAGCAGACCTGTGTGTGTTA R: GCCTCCCTGACCCTATTCC
MICB exon 3	F: GAGTAATGGGAGGCCTTCT R: TGCATCCATAGCACAGGG
MICB exony 4-5	F1: CAGGAGTCCACCCTTGACAT F2: CGTTGACTCTGAAGCACCAG

NKG2D-Hb1	R: AAAGGAGCTTTCCCATCTCC F: TGCGAGGTATTTATGTTCTG
NKG2D-Hb2	R: CAGTTTAGGAATACAGCAC F: TAAGGCTGGAGAATAATGC R: TCAGTGAAGGAAGAGAAGG

Tabulka 13 – Primery použité pro sekvenační PCR reakci.

Samotné sekvenování probíhalo na přístroji 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

## 4.5 Analýza KIR – NGS sekvenování

KIR geny tvoří tzv. KIR genom, jehož celá délka byla amplifikována tzv. long range PCR (LR PCR) za použití upraveného protokolu Maniangu a kolektivu.<sup>184</sup>

Použité primery a další materiál, spolu s popisem programu lze najít v tabulkách 14, 15 a 16.

Směr	Sekvence primeru
Forward	5'-GCCAAATAACATCCTGTGCGCTGCTGAGCT-3'
Forward	5'-CTCACAACATCCTGTGTGCTGCTGAACTGA-3'
Forward	5'-GCGGCCGCCTGTCTGCACAGACAGCACC-3'
Forward	5'-CACATCCTCTGCACCGGTCAGTCGAGCCGA-3'
Reverse	5'-TTGGAGAGGTGGGCAGGGGTCAAGTG-3'
Reverse	5'-CTCCATCTGAGGCTCCCCTGAATGTG-3'

Tabulka 14 – Primery použité pro LR PCR reakci.

Položka reakce	Množství
DNA	250 ng
Každý ze zmíněných primerů (10 µM)	1 µL
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	2 µL
1× PrimeSTAR GXL Buffer	10 µL
dNTP mixture	4 µL
Voda	Množství do doplnění celkového objemu 50 µL
<b>Celkem</b>	<b>50 µL</b>

Tabulka 15 – Složení LR PCR reakce, kit společnosti Takara Saint-Germain-en-Laye, France.

LR PCR cyklus pro KIR	Teplota	Doba	Opakování
Vstupní denaturace	98 °C	30 sekund	1x
Denaturace	98 °C	30 sekund	31 x
Navázání primerů	68 °C	30 sekund	

Elongace	72 °C	12 minut	
Finální elongace	72 °C	10 minut	1x

Tabulka 16 – Průběh LR PCR.

Pro vizualizaci získaných PCR produktů byl použitý 0,7% agarózový gel (ve složení 0,98 g agarózy, 140 ml 1x TAE pufru s 14 µl SYBR Safe DNA Gel Stain, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 1 µL vzorku byl společně s 3 µL vody a 1 µL 5x loading dye nanesen na gel spolu s žebříkem GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) a běh byl nastaven na 70 V po dobu 60 minut.

Koncentrace získané DNA byla určena použitím kitu Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit od společnosti Thermo Scientific.

Následně byla připravena knihovna, a to v několika krocích:

1. Fragmentace spolu s opravou konců a přípravou dA tailingu.
2. Ligace adaptoru a jeho úprava
3. Přečištění
4. Enrichment PCR
5. Přečištění

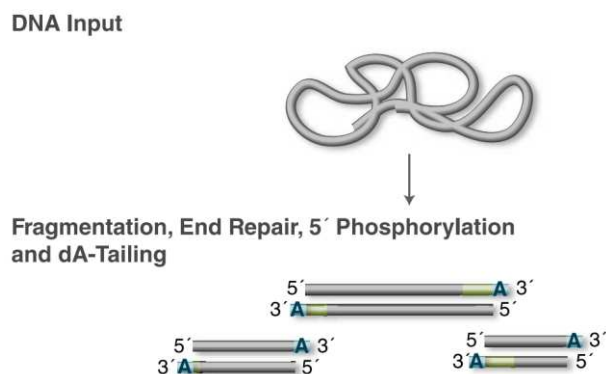
Fragmentace byla provedena za použití kitu NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ve složení dle tabulky 17 s programem dle tabulky 18.

<b>Položka reakce</b>	<b>Množství</b>
DNA z LR PCR (pokud bylo DNA méně, byl objem doplněn TE puftrem)	13 µL
NEBNext Ultra II FS Reaction Buffer	3,5 µL
NEBNext Ultra II FS Enzyme Mix	1 µL
<b>Celkem</b>	<b>17,5 µL</b>

Tabulka 17 – Složení fragmentační reakce.

<b>Program pro fragmentaci</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
Vyhřívání víko cycleru	75 °C	po celou dobu
Inkubace pro získání 150-350 kb fragmentů	37 °C	20 minut
Deaktivace fragmentáz	65 °C	30 minut
Zachlazení	4 °C	neomezeně

Tabulka 18 – Průběh fragmentace.



Obrázek 9 – Průběh fragmentace graficky (návod NEBNext Ultra II DNA and RNA Library Prep Kits for Illumina (New England Biolabs)).

Stejný kit byl použit i pro ligaci adaptorů (tabulky 19, 20 a obrázek 10) a excizi uracilu z adaptorů (tabulky 21 a 22, obrázek 11).

Položka reakce	Množství
Fragmentovaná DNA (použita je celá reakce)	17,5 µL
NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	15 µL
NEBNext Ligation Enhancer	1 µL
NEBNext Adaptor for Illumina	1,25 µL
<b>Celkem</b>	<b>34,75 µL</b>

Tabulka 19 – Složení reakce pro ligaci adaptorů.

Program pro ligaci adaptorů	Teplota	Čas
Bez vyhřívání víka cycleru		
Inkubace DNA s adaptorem	20 °C	15 minut

Tabulka 20 – Průběh ligace adaptorů.



Obrázek 10 – Znárodnění navázaného adaptoru na fragmentované DNA (návod NEBNext Ultra II DNA and RNA Library Prep Kits for Illumina (New England Biolabs)).

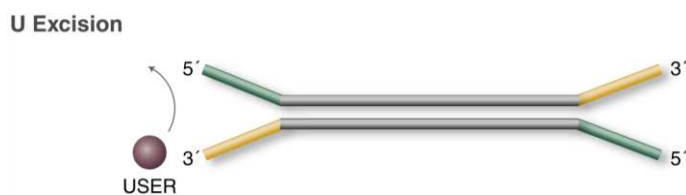
Položka reakce	Množství
Fragmentovaná DNA + adaptory (použita je celá reakce)	34,75 µL
USER enzym (Uracil DNA glycosyláza (UDG) a DNA glycosyláza-lyáza Endonucleáza VIII)	1,5 µL
<b>Celkem</b>	<b>36,25 µL</b>

Tabulka 21 – Složení reakce pro excizi uracilu z adaptorů.

Program pro excizi uracilu
----------------------------

Vyhřívané víko cycleru	47 °C	po celou dobu
Aktivita USER enzymu	37 °C	15 minut

Tabulka 22 – Průběh excize uracilu.



Obrázek 11 – Znárodnění odstranění uracilu z adaptorů (návod NEBNext Ultra II DNA and RNA Library Prep Kits for Illumina (New England Biolabs)).

Posléze byla provedena velikostní selekce adaptor-ligované DNA za využití magnetických kuliček AMPure XP beads ve složení dle tabulky 23.

Položka reakce	Množství
DNA	36,25 µL
0,1x TE	64 µL
AMPure beads	65 µL

Tabulka 23 Složení velikostní selekce adaptor-ligované DNA.

Reakci bylo třeba nechat inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a následně byly zkumavky umístěny na magnetický stojánek a po vyčištění od kuliček byl supernatant přenesen do nové zkumavky. V druhé části reakce bylo napipetováno 15 µL kuliček, inkubace trvala opět 5 minut, ale tentokrát byl po sedimentaci kuliček odstraněn supernatant. Přečištění bylo provedeno dvakrát 80% ethanolem (200 µL) a po odpaření zbytkového ethanolu bylo napipetováno 8,5 µL 0,1x TE a eluce DNA knihovny z magnetických kuliček při pokojové teplotě trvala 2 minuty. Následně bylo do nové zkumavky přeneseno 7,5 µL eluátu bez kuliček.

Dalším krokem bylo provedení enrichment PCR, jejímž cílem je navázání tzv. barcodů na fragmentovanou DNA. K tomu slouží primery i5 a i7, které mají část komplementární k adaptorům (tj. k sekvenci AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA a k sekvenci AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT) a následně svojí specifickou sekvenci (v našem případě jsme použili primery pro 96 kombinací, 8 typů i5 – i501-i508 a 12 typů i7 – i701-i712). Po navázání pak lze od sebe odlišit sekvence jednotlivých pacientů/dárců dle použité kombinace (pro příklad vypadá výsledný PCR produkt osoby číslo jedna takto: i501-adaptor-fragment DNA-adaptor-i701, u osoby 2 takto: i501-adaptor-fragment DNA-adaptor-i702, a dále následují varianty dle potřeby). Detaily k této PCR lze nalézt v tabulkách 24-25 a obrázku 12.

Položka reakce	Množství
Přečištěná fragmentovaná DNA s adaptory	7,5 µL

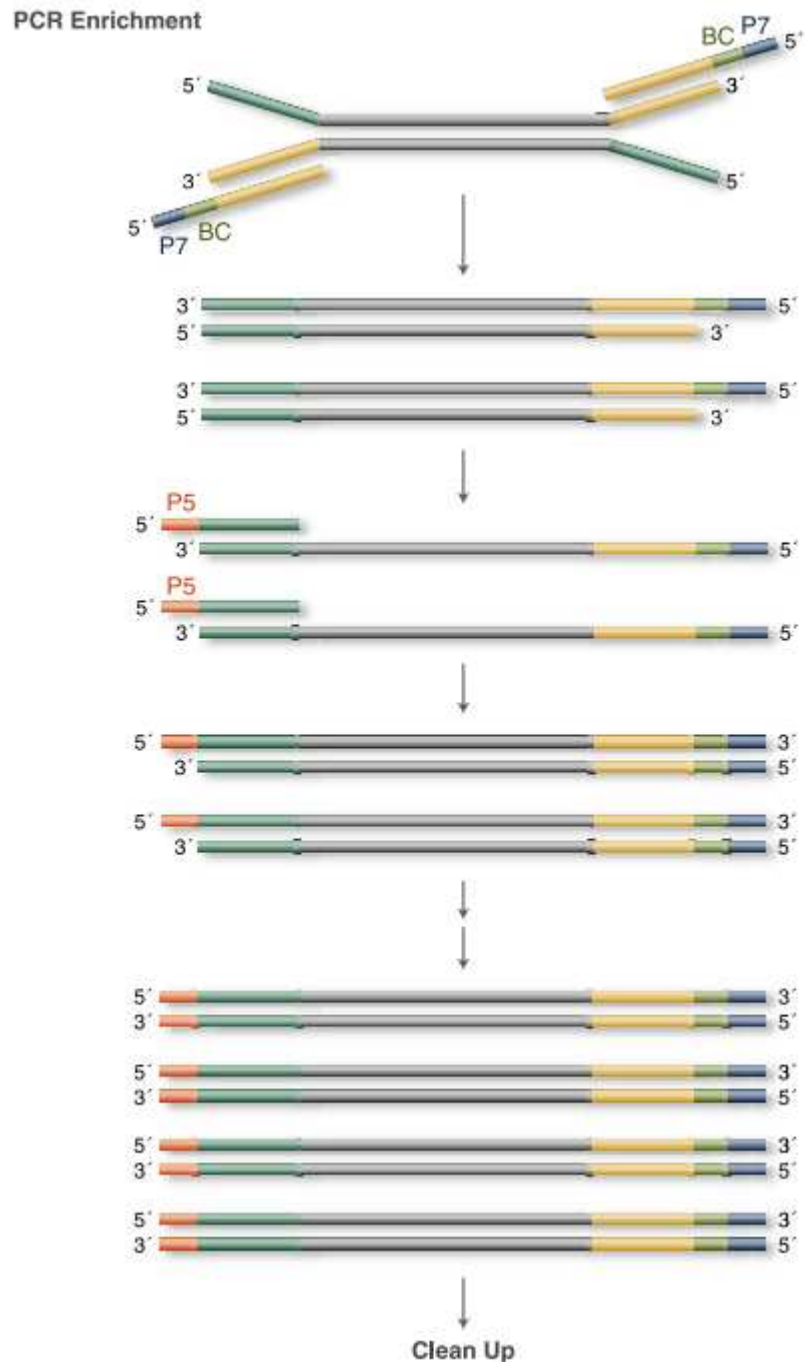
Indexový primer i5 (vždy nutné poznamenat) z kitu NEBNext Multiplex Oligos for Illumina	2,5 µL
Indexový primer i7 (vždy nutné poznamenat) z kitu NEBNext Multiplex Oligos for Illumina	2,5 µL
NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	12,5 µL
<b>Celkem</b>	<b>25 µL</b>

Tabulka 24 – Složení reakce pro enrichment PCR.

<b>Enrichment PCR cyklus</b>	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Opakování</b>
Vstupní denaturace	98 °C	30 sekund	1x
Denaturace	98 °C	10 sekund	5x
Navázání primerů, elongace	65 °C	75 sekund	1x
Finální elongace	65 °C	5 minut	1x
Zachlazení	4 °C	neomezeně	1x

Tabulka 25 – Průběh enrichment PCR.



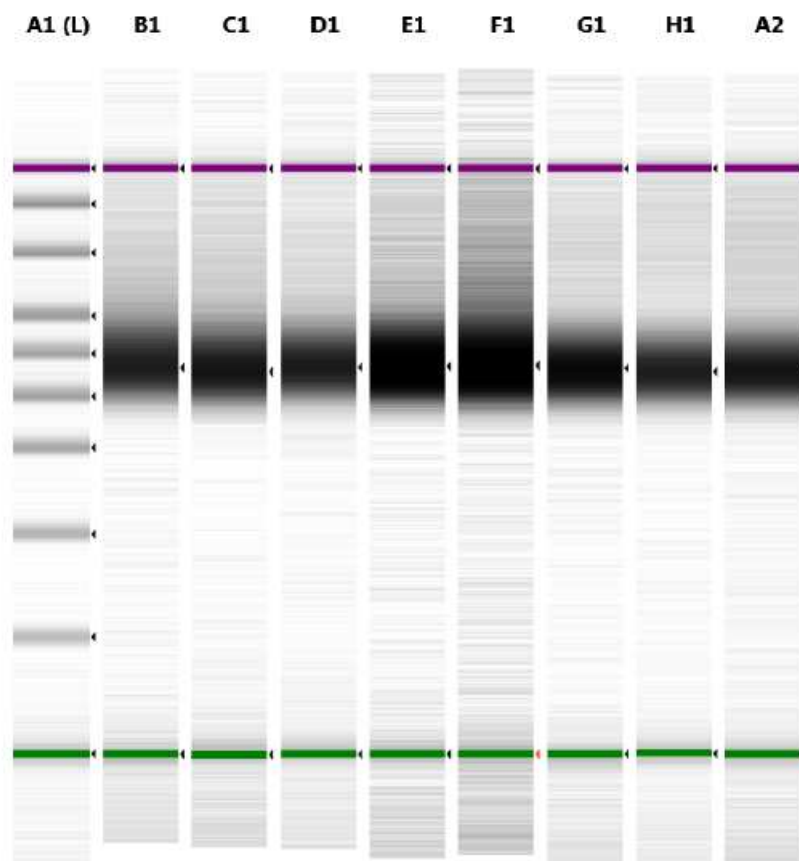


Obrázek 12 – Znáznornění průběhu enrichment PCR (návod NEBNext Ultra II DNA and RNA Library Prep Kits for Illumina (New England Biolabs)).

Po PCR byl výsledný produkt opět přečištěn pomocí magnetických kuliček Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) dle návodu NEBNext Ultra II DNA and RNA Library Prep Kits for Illumina. K produktu enrichment PCR bylo přidáno 22,5  $\mu$ L AMPure XP beads, promícháno a inkubováno 5 minut. Následně byly na magnetickém stojánku kuličky sedimentovány a supernatant odstraněn. Ke kuličkám pak bylo napipetováno 200  $\mu$ L 80% ethanolu a po 30sekundové inkubaci zase odpipetováno (opakováno 2x). Nakonec bylo

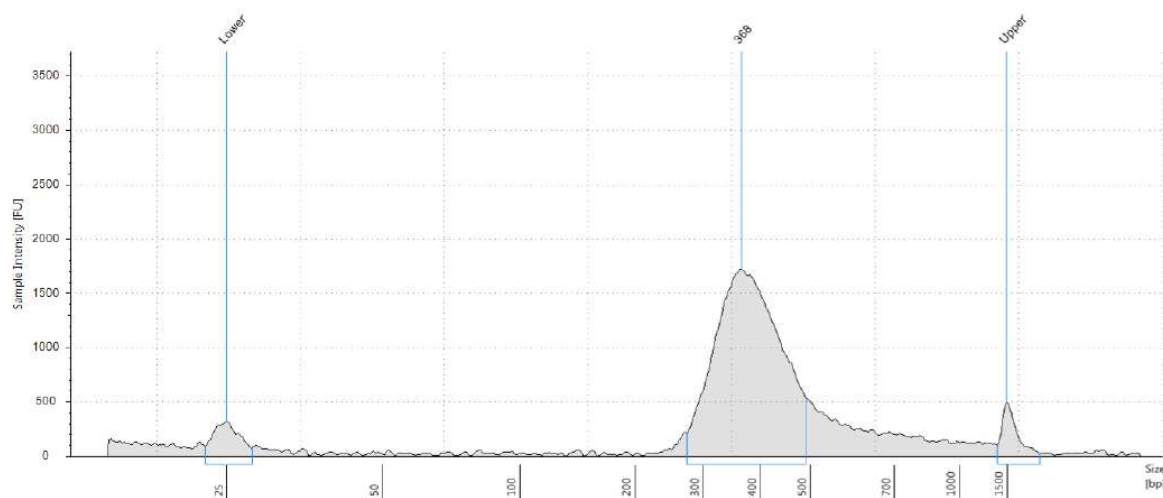
přidáno 33  $\mu\text{L}$  0,1x TE, inkubováno při pokojové teplotě 2 minuty a po sedimentaci kuliček na magnetickém stojánku bylo přeneseno 30  $\mu\text{L}$  eluátu do nové zkumavky.

Velikost této knihovny byla kontrolována pomocí Agilent 2200 TapeStation a High Sensitivity DNA kitu (Agilent, Santa Clara, CA, USA), kdy přípustná délka fragmentů s adaptory a barcode sekvencemi byla 300-400 bp. Vedle samotného obrázku gelu bylo výstupem také procentuální zastoupení jednotlivých fragmentů v dané délce. Pro lepší představu je výsledek znázorněn na obrázcích 13 a 14.



Obrázek 13 – Fotografie gelu s výslednými knihovnami vzorků pacientů P6-10, P12 a P15. První sloupec je 1 kb žebřík. Největší podíl DNA leží v oblasti 300 bp.

## B1: P6



Sample Table

Well	Conc. [pg/ul]	Sample Description	Alert	Observations
B1	3980	P6		

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/ul]	Assigned Conc. [pg/ul]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	288	-	17700	-		Lower Marker
368	3980	-	16700	100.00		
1500	250	250	256	-		Upper Marker

Obrázek 14 – Výsledek pro vzorek P6 – největší peak knihovny leží v oblasti 300-500 bp.

Koncentrace byla změřena Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kitem (Thermo Scientific). Samotná sekvenace knihoven probíhala na přístroji MiSeq od společnosti Illumina s nastavením sekvenace na pair-endové čtení 300+300 cyklů (Illumina, San Diego, CA, USA).

## 4.6 Analýza získaných sekvencí – MICA, MICB a NKG2D

V případě NKG2D sekvencí byla analýza postavena na přítomnosti daného nukleotidu na dané pozici (rs1049174 a rs2255336). Odpovídající oblast sekvence byla dohledána a daný nukleotid uveden do tabulky. Na základě výsledku pak bylo určeno, jestli má daná osoba homozygotní LNK haploblok (u rs1049174, LNK1/LNK1, tj. přítomnost pouze cytosinu na této pozici, u rs2255336, LNK2/LNK2, tj. přítomnost pouze guaninu), homozygotní HNK (u rs1049174, HNK1/HNK1, tj. přítomnost pouze guaninu na této pozici, u rs2255336, HNK2/HNK2, tj. přítomnost pouze adeninu) či jejich kombinaci (u rs1049174, LNK1/HNK1 C/G, u rs2255336, LNK2/HNK2 G/A).

V případě MICA a MICB byly použity celé sekvence exonů 2-4 a v případě MICB i exonu 5. Nejprve byly v programu CAP3 tool<sup>185</sup> zkombinovány reverse a forward

sekvence jednotlivých vzorků. Tyto sekvence pak byly za použití nástroje Clustal Omega<sup>186</sup> v programu UGENE<sup>187</sup> zarovnány spolu s referenčními sekvencemi alel MICA a MICB získanými z databáze IPD (verze 3.42)<sup>31</sup>. Přesahy sekvencí poukazující na přítomnost intronových částí byly oříznuty a výsledné sekvence zarovnány ještě jednou Muscle alignerem<sup>188</sup> pro větší přesnost. Následně byly sekvence rozřezány na jednotlivé exony a další analýzy probíhaly na úrovni těchto exonů.

V případě, že byl dárce nebo pacient homozygot, byly sekvence bez jakýchkoliv nejasností. To neplatilo v případě, kdy se jednalo o vzorek od heterozygotní osoby. Každá taková sekvence byla zkopírována tak, aby tvořila dvě kopie v případě jedné nejasné pozice a každá taková sekvence obsahovala jednu variantu nukleotidu podle toho, které dvě byly dle sekvenace přítomné. V případě, že těchto nejasností bylo více, postupovalo se stejným způsobem až do momentu, kdy byly všechny nejasnosti vyřešeny. To tedy vedlo k 2<sup>n</sup> možnostem. Takto vzniklé sekvence byly porovnány se setem referenčních sekvencí a v případě, že neexistovala referenční sekvence, byla uměle vytvořená sekvence vymazána i se svou komplementární sekvencí. Zůstaly proto sekvence pouze k již existujícím referencím, nebylo nicméně v možnostech projektu každý heterozygotní vzorek analyzovat tak, aby byla jednoznačně určena daná sekvence obou vláken DNA a vycházeli jsme tak z pravděpodobnosti, kdy byla volena četněji se v populaci vyskytující alela. Stejně tak jsme v případě, že bylo u některé osoby možné určit více variant alel, volili jsme tu běžnější oproti vzácnějším i s vědomím, že tím může dojít ke zkreslení a ztrátě variability.

Roli polymorfismů jsme analyzovali pro každý exon zvlášť, určení alel jsme ale prováděli po spojení všech dostupných exonů pro daný vzorek.

## 4.7 Analýza získaných sekvencí – KIR

Určování KIR alel bylo provedeno na Katedře kybernetiky Západočeské univerzity použitím software dostupného na <http://www.kky.zcu.cz/en/sw/KIRlys>, vyvinutým na tomto pracovišti.

Nejprve byly získány referenční sekvence z IPD-KIR databáze (verze 2.9.0 z prosince 2019).<sup>31</sup> Tyto sekvence neobsahovaly kompletní sekvence, ale pouze exonovou část, a to ještě ne kompletní u všech sekvencí. Proto bylo sekvence potřeba upravit, a to tak, že u sekvencí, kde chyběly jen intronové a UTR části sekvence, byly tyto nahrazeny těmito částmi jiných alel (dle tabulky 26). Pro každý gen byla vybrána jedna zástupná alela (rovněž tabulka 26), vybrané alely byly seřazeny za sebe a odděleny 200 písmeny N.

Exonové části alel	Intronové části alel
2DL1*028	2DL1*0030201

2DL2*0010101	2DL2*0010101
2DS1*006	2DS1*0020101
2DS2*017	2DS2*0010101
2DS3*0010301	2DS3*0010301
2DS4*020	2DS4*0010101
2DL3*0010101	2DL3*0010101
2DL4*0010201	2DL4*0080101
2DS5*001	2DS5*0020101
3DL1*0020101	3DL1*0010101
3DL2*0010101	3DL2*0010101
3DL3*0010101	3DL3*0010101
2DL5A*0010101	2DL5A*0010101
2DP1*0010201	2DP1*0030101
3DP1*0030101	3DP1*0030101
3DS1*0130101	3DS1*0130101

Tabulka 26 Seznam použitých alel pro exonové i intronové části sekvencí KIR.

Na takto vytvořenou sekvenci bylo následně provedeno zarovnání získaných fragmentů DNA (tzv. readů), a to pomocí nástroje bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Na zarovnaný soubor byla pro každý gen vypočítána statistika pokrytí (průměrná hloubka pokrytí, pokrytí genu do šířky, variance, směrodatná odchylka, minimum, maximum, kvantily pokrytí, poměry). Za pomoci těchto normalizovaných statistik a sady haplotypových pravidel byla stanovena přítomnost/nepřítomnost daného genu. Na základě framework genů a předpokladu, že tyto geny se vyskytují prakticky u všech jedinců dvakrát bylo stanoveno CNV (copy number variation) přítomných genů.

Po této analýze bylo možné přistoupit k identifikaci samotných alel genů. Ta se prováděla ve všech exonech přítomných genů dle zastoupení jednotlivých bází v zarovnaném souboru (hranice byla nastavena na 20 % průměrného pokrytí). Pokud došlo k vyhodnocení, že se daná báze v sekvenci skutečně nachází, porovnávala se tato báze s bázemi na konkrétní pozici v referenčních alelách. V případě, že se daná báze na dané pozici v referenční alele nevyskytuje, nebo v méně než 20 %, pak byla daná alela vyloučena. Takto byly vyhodnocovány všechny další báze a dle toho také vypočtena pravděpodobnost, s jakou se o danou alelu jednalo.

V případě, že měl gen nastavenou CNV > 2, byly vzaty všechny alely z předchozího kroku, které měly pravděpodobnost > 0 a byly z nich vytvořeny dvojice (i dvojici samu se sebou). Pro každou dvojici je spočítána pravděpodobnost, přičemž pokud měla dvojice stejnou bázi na daném místě, byla míra pravděpodobnosti snižována.

Do výsledků pak byla vybrána alela s nejvyšší pravděpodobností, případně dvojice alel s nejvyšší pravděpodobností. Rozhodnutí, zda se u 2DL5 jedná o variantu A nebo B se učinilo na základě haplotypových pravidel.

## 4.8 Příprava dat k analýze vlivu KIR-HLA shody na HSCT

Pro analýzu vlivu KIR-HLA shody na HSCT byla vzata informace o typizaci HLA pacienta před transplantací a tato typizace byla z alel (například HLA-B\*07) převedena na informaci antigenu vázajícího KIR, a to C1, C2, Bw4 a Bw6 dle aminokyseliny na pozici 77 HLA-B (výčet na <https://hla.alleles.org/antigens/bw46.html> zahrnuje i HLA-A, které byly tudíž do analýzy také zahrnuty) a dle aminokyseliny na pozici 80 domény  $\alpha 1$  HLA-C pro rozlišení C1 a C2.<sup>189</sup> Typ HLA antigenu bylo možné určit za použití KIR Ligand kalkulátoru na <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/ligand/>.

Zda dojde k navázání KIR k HLA ligandu bylo určeno dle výčtu KIR receptorů a jejich ligandů dle manuskriptu Daniely Pende s kolektivem.<sup>153</sup>

Na základě přítomnosti jednotlivých KIR genů a určených HLA antigenů pak byla provedena analýza shody mezi jednotlivými KIR dárců a přítomnosti HLA antigenů u pacientů. V případě shody byla uvedena hodnota 1, v případě absence ať už KIR nebo odpovídajícího HLA ligandu byla uvedena hodnota 0. Následně byl proveden součet všech inhibičních receptorů a všech aktivačních receptorů, které měly shodu mezi dárcem a pacientem.

## 4.9 Statistické analýzy souborů

Pro všechny statistické analýzy byly vybrány takové skupiny, které obsahovaly alespoň 5 vzorků. Primárně hodnocenými parametry bylo přežití bez relapsu (RFS) a OS a křivky provedeny za využití analýzy Kaplan-Meiera a log-rank testu. Statistické analýzy byly provedeny v programu R (verze 4, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) za použití balíčků „survival“ (verze 3.2.) a „survminer“ (verze 0.4.8).<sup>190</sup> Před posuzováním vlivu alel či polymorfismů na výsledek HSCT byly univariální Cox regresní analýzou zjišťovány klinické parametry, které statisticky signifikantně ovlivňují RFS a OS. Zjištěné parametry (DRI, AML jako sekundární malignita, karyotyp, stav onemocnění v době transplantace, cGVHD) pak byly zahrnuty do multivariální Cox regresní analýzy. Za statisticky signifikantní výsledky byly považovány ty s p hodnotou nižší než 0,05.

V případě populační analýzy byl pro distribuce alel použit Fisherův exaktní test, rovněž v programu R.

U analýzy výskytu alel jsou uvedeny nejčtenější alely, vyskytující se u alespoň 10 % osob.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola je pro přehlednost výsledků a související diskuze rozdělena do dvou podkapitol, a to z důvodu rozdílných analýz, populační a funkční.

### 5.1 Výsledky – populační analýza

#### 5.1.1 KIR

V našem datasetu, který je rasově velmi homogenní a složen pouze z kavkazské populace, jsme zkoumali výskyt nejčtenějších alel genů KIR a NKG2D a jeho ligandů. Protože počet stejných alel u jedné osoby (homozygota) může dosahovat čísla 2, je součet alel vyšší než počet vzorků a procent tak v součtu více než sto.

Největší alelickou variabilitu v rámci KIR vykazovaly tzv. framework geny, 2DL4, 3DL2, 3DL3 a 3DP1. Nejčtenější alelou pro gen 2DL4 byla \*008 s 65% zastoupením, kterou následovala alela \*001 s výskytem u 43 % vzorků a alela \*005 u 40 % vzorků. Geny 3DL2 a 3DL3 naopak vykazovali větší alelickou heterogenitu a žádná z alel těchto genů nedosahovala ani 40 % ve vzorcích. U obou genů byla nejčtenější alela \*001, která byla u 3DL2 následována \*007 a \*002 a u genu 3DL3 \*009 a \*003. Podobně jako u genu 2DL4 byla pozorována menší alelická variabilita u pseudogenu 3DP1 s 65% zastoupením alely \*009 následované alelami \*003 a \*006. Jednotlivá procentuální zastoupení jsou uvedena v tabulce 27.

Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích	Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích
<b>2DL4</b>		<b>3DL3</b>	
008	65	001	38
001	43	009	23
005	40	003	21
011	26	013	18
<b>3DL2</b>		002	16
001	39	014	12
007	31	<b>3DP1</b>	
002	28	009	65
003	24	003	31
010	17	006	25
005	10	015	18

Tabulka 27 – Distribuce nejčtenějších ( $\geq 10$  %) alel frameworkových KIR genů v české populaci.

V našem datasetu byl vyšší počet alel inhibičních KIR genů (s dlouhou intracelulární částí proteinu, KIR-L) oproti aktivačním KIR. Gen 3DL1 měl 7 alel s výskytem vyšším než 10 %. Nejčtenější alelou v našem vzorku byla 3DL1\*015 následována alelami \*004 a \*002. Významnější variabilitu můžeme pozorovat ještě u 2DL1, kde byla v našem datasetu nejfrekventovanější alelou \*035, což je nejspíše zapříčiněno sekvenační chybou, jak je uvedeno dále v diskuzi. U genů 2DL2 a 2DL3 jsme na druhou stranu pozorovali jen jednu čtenější alelu. Samotný gen 2DL3 nebyl příliš zastoupen a jeho nejčtenější alela \*030 je zastoupena pouze ve 4 % vzorků. Detailní distribuce alel je popsána v tabulce 28.

Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích	Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích
<b>2DL1</b>		<b>2DL5</b>	
035	25	B*002	32
003	24	A*001	26
002	22	A*005	23
001	12	B*008	10
<b>2DL2</b>		<b>3DL1</b>	
009	30	015	24
<b>2DL3</b>		004	22
030	4	002	19
		005	17
		095	12
		008	11
		001	11

Tabulka 28 – Distribuce nejčtenějších ( $\geq 10\%$ ) alel inhibičních KIR genů v české populaci.

V případě alel aktivačních genů KIR (a krátkou intracelulární částí proteinu, KIR-S), byl nejčteněji se vyskytující gen 2DS4 se 4 alelami vyskytujícími se ve více než 10 % případů, a to s podobně často se vyskytujícími alelami \*003 a \*001 (30 a 29 %), následovanými \*006 a \*010. Druhou největší, byť výrazně nižší oproti 2DS4, variabilitu má gen 2DS1 s alelami \*006 a \*013. Ostatní geny neměly více než 1 alelu s alespoň 10% frekvencí, byť byly zastoupeny poměrně čteně, 2DS2 dokonce ve více než polovině vzorků (tabulka 29).

Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích	Alela genu	% zastoupení ve všech vzorcích
<b>2DS1</b>		<b>2DS4</b>	
006	24	003	30



013	12	001	29
<b>2DS2</b>		006	21
001	52	010	11
<b>2DS3</b>		<b>2DS5</b>	
001	33	002	33
		<b>3DS1</b>	
		013	39

Tabulka 29 – Distribuce nejčtenějších ( $\geq 10\%$ ) alel aktivačních KIR genů v české populaci.

Ačkoliv nejsou pseudogeny exprimovány na povrchu buněk, mají i tak alelickou variabilitu. Nejčtenější alely 2DP1 byly \*003 s 39% zastoupením, \*001 s 29% zastoupením a \*002 ve 23 % vzorcích a nejčastější geny pseudogenu 3DP1 jsou uvedeny v tabulce 27.

### 5.1.2 MICA a MICB – distribuce alel

V našem datasetu byla nejčtenější MICA alela MICA\*008 následovaná MICA\*002, MICA\*009, MICA\*004 a MICA \*010, MICA\*007 a MICA\*018. Nejčtenější MICB alely byly MICB\*005, MICB\*004, MICB\*002 a MICB\*008. Procentuální zastoupení jednotlivých alel je uvedeno v tabulce 30.

<b>MICA</b>	<b>% zastoupení ve všech vzorcích</b>	<b>MICB</b>	<b>% zastoupení ve všech vzorcích</b>
MICA*008	67	MICB*005	66
MICA*002	22	MICB*004	37
MICA*009	17	MICB*002	35
MICA*004	15	MICB*008	17
MICA*010	11		
MICA*007	10		
MICA*018	10		

Tabulka 30 – Distribuce nejčtenějších ( $\geq 10\%$ ) MICA a MICB alel v české populaci.

### 5.1.3 MICA a MICB – distribuce polymorfismů

Dále byla provedena analýza funkčních polymorfismů ligandů MICA a MICB – rs1051792 (G  $\rightarrow$  A známý jako MICA-129) a rs3134900 (C  $\rightarrow$  G známý jako MICB-98).

Zjistili jsme, že 55 % vzorků byla homozygotů s MICA-129 Val/Val a 11 % vzorků bylo homozygotních pro MICA-129 Met/Met. U MICA-14 pak byla drtivá většina vzorků (95 %) homozygotů s tryptofanem na pozici MICA-14 (tabulka 31).

V případě MICB byla většina vzorků homozygotní pro MICB-98 Ile/Ile (83 %) a pouze 3 % homozygotní pro MICB-98 Met/Met. U MICB-58 byla téměř polovina vzorků (49 %) homozygotních pro MICB-58 Lys/Lys. Druhá nejčetnější skupina byly vzorky s heterozygotní MICB-58 Lys/Glu (tabulka 32).

<b>MICA</b>	<b>% zastoupení ve všech vzorcích</b>
<b><i>rs1051792</i> MICA-129</b>	
G/G (Val/Val)	55
G/A (Val/Met)	34
A/A (Met/Met)	11
<b><i>rs1063630</i> MICA-14</b>	
G/G (Gly/Gly)	3
G/T (Gly/Trp)	2
T/T (Trp/Trp)	95

Tabulka 31 – Distribuce MICA-129 a MICA-14 v české populaci.

<b>MICB</b>	<b>% zastoupení ve všech vzorcích</b>
<b><i>rs3134900</i> MICB-98</b>	
C/C (Ile/Ile)	83
C/G (Ile/Met)	14
G/G (Met/Met)	3
<b><i>rs1065075</i> MICB-58</b>	
A/A (Lys/Lys)	49
A/G (Lys/Glu)	34
G/G (Glu/Glu)	17

Tabulka 32 – Distribuce MICB-98 a MICB-58 v české populaci.

### 5.1.4 NKG2D – distribuce polymorfismů

Vedle polymorfismů genů MICA a MICB jsme sledovali polymorfismy receptoru NKG2D. Jak je uvedeno výše, o tom, jaký NKG2D haploblok se u osoby nachází rozhodují polymorfismy rs2255336 (G → A) a rs1049174 (C → G). Téměř všechny vzorky měly alespoň jednu alelu s nízkou NK aktivitou (LNK), a to v obou haploblocích (92 % u LNK1 a 97 % u LNK2). Většina pak byla homozygotní pro LNK/LNK haploblok, naproti tomu homozygotní HNK/HNK se nachází v populaci nejméně často, s frekvencí pod 10 % (tabulka 33).

<b>NKG2D</b>	<b>% zastoupení ve všech vzorcích</b>
<b><i>rs1049174</i> LNK/HNK1</b>	
C/C (LNK1/LNK1)	56
C/G (LNK1/HNK1)	36

G/G (HNK1/HNK1)	8
<b>rs2255336 LNK2/HNK2</b>	
G/G (LNK2/LNK2)	70
G/A (LNK2/HNK2)	27
A/A (HNK2/HNK2)	3

Tabulka 33 – Distribuce NKG2D haplobloků v české populaci.

## 5.2 Diskuze – populační analýza

### 5.2.1 Distribuce alel KIR

Expres KIR proteinu na povrchu buňky, ale i jeho síla vazby k ligandu, se liší nejen dle genu, kterým je protein kódován, ale i dle konkrétní alely. Je tedy vhodné znalostí alelického složení disponovat, protože může mít efekt na výslednou reakci NK buněk. Například alela 3DL1\*004, která patří mezi nejčtenější 3DL1 alely (i v našem vzorku) není na povrchu buněk měřitelně exprimována, nedochází tudíž k přijetí inhibičního signálu, což může mít ve výsledku dopad i na prognózu pacienta po transplantaci.<sup>191</sup>

V současné době existují dvě velké (počty v tisících a milionech osob) populační studie zaměřené na analýzu KIR alel v kavkazské populaci. První od Wagner et al., zdaleka největší, je německá studie zkoumající téměř dva miliony vzorků (1,08 milionu dárců z Německa, 0,38 milionu z Polska, 0,2 milionu z USA a 0,17 milionu z UK) a druhá od Amorim et al. z USA zkoumající 2 130 obyvatel USA s evropskými kořeny.<sup>192, 193</sup>

Uvedená první práce popisuje, že největší alelická diverzita leží v inhibičních KIR genech.<sup>193</sup> Rozdíl mezi geny s třemi Ig-doménami a dvěma pak leží primárně v počtu různých alel, kdy 3doménové geny mají více různých alel s různým procentuálním zastoupením, zatímco 2doménové geny mají spíše menší množství různých alel, které jsou v populaci nacházeny nejčteněji.<sup>193</sup> Totéž bylo pozorováno i v práci zaměřené na čínskou populaci.<sup>194</sup> A odpovídá to i výsledkům naší práce, kdy bylo nejvíce alel s vyšším než 10% zastoupením pozorováno u genů 3DL1-3 a 3DP1. Z 2doménových následují 2DL1 a 2DL4, což opět odpovídá studii Wagner et al.<sup>193</sup> Nižší zastoupení různých alel je sledováno v genech pro proteiny s aktivační funkcí, což opět odpovídá uvedené největší práci.<sup>193</sup> Ke stejnému výsledku došli i autoři, kteří zkoumali čínskou populaci Zhejiang Han, kde nejčtenější výskyt alel pro aktivační KIR byl 2DS4.<sup>194</sup> Jejich nejčtenější alelou je 2DS4\*001, která je na povrchu buněk exprimována a dokonce se vyskytuje u více než poloviny osob (52,3 %). Tato alela je nejčtenější i v populacích v Oceánii i v kavkazské populaci, ale ne u více než poloviny vzorků.<sup>193, 195</sup> U těchto populací jsou další nejčtenější alely neexprimované (\*003, \*004 v Oceánii, \*003 a \*006 v kavkazské populaci).<sup>193, 195</sup> V Japonské populaci je alela \*001 zastoupena v polovině případů.<sup>196</sup>

V tabulce I v sekci 10 Přílohy je pak uvedené porovnání nejčtenějších alel ve studii Amorim s kolektivem a dle Wagner et al. s našimi výsledky, doplněné o procentuální zastoupení jednotlivých alel, byť není ve všech pracích uvedené či je uvedené pouze jako rozptyl. Pro srovnání s nekavkazskou populací jsou v tabulce také uvedeny nejčtenější alely v asijské (japonské) populaci. Rozdíly ve frekvencích výskytu jednotlivých alel je možné vysvětlit nejen rozdílnými populacemi, ale také jiným přístupem k výpočtu frekvence (zastoupení daných alel na gen či zastoupení v celé populaci, která zahrnuje i osoby bez daného genu). Většina vzorků se víceméně shoduje, speciálně u genu 2DS2 je nejčtenější alelou \*001 ve všech populacích, od kavkazské přes asijskou po subsaharskou africkou.<sup>193, 196, 197</sup> V některých případech nicméně neseří pořadí četnosti alel (například u genu 2DS4). U některých genů jsou nicméně rozdíly již markantnější, a to například u genu 2DL1, kde je v naší zkoumané populaci nejčtenější alelou \*035. Za touto diskrepancí může stát záměna jednoho nukleotidu, čteně popisovaná i v práci od Ines Wagner.<sup>193</sup> V případě nejčtenější alely 2DL1\*035 v našem datasetu a 2DL1\*004 v uvedených pracích je na pozici 708 nukleotidové sekvence pro \*004 cytosin, zatímco pro \*035 se zde nachází adenin. Na stejném principu lze vysvětlit rozdíl v genu 2DL2, kde má alela \*001 na pozici 504 thymin zatímco \*009 cytosin. A stejně lze postupovat i v dalších případech. Za zmínku také stojí, že u genu 3DL1 byly v pracích od Amorim a Wagner nejčtenější alely \*001, \*004 a \*005 zatímco naše nejčtenější byla \*015, což odpovídá nejčtenější alele v populaci Zheijang Han, ale i v japonské populaci.<sup>194, 196</sup> Je otázkou, zda jde o sekvenační chybu a pokud ano, jak s tímto nakládat v dalších analýzách.

Lze nicméně shrnout, že i přes tyto neshody v jednotlivých alelách odpovídá náš dataset a frekvence alel největším studiím zaměřeným na kavkazskou populaci a bylo by vhodné, v případě zavedení algoritmu pro určování alel pro výběr dárce na našem pracovišti, aby tyto sekvenační chyby byly v našem postupu eliminovány.

## 5.2.2 Distribuce alel MICA a MICB

Tato práce se vedle analýzy alel KIR genů zabývala také alelami genů MICA a MICB a frekvencí výskytu jednotlivých známých funkčních polymorfismů (NKG2D Hb-1 a 2, MICA-14, MICA-129, MICB-58 a MICB-98).

Rozložení alel odpovídá rozložení v německé populaci, kde byla nejčtenější alelou MICA\*008 (ve 42 % vzorků) následovaná MICA\*002 (12 %) a MICA\*009 (9 %).<sup>198</sup> Alela MICA\*008 je zpravidla nejčtenější alelou vůbec, a to jak v kavkazské, tak nekavkazské populaci a bývá následována alelou MICA\*002.<sup>199-201</sup> Nicméně například v brazilské populaci může být naopak nejčtenější MICA\*002 (u 20 % osob, následována \*009 u 14 % a \*008 u 11 % osob).<sup>202</sup> Důvodem vysoké četnosti alely MICA\*008 je s největší pravděpodobností její vznik jako odpověď na infekci CMV. Protein vzniklý z této alely je v buňce ukotven pomocí GPI kotvy díky čemuž není CMV schopen odhodit tento stresový ligand z buňky způsobem, který využívá

v případě jiných alel MICA ligandu (ale pochopitelně vyvinul způsoby jiné, popsané v teoretické části této práce).<sup>203</sup>

Frekvence alel MICB v naší populaci pak odpovídá i světovým datům, dle nejčtenější MICB alelou je \*005 (44 %), \*004 (22 %) a \*002 (19 %) s \*008 (11 %).<sup>198, 204, 205</sup>

### **5.2.3 Distribuce známých polymorfismů MICA a MICB a NKG2D**

Nejčtenější kombinace alel MICA-129 Val/Val následovaná MICA-129 Val/Met s nejméně četnou kombinací MICA-129 Met/Met se objevuje i v dalších studiích. Dle Ouni et al. byla u pacientů s karcinomem prsu nejčastěji přítomna MICA-129 Val/Val (53 %) následovaná MICA-129 Met/Val (45 %) a MICA-129 Met/Met byla přítomna u 2 % pacientů. U zdravých osob ale bylo pořadí MICA-129 Val/Val a Val/Met opačné, MICA-129 Val/Val byla přítomna u 37 %, MICA-129 Met/Val u 45 % a MICA-129 Met/Met u 7 % osob.<sup>206</sup> Rovněž Renate von Linsingen a kolektiv sledovali u zdravých osob na prvním místě MICA-129 Met/Val s 46 % a MICA-129 Val/Val na druhém místě s 38 %, Met/Met mělo 16 % osob a u osob s karcinomem děložního čípku pořadí opačné – MICA-129 Val/Val u 48 % nemocných, MICA-129 Met/Val u 35 % a MICA-129 Met/Met u 15 % nemocných.<sup>202</sup>

Přítomnost MICB-98 Met je méně četná v populaci i dle studie zaměřené primárně na efekt MICB-98 na výsledek HSCT.<sup>149</sup> Tomu odpovídá i náš výsledek, kde byla přítomnost MICB-98 Met u 17 % vzorků.

Co se týče receptoru NKG2D, bylo popsáno, že pacient s homozygotním NKG2D HNK/HNK by měl mít snížené riziko vzniku nádorového onemocnění.<sup>116</sup> Dle práce Espinozy a kolektivu vedl štěp dárce s HNK/HNK k lepšímu přežití u HSCT.<sup>117</sup> V naší práci nicméně nemůžeme potvrdit nebo vyvrátit ani jeden z těchto efektů, protože byl náš vzorek příliš malý (8 % u HNK1/HNK1 a 3 % u HNK2/HNK2) pro statistickou analýzu. Ačkoliv takto nízké zastoupení odpovídá frekvenci i v jiných populacích, bylo by pro statistickou analýzu efektu potřeba zařadit více osob s tímto polymorfismem.<sup>207</sup>

## **5.3 Výsledky – funkční analýza**

### **5.3.1 Vliv shody KIR a HLA na výsledek HSCT**

V souboru dat pro KIR jsme pozorovali standardní spojitost mezi klinickými parametry a výsledky HSCT. S kratším OS byly statisticky signifikantně spojeny vyšší hodnoty DRI, nižší HCT-CI (0 vs. 3), komplexní karyotyp a transplantace v průběhu aktivního onemocnění. Dále pak byl pozorován negativní efekt haploidentické transplantace oproti plně shodnému štěpu na OS ( $p = 0,049$ ).

Přítomnost aGVHD byla spojena s horším OS oproti pacientům, kteří neměli žádnou GVHD. V analýze RFS tyto hodnoty nebyly statisticky signifikantní, což je nejspíše dáno menším počtem pacientů v analýze, kam byli zahrnuti pouze pacienti s relapsem nebo úmrtím (n=39).

V naší práci jsme se věnovali analýze vlivu shody/neshody mezi KIR receptory u dárců a jejich odpovídajícím HLA ligandům u pacientů. Vycházeli jsme ze znalosti ligandů pro dané KIR tak, jak je uvedeno v tabulce 34.

U většiny KIR jsme pozorovali určitou míru shody s patientskými HLA, v případě genů 2DL2 a 2DL3 jsme dokonce pozorovali 100% shodu. Druhou největší shodu pak vykazoval gen 2DL1 s HLA-C2 (68 %) a naopak největší neshodu jsme pozorovali v případě genu 2DS4 (92 %) (tabulka 34). Ne u všech genů šlo provést analýzu z důvodu neznalosti odpovídajícího ligandu, což se týká KIR 2DL4, 2DL5, 2DS3, 3DL3 a samozřejmě pseudogenů 2DP1 a 3DP1. V případě KIR 3DS1 byla shoda s ligandem (HLA-B\*51) sledována u 2 pacientů a nebyla tudíž další analýza možná pro nízký počet vzorků.

KIR	HLA ligand	Neshoda	Míra neshody (n)	Míra neshody (%)
2DL1	C2	Chybí KIR nebo HLA	23	32 %
2DL2	C1, C2	Chybí KIR nebo HLA	0	0 %
2DL3	C1, C2	Chybí KIR nebo HLA	0	0 %
2DS1	C2	Chybí KIR nebo HLA	43	61 %
2DS2	C1, A*11	Chybí KIR nebo HLA	39	55 %
2DS4	A*11	Chybí KIR nebo HLA	65	92 %
2DS5	C2	Chybí KIR nebo HLA	47	66 %
3DL1	Bw4, A*23, A*24, A*32	Chybí KIR nebo HLA	28	39 %
3DL2	A*03, A*11	Chybí KIR nebo HLA	40	56 %

Tabulka 34 – Míra neshody u KIR genů s jejich známými HLA ligandy v našem vzorku. Zdroj interakcí byla práce Daniely Pende s kolektivem.<sup>153</sup>

Jak je patrné z tabulky 34, známe více ligandů pro inhibiční KIR oproti aktivačním. To je patrně také vysvětlením, proč bylo v našem datasetu pozorováno vyšší zastoupení inhibičních KIR se shodou v HLA (v mediánu 4) oproti vzorkům, které měly shodu v aktivačních KIR s HLA (medián 1) (tabulka 35).

Počet inhibičních KIR s HLA shodou	Počet vzorků	Počet aktivačních KIR s HLA shodou	Počet vzorků
2-3	27	0	18
4	33	1	26
5	11	2	17
		3	10
Medián	4	Medián	1

Průměr	3,7	Průměr	1,3
--------	-----	--------	-----

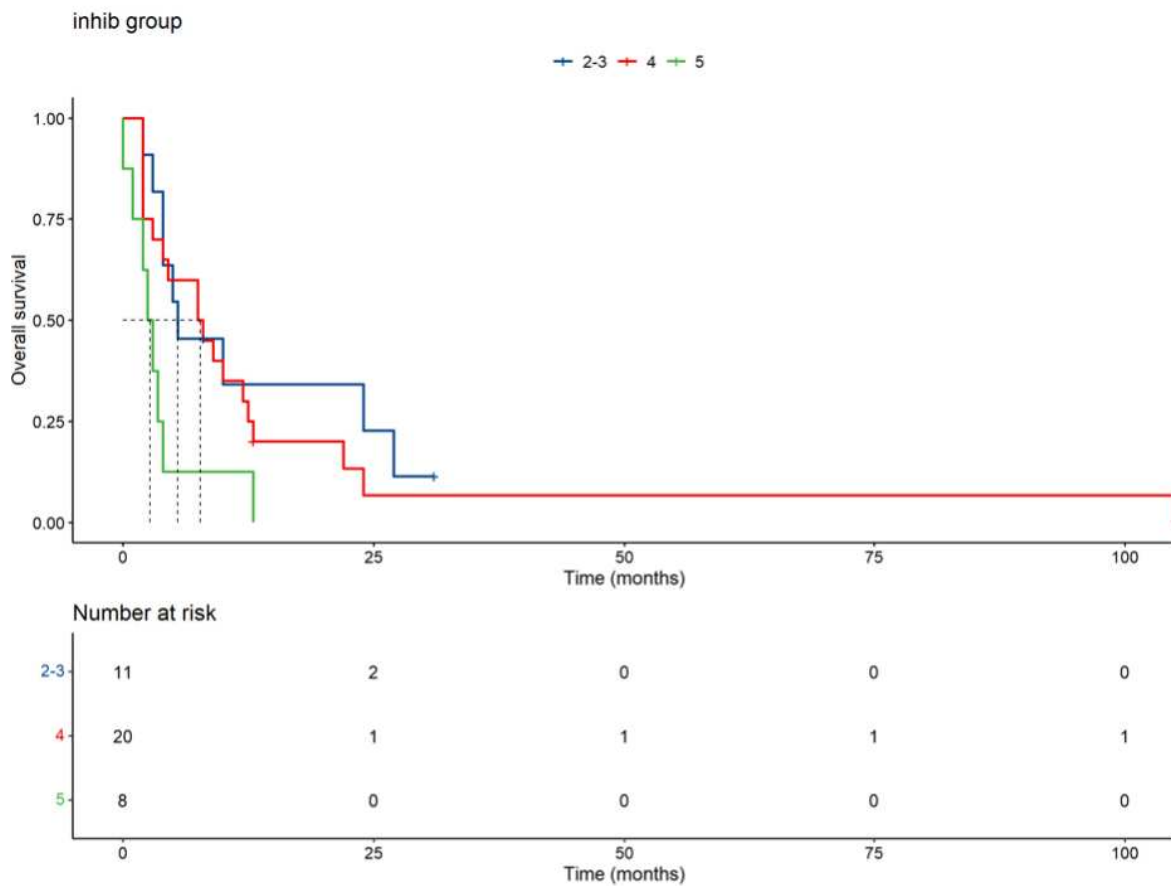
Tabulka 35 – Počet vzorků KIR s odpovídajícím HLA ligandem.

V případě převahy počtu inhibičních KIR s přítomným ligandem nad aktivačními, bylo nejčteněji pozorováno o 2 inhibiční ligandy více (tabulka 36). Žádný pacient pak neměl více aktivačních genů KIR se shodou v HLA ligandu oproti inhibičním KIR.

<b>Počet inhibičních mínus aktivačních ligandů</b>	
0	1
1	13
2	24
3	23
4	6
5	4
Medián	2
Průměr	2,5

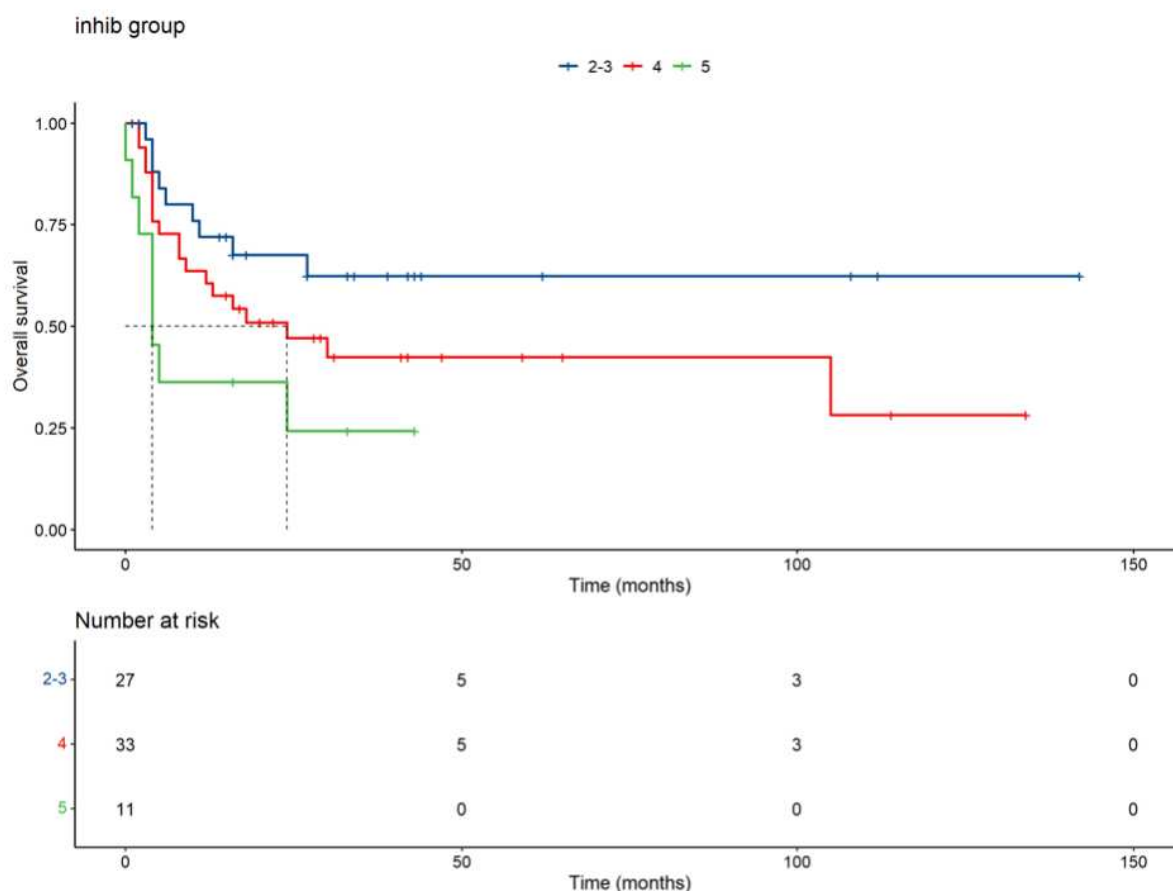
Tabulka 36 – Počet převažujících inhibičních KIR se shodou v HLA oproti aktivačním KIR se shodou.

S ohledem na převahu inhibičních KIR se shodou v HLA nás tedy zajímalo, zda hraje roli počet těchto KIR se shodou na výsledek transplantace. V univariantní analýze jsme pozorovali efekt počtu shodných KIR nejen na počty relapsů, kdy pacienti s méně shodnými inhibičními KIR dosahovali signifikantně lepšího přežití bez relapsu (HR = 0,29 s p hodnotou 0,014), ale stejný výsledek jsme pozorovali i v případě celkového přežití, a to ještě s vyšší statistickou signifikancí (HR = 0,28, p = 0,008) (obrázky 15, 16).



Obrázek 15 – Kaplan-Meierova křivka RFS pro pacienty, kteří měli 2-3, 4 nebo 5 HLA ligandů vázajících inhibiční receptory KIR dárce. Čím vyšší shoda, tím vyšší bylo riziko relapsu (p hodnota pro 5 vs. 2-3 = 0,014).





Obrázek 16 – Kaplan-Meierova křivka OS pro pacienty, kteří měli 2-3, 4 nebo 5 HLA ligandů vázajících inhibiční receptory KIR dárce. Čím vyšší shoda, tím vyšší bylo riziko úmrtí (p hodnota pro 5 vs. 2-3 = 0,008).

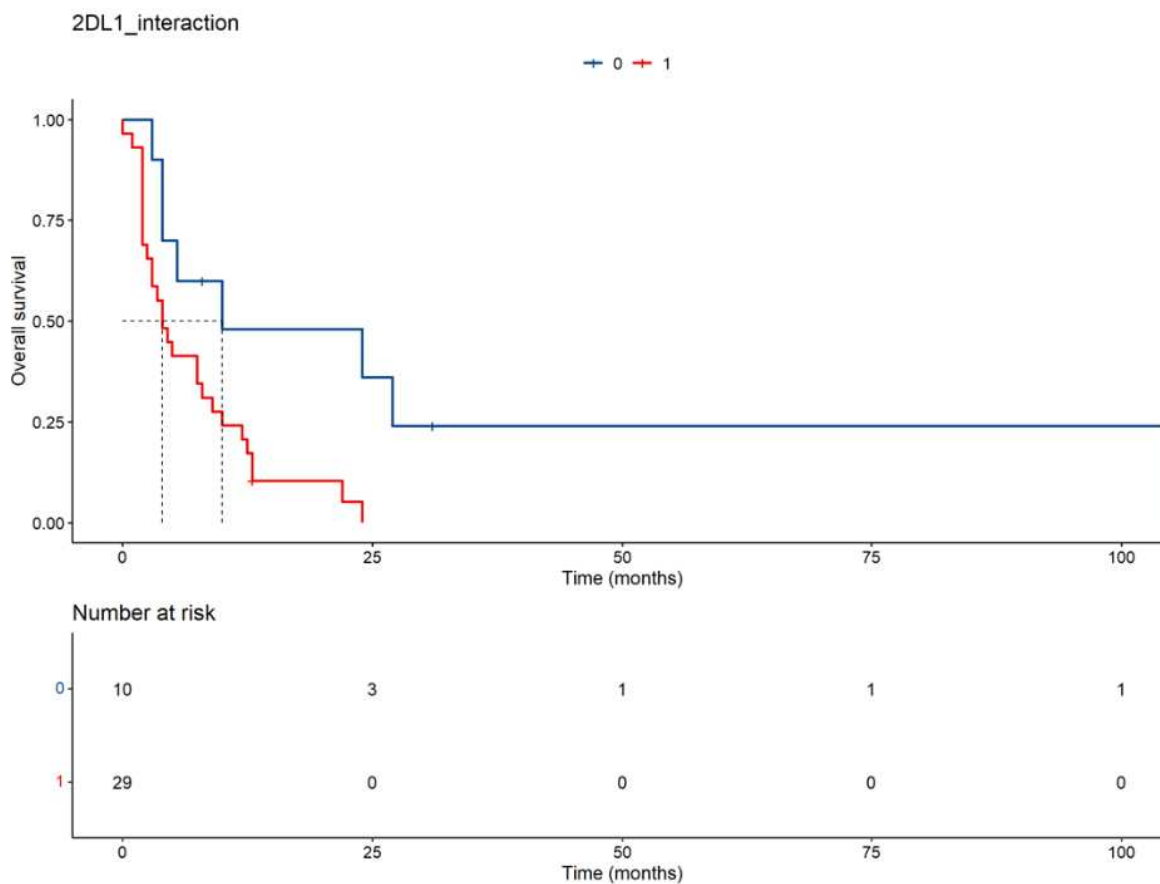
Ačkoliv se důvod úmrtí ve skupinách s převahou 2-3 nebo 5 inhibičních KIR nelišil (relaps), lišilo se procentuální zastoupení zemřelých pacientů. Pacientů s vyšším počtem inhibičních KIR se shodou s HLA zemřelo o 40 % více (73 % oproti 33 %) (tabulka 37).

2-3 vs. 5 inhibičních KIR	Počet celkem	Počet mrtvých	Nejčastější důvod úmrtí
2-3	27	9 (33 %)	Relaps (5, 56 %)
5	11	8 (73 %)	Relaps (4, 50 %)

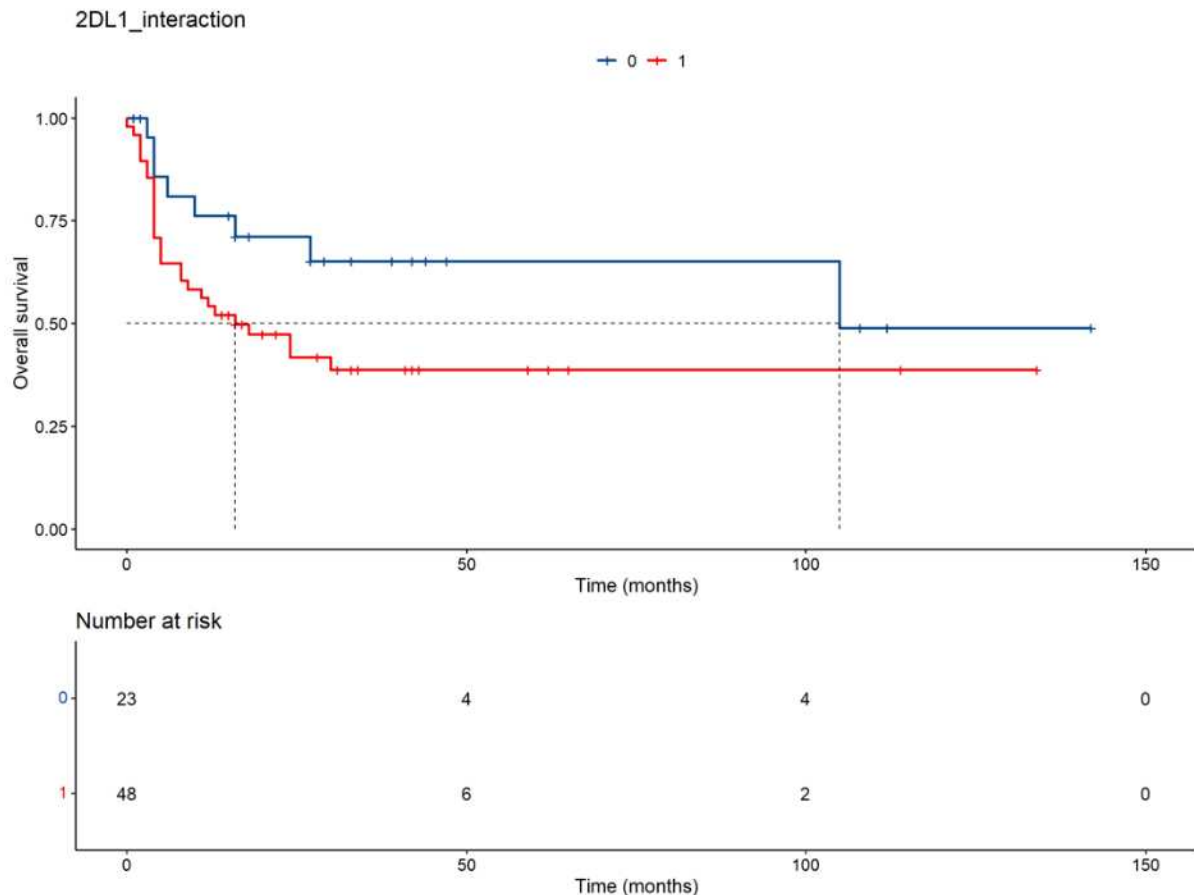
Tabulka 37 – Počet úmrtí a relapsů dle počtu inhibičních KIR shodných s HLA.

Analýze vlivu jednotlivých KIR a jejich shodě s HLA jsme pak podrobili všechny KIR se shodou v HLA. V případě genů 2DL2 a 2DL3 pak nebylo možné analýzu provést, protože měly ve 100 % případů shodu s HLA příjemce. V případě analýzy RFS nebylo možné analýzu provést pro gen 2DS4, pro příliš nízký počet vzorků, které by bylo možné zahrnout do analýzy (n=3). Pro aktivační KIR 2DS1, 2DS2, 2DS5 a inhibiční KIR 3DL1, 3DL2 jsme nepozorovali statisticky signifikantní rozdíl mezi

shodou a neshodou s HLA ligandem. Nicméně gen 2DL1 vykazoval statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ) rozdíl mezi shodou a neshodou s HLA v případě RFS (obrázek 17). Tento efekt se nicméně nepotvrdil v případě OS, kde dosahovala  $p$  hodnota 0,08 (obrázek 18).



Obrázek 17 – Kaplan-Meierova křivka RFS pro pacienty, kteří měli pro dárcovský KIR 2DL1 shodu s HLA u pacienta (1) vs pro pacienty, kteří shodu neměli (0) ( $p$  hodnota pro shodu vs. neshodu = 0,014).



Obrázek 18 – Kaplan-Meierova křivka OS pro pacienty, kteří měli pro dárcovský KIR 2DL1 shodu s HLA u pacienta (1) vs pro pacienty, kteří shodu neměli (0). V tomto případě se již nejedná o statisticky signifikantní výsledek ( $p = 0,077$ ).

Tak jako v analýze počtu inhibičních KIR se shodou s HLA, i zde byl nejčastějším důvodem úmrtí relaps, a i zde se lišil počet zemřelých pacientů. Pacientů se shodou 2DL1 s HLA zemřelo o 23 % více oproti pacientům bez shody 2DL1 s HLA (58 % oproti 35 %) (tabulka 38).

2DL1 – HLA shoda	Počet celkem	Počet mrtvých	Nejčastější důvod úmrtí
Shoda	48	28 (58 %)	Relaps 16 (57 %)
Neshoda	23	8 (35 %)	Relaps 4 (50 %)

Tabulka 38 – Počet úmrtí a relapsů dle shody či neshody v KIR 2DL1.

### 5.3.2 Vliv polymorfismů NKG2D, MICA a MICB na HSCT

V našem souboru dat pro MICA, MICB a NKG2D jsme pozorovali typickou korelaci mezi klinickými parametry a výsledky HSCT, konkrétně vztah mezi DRI a jeho vlivem na RFS a OS. Dále pak kratší RFS v případě přítomnosti komplexního karyotypu (v našem případě zemřelo na relaps 69 % pacientů s komplexním karyotypem a 81 % pacientů s komplexním karyotypem zrelabovalo). Náš dataset

rovněž potvrzuje dřívější pozorování, že pacienti transplantovaní v době přítomnosti aktivního onemocnění mají horší OS a RFS (OS v CR = 0,527,  $p < 0,05$ ; RFS v CR = 0,51,  $p < 0,05$ ). Stejně tak zhoršuje OS a RFS předchozí přítomnost maligního onemocnění (OS  $p < 0,005$ ; RFS  $p < 0,05$ ). Přítomnost chronické GVHD naopak měla protektivní efekt na celkové přežití ( $p < 0,05$ ). Celkové výsledky jsou shrnuty v tabulce 39, statisticky významné výsledky jsou zvýrazněné.

	OS				PFS			
	HR	lower_CI	upper_CI	pvalue	HR	lower_CI	upper_CI	pvalue
<b>Věkové skupiny pacientů</b>								
≤50	1,000				1,000			
51-65	1,706	0,922	3,155	0,089	1,274	0,602	2,699	0,527
>65	1,105	0,490	2,494	0,809	0,552	0,173	1,763	0,316
<b>Pohlaví pacientů</b>								
Žena	1,000				1,000			
Muž	0,939	0,567	1,557	0,809	0,956	0,493	1,856	0,895
<b>Diagnóza</b>								
AML	1,000				1,000			
MDS	0,332	0,046	2,398	0,275	0,563	0,077	4,109	0,571
<b>Disease Risk Index</b>								
Low	1,000				1,000			
Intermediate	0,920	0,278	3,050	0,892	1,181	0,152	9,149	0,874
High	3,821	1,151	12,686	<b>0,029</b>	7,450	0,989	56,129	0,051
Very high	8,256	2,095	32,545	<b>0,003</b>	23,261	2,747	196,974	<b>0,004</b>
<b>AML jako sekundární malignita</b>								
Ne	1,000				1,000			
Ano	2,106	1,263	3,513	<b>0,004</b>	2,188	1,123	4,261	<b>0,021</b>
<b>Karyotyp</b>								
Normální karyotyp	1,000				1,000			
Jiné změny	1,542	0,866	2,745	0,141	1,703	0,746	3,887	0,206
Komplexní karyotyp	4,162	2,100	8,251	<b>0,000</b>	8,404	3,658	19,306	<b>0,000</b>
<b>Stav onemocnění v době HSCT</b>								
Aktivní onemocnění	1,000				1,000			
Kompletní remise	0,527	0,320	0,869	<b>0,012</b>	0,510	0,265	0,983	<b>0,044</b>
<b>Zdroj štěpu</b>								
Kostní dřev	1,000				1,000			
PBSC	0,829	0,457	1,505	0,538	0,646	0,312	1,341	0,241
<b>Typ dárce</b>								
Haploidentický	1,000				1,000			
Plně shodný příbuzný	0,648	0,323	1,298	0,221	1,346	0,529	3,424	0,533
Nepříbuzný	0,595	0,333	1,063	0,080	0,974	0,423	2,243	0,950
<b>Přípravný režim</b>								
Myeloablativní	1,000				1,000			
Redukovaný	1,564	0,743	3,291	0,239	0,969	0,424	2,215	0,940
<b>GVHD profylaxe</b>								
Ne	1,000				1,000			
Ano	1,578	0,910	2,736	0,104	0,796	0,348	1,821	0,589
<b>aGVHD</b>								

Ne	1,000				1,000			
Ano	1,139	0,617	2,101	0,678	0,904	0,425	1,923	0,793
<b>cGVHD</b>								
Ne	1,000				1,000			
Ano	0,476	0,243	0,933	<b>0,031</b>	0,232	0,080	0,673	<b>0,007</b>

Tabulka 39 – Univariantní analýza klinických parametrů.

Jak již bylo uvedeno v sekci s četností zastoupení jednotlivých alel, většina vzorků obsahovala v haplobloku 1 alespoň jednu low NK alelu (92 % vzorků bylo LNK1/LNK1 nebo LNK1/HNK1). U haplobloku 2 to bylo dokonce 97 % vzorků. Pravděpodobně díky takto malému zastoupení homozygotních HNK jedinců nebylo možné v našem datasetu sledovat pozitivní efekt HNK/HNK na výsledek transplantace.

U genů MICA a MICB byl ale zvolen postup jiný s ohledem na délku získané sekvence, která se neomezovala na dva konkrétní polymorfismy, ale zkoumala exony 2-4 u MICA a 2-5 u MICB.

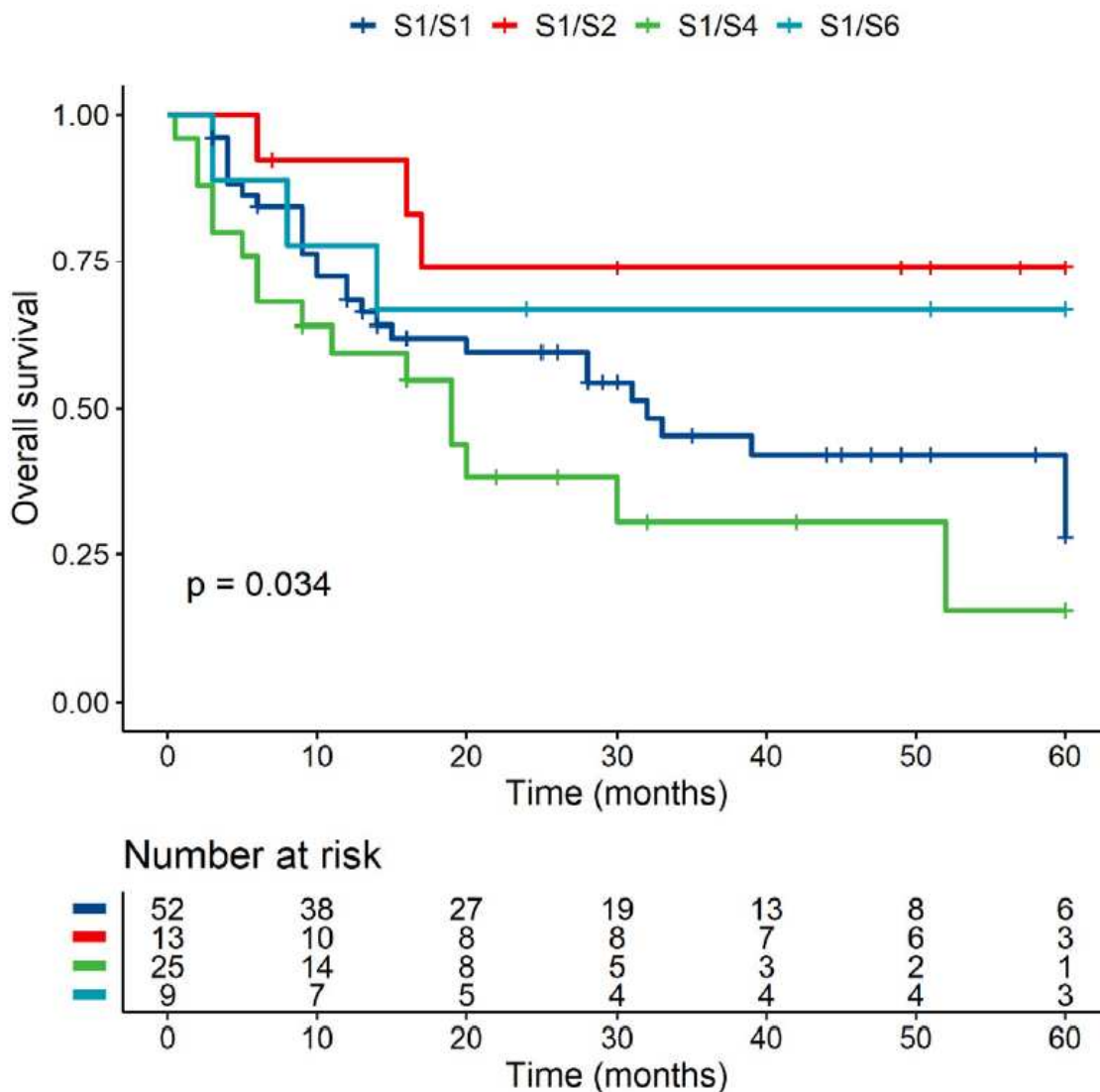
V sekci metodika je uvedeno, že sekvence jednotlivých exonů byly zkoumány zvlášť. Díky tomu bylo možné rozdělit referenční sekvence získané z databáze IPD do skupin dle rozdílů v jednotlivých sekvencích v daných exonech. Pro exon 2 MICA bylo získáno 10 skupin na základě referenčních sekvencí a naše sekvence spadaly do pěti z nich, a to do skupin S1, S2, S4, S6 a S7. Ostatní skupiny nebyly v našich vzorcích zastoupeny. Exon 3 MICA byl rozdělen do 18 skupin a naše vzorky byly zastoupeny v 10 skupinách (S1, S2, S5-9, S13, S15 a S16). U exonu 4 MICA byly referenční sekvence rozděleny do 10 skupin a naše vzorky se nacházely v 6 z nich – S1-3, S5, S6 a S10.

Kohorty byly rozděleny na dárcovské a patientské. Zatímco v patientské kohortě jsme nepozorovali žádný polymorfismus, který by ovlivňoval výsledek HSCT, v kohortě dárců jsme v exonu 2 MICA pozorovali polymorfismus, který měl statisticky signifikantní efekt na celkové přežití, a to i v multivariantní analýze. Jednalo se o polymorfismus nacházející se ve skupině S4, kde se na pozici 14 nacházela místo tryptofanu aminokyselina glycin. S ohledem na pozici aminokyseliny a genu se tedy jedná o polymorfismus MICA-14. Aminokyselinovou sekvenci odlišující S4 od ostatních skupin lze najít v tabulce 40.

<b>Aminokyselinová sekvence MICA exonu 2 od pozice 3 do 37</b>	
<b>Skupina</b>	<b>Sekvence</b>
Skupina S1	HSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYD
Skupina S2	HSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRCD
Skupina S4	HSLRYNLTVLS <b>G</b> DGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRCD
Skupina S6	HSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLTEVHLDGQPFLRCD
Skupina S7	HSLPYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYD

Tabulka 40 – Aminokyselinová sekvence od pozice 3 do pozice 37 proteinu MICA s vyznačeným glycinem na pozici 14 ve skupině S4.

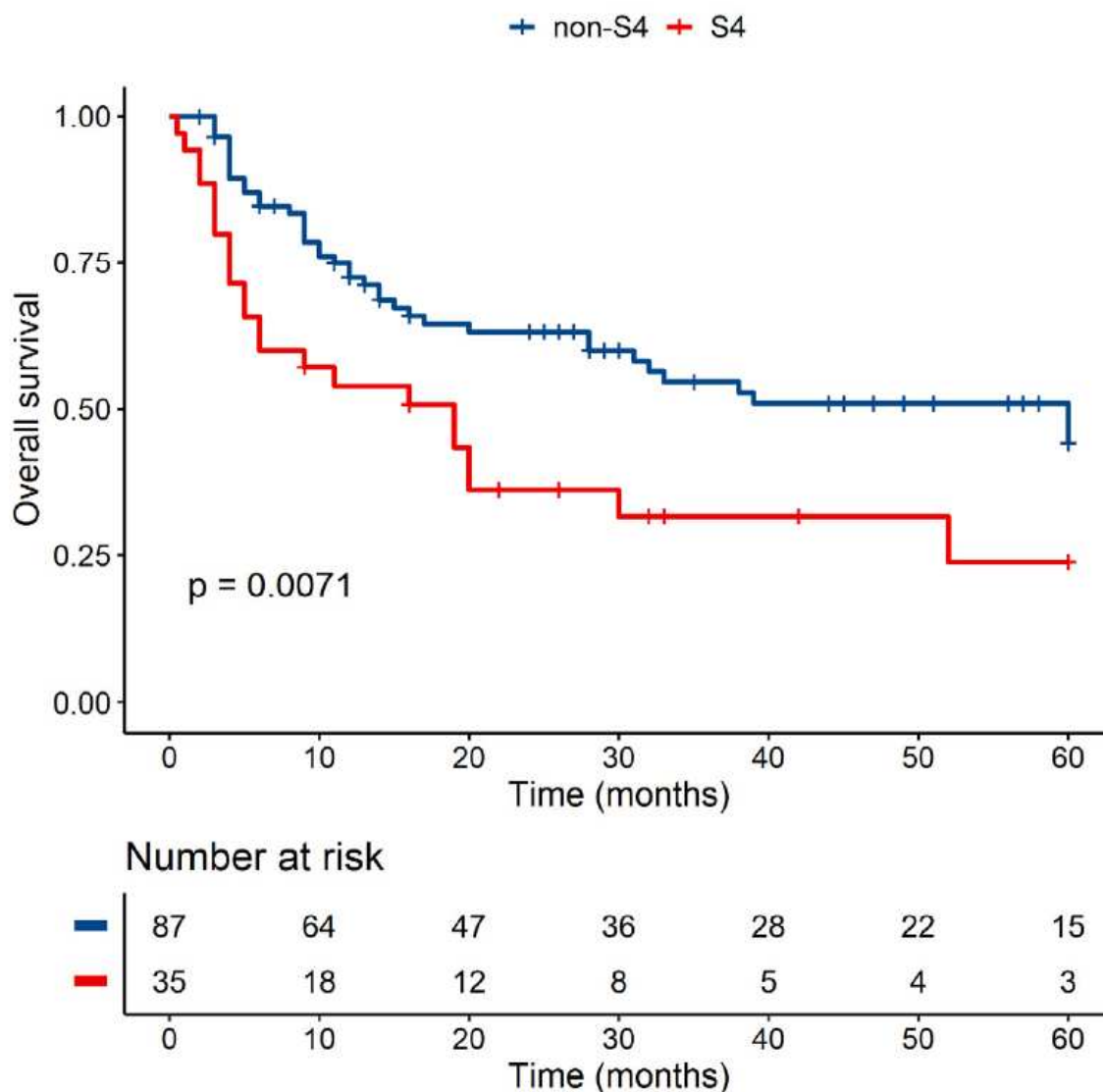
Nejprve jsme provedli analýzu pro celkové přežití u 4 nejčetnějších skupin exonu 2 MICA – S1/S1 (n=52), S1/S2 (n=13), S1/S4 (n=25) a S1/S6 (n=9), ostatní skupiny měly méně než 5 vzorků, a tudíž se do analýzy nedostaly. Mezi skupinami byl statisticky signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) s nejhorším přežitím u pacientů, jejichž dárce spadali do skupin S1/S1 a S1/S4 (obrázek 19).



Obrázek 19 – Kaplan-Meierova křivka celkového přežití pro skupiny exonu 2 MICA.

Tyto dvě skupiny pak byly následně použity pro další, multivariantní analýzu, ve které bylo cílem zjistit a případně potvrdit, zda klinické parametry neovlivňovaly výsledek univariantní analýzy. Multivariantní analýza potvrdila, že klinické parametry skutečně výsledek neovlivnily a pacienti, kteří byli transplantováni štěpem od dárce se skupinou S4 (neboli MICA-14Gly) měli 2,7krát vyšší riziko oproti pacientům, kteří byli transplantováni štěpem s S1/S1 (HR=2,745 (95% CI, 1,113-6,771,  $p < 0,05$ )). Pro potvrzení, zda se zhoršení přežití skutečně zakládá na přítomnosti S4, byly následně použité všechny vzorky bez ohledu na počet sekvencí

v dané skupině, a provedlo se srovnání skupin obsahující S4 a neobsahující S4 skupinu ve štěpu (obrázek 20). Tato analýza potvrdila, že přítomnost S4 v dárcovském štěpu skutečně vede k signifikantně kratšímu OS (s p hodnotou < 0,01 u univariantské analýzy a  $p < 0,05$  u multivariantské analýzy s HR=2,254 (95% CI, 1,058-4,801)). Stejná (univariantská) analýza byla provedena i pro ostatní skupiny s vyšším počtem pacientů (tj. S1 vs non-S1, S2 vs non-S2 a S6 vs non-S6) ale bez potvrzeného statisticky signifikantního rozdílu mezi skupinami.



Obrázek 20 – Kaplan-Meierova analýza celkového přežití u pacientů, kteří byli transplantováni štěpem obsahujícím nebo neobsahujícím skupinu S4 v exonu 2 MICA (MICA-14Gly).

Co se týče procentuálního zastoupení úmrtí v jednotlivých skupinách, pacientů v non-S4 skupině zemřelo 44 %, zatímco ve skupině s S4 štěpem zemřelo 59 % pacientů. Nejčastější příčinou úmrtí u pacientů s S4 štěpem byl relaps (u 41 %),

stejně jako u pacientů bez S4 (54 %), pacienti s S4 ale výrazně častěji umírali na infekci (36 %) ve srovnání s pacienty bez S4 (22 %) (tabulka 41).

	<b>Štěp s S4</b>	<b>Štěp bez S4</b>
Počet živých pacientů	41 %	56 %
Počet zemřelých pacientů	59 %	44 %
<b>Důvody úmrtí</b>		
Relaps	41 %	54 %
Infekce	36 %	22 %
Orgánové selhání	14 %	11 %
GVHD	9 %	11 %
Odmítnutí štěpu	0 %	3 %

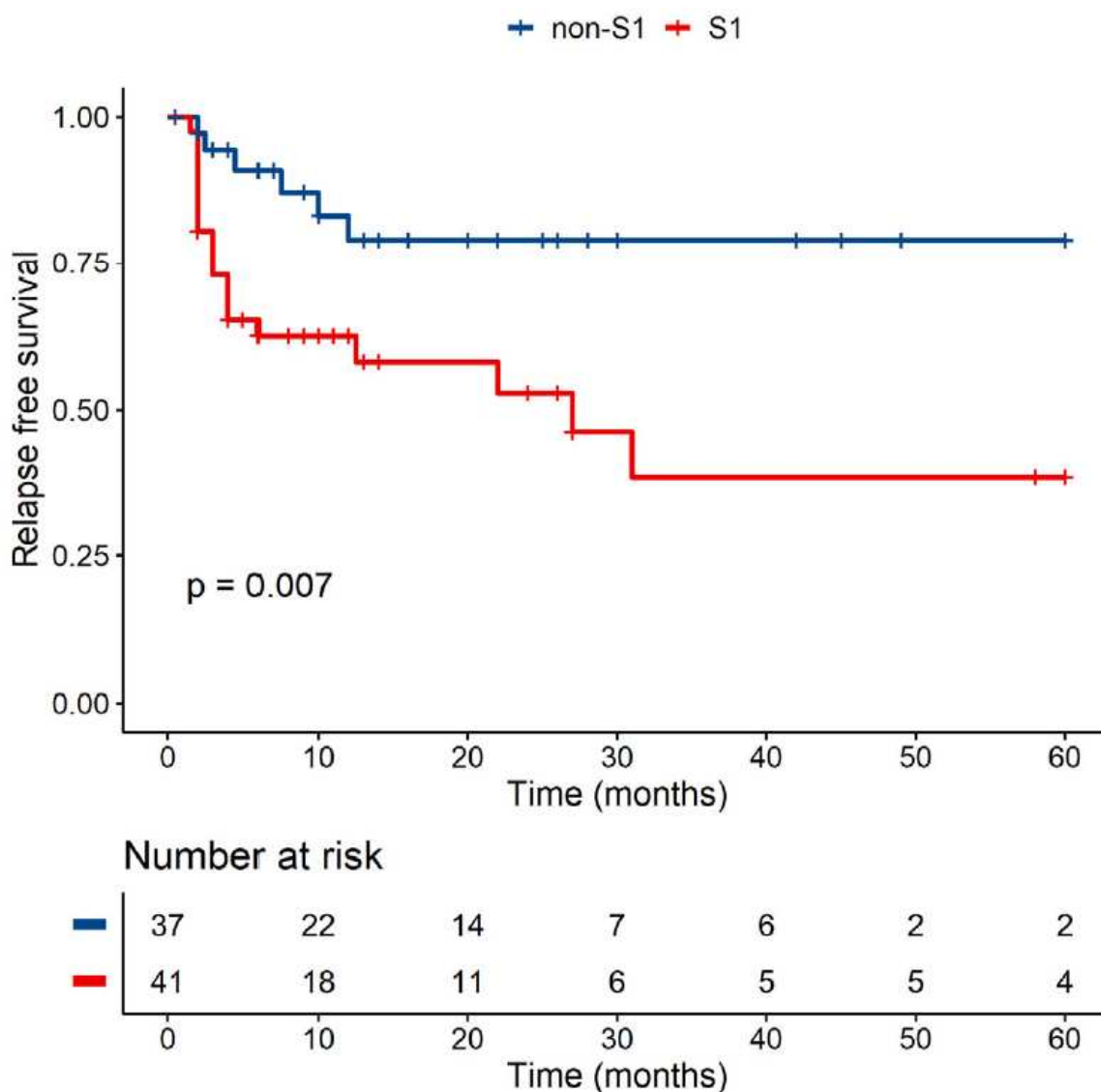
Tabulka 41 – Procentuální zastoupení přeživších a zemřelých pacientů spolu s důvody úmrtí při srovnání pacientů se štěpem od dárce s S4 nebo bez.

Na našem souboru dat jsme zkoumali také efekt varianty MICA-129 jak u dárců, tak u pacientů, a to včetně shody a neshody mezi dárce a pacientem, ale žádný efekt jsme nepozorovali. V případě porovnání OS přítomnosti MICA-129Val/Val s MICA-129Val/Met a s MICA-129Met/Met u dárců byla  $p=0,73$ . U pacientů pak pro tuto analýzu vyšla  $p$  hodnota 0,97. V případě srovnání shody a neshody mezi dárce a pacientem rovněž nebylo dosaženo statistické signifikance ( $p=0,42$ ).

Referenční sekvence pro MICB tvořily v exonu 2 šest skupin, stejně jako pro exon 3, zatímco pro exon 4 bylo vytvořeny na základě referenčních sekvencí tři různé skupiny. Všechny naše vzorky ale vždy odpovídaly prvním třem skupinám v každém exonu, tj. S1-3. Pouze jeden dárce měl sekvenci exonu 2 MICB odpovídající skupině S5.

Po provedení analýz stejným způsobem jako u MICA jsme sledovali efekt skupiny S1 v exonu 2 genu MICB v případě přítomnosti u pacienta. Pacienti s S1 skupinou měli signifikantně vyšší riziko relapsu než pacienti bez této skupiny ( $p < 0,01$ ) (obrázek 21).





Obrázek 21 – Kaplan-Meierova analýza přežití bez relapsu u pacientů, kteří měli v exonu 2 MICB skupinu S1 (MICB-58Lys) vs bez skupiny S1 (MICB-58Glu).

Tento efekt sice numericky přetrvával i v multivariantní analýze, ale nebyl statisticky signifikantní ( $p=0,069$  s  $HR=3,764$ , 95% CI, 0,902-15,707). Polymorfismus, který odlišuje skupinu S1 exonu 2 MICB od ostatních je aminokyselina glutamát na pozici, kde mají ostatní skupiny lysin (tabulka 42). S ohledem na pozici se tak jedná o MICB-58Glu (vypočítáno bez vedoucí sekvence).

**Aminokyselinová sekvence MICB exonu 2 od pozice 49 do 63**

Skupina	Sekvence
Skupina S1	QWAEDVLGA <u>E</u> TWDTE
Skupina S2	QWAEDVLGAKTWDTE
Skupina S3	QWAENVLGAKTWDTE

Tabulka 42 – Aminokyselinová sekvence od pozice 49 do pozice 63 proteinu MICB s vyznačeným glutamátem na pozici 58 ve skupině S1.

## 5.4 Diskuze – funkční analýza

### 5.4.1 Vliv (ne)shody KIR a HLA na výsledek HSCT

V několika pracích bylo popsáno, že neshoda mezi dárcem a pacientem v KIR-HLA vede k lepšímu OS a nižšímu riziku relapsu u pacientů s AML.<sup>62, 174, 208</sup> Na druhou stranu, tento výsledek nepotvrdily práce Yahng a Shimoni s kolektivy, kteří popisují u pacientů s AML naopak vyšší riziko relapsu, horší OS a četnější reaktivaci CMV.<sup>209, 210</sup> I v dalších diagnózách, které byly indikací pro HSCT jsou pak výsledky vlivu neshody KIR a HLA rozporuplné.<sup>211</sup> Populace pacientů se pochopitelně výrazně lišily a proto není možné z těchto výsledků vytvořit jednoznačný závěr, naše data se však spíše kloní k pracím Ruggeri et al.<sup>62, 174</sup> a Mancusi et al.<sup>208</sup> či Bakhtiariho et al.<sup>212</sup> které popisují neshodu mezi KIR a HLA jako benefiční s ohledem na RFS a OS.

V našem datasetu jsme pak pozorovali vedle vlivu počtu shody a neshody KIR-HLA také efekt jednotlivých KIR se shodou v HLA na přežití bez relapsu, konkrétně u 2DL1. V případě neshody mezi 2DL1 a HLA ligandem bylo přežití pacienta bez relapsu signifikantně delší oproti pacientům, kteří 2DL1-HLA shodu měli. Statisticky signifikantní vliv tohoto efektu na celkové přežití se neprokázal. Roli shody 2DL1 s HLA ligandem popsali Gaafar et al., ti nicméně popisují efekt 2DL1 shody na vyšší riziko rozvoje aGVHD.<sup>213</sup> V našem datasetu sice pacienti se shodou v 2DL1-HLA měli lehce zvýšený výskyt aGVHD, rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní (83 % vs 74 % u pacientů s neshodou).

Nejčtetnějšími alelami genu 2DL1 v kavkazské populaci jsou \*001/\*002, \*003 a \*004.<sup>193</sup> Jak popsali Bari et al., alely \*001, \*002 a \*003 vedou k silnější a dlouhodobější inhibici díky přítomnosti argininu na pozici 245 oproti \*004, která má na této pozici cystein.<sup>214</sup> Naše analýza vlivu KIR se shodným HLA nebyla nicméně provedena na úrovni alel a je třeba zmínit i to, že zatímco alely \*002 a \*003 byly druhá a třetí nejčtetnější v našem vzorku, nejčtetnější byla \*035, což je nejspíše sekvenční chyba a není tak možné říci, zda se místo ní nejednalo o alelu \*004. Na druhou stranu lze záměnu \*004 za \*035 předpokládat, protože takto častá alela se v našem souboru nevyskytovala vůbec, což dává tušit sekvenční chybu. Z pohledu proteinu se alely \*004 a \*035 100% shodují, tudíž má i alela \*035 cystein na pozici 245. Tato alela, přítomná v ¼ vzorků, vede k proteinu se slabší inhibicí, zbývající alely (\*001-003) vedou k silnější inhibici. S ohledem na přítomnost ligandu (shoda 2DL1-HLA) tak došlo u většiny vzorků k silné inhibici NK buněk a tím pravděpodobně nižší GVL, což je spojeno s vyšším rizikem relapsu. Stejný výsledek se ukazuje u celkového přežití, kde ale nedošlo k jeho statistickému průkazu. Silnější inhibice spojená s horší reakcí štěpu proti leukémii a horším celkovým přežitím odpovídá již dříve publikovaným pracím.<sup>211</sup>

## 5.4.2 Vliv polymorfismů NKG2D, MICA a MICB na HSCT

Několika týmy byla popsána role polymorfismů NKG2D ligandů na výsledek HSCT, primárně MICA-129 a MICB-98. Polymorfismus MICA-129 u pacienta hrál roli v rozvoji GVHD a v celkovém přežití. Pacienti s MICA-129 Val/Val měli zvýšené riziko rozvoje cGVHD<sup>148</sup>, což jsme pozorovali i v našem datasetu, kde mělo 43 % homozygotních pacientů s touto alelou aGVHD, na rozdíl od pacientů, kteří měli MICA-129 Met/Met nebo Val/Met, u kterých došlo k rozvoji cGVHD u 22 % z nich. V další studii pak bylo pozorováno lepší celkové přežití u pacientů, kteří měli alespoň jednu alelu MICA-129 Met, a to přesto, že pacienti s oběma alelami MICA-129 Met/Met trpěli častěji aGVHD, ačkoliv u nich byla mortalita spojená s aGVHD nižší.<sup>147</sup> U našich pacientů jsme toto neprokázali, což odpovídá i jiným pracím zaměřených na toto téma.<sup>215, 216</sup>

Byl popsán vliv MICA-129 nejen u pacienta, ale také u dárce. Štěp obsahující alespoň jednu alelu MICA-129 Met měl ve studii Martina et al. vliv na nižší riziko nerelapsové mortality.<sup>216</sup> To se v našich výsledcích neprojevovalo, zato jsme ale objevili polymorfismus MICA-14 mající vliv na celkové přežití v případě přítomnosti u dárce. Pacienti se štěpem od dárce, který měl alespoň jednu alelu MICA-14 Gly, měli signifikantně horší přežití, a to nejen v univariantsní analýze, ale tento efekt byl potvrzen v multivariantsní analýze.<sup>217</sup> Vysvětlení by mohlo ležet v pozici samotného polymorfismu, a to záměně aminokyseliny v doméně  $\alpha 1$ , která se podílí na vazbě k receptoru NKG2D. S ohledem na pozici polymorfismu by mohlo dojít k rozdílné afinitě k receptoru a tím vést k rozdílné reaktivitě NK buněk, jak naznačují Chen s kolektivem.<sup>218</sup> Důležitou roli hraje to, že se jedná o přítomnost polymorfismu na dárcovských lymfocytech, tedy i T lymfocytech. Tyto buňky jsou tak citlivější k zabíjení NK buňkami a štěp tudíž není schopen plnit svou funkci tak, jako kdyby k eliminaci dárcovských lymfocytů nedocházelo.<sup>56</sup>

Vedle role MICA byly zkoumány i polymorfismy a shoda mezi dárce a pacientem v genu MICB.<sup>149</sup> Popsán byl efekt shody MICB-98 mezi dárce a pacientem na výsledek HSCT.<sup>149</sup> Na našich datech nebylo možné tento efekt zkoumat, protože neshoda mezi dárce a pacientem byla v našem souboru pozorována pouze u 5 vzorků, což je nedostatečný počet pro statistickou analýzu. Objevili jsme ale polymorfismus, který by mohl mít vliv na HSCT. Jedná se o polymorfismus vedoucí k záměně aminokyseliny na pozici 58 genu MICB (MICB-58 Lys/Glu) v doméně  $\alpha 1$  MICB proteinu. Efekt jsme na rozdíl od MICA-14, který má roli v dárcovském štěpu, pozorovali při přítomnosti u pacientů. V univariantsní analýze jsme pozorovali u pacientů, kteří měli alespoň jednu alelu MICB-58 Glu, signifikantně vyšší riziko relapsu oproti pacientům bez této alely. Tento výsledek nicméně nebyl potvrzen v multivariantsní analýze, a to nejspíše rozdílem mezi skupinami pacientů, protože větší poměr pacientů s MICB-58 Glu (51 vs 19 %) bylo transplantováno s aktivním onemocněním, které je známo svým negativním vlivem na výsledek transplantace. Stejně jako v případě MICA-14 se jedná o záměnu

aminokyseliny v oblasti zodpovědné za vazbu k receptoru, kde může změna vést k jiné vazbě k receptoru. Použijeme-li logiku popsanou u MICA-129, kde přítomnost alely MICA-129 Met vedla k silnější afinitě k receptoru a silnější, ale kratší reakci NK buněk<sup>148</sup>, a budeme u MICB-58 předpokládat stejnou intenzitu vazby (což by muselo být potvrzeno dalšími experimenty), můžeme u MICB-58 Glu očekávat rovněž kratší reakci NK buněk, která tak vede k horší protinádorové reakci a vyššímu riziku relapsu. To by mohlo vysvětlovat i důvod, proč tito pacienti hůře dosahovali kompletní remise.

Vedle polymorfismů na úrovni ligandů jsme zkoumali i efekt polymorfismů v rámci receptoru NKG2D. Konkrétně polymorfismů vedoucích k HNK haplotypu. V práci Espinozy a kolektivu bylo popsáno, že pacienti, kteří byli transplantováni štěpem s HNK1 dosahovali lepšího přežití<sup>117</sup>, což ale nebylo v naší práci potvrzeno, podobně jako v práci Apithy a kolektivu.<sup>219</sup>

## 6 ZÁVĚRY PRÁCE

Výše uvedená práce je první dosud publikovanou studií zkoumající alelickou distribuci KIR a NKG2D s MICA a MICB v české populaci a popisující vliv polymorfismů MICA-14 a MICB-58 na výsledek alogenní transplantace kmenových buněk. Naše výsledky ukazují vliv přítomnosti MICA-14 Gly v dárcovském štěpu na horší celkové přežití a poukazují na potenciální roli přítomnosti MICB-58 Glu u pacienta s ohledem na časný relaps. Dále jsme pozorovali distribuci alel odpovídající distribuci alel v kavkazské populaci.

Všechny vytýčené cíle práce definované v části CÍLE, HYPOTÉZY A OTÁZKY DIZERTAČNÍ PRÁCE byly splněny:

1. Odpovídá zastoupení jednotlivých alel a polymorfismů jiným populačním studiím provedeným na kavkazské populaci?
  - Na základě sekvenační analýzy (Sangerova sekvenace a NGS) jsme popsali nejčtenější alely genů KIR, MICA, MICB a NKG2D a potvrdili, že výsledky odpovídají dalším studiím.
2. Ovlivňují známé polymorfismy (MICA-129, MICB-98, NKG2D haplotyp) výsledek transplantace?
  - V našem souboru nehrály známé polymorfismy roli, a to ani v případě celkového přežití po HSCT, ani v případě relapsu.
3. Jsme schopní identifikovat zatím neznámé polymorfismy či alely, které ovlivňují výsledek HSCT?
  - Identifikovali jsme dva nové polymorfismy s vlivem na HSCT. Jednak vliv polymorfismu MICA-14 v dárcovském štěpu, který ovlivňoval celkové přežití pacientů, tak i vliv polymorfismu MICB-58 u pacienta, který by mohl vést k časnějšímu relapsu či k horšímu dosažení kompletní remise před samotnou HSCT.
4. Hraje přítomnost inhibičních a/nebo aktivačních KIR, v případě shody s jejich ligandy, roli v HSCT?
  - V této práci jsme potvrdili, že hraje roli počet inhibičních KIR receptorů s přítomným odpovídajícím HLA ligandem jak s ohledem na relaps, tak s ohledem na celkové přežití.
  - V univariantsní analýze jsme sledovali vliv shody 2DL1 s HLA ligandem na relaps.

Získané výsledky by bylo vhodné potvrdit na větším souboru dat, ideálně v multicentrické studii, ve které by bylo možné lépe posoudit vliv jednotlivých polymorfismů a vlivu shody a neshody KIR-HLA na výsledek HSCT. V případě průkazu vlivu daných parametrů by pak bylo možné k nim přihlídnout při výběru optimálního dárce.

## 7 SEZNAM LITERATURY

1. Vakiti A, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
2. Gbenjo JTC, McCrary GLM, Wilson SE. Leukemia: What Primary Care Physicians Need to Know. *Am Fam Physician*. Apr 2023;107(4):397-405.
3. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*. Jul 2019;36:70-87. doi:10.1016/j.blre.2019.04.005
4. Hilgendorf I, Greinix H, Halter JP, Lawitschka A, Bertz H, Wolff D. Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation. *Dtsch Arztebl Int*. Jan 23 2015;112(4):51-8. doi:10.3238/arztebl.2015.0051
5. Grigoropoulos NF, Petter R, Van 't Veer MB, Scott MA, Follows GA. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *Bmj*. Mar 28 2013;346:f1660. doi:10.1136/bmj.f1660
6. Basharat M, Khan SA, Din NU, Ahmed D. Immunophenotypic characterisation of morphologically diagnosed cases of Acute Myeloid Leukaemia (AML). *Pak J Med Sci*. Mar-Apr 2019;35(2):470-476. doi:10.12669/pjms.35.2.614
7. Jordan CT. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*. Mar 2007;20(1):13-8. doi:10.1016/j.beha.2006.10.005
8. Hassan K, Qureshi M, Shafi S, Ikram N, Akhtar MJ. Acute myeloid leukemia-FAB classification and its correlation with clinico-haematological features. *J Pak Med Assoc*. Oct 1993;43(10):200-3.
9. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. Jan 26 2017;129(4):424-447. doi:10.1182/blood-2016-08-733196
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
11. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. Sep 17 2015;373(12):1136-52. doi:10.1056/NEJMra1406184
12. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-1377. doi:10.1182/blood.2022016867
13. Duarte RF, Labopin M, Bader P, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. Oct 2019;54(10):1525-1552. doi:10.1038/s41409-019-0516-2
14. Ferrara F, Vitagliano O. Induction therapy in acute myeloid leukemia: Is it time to put aside standard 3 + 7? *Hematol Oncol*. Dec 2019;37(5):558-563. doi:10.1002/hon.2615
15. Ganapule A, Nemani S, Korula A, et al. Allogeneic Stem Cell Transplant for Acute Myeloid Leukemia: Evolution of an Effective Strategy in India. *Journal of Global Oncology*. 2017;3(6):773-781. doi:10.1200/jgo.2016.006650
16. Armand P, Kim HT, Logan BR, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;123(23):3664-3671. doi:10.1182/blood-2014-01-552984
17. Loke J, Buka R, Craddock C. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Who, When, and How? *Front Immunol*. 2021;12:659595. doi:10.3389/fimmu.2021.659595

18. Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplantation*. 2012;47(6):749-756. doi:10.1038/bmt.2011.110
  19. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012/01/01 2012;481(7382):506-510. doi:10.1038/nature10738
  20. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Publisher Correction: Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*. Aug 2019;572(7770):E19. doi:10.1038/s41586-019-1475-x
  21. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. Feb 22 2021;11(2):41. doi:10.1038/s41408-021-00425-3
  22. Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Survival of patients with acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a center for international blood and marrow transplant research study. *Biol Blood Marrow Transplant*. Mar 2015;21(3):454-9. doi:10.1016/j.bbmt.2014.11.007
  23. 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 Transplant*. Feb 2010;45(2):219-34. doi:10.1038/bmt.2009.141
  24. Giralt S, Bishop MR. Principles and Overview of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Springer US; 2009:1-21.
  25. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139-70. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606
  26. Mehta RS, Olson A, Ponce DM, Shpall EJ. Chapter 107 - Unrelated Donor Cord Blood Transplantation for Hematologic Malignancies. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, et al, eds. *Hematology (Seventh Edition)*. Elsevier; 2018:1633-1649.e4.
  27. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. Feb 28 2007;48(1):11-23. doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11
  28. Lutz CT. Human leukocyte antigen Bw4 and Bw6 epitopes recognized by antibodies and natural killer cells. *Curr Opin Organ Transplant*. Aug 2014;19(4):436-41. doi:10.1097/mot.000000000000103
  29. Biassoni R, Falco M, Cambiaggi A, et al. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med*. Aug 1 1995;182(2):605-9. doi:10.1084/jem.182.2.605
  30. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci*. Feb 22 2018;19(2)doi:10.3390/ijms19020621
  31. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. Jan 8 2020;48(D1):D948-d955. doi:10.1093/nar/gkz950
  32. Oran B, Saliba RM, Carmazzi Y, et al. Effect of nonpermissive HLA-DPB1 mismatches after unrelated allogeneic transplantation with in vivo T-cell depletion. *Blood*. Mar 15 2018;131(11):1248-1257. doi:10.1182/blood-2017-07-798751
  33. Ayuk F, Balduzzi A. Donor Selection for Adults and Pediatrics. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, eds. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer
- Copyright 2019, EBMT and the Author(s). 2019:87-97.
34. Ciurea SO, Bayraktar UD. "No donor"? Consider a haploidentical transplant. *Blood Rev*. Mar 2015;29(2):63-70. doi:10.1016/j.blre.2014.09.009

35. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. The Bidirectional Relationship Between Cytomegalovirus Replication and Graft-Versus-Host Disease - a Retrospective Single Center Study. *Blood*. 2009;114(22):2236-2236. doi:10.1182/blood.V114.22.2236.2236
36. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. Nov 2014;21(6):466-9. doi:10.1097/moh.0000000000000085
37. Vaezi M, Kasaeian A, Souri M, et al. How Do Donor-Recipient CMV Serostatus and Post-Hematopoietic Stem Cell Transplantation CMV Reactivation Affect Outcomes in Acute Leukemia Patients? *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. Jul 1 2017;11(3):199-208.
38. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. Jan 2006;91(1):78-83.
39. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, eds. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer

Copyright 2019, The Editor(s) (if applicable) and The Author(s). 2019.

40. Çiftçiler R, Göker H, Demiroğlu H, et al. Comparison of Myeloablative Versus Reduced-Intensity Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia: A Cohort Study. *Turk J Haematol*. May 3 2019;36(2):88-96. doi:10.4274/tjh.galenos.2019.2018.0220
41. Davulcu EA, Vural F. Immunosuppressive agents in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Transplan*. 2017;
42. Sun W, Mo XD, Zhang XH, et al. Chemotherapy plus DLI for relapse after haploidentical HSCT: the biological characteristics of relapse influences clinical outcomes of acute leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*. Aug 2019;54(8):1198-1207. doi:10.1038/s41409-018-0406-z
43. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507. doi:10.3389/fimmu.2016.00507
44. Ullah MA, Hill GR, Tey SK. Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:144. doi:10.3389/fimmu.2016.00144
45. Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*. Sep 1 2007;110(5):1530-9. doi:10.1182/blood-2006-10-048173
46. Mushtaq MU, Shahzad M, Shah AY, et al. Impact of natural killer cells on outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2022;13:1005031. doi:10.3389/fimmu.2022.1005031
47. Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of Graft-Versus-Host Disease. *Dermatol Clin*. Oct 2019;37(4):569-582. doi:10.1016/j.det.2019.05.014
48. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. Oct 2003;78(3):181-7. doi:10.1007/bf02983793
49. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. Oct 1974;18(4):295-304. doi:10.1097/00007890-197410000-00001
50. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*. Sep 4 2007;2:35. doi:10.1186/1750-1172-2-35
51. Arai S, Margolis J, Zahurak M, Anders V, Vogelsang GB. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(3):155-60. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm11939605
52. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The



- 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(3):389-401.e1. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001
53. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med*. Dec 28 2017;377(26):2565-2579. doi:10.1056/NEJMra1703472
54. Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. *Bone Marrow Transplant*. Nov 2018;53(11):1401-1415. doi:10.1038/s41409-018-0204-7
55. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(4):215-233. doi:10.1053/bbmt.2003.50026
56. Simonetta F, Alvarez M, Negrin RS. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2017;8:465. doi:10.3389/fimmu.2017.00465
57. Pereira MR, Pouch SM, Scully B. *Infections in Allogeneic Stem Cell Transplantation*. Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases. 2018 Dec 8:209-26. doi: 10.1007/978-1-4939-9034-4\_11.
58. Junghanss C, Marr KA, Carter RA, et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):512-20. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm12374456
59. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*. Jun 2010;24(2):257-72. doi:10.1016/j.idc.2010.01.010
60. Nucci M, Andrade F, Vigorito A, et al. Infectious complications in patients randomized to receive allogeneic bone marrow or peripheral blood transplantation. *Transpl Infect Dis*. Dec 2003;5(4):167-73. doi:10.1111/j.1399-3062.2003.00033.x
61. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *MMWR Recomm Rep*. Oct 2000;49(Rr-10):1-125, ce1-7.
62. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. Mar 15 2002;295(5562):2097-100. doi:10.1126/science.1068440
63. Gabrielli S, Ortolani C, del Zotto G, et al. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *Journal of Immunology Research*. 2016/12/19 2016;2016:1376595. doi:10.1155/2016/1376595
64. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. Dec 2013;34(12):573-82. doi:10.1016/j.it.2013.07.005
65. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*. 2005;86:209-39. doi:10.1016/s0065-2776(04)86006-1
66. Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology*. Apr 2008;123(4):575-83. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02730.x
67. Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. *J Immunother*. May 2010;33(4):382-90. doi:10.1097/CJI.0b013e3181cd872d
68. Kiniwa T, Enomoto Y, Terazawa N, et al. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 6 2016;113(36):10139-44. doi:10.1073/pnas.1600112113
69. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Zhang J, Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol*. Aug 2008;69(8):490-500. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.004

70. Senju H, Kumagai A, Nakamura Y, et al. Effect of IL-18 on the Expansion and Phenotype of Human Natural Killer Cells: Application to Cancer Immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2018;14(3):331-340. doi:10.7150/ijbs.22809
71. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood.* Jul 15 2005;106(2):566-71. doi:10.1182/blood-2004-10-4035
72. Agaugué S, Marcenaro E, Ferranti B, Moretta L, Moretta A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* Sep 1 2008;112(5):1776-83. doi:10.1182/blood-2008-02-135871
73. Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs. *PLOS ONE.* 2010;5(8):e11966. doi:10.1371/journal.pone.0011966
74. Lin L, Ma C, Wei B, et al. Human NK cells licensed by killer Ig receptor genes have an altered cytokine program that modifies CD4+ T cell function. *J Immunol.* Jul 15 2014;193(2):940-9. doi:10.4049/jimmunol.1400093
75. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* Aug 4 2005;436(7051):709-13. doi:10.1038/nature03847
76. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev.* Dec 2006;214:130-42. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00460.x
77. Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* Apr 2009;30(4):143-9. doi:10.1016/j.it.2009.01.006
78. Batoni G, Esin S, Favilli F, et al. Human CD56bright and CD56dim Natural Killer Cell Subsets Respond Differentially to Direct Stimulation with Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2005;62(6):498-506. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01692.x
79. Michel T, Poli A, Cuapio A, et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* Apr 1 2016;196(7):2923-31. doi:10.4049/jimmunol.1502570
80. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol.* 2019;10:1812. doi:10.3389/fimmu.2019.01812
81. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Front Immunol.* 2018;9:2796. doi:10.3389/fimmu.2018.02796
82. Brillantes M, Beaulieu AM. Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:102. doi:10.3389/fcimb.2020.00102
83. Gang M, Wong P, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA. Memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy. *Semin Hematol.* Oct 2020;57(4):185-193. doi:10.1053/j.seminhematol.2020.11.003
84. Penack O, Gentilini C, Fischer L, et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia.* May 2005;19(5):835-40. doi:10.1038/sj.leu.2403704
85. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol.* Mar 2018;39(3):222-239. doi:10.1016/j.it.2017.12.001
86. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cellular & Molecular Immunology.* 2019;16(5):430-441. doi:10.1038/s41423-019-0206-4
87. Sim MJW, Rajagopalan S, Altmann DM, Boyton RJ, Sun PD, Long EO. Human NK cell receptor KIR2DS4 detects a conserved bacterial epitope presented by HLA-C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 25 2019;116(26):12964-12973. doi:10.1073/pnas.1903781116
88. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:909. doi:10.3389/fimmu.2019.00909
89. Sivori S, Vitale M, Morelli L, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* Oct 6 1997;186(7):1129-36. doi:10.1084/jem.186.7.1129

90. Campbell KS, Yusa S-i, Kikuchi-Maki A, Catina TL. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *The Journal of Immunology*. 2004;172(2):899-906.
91. Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(12):2065-2072.
92. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. Feb 4 2002;195(3):343-51. doi:10.1084/jem.20011149
93. Ghadially H, Horani A, Glasner A, et al. NKp46 regulates allergic responses. *Eur J Immunol*. Nov 2013;43(11):3006-16. doi:10.1002/eji.201343388
94. Yu H, Tian Y, Wang Y, Mineishi S, Zhang Y. Dendritic Cell Regulation of Graft-Vs.-Host Disease: Immunostimulation and Tolerance. *Front Immunol*. 2019;10:93. doi:10.3389/fimmu.2019.00093
95. Ghadially H, Ohana M, Elboim M, et al. NK cell receptor NKp46 regulates graft-versus-host disease. *Cell Rep*. Jun 26 2014;7(6):1809-14. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.011
96. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*. Jan 1 2007;109(1):323-30. doi:10.1182/blood-2005-08-027979
97. Chretien AS, Devillier R, Fauriat C, et al. NKp46 expression on NK cells as a prognostic and predictive biomarker for response to allo-SCT in patients with AML. *Oncoimmunology*. 2017;6(12):e1307491. doi:10.1080/2162402x.2017.1307491
98. Borrego F, Masilamani M, Marusina AI, Tang X, Coligan JE. The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res*. 2006;35(3):263-78. doi:10.1385/ir:35:3:263
99. Kim DK, Kabat J, Borrego F, Sanni TB, You CH, Coligan JE. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol*. May 2004;41(1):53-62. doi:10.1016/j.molimm.2004.01.004
100. Creelan BC, Antonia SJ. The NKG2A immune checkpoint — a new direction in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019/05/01 2019;16(5):277-278. doi:10.1038/s41571-019-0182-8
101. Machuldova A, Holubova M, Caputo VS, et al. Role of Polymorphisms of NKG2D Receptor and Its Ligands in Acute Myeloid Leukemia and Human Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:651751. doi:10.3389/fimmu.2021.651751
102. Brooks AG, Borrego F, Posch PE, et al. Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol*. Jan 1 1999;162(1):305-13.
103. Michaëlsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Kärre K, Söderström K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med*. Dec 2 2002;196(11):1403-14. doi:10.1084/jem.20020797
104. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo j*. Aug 2 1999;18(15):4250-60. doi:10.1093/emboj/18.15.4250
105. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol*. Mar 1 2005;174(5):2878-84. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2878
106. Orbelyan GA, Tang F, Sally B, et al. Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol*. Jul 15 2014;193(2):610-6. doi:10.4049/jimmunol.1400556
107. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. Jun 1998;8(6):693-701. doi:10.1016/s1074-7613(00)80574-9

108. Bellón T, Heredia AB, Llano M, et al. Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol.* Apr 1 1999;162(7):3996-4002.
109. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol.* Jun 2003;4(6):557-64. doi:10.1038/ni929
110. Dukovska D, Fernández-Soto D, Valés-Gómez M, Reyburn HT. NKG2H-Expressing T Cells Negatively Regulate Immune Responses. *Front Immunol.* 2018;9:390. doi:10.3389/fimmu.2018.00390
111. Huang H, Wang X, Zhang Y, Zheng X, Wei H, Sun R. Up-regulation of NKG2F receptor, a functionally unknown killer receptor, of human natural killer cells by interleukin-2 and interleukin-15. *Oncol Rep.* Oct 2010;24(4):1043-8. doi:10.3892/or.2010.1043
112. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica.* Oct 2009;94(10):1427-34. doi:10.3324/haematol.2009.008318
113. Wolan DW, Teyton L, Rudolph MG, et al. Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å. *Nat Immunol.* Mar 2001;2(3):248-54. doi:10.1038/85311
114. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity.* Jul 2002;17(1):19-29. doi:10.1016/s1074-7613(02)00333-3
115. 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.* Aug 1998;48(3):163-73. doi:10.1007/s002510050420
116. 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 Res.* Jan 1 2006;66(1):563-70. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-2776
117. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *haematologica.* 2009;94(10):1427.
118. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev.* Feb 2009;5(1):22-34. doi:10.2174/157339509787314369
119. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* Jul 2001;22(7):378-85. doi:10.1016/s1471-4906(01)01960-3
120. Gojo I, Beumer JH, Pratz KW, et al. A Phase 1 Study of the PARP Inhibitor Veliparib in Combination with Temozolomide in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* Feb 1 2017;23(3):697-706. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-16-0984
121. Chandhok NS, Wei W, Bindra R, et al. The PRIME Trial: PARP inhibition in IDH mutant effectiveness trial. A phase II study of olaparib in isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2019;134:3909.
122. Kohl V, Flach J, Naumann N, et al. Antileukemic Efficacy in Vitro of Talazoparib and APE1 Inhibitor III Combined with Decitabine in Myeloid Malignancies. *Cancers (Basel).* Oct 3 2019;11(10)doi:10.3390/cancers11101493
123. Baer MR, Kogan AA, Bentzen SM, et al. Phase I Clinical Trial of DNA Methyltransferase Inhibitor Decitabine and PARP Inhibitor Talazoparib Combination Therapy in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* Apr 1 2022;28(7):1313-1322. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-21-3729

124. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, et al. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol*. Sep 2008;9(9):1065-73. doi:10.1038/ni.1642
125. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, et al. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res*. Jan 15 2012;72(2):460-71. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-1977
126. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol*. Jul 15 2004;173(2):1078-84. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1078
127. Zöller T, Wittenbrink M, Hoffmeister M, Steinle A. Cutting an NKG2D Ligand Short: Cellular Processing of the Peculiar Human NKG2D Ligand ULBP4. *Front Immunol*. 2018;9:620. doi:10.3389/fimmu.2018.00620
128. Vyas M, Reinartz S, Hoffmann N, et al. Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncoimmunology*. 2017;6(9):e1339854. doi:10.1080/2162402x.2017.1339854
129. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer*. Feb 1 2006;118(3):684-7. doi:10.1002/ijc.21382
130. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*. Aug 1 2008;68(15):6368-76. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-6768
131. Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol*. Apr 1 2010;184(7):3346-50. doi:10.4049/jimmunol.0903789
132. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol*. Aug 2013;78(2):120-9. doi:10.1111/sji.12072
133. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res*. Jan 15 2010;70(2):481-9. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-1688
134. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem J*. Sep 1 2013;454(2):295-302. doi:10.1042/bj20130194
135. Thomas M, Wills M, Lehner PJ. Natural killer cell evasion by an E3 ubiquitin ligase from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochem Soc Trans*. Jun 2008;36(Pt 3):459-63. doi:10.1042/bst0360459
136. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev*. May 2010;235(1):267-85. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00893.x
137. Nice TJ, Coscoy L, Raulet DH. Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J Exp Med*. Feb 16 2009;206(2):287-98. doi:10.1084/jem.20081335
138. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol*. 2000;76:1-60. doi:10.1016/s0065-2776(01)76018-x
139. Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, et al. Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet*. Feb 2002;29(1):35-46. doi:10.1046/j.0960-7420.2001.00275.x
140. Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, et al. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics*. Jan 2002;79(1):114-23. doi:10.1006/geno.2001.6673
141. Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev*. Sep 2015;267(1):88-116. doi:10.1111/imr.12328

142. Cox ST, Arrieta-Bolaños E, Pessoa S, Vullo C, Madrigal JA, Saudemont A. RAET1/ULBP alleles and haplotypes among Kolla South American Indians. *Hum Immunol*. Jun 2013;74(6):775-82. doi:10.1016/j.humimm.2013.01.030
143. Carapito R, Jung N, Kwemou M, et al. Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood*. Oct 13 2016;128(15):1979-1986. doi:10.1182/blood-2016-05-719070
144. Parmar S, Del Lima M, Zou Y, et al. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. Oct 1 2009;114(14):2884-7. doi:10.1182/blood-2009-05-223172
145. Fuerst D, Neuchel C, Niederwieser D, et al. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. Dec 29 2016;128(26):3169-3176. doi:10.1182/blood-2016-05-716357
146. Abdelhakim H, Abdel-Azim H, Saad A. Role of  $\alpha\beta$  T Cell Depletion in Prevention of Graft versus Host Disease. *Biomedicines*. Jun 26 2017;5(3)doi:10.3390/biomedicines5030035
147. Isernhagen A, Malzahn D, Viktorova E, et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med*. Nov 2015;7(11):1480-502. doi:10.15252/emmm.201505246
148. Boukouaci W, Busson M, Peffault de Latour R, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. Dec 10 2009;114(25):5216-24. doi:10.1182/blood-2009-04-217430
149. Carapito R, Aouadi I, Pichot A, et al. Compatibility at amino acid position 98 of MICB reduces the incidence of graft-versus-host disease in conjunction with the CMV status. *Bone Marrow Transplant*. Jul 2020;55(7):1367-1378. doi:10.1038/s41409-020-0886-5
150. Antoun A, Vekaria D, Salama RA, et al. The genotype of RAET1L (ULBP6), a ligand for human NKG2D (KLRK1), markedly influences the clinical outcome of allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. Dec 2012;159(5):589-98. doi:10.1111/bjh.12072
151. Long EO, Colonna M, Lanier LL. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. *Immunol Today*. Feb 1996;17(2):100. doi:10.1016/0167-5699(96)80590-1
152. Dębska-Zielkowska J, Moszkowska G, Zieliński M, et al. KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease. *Cells*. Jul 14 2021;10(7)doi:10.3390/cells10071777
153. Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179. doi:10.3389/fimmu.2019.01179
154. Oevermann L, Michaelis SU, Mezger M, et al. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood*. Oct 23 2014;124(17):2744-7. doi:10.1182/blood-2014-03-565069
155. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol*. Nov 1 2002;169(9):5118-29. doi:10.4049/jimmunol.169.9.5118
156. Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, et al. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol*. Jan 2007;37(1):199-211. doi:10.1002/eji.200636316
157. VandenBussche CJ, Dakshanamurthy S, Posch PE, Hurley CK. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *J Immunol*. Oct 15 2006;177(8):5347-57. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5347
158. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*. Dec 15 2003;171(12):6640-9. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6640

159. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol*. Mar 1 2001;166(5):2992-3001. doi:10.4049/jimmunol.166.5.2992
160. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol*. Oct 15 2005;175(8):5222-9. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5222
161. Impola U, Turpeinen H, Alakulppi N, et al. Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients. *Front Immunol*. 2014;5:405. doi:10.3389/fimmu.2014.00405
162. Shaffer BC, Hsu KC. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol*. Dec 2016;29(4):351-358. doi:10.1016/j.beha.2016.10.010
163. Bari R, Rujkijyanont P, Sullivan E, et al. Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. Oct 20 2013;31(30):3782-90. doi:10.1200/jco.2012.47.4007
164. Bari R, Bell T, Leung WH, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine 245. *Blood*. Dec 10 2009;114(25):5182-90. doi:10.1182/blood-2009-07-231977
165. Anfossi N, André P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. Aug 2006;25(2):331-42. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
166. Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, et al. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. Jul 10 2017;35(20):2268-2278. doi:10.1200/jco.2016.70.7059
167. Shaffer BC, Heller G, Le Luduec J-B, et al. Selection of Unrelated Allogeneic Hematopoietic Cell Donors Based on KIR3DL1 Allotypes Is Feasible and Results in Improved Disease-Free Survival in Transplant Recipients with MDS and AML. *Blood*. 2016;128(22):990-990. doi:10.1182/blood.V128.22.990.990
168. Shaffer BC, Le Luduec J-B, Park S, et al. Prospective KIR genotype evaluation of hematopoietic cell donors is feasible with potential to benefit patients with AML. *Blood Advances*. 2021;5(7):2003-2011. doi:10.1182/bloodadvances.2020002701
169. Dubreuil L, Maniangou B, Chevallier P, et al. Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers (Basel)*. Dec 1 2020;12(12)doi:10.3390/cancers12123595
170. Becker PS, Suck G, Nowakowska P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. Apr 2016;65(4):477-84. doi:10.1007/s00262-016-1792-y
171. Kärre K. A Perfect Mismatch. *Science*. 2002;295(5562):2029-2031. doi:10.1126/science.1070538
172. Heidenreich S, Kröger N. Reduction of Relapse after Unrelated Donor Stem Cell Transplantation by KIR-Based Graft Selection. *Front Immunol*. 2017;8:41. doi:10.3389/fimmu.2017.00041
173. Symons HJ, Fuchs EJ. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. *Bone Marrow Transplant*. Sep 2008;42(6):365-77. doi:10.1038/bmt.2008.215
174. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110(1):433-440. doi:10.1182/blood-2006-07-038687
175. Chewing JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol*. Jul 15 2007;179(2):854-68. doi:10.4049/jimmunol.179.2.854

176. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. Jun 15 2005;105(12):4878-84. doi:10.1182/blood-2004-12-4825
177. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. Aug 1 2003;102(3):814-9. doi:10.1182/blood-2003-01-0091
178. Wanquet A, Bramanti S, Harbi S, et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell-Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. Mar 2018;24(3):549-554. doi:10.1016/j.bbmt.2017.11.042
179. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. Mar 15 2005;105(6):2594-600. doi:10.1182/blood-2004-04-1441
180. Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood*. Apr 1 2004;103(7):2860-1; author reply 2862. doi:10.1182/blood-2003-11-3893
181. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. Aug 2005;19(8):1446-51. doi:10.1038/sj.leu.2403839
182. Mullighan CG, Petersdorf EW. Genomic Polymorphism and Allogeneic Hematopoietic Transplantation Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006;12(1):19-27. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.014
183. Weisdorf D, Cooley S, Wang T, et al. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv*. Feb 25 2020;4(4):740-754. doi:10.1182/bloodadvances.2019001053
184. Maniangu B, Legrand N, Alizadeh M, et al. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front Immunol*. 2017;8:547. doi:10.3389/fimmu.2017.00547
185. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. Sep 1999;9(9):868-77. doi:10.1101/gr.9.9.868
186. Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. Oct 11 2011;7:539. doi:10.1038/msb.2011.75
187. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, team tU. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
188. Edgar RC. MUSCLE v5 enables improved estimates of phylogenetic tree confidence by ensemble bootstrapping. *bioRxiv*. 2021:2021.06.20.449169. doi:10.1101/2021.06.20.449169
189. Faridi RM, Agrawal S. Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA-C allorecognition patterns implicative of dominant activation of natural killer cells contribute to recurrent miscarriages. *Hum Reprod*. Feb 2011;26(2):491-7. doi:10.1093/humrep/deq341
190. *R: A language and environment for statistical computing*. . 2018. <https://www.R-project.org/>
191. Alicata C, Pende D, Meazza R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: Improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *European Journal of Immunology*. 2016;46(6):1511-1517. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.201546236>
192. Amorim LM, Augusto DG, Nemat-Gorgani N, et al. High-Resolution Characterization of KIR Genes in a Large North American Cohort Reveals Novel Details of Structural and Sequence Diversity. *Front Immunol*. 2021;12:674778. doi:10.3389/fimmu.2021.674778



193. Wagner I, Schefzyk D, Pruschke J, et al. Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front Immunol.* 2018;9:2843. doi:10.3389/fimmu.2018.02843
194. Tao S, He Y, Kichula KM, et al. High-Resolution Analysis Identifies High Frequency of KIR-A Haplotypes and Inhibitory Interactions of KIR With HLA Class I in Zhejiang Han. *Front Immunol.* 2021;12:640334. doi:10.3389/fimmu.2021.640334
195. Nemat-Gorgani N, Edinur HA, Hollenbach JA, et al. KIR diversity in Māori and Polynesians: populations in which HLA-B is not a significant KIR ligand. *Immunogenetics.* Nov 2014;66(11):597-611. doi:10.1007/s00251-014-0794-1
196. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* Mar 20 2006;203(3):633-45. doi:10.1084/jem.20051884
197. Nemat-Gorgani N, Guethlein LA, Henn BM, et al. Diversity of KIR, HLA Class I, and Their Interactions in Seven Populations of Sub-Saharan Africans. *J Immunol.* May 1 2019;202(9):2636-2647. doi:10.4049/jimmunol.1801586
198. Klussmeier A, Massalski C, Putke K, et al. High-Throughput MICA/B Genotyping of Over Two Million Samples: Workflow and Allele Frequencies. *Front Immunol.* 2020;11:314. doi:10.3389/fimmu.2020.00314
199. Field SF, Nejentsev S, Walker NM, et al. Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes. *Diabetes.* Jun 2008;57(6):1753-6. doi:10.2337/db07-1402
200. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, et al. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics.* Jul 1999;49(7-8):620-8. doi:10.1007/s002510050658
201. Zhang Y, Han M, Vorhaben R, Giang C, Lavingia B, Stastny P. Study of MICA alleles in 201 African Americans by multiplexed single nucleotide extension (MSNE) typing. *Hum Immunol.* Jan 2003;64(1):130-6. doi:10.1016/s0198-8859(02)00743-7
202. von Linsingen R, Pinho de França P, de Carvalho NS, Bicalho MDG. MICA and KLRK1 genes and their impact in cervical intraepithelial neoplasia development in the southern Brazilian population. *Hum Immunol.* May 2020;81(5):249-253. doi:10.1016/j.humimm.2020.02.007
203. Seidel E, Dassa L, Schuler C, et al. The human cytomegalovirus protein UL147A downregulates the most prevalent MICA allele: MICA\*008, to evade NK cell-mediated killing. *PLoS Pathog.* May 2021;17(5):e1008807. doi:10.1371/journal.ppat.1008807
204. López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, et al. MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology (Oxford).* Mar 2007;46(3):426-30. doi:10.1093/rheumatology/kel331
205. Jumnainsong A, Jearanaikoon P, Khahmahpahte S, et al. Associations of MICB with cervical cancer in north-eastern Thais: identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation. *Clin Exp Immunol.* Aug 2008;153(2):205-13. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03682.x
206. Ouni N, Ben Chaaben A, Kablouti G, et al. MICA-129Met/Val Polymorphism Is Associated with Early-Onset Breast Cancer Risk. *Immunol Invest.* Aug 2017;46(6):603-614. doi:10.1080/08820139.2017.1336175
207. Vazquez-Gonzalez WG, Martinez-Alvarez JC, Arrazola-Garcia A, Perez-Rodriguez M. Haplotype block 1 variant (HB-1v) of the NKG2 family of receptors. *Hum Immunol.* Oct 2019;80(10):842-847. doi:10.1016/j.humimm.2019.07.276
208. Mancusi A, Ruggeri L, Urbani E, et al. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2015;125(20):3173-3182.
209. Yahng S-A, Jeon Y-W, Yoon J-H, et al. Negative Impact of Unidirectional Host-versus-Graft Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Ligand Mismatch on Transplantation Outcomes after

- Unmanipulated Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(2):316-323.
210. Shimoni A, Labopin M, Lorentino F, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatching and outcome after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Leukemia*. 2019;33(1):230-239.
211. Gao F, Ye Y, Gao Y, Huang H, Zhao Y. Influence of KIR and NK Cell Reconstitution in the Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:2022. doi:10.3389/fimmu.2020.02022
212. Bakhtiari T, Ahmadvand M, Yaghmaie M, et al. Investigation of KIR/HLA relationship and other clinical variables after T-cell-replete haploidentical bone marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *BMC Immunology*. 2023/06/20 2023;24(1):10. doi:10.1186/s12865-023-00548-1
213. Gaafar A, Sheereen A, Almohareb F, et al. Prognostic role of KIR genes and HLA-C after hematopoietic stem cell transplantation in a patient cohort with acute myeloid leukemia from a consanguineous community. *Bone Marrow Transplant*. Sep 2018;53(9):1170-1179. doi:10.1038/s41409-018-0123-7
214. Bari R, Bell T, Leung W-H, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(25):5182-5190.
215. Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1991;51(6):1197-1202.
216. Martin PJ, Levine DM, Storer BE, Nelson SC, Dong X, Hansen JA. Recipient and donor genetic variants associated with mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv*. Jul 28 2020;4(14):3224-3233. doi:10.1182/bloodadvances.2020001927
217. Machuldova A, Houdova L, Kratochvilova K, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms in MICA and MICB Genes Could Play a Role in the Outcome in AML Patients after HSCT. *J Clin Med*. Oct 9 2021;10(20)doi:10.3390/jcm10204636
218. Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*. 2014;35(12):2633-2642.
219. Apithy M-J, Charbonnier A, Desoutter J, et al. Impact of MICA and NKG2D polymorphisms in HLA-fully matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2018;53(7):918-922.

## 8 PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu Mgr. Pavlu Pitulemu, PhD. za jeho konzultace a speciálně pro jeho podporu, když jsem za ním přišla s plánem napsat článek do mého oblíbeného časopisu *Frontiers in Immunology*. Neodrazoval mě od náročného úkolu a pustil se se mnou do projektu s nadšením, díky čemuž jsme tohoto úspěchu dosáhli. Na stejném místě bych chtěla poděkovat i konzultantce Mgr. Monice Holubové, PhD., která mi byla rádcem a podporou při otázkách k transplantacím, imunologii a která vždy trvala na tom, že text musí vždy o něco lepší, než byl původně. Poděkování ale patří také všem mým spoluautorům článků, kteří se z velké části podíleli na laboratorní práci a také na přípravě analýz. Takto velký projekt bych ale nedokázala nejen dokončit, ale ani začít bez podpory mých nejbližších a rodiny, kde největší díky patří Janu Machuldovi za to, jak se mnou všechno přestál.

Na závěr děkuji finanční podpoře mého výzkumu, která byla čerpána z grantu NV18-03-00277 Ministerstva Zdravotnictví ČR.

## 9 SEZNAM PŘÍLOH

### 9.1 Data

**Příloha 1:** Porovnání nejčastějších alel v našem datasetu se dvěma největšími studii na kavkazské populaci

### 9.2 Přehledové publikace

#### Příloha I:

Machuldova A, Holubova M, Caputo VS, Cedikova M, Jindra P, Houdova L and Pitule P (2021) Role of Polymorphisms of NKG2D Receptor and Its Ligands in Acute Myeloid Leukemia and Human Stem Cell Transplantation. Front. Immunol. 12:651751. IF 2021: 7.97 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651751>

#### Příloha II:

Machuldova A, Pitule P, Dekojova T, Jindra P, Holubova M (04/2023) Význam receptorů NK buněk u alogenních transplantací krvetvorných buněk u pacientů s akutní myeloidní leukémií. [Role of NK cell receptors in allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia]. Transfuze Hematol. dnes.

### 9.3 Původní práce

#### Příloha III:

Machuldova A, Houdova L, Kratochvilova K, Leba M, Jindra P, Ostasov P, Maceckova D, Klieber R, Gmucova H, Sramek J and Holubova M (2021). Single-Nucleotide Polymorphisms in MICA and MICB Genes Could Play a Role in the Outcome in AML Patients after HSCT. Journal of clinical medicine, 10(20), 4636. IF 2021: 4.964 <https://doi.org/10.3390/jcm10204636>

# 10 PŘÍLOHY

## 10.1 Data – příloha 1

Gen	3 nejčtenější alely dle Amorim et al.	3 nejčtenější alely dle Wagner et al. (rozpětí výskytu)	3 nejčtenější alely v našem vzorku	3 nejčtenější alely v japonské populaci dle Yawata et al.
2DL1	*003 *002 *004	*003/*034 (30-40 %) *001/*002 (30-40 %) *004 (10-20 %)	*035 (25 %) *003 (24 %) *002 (22 %)	*003 (90 %) *002 (7 %) *004 (1 %)
2DL2	*001 *003	*001 (50-60 %) *003 (40-50 %) *001/*002 (0-10 %)	*009 (30 %)	*003 (4 %) *001 (2 %)
2DL3	*001 *002 *005	*001 (50-60 %) *002 (30-40 %) *005 (0-10 %)	*030 (4 %)	*001 (87 %) *002 (4 %) *007 (2 %)
2DL4	*005 *008 *001	*008 (25-35 %) *001 (25-35 %) *005 (20-25 %)	*008 (65 %) *001 (43 %) *005 (40 %)	*001 (45 %) *005 (17 %) *011/*006 (obě 13 %)
2DL5A	*001 *005	*005 (nelze určit) *001 (nelze určit)	*001 (26 %) *005 (23 %)	*001 (11 %) *005 (5 %)
2DL5B	*002	*002 (nelze určit)	*002 (32 %) *008 (10 %)	*002 (3 %)
2DS1	*002	*002 (55-65 %) NEW (20-25 %) *006 (5-15 %)	*006 (24 %) *013 (12 %)	*002
2DS2	*001	*001 (75 %)	*001 (52 %)	*001
2DS3	*001	*001 (60-75 %)	*001 (33 %)	*002
2DS4	*001 *003 *010	*001/*017 (25 %) *003 (20-25 %) *006 (20-25 %)	*003 (30 %) *001 (29 %) *006 (21 %)	*001 (50 %) *004 (13 %) *007 (13 %)
3DL1	*001 *004 *005	*001 (15-25 %) *005 (15-25 %) *004 (15-25 %)	*015 (24 %) *004 (22 %) *002 (19 %)	*015 (46 %) *007 (13 %) *005 (13 %)
3DL2	*007 *002 *001	*001 (20-25 %) *007 (15-25 %) *002 (15-25 %)	*001 (39 %) *007 (31 %) *002 (28 %)	*002 (46 %) *010 (12 %) *007 (12 %)
3DL3	*001 *003 *009	*001 (10-25 %) *003 (10-25 %) *009 (10-20 %)	*001 (38 %) *009 (23 %) *003 (21 %)	Chybí
3DS1	*013	*013 (95-100 %)	*013 (39 %)	*013 (17 %)

Tabulka I – Srovnání a procentuální zastoupení nejčtenějších alel v našem datasetu oproti dvěma největším studiím na kavkazské populaci od Amorim, Wagner a pro srovnání s jinou populací přidány alely japonské populace od Yawata.<sup>192, 193, 196</sup> Shoda s naším výsledkem je vyznačena tučně (bez ohledu na pořadí). Rozdíly

v procentech je možné vysvětlit rozdílnou metodikou pro určování alel i rozdílnou metodikou výpočtu frekvence. V práci Amorim et al. není frekvence jednotlivých alel v procentech uvedena.

## **10.2 Přehledové a původní práce**



# Role of Polymorphisms of NKG2D Receptor and Its Ligands in Acute Myeloid Leukemia and Human Stem Cell Transplantation

Alena Machuldova<sup>1\*</sup>, Monika Holubova<sup>1,2</sup>, Valentina S. Caputo<sup>3,4</sup>, Miroslava Cedikova<sup>1</sup>, Pavel Jindra<sup>2</sup>, Lucie Houdova<sup>5</sup> and Pavel Pitule<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tumor Biology and Immunotherapy, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czechia, <sup>2</sup>Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czechia, <sup>3</sup>Hugh & Josseline Langmuir Center for Myeloma Research, Center for Hematology, Department of Immunology and Inflammation, Imperial College London, London, United Kingdom, <sup>4</sup>Cancer Biology and Therapy Laboratory, School of Applied Sciences, London South Bank University, London, United Kingdom, <sup>5</sup>NTIS, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Pilsen, Czechia, <sup>6</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czechia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Mar Vales-Gomez,  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC), Spain

### Reviewed by:

Ralf Dressel,  
University Medical Center  
Göttingen, Germany  
Fátima Solana,  
University of Cordoba, Spain

### \*Correspondence:

Alena Machuldova  
alena.machuldova@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
NK and Innate Lymphoid Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 10 January 2021

**Accepted:** 15 March 2021

**Published:** 30 March 2021

### Citation:

Machuldova A, Holubova M,  
Caputo VS, Cedikova M, Jindra P,  
Houdova L and Pitule P (2021) Role of  
Polymorphisms of NKG2D Receptor  
and Its Ligands in Acute Myeloid  
Leukemia and Human Stem  
Cell Transplantation.  
Front. Immunol. 12:651751.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.651751

Natural killer cells possess key regulatory function in various malignant diseases, including acute myeloid leukemia. NK cell activity is driven by signals received through ligands binding activating or inhibitory receptors. Their activity towards elimination of transformed or virally infected cells can be mediated through MICA, MICB and ULBP ligands binding the activating receptor NKG2D. Given the efficiency of NK cells, potential target cells developed multiple protecting mechanisms to overcome NK cells killing on various levels of biogenesis of NKG2D ligands. Targeted cells can degrade ligand transcripts via microRNAs or modify them at protein level to prevent their presence at cell surface via shedding, with added benefit of shed ligands to desensitize NKG2D receptor and avert the threat of destruction via NK cells. NK cells and their activity are also indispensable during hematopoietic stem cell transplantation, crucial treatment option for patients with malignant disease, including acute myeloid leukemia. Function of both NKG2D and its ligands is strongly affected by polymorphisms and particular allelic variants, as different alleles can play variable roles in ligand-receptor interaction, influencing NK cell function and HSCT outcome differently. For example, role of amino acid exchange at position 129 in MICA or at position 98 in MICB, as well as the role of other polymorphisms leading to different shedding of ligands, was described. Finally, match or mismatch between patient and donor in NKG2D ligands affect HSCT outcome. Having the information beyond standard HLA typing prior HSCT could be instrumental to find the best donor for the patient and to optimize effects of treatment by more precise patient-donor match. Here, we review recent research on the NKG2D/NKG2D ligand biology, their regulation, description of their polymorphisms across the populations of patients with AML and the influence of particular polymorphisms on HSCT outcome.

**Keywords:** natural killer group 2 member D, MICA, MICB, ULBP, hematopoietic stem cell transplant, acute myeloid leukemia, polymorphism



## INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is an aggressive malignancy originated from a myeloid lineage of bone marrow cells with median overall survival of 8.5 months and 24% 5-year overall survival according to National Cancer Institute in the USA (1, 2). Most patients with AML achieve complete remission after chemotherapy treatment, but relapse is almost inevitable and often indicates the appearance of treatment-resistant clones (3). Carrying specific gene mutations enable drug-resistance, survival, and uncontrolled proliferation. However, for the disease progression, AML cells also need to escape immune system control. Healthy immunosurveillance should eliminate AML cells by using two main effector cells types that play pivotal and complementary role in this mechanism - T lymphocytes and natural killer (NK) cells. Unlike T cells, whose function depends on the recognition of "non-self" peptides presented on HLA molecules, NK cells recognize cells with or without the altered level of HLA molecules and thus can recognize transformed cells that hide these molecules as a mechanism of escape T-cells (4). Besides direct attack targeted to transformed cells, NK cells also compete with myeloid leukemic blasts to colonize the bone marrow niche and to adhere to bone marrow fibroblasts, preventing myeloid blasts from proliferation (5).

Interaction between AML and NK cells exists in both directions, as AML cells use multiple mechanisms to protect themselves, including modification of NK cells in patients. Individuals with AML have low levels of cytotoxic NK cells, usually combined with decreased expression levels of activating receptors, for example, NKp46 (6), NKp30 (7), NKG2D (6) or DNAM-1 (8, 9). In contrast, inhibitory receptors tend to be increased, for example a decreased DNAM-1 is being associated with increased expression of inhibitory receptors TIGIT and/or TACTILE (9). Another inhibitory receptors implicated in NK cells' tolerance to the AML blasts are inhibitory KIR, NKG2A, CD158b, and LIR-1 (6, 10). In addition, AML cells express a high amount of soluble activating receptors' ligands responsible for NK cells silencing through downregulation of their receptors by chronic exposure causing exhaustion of NK cells (11).

To overcome immunosurveillance impairment caused by malignant cells, hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) is an essential treatment option for patients with relapsed AML. NK cells have a crucial role in the success of HSCT by affecting host, graft, and residual leukemic cells. The graft-versus-leukemia (GvL) effect of NK cells was already described in 1986 (12). In addition, NK cells decrease the incidence of graft-versus-host disease (GvHD) by reduction of antigen-presenting cells, and elimination of host T cells, preventing graft rejection (13).

To take full advantage of their potential, it is crucial to understand the mechanisms of ligand-receptor functions and to know better the parameters, which can influence the outcome of HSCT. Balance of NK cells reactivity depends on the combination of signals transduced from inhibitory and activating receptors and their ligands present on "examined" cells. Main and broadly investigated inhibitory and activating receptors of NK cells are KIR receptors which recognize HLA

class I-bearing targets, while activating natural cytotoxic receptors (NCR), namely NKp30, NKp44 and NKp46, DNAM-1 and NKG2D recognize non-HLA molecules and ligands expressed *de novo* on "stressed" cells (14–17).

This review focuses on activating NKG2D receptor, its ligands, their regulation, and on the role of their polymorphism in AML patients and dependency of the polymorphism of NKG2D and its ligands on HSCT outcome.

## NKG2D RECEPTOR

NKG2D (encoded by the *KLRK1* gene – killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1) is a C-type lectin receptor present on the surface of natural killer (NK) cells,  $\gamma\delta$  T cells, CD8+ T cells and CD4+ T cells (18–20).

*KLRK1* is composed of 10 exons (exons 1A, 1B, and 2–9) and 9 introns, with exons 2–4 encoding intracellular/transmembrane domain and exons 5–9 encoding the ligand-binding outer domain, which is exposed into the extracellular space (21).

NKG2D receptor recognizes and binds multiple ligand families, and upon ligand's engagement it interacts with adapter dimer DAP10, which triggers activation signal leading to cell-mediated cytotoxicity (degranulation), co-stimulation of cytokine production, playing an important role in the tumorous and infected cells elimination (18, 22, 23).

Although *NKG2D* shows strong evolutionary conservation, two different haplotype blocks have been described. Haplotype block Hb-1 contains two alleles called *LNK1* (low-activity related) and *HNK1* (high-activity related), in three haplotype combinations – *LNK1/LNK1*, *HNK1/HNK1*, and *LNK1/HNK1*. For haplotype block Hb-2, the situation is similar with haplotypes containing *LNK2* and *HNK2* alleles (24).

From a clinical perspective, *HNK1/HNK1* and *HNK2/HNK2* haplotypes seem to be associated with lower cancer risk than *LNK1/LNK1* and *LNK2/LNK2*, respectively (24). NKG2D receptor haplotypes also show a significant impact on transplantation outcomes. Patients with standard-risk hematology malignancy (AML and acute lymphoblastic leukemia, ALL in first complete remission, malignant lymphoma in complete remission, chronic myeloid leukemia, CLL in chronic phase and any status of a myelodysplastic syndrome) undergoing HSCT with *HNK1* haplotype donor have lower transplantation-related mortality and better overall survival (difference in 5-year overall survival of 73% vs. 49%,  $p=0.01$ ) (18). NKG2D haplotype also represents a candidate biomarker for the prediction of treatment-free remission, described currently in patients with CML treated by dasatinib, where patients with *HNK1/HNK1* haplotype achieved molecular response faster than patients with other haplotypes (25).

As mentioned in the *Introduction*, AML cells can modify the expression of activating receptor of NK cells, including the NKG2D receptor, as described by Hilpert et al. in 2012 (26). Khaznadar and colleagues investigated AML patients, dividing them into two groups according to clinical outcome. The group with deficient NK cell profile (NK-DP), reduced expression of



NKG2D, DNAX accessory molecule-1, Nkp46 and IFN- $\gamma$  had a higher risk of relapse, while the group with NK cell-high profile (NK-HP) had a significantly lower risk of relapse and better median overall survival (HR 0.66, 95% CI 0.44-0.99) (27).

## NKG2D LIGAND

NKG2D ligands in human can be divided into two families - MIC (MHC class I-related chain) family and ULBP/RAET (HCMV Unique Long 16-binding protein/Retinoic acid early transcript) family. Both are distant HLA class I homologues but do not associate with  $\beta$ -2 microglobulin and have no known role in antigen presentation (26).

NKG2D ligands are called stress-ligands as their presence is stimulated predominantly in damaged, virally infected, or tumorous cells (27). Besides of these stimuli, these ligands can be upregulated by standard cell-stress conditions including heat shock (28), oxidative stress (29), and ionizing radiation (28, 30).

NKG2D ligands are also expressed on healthy conditions, particularly on proliferative cells like embryonic cells (31), myeloid progenitors (32), normal intestinal epithelial cells (33), or cells of repairing tissue (34). The mechanisms protecting these cells against NK cell attack are not fully known. It seems that on healthy cells, NKG2D ligands alone is not sufficient signal to trigger NK cell activation (35). The intracellular localization of NKG2D ligand is an additional observed protecting mechanism causing ligand's inaccessibility to the receptor (33, 35). On the other hand, the presence of NKG2D ligands on immune cells also plays an important role in regulating immune responses (36).

The polymorphism of NKG2D ligands genes affects susceptibility to different diseases (37), disease severity (38), transplantation outcome (organ or HSCT), and serves as a risk factor (39) and/or as protective factor for cancer (40).

### MIC Family

MIC family comprises 7 genes, from which only two are expressed (*MICA* and *MICB*) and an additional five being considered as pseudogenes (*MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF*, and *MICG*) (41).

Both *MICA* and *MICB* contain 6 exons and 5 introns - exon 1 encodes leader sequence, exons 2 - 4 encode three extracellular domains  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\alpha$ 3, exon 5 encodes the transmembrane region and exon 6 encodes the cytoplasmic tail. The majority of polymorphisms of *MICA* and *MICB* alleles are concentrated on exons 2, 3, 4, and 5, predominantly within  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 domains (Figure 1) (41, 42).

In the current literature, there are two different nomenclature approaches for *MICA* allele description (summarized in Figure 2).

The first approach is based on a sequence of exon 5, called exon 5 (EX5) microsatellite alleles' group, and corresponds to a repeated sequence of 4 to 10 Ala (GCT) codons within this exon, with alleles named *A4*, *A5*, *A5.1*, *A6-10*. *A5.1 MICA* alleles are specific by having additional guanine nucleotide insertion between codons 20 and 21, resulting in a premature stop

codon at codon 41 (43). This truncated protein lacks the cytoplasmic tail encoded by exon 6 (41, 44). This difference is translated into the form of anchorage of the final protein to the cell membrane. Most of *MICA* alleles are transmembrane-anchored glycoprotein with a cytoplasmic tail; *A5.1* alleles create glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored glycoproteins (45). To date, it is not clear if other microsatellite alleles (*A4*, *A6-A10*) could encode similar truncated proteins too. This feature seems to arise as a consequence to cytomegalovirus' (CMV) immunoevasin UL142 (46). This immunoevasin enables the immune escape of the infected cells by retaining protein product of *MICA* alleles in the Golgi apparatus while not affecting truncated proteins encoded by *MICA A5.1* alleles (46, 47).

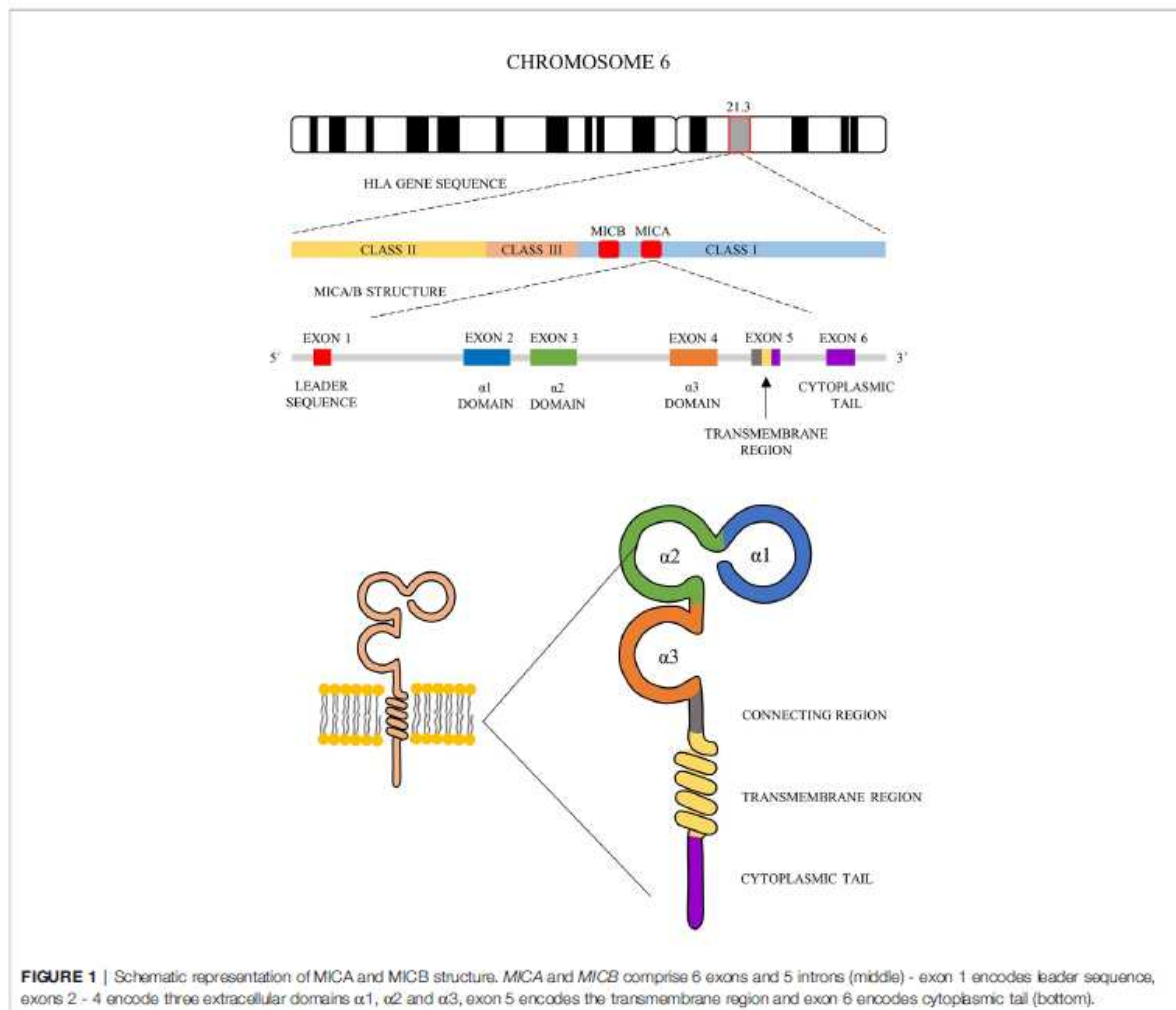
The second nomenclature approach is based on the gene sequence, but not always all exons have been sequenced. The sequence alleles nomenclature (for example *MICA\*008:01:09*) is similar to the HLA World Health Organization nomenclature, comprising gene name (*MICA* or *MICB*), separator (\*), allele group (for example \*008), field separator (:): specific *MICA* protein (two-digit format, for example, 01) and next closer specification as described at [hla.alleles.org/nomenclature/naming.html](http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html) (48). This nomenclature approach is used not only for *MICA* but also for *MICB* alleles (48). To date 223 *MICA* sequence alleles encoding 104 proteins and 138 *MICB* alleles encoding 37 proteins have been described (release June 2020) (48).

According to the large study of 1.2 million donors with German descent, the most common *MICA* allele in Caucasian (German) population is *MICA\*008 (A5.1)* with a frequency of 42.3% followed by *MICA\*002 (A9 microsatellite allele)* with 11.7%, and *MICA\*009 (A6 microsatellite allele)* with 8.8%. The most common *MICB* allele in the same population is *MICB\*005* with a frequency of 43.9% followed by *MICB\*004* with 21.7% and *MICB\*002* with 18.9% (49). Taking another populations into account, *MICA\*008* is the most frequent *MICA* allele worldwide with *MICA\*002*, *MICA\*009*, *MICA\*010* and *MICA\*004* taking next places varying according to inter-ethnic variability (49-51). Also, *MICB* results across the population correspond to the German study, i.e., most frequent is *MICB\*005* and followed by *MICB\*002*, *MICB\*004*, *MICB\*014*, and *MICB\*003* (52).

### ULBP Family

All 10 ULBP family members are officially named *RAET1* genes and are orthologs of the mouse *Raet1* genes (53). Six genes of them are expressed (*ULBP1 - 6*), while 4 are pseudogenes (53).

*ULBP1 (RAET11)*, *ULBP2 (RAET1H)*, *ULBP3 (RAET1N)*, *ULBP4 (RAET1E)* and *ULBP6 (RAET1L)* have 4 exons while *ULBP5 (RAET1G)* comprises 5 exons. Exon 1 encodes leader sequence, exons 2 and 3 define the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 domains, and exon 4 encodes a hydrophobic sequence, both for GPI anchor region and transmembrane region with the cytoplasmic tail (53-56). *ULBP2* and *ULBP5* can form both transmembrane-anchored and GPI-anchored form, *ULBP1*, *ULBP3* and *ULBP6* are only GPI-anchored and *ULBP4* forms just transmembrane-anchored protein (Table 1) (57, 58). Exon 5 seems to encode for the extended cytoplasmic domain (*ULBP5*) or is non-coding (other



ULBPs) (54–56). Compared with MIC, ULBP proteins lack  $\alpha 3$  domain (53), which seems to have no effect on NKG2D binding (53), but it probably precludes CD8 (T cells co-receptor) binding (59).

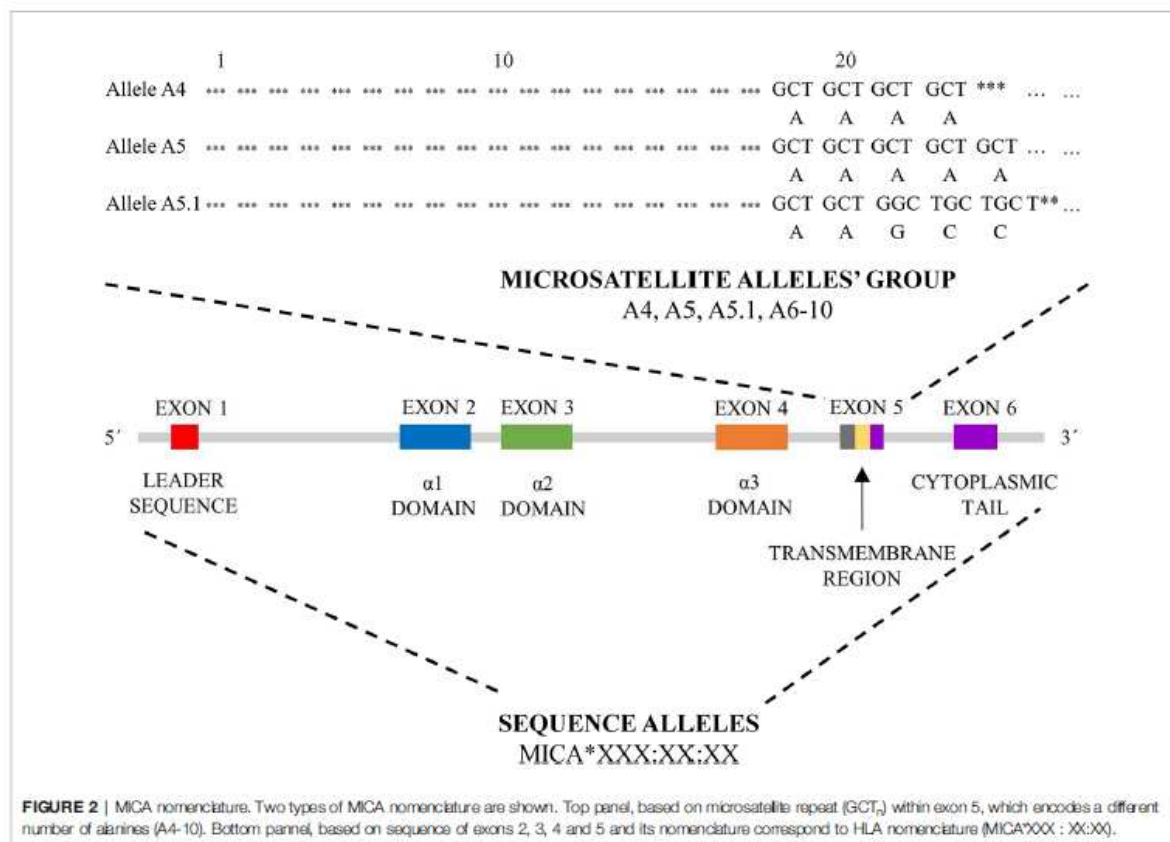
*ULBP/RAET1* genes seem to be less polymorphic than MIC genes, although this could be caused by a lower number of sequenced samples (52). Four out of the six *ULBP* genes have been found to be polymorphic in exons 2 and 3, coding extracellular part of the protein. So far no polymorphism has been described in *ULBP1* and *ULBP3* within exons 2 and 3 (52). The most polymorphic gene is *ULBP4* with 11 known alleles (52), followed by *ULBP6* with 7 known alleles, *ULBP2* with 6 alleles and *ULBP5* with 3 described alleles (52, 60). Currently, *ULBP* polymorphism has been studied in 223 Euro-Caucasoid, 60 Afro-Caribbean, 52 Indo-Asian individuals (61), Kolla South American Indians (60) and Thais (62), a broader sampling is required to achieve a true picture of *ULBP* polymorphism. For the Caucasian population, the most common *ULBP4* allele

is \*002, while for Thais it is \*001, and for Kolla Indians it is \*003 (60). Similarly, *ULBP6* alleles frequency also differs between populations, Caucasians having \*003 most often, Thais \*001 and Kolla Indians \*002 (60). The variability in the frequency of *ULBP* alleles among individual populations seems to be associated with differences in life conditions and contact with unique pathogens (60).

## REGULATION OF NKG2D LIGANDS

As mentioned above, NKG2D ligands are stress-associated molecules upregulated on damaged or transformed cells to attract immune cells, especially NK cells. Their expression is regulated by numerous pathways and signals on multiple levels of biogenesis - on transcriptional, translational, and post-translational level (Figure 3).





**TABLE 1 |** Human NKG2D ligands.

Ligand name	Alternative name	Number of exons	Anchorage type
MICA	PERB11.1	6	TM/GPI
MICB	PERB11.2	6	TM
ULBP1	RAET1I	4	GPI
ULBP2	RAET1H	4	TM/GPI
ULBP3	RAET1N	4	GPI
ULBP4	RAET1E	4	TM
ULBP5	RAET1G	5	TM/GPI
ULBP6	RAET1L	4	GPI

TM, transmembrane type; GPI, glycosylphosphatidylinositol-linked type.

In malignant cells, upregulation of NKG2D ligands expression is induced initially by hyperproliferative state occurring during early tumorigenesis. Hyperproliferation activates E2 transcription factor, which induces NKG2D ligands' transcription (34). Hyperproliferative state could also trigger DNA damage response (63), and so activate p53 (64). Activated p53 then enhances transcription of NKG2D ligands (65).

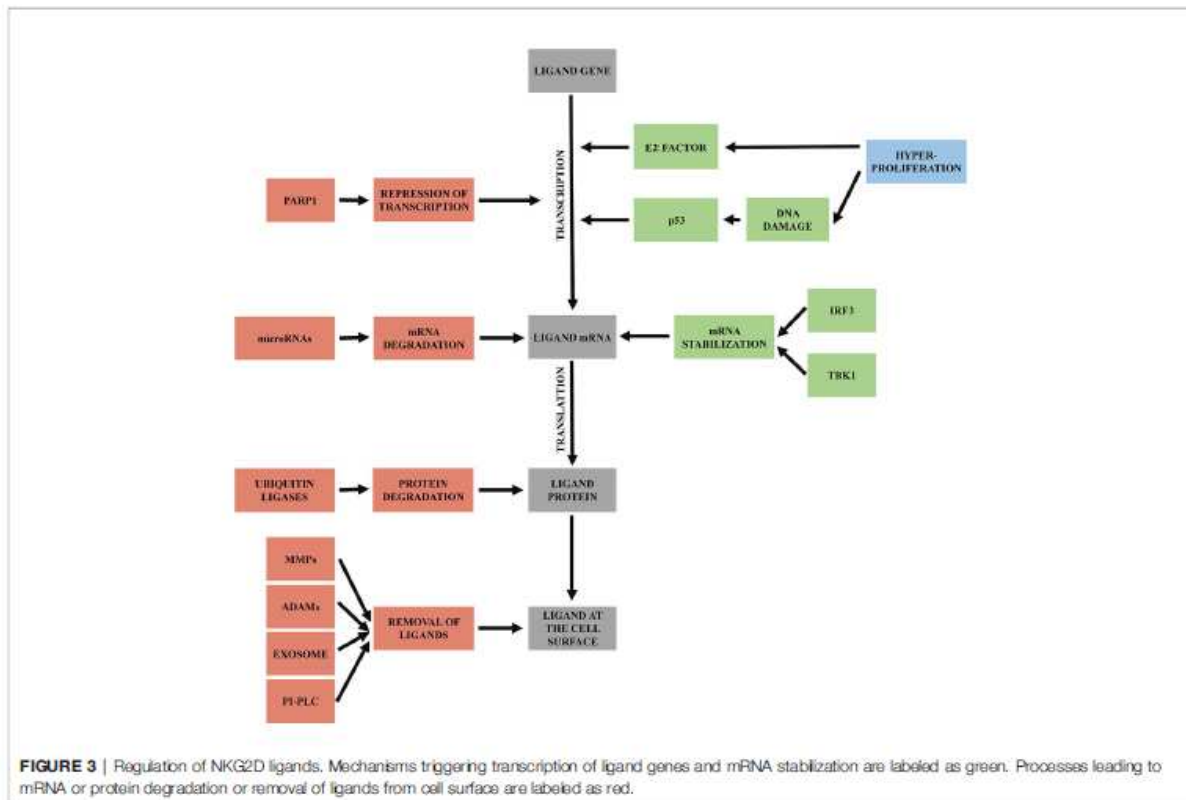
NKG2D ligands' mRNA usually has a very short half-life; it is rapidly degraded and needs to be stabilized for translation. Besides the increased transcription, DNA damage response also

plays a role in the mRNA stabilization via signaling protein TBK1 and transcription factor IRF3, which induce conditions that help to increase the half-life of NKG2D ligands transcripts (66).

In contrast, faster degradation of NKG2D ligand transcripts can be induced by specific microRNAs that bind to their 3' untranslated region and repress their translation (67). MicroRNA regulates stress ligands overexpression, as only when MICA and MICB mRNA exceeds the microRNA repression, the NKG2D ligands are expressed on the cell surface. Overexpression of microRNAs can help tumors to downregulate NKG2D ligands expression and then escape the immune system (68).

Another mechanism leading to the reduced levels of surface NKG2D ligands is via poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) mediated repression of transcription. This mechanism seems to be specific for leukemia stem cells and enables them to escape immune surveillance and later to cause relapse of disease (69). This opens the possibility to use PARP inhibitors for AML patient (70), an approach that the first clinical trials are currently assessing (71-73).

At the protein level, NKG2D ligands are regulated by various post-translational modifications. First, described in MULT1 ligand (mouse homolog of human ULBP1), is ubiquitin-



dependent degradation (74). Ubiquitin modifications occur primarily on lysine residues of target proteins (75). The presence of multiple lysins in the cytoplasmic tail of MICA, MICB and ULBP5 (RAET1G) suggests that this regulation could also exist for these human ligands (76). It has been shown, for example, that KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) uses E3 ubiquitin ligase K5 to downregulate cell surface expression of MICA and MICB (77).

A crucial system of NKG2D ligands regulation is the production of soluble variants of the NKG2D ligands by various mechanisms - co-transcriptional alternative splicing, post-translational ligand shedding, exosome ligand excretion and phospholipase C (PI-PLC) cleavage for ligands anchored by GPI. Shed ligands passively block NKG2D receptor on the NK cell, which is then internalized into the cell and degraded, leading to impairment of its function (78). This mechanism helps cancer cells to escape immune surveillance by blocking NKG2D and consequently NK cell activity. Another benefit of released ligands for cancer cell is that this cell became less visible for NK cells due to the lower NKG2D ligands' concentration on its surface (79).

Co-transcriptional regulation by alternative splicing can also lead to soluble forms of NKG2D ligands, and has been described for ULBP4 (55) and ULBP5 (54). In RAET1G (ULBP5) it creates a product RAET1G2, where alternative splicing in exon 4 caused a frameshift and premature termination of the protein sequence and thus led to the soluble form of RAET1G (ULBP5) (54). The

next example was described in ULBP4 (RAET1E) with a product of spliced variant called RAET1E2 where a stop codon was placed within intron between exons 3 and 4, producing a shortened form of ULBP4 (RAET1E) (80).

First, ligand shedding is mediated by two proteases families, "a disintegrin and metalloproteinase" (ADAMs) family (81) and matrix metalloproteinase family (MMPs) (82, 83). From the ADAM proteases family, ADAM9, ADAM10 and ADAM17 have been shown to be active in shedding of MICA, MICB and ULBP2 ligands (84). Matrix metalloproteinases are able to shed ULBP2 (83) or MICA (82, 85). Polymorphism of some NKG2D ligands can bypass the shedding process; for example, MICA\*008 is bound to the membrane through GPI anchor, makes this allele resistant to protease-mediated cleavage (45).

The second way for cancer cells to remove NKG2D ligands at the protein level is the use of constitutive production and release of endosome-derived vesicles called exosomes, which eliminate active proteins or microRNAs from cells. The NKG2D ligands are expressed and carried on the surface of tumor exosomes and released into the environment (86). The NKG2D ligands released *via* exosomes have a proven effect on the downregulation of NKG2D and desensitization of cytotoxic cells (87, 88).

The last mechanism which cells can use to cut off their ligands is using cleavage *via* phospholipase release (PI-PLC), described in GPI anchored ULBP1 (RAET1I), ULBP2 (RAET1H), ULBP3 (RAET1N) and ULBP6 (RAET1L) (89). This mechanism is



described on gastric tumor cells (89) and needs to be confirmed for other types of cancer.

The way of ligands shedding, either by protease cleavage or by exosomes, is most likely dependent on ligands attachment to the cell membrane. GPI-anchored *MICA* alleles vs. other transmembrane attached *MICA* alleles could serve as a model – protein product of *MICA*\*008, GPI-anchored NKG2D ligand, is not usually cleaved by proteases but is released by exosomes (90). On the other hand, other transmembrane-attached *MICA*, *MICB*, or *ULBP* are primarily released by cleavage (81, 83, 91). Some ligands, for example *ULBP2*, can be released by both ways (88).

Solubilization of NKG2D ligands thus can have severe consequences for cancer patients, as lower cell-surface NKG2D ligands concentration (83) and presence of soluble NKG2D ligands in sera, very often, correlate with higher tumor stage and poor prognosis (84). For example, metalloproteinase *ADAM10* is highly expressed in malignant pleural mesothelioma (92), prostate cancer (93) or in oral squamous cell carcinoma (94), which makes all of those tumor types able to escape immune surveillance by NKG2D ligands shedding.

In general, solubilization of *MICA* is a widespread mechanism of NK cell escape in malignant diseases. Holdenrieder et al. described an increased level of soluble *MICA* in lung cancer, colorectal and other gastrointestinal cancers, breast cancer, ovarian cancer, other gynecologic cancers, renal cancer, and prostate cancer as mentioned above (79). Paschen et al. described increased levels of s*MICA* also in melanoma (95), while in hematological malignancies, a higher level of s*MICA* and s*MICB* was described in multiple myeloma (96) and various leukemias (97, 98).

## NKG2D LIGANDS AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA

As described above, multiple mechanisms enable tumors to escape immune surveillance with ligand shedding being one of the most important. In relation to AML, in 2003, a seminal work of Salih et al. investigated AML blasts and found various NKG2D ligands expressed on these cells, but they also demonstrated that patients with AML had significantly elevated levels of soluble *MICA* and *MICB* in comparison with healthy donors (99). This observation was confirmed nine years later by Hilpert et al., who discovered that 70% of AML blasts were positive for at least one NKG2D ligand (with 15% of patients having leukemic cells expressing even four or five different NKG2D ligands), and in addition, 100% of patients with AML in this study had detectable serum levels of NKG2D ligands with *MICA* being the one most often detected in the sera (97). In AML patients, also complete absence of surface expression of NKG2D ligands was described, and it is believed to be a consequence of malignant cell development (32).

In addition to shedding and no presence of NKG2D ligands on the cell surface, polymorphisms of NKG2D ligands may play a role in AML development, although data are still too sparse to make clear conclusions. Currently, there are only two studies addressing the relationship between *MICA* polymorphisms and

leukemia, including acute myeloid leukemia, work of Luo et al. focused on people of Han nationality of Southern China (100) and work of Baek et al. on Korean patients (101). There is a need to extend this type of studies to a wider population to allow for significant conclusions.

Luo et al. described differences between patients with leukemia and healthy ethnically matched controls. According to their observation, homozygotes with microsatellite alleles *A5* and allele *MICA*\*010 have increased risk for developing leukemia (specifically for AML, the ratio of frequency was 35.9% in patients with AML vs. 17.6% in control samples). This makes *MICA* *A5* a risk factor for AML. Ji et al. in their meta-analysis focused on multiple types of cancer in multiple populations, described alleles *A5* as protective factor for its carrier (40), which seems contradictory with AML results of Luo et al. It is necessary to further study the correlation between alleles *A5* as a positive or negative risk factors across multiple populations and specific cancers. Alleles *MICA* *A5.1* (including the most frequent allele *MICA*\*008) frequency was decreased in heterozygous leukemic patients, described only on lymphocytic leukemia, with data for myeloid leukemia, unfortunately, missing (100).

The other study with data from Korean patients included 324 patients with AML, ALL, and MDS, with 172 AML samples. In AML patients, the authors observed a higher frequency of *MICA* *A9* alleles than in the control group (34.9% vs. 22.0%). Although alleles *A9* can be found on a transcript level more frequently in AML patients, presence of protein product is often reduced on the cell surface by release or shedding of the ligand from AML cells and rendering tumor cells less detectable by NK and T cells (101). Similarly to Han population described above, *MICA* *A5.1* alleles were found with lower frequency in AML patients than in controls (25.0% vs 38.0%) (101).

Only a little is known about the relationship between of AML and *MICB*. Baek et al. observed a difference between patients and controls only within one *MICB* allele, *MICB*\*005:03, with lower frequency in AML patients (2.9% vs. 10.5%) (101).

In the case of *ULBP*, only one study analyzed *ULBP* polymorphisms and their distribution among patients with hematological malignancies and among their donors with no difference in alleles frequency observed. Therefore, *ULBP* cannot currently be used as genetic determinants for the risk of developing a hematological malignancy (61, 102). On the other hand, although Mastaglio et al. were not assessing polymorphisms, they described *ULBP1* expression on AML blasts correlating with improved 2-year overall survival, relapse-free survival, and reduced relapse (103).

## NKG2D LIGANDS AND TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Transplantation of hematopoietic stem cells is a standard treatment of multiple hematology malignancies, as well as non-malignant diseases (104). The aim of transplantation of HSCT lies in the graft's ability to react against residual cancer cells



present in the patient, the effect known as graft-versus-leukemia (GvL) response (105, 106). Unfortunately, HSCT has several side effects and most patients experience some serious complications – acute-graft-versus-host disease (aGvHD), chronic GvHD (cGvHD) and/or relapse (107, 108). These complications also negatively impact patients' quality of life and increase mortality.

GvHD can be described as an exaggerated manifestation of inflammation based on the interaction between donor lymphocytes and foreign (i.e., patient's) antigens (109). The incidence of GvHD (both types) ranges between 40 to 60%, with mortality around 15% (109). Chronic GvHD is a major cause of mortality in long-term survivors of HSCT (110), and acute GvHD is the second leading cause of death after HSCT (111).

From a pathophysiology perspective, acute GvHD is caused by a conditioning regimen that damages target tissue (112). This damage leads to a cytokine storm which activates antigen-presenting cells (APC) from the patient (and later also donor's APC), that are recognized by donor's T cells (113). During the second phase, donor's T cells are activated by interaction with APC, and they proliferate and differentiate into helper T cells Th-1, cytotoxic T cells and Th-17/Tc-17 (114). These activated T cells then produce additional cytokines, such as IL-2, which promotes further activation of T cells and also triggers NK cell responses (115). The last phase is based on escalation of inflammation resulting in end-organ damage (109). The mortality risk depends on the stage and grade of aGvHD (111). Among the most affected organs are the upper and lower gastrointestinal tracts, liver, and skin. Grading depends on the combination of damage of these organs (111). A stricter definition can be found in NIH consensus criteria from 2014 (116).

Chronic GvHD also consists of three phases, and its trigger is tissue damage caused by aGvHD, another cytotoxic injury or infection (117). This damage activates innate immune cells but also non-hematopoietic cells. The second phase is based on the overreaction of the adaptive immune system going hand in hand with the reduction of immune cell regulators, such as regulatory T-cells, causing upregulation of helper T cells Th-1, Th-17 and in contrast to aGvHD, also Th-2 (117). Phase three consists in abnormal tissue repair (117). Clinical manifestations can be similar to autoimmune disorders, it manifests in oral mucosa, for example, lichen or planus, it attacks eyes, causing, for example, keratoconjunctivitis sicca or uveitis, and it targets skin, soft tissues, or inner organs (liver, lung disease, gastrointestinal tract or CNS) (110).

Older definition (currently seldom used) required onset of symptoms within 100 days for aGvHD and later onset for cGvHD. This is currently replaced by NIH definition, which is based on clinical manifestations rather than on the time of the onset alone (116).

As both GvHD types are potentially dangerous and life-threatening, all efforts are directed to avoid GvHD completely or to suppress GvHD manifestation (106). This can be achieved by a complete match of patient's and donor's HLA molecules (10 out of 10) (118). However, the full match can lead to a lower GvL

reaction. The key clinical issue is then minimization of GvHD and maximization of GvL (119). Some mismatches between donor and patient in HLA, such as some HLA-DPB1 or HLA-Cw, can decrease the risk of relapse, which is caused by GvL reaction of T cells while not increasing the risk of severe GvHD (119). But leukemic cells can also hide HLA molecules and then escape T cells surveillance. In this situation, NK cells can be fundamental to eliminate tumorous cells because under standard circumstances, NK cells are inhibited by HLA molecules. When HLA molecules are missing, NK cells do not receive an inhibition signal and wait to be activated. Activating signal can come from NK cells-related activating KIR ligand-receptor in case of a match between patient and donor (120), or it can come from activating NKG2D receptor, where ligands match, mismatch or even their polymorphisms can play a crucial role (121). But there are still many unanswered questions, like which specific effect individual polymorphisms play? And do we know some particular polymorphisms which could influence HSCT outcome, or if match or mismatch in NKG2D ligands between donor and recipient influence HSCT?

### MICA and HSCT Outcome

Theoretically, the mismatch between donor and patient in *MICA* should lead to impaired NK cell, and T cell activation as the ligand is not recognized by the receptor. The clinical effect in patient with mismatched donor then should show a lower GvL effect worsening overall survival, and on the other hand, a lower risk of GvHD could be expected.

Indeed, Fuerst et al. described a higher risk of relapse (lower GvL effect) in the donor-recipient mismatch of *MICA*. His study was focused on match/mismatch in one amino acid – methionine or valine – at position 129 of *MICA*, called *MICA-129 Met* or *Val* (122). Based on his data, *MICA-129* mismatch can also lead to higher non-relapse mortality overall, meaning mostly aGvHD (122). According to Parmar and coworkers, aGvHD in patients with mismatched *MICA* is triggered by  $\alpha\beta$  T cells. They speculate that these cells' response to *MICA* allo-antigens is similar to mismatched HLA antigens present on APC (123). It is worth mentioning that overall survival (OS) rates were lower in the case of *MICA-129* mismatch, but OS rates were similar for matched and mismatched *MICA* pairs at allele level (122). We can then speculate that it is amino acid at position 129, which plays the most important role in HSCT outcome and *MICA* match/mismatch. Focusing on *MICA* alleles generally, it has been described multiple times that donor-recipient match leads to a lower risk of aGvHD (122–124). We can use similar logic also to cGvHD, whose incidence is increased in transplant pairs mismatched for *MICA* (124). Compared to GvHD occurrence, data regarding the disease relapse is not consistent across the literature. Unlike Fuerst, Carapito et al. described lower risk of relapse in transplant pairs mismatched for *MICA* (124). A similar result regarding the relapse and mismatch in *MICA* between patient and donor was described by Parmar et al. (123). In this study focused on myeloid leukemias, 3-year cumulative incidence of relapse in patients with *MICA* mismatched vs *MICA* matched graft was higher for patients



with a matched graft (20% for mismatched versus 35% for matched graft) (123). Here authors correlated stronger GvHD with a lower risk of relapse and thus higher GvL effect, also corroborated by other studies (125, 126).

The impact of the type of amino acid at position 129 (*MICA-129Met* or *MICA-129Val*) was described to play a role in HSCT not only from match/mismatch point of view. *MICA-129Met* isoform binds NKG2D receptor with higher affinity than *MICA-129Val* isoform, which leads to stronger activation of NK cells – it stimulates NK-cells mediated cytotoxicity more effectively, it triggers stronger IFN $\gamma$  release and a faster activation of CD8+ T cells (121). On the other hand, this stronger and faster reaction leads to quicker NKG2D downregulation and reduction of effectivity of NK cells followed by lower activation of CD8+ T cells, a phenomenon called exhaustion of NK cell activity (121). On the other hand, *MICA-129Val* isoform induces weaker but longer-lasting NK cell reactivity (121). Consistent with this knowledge is the fact that homozygous carriers of *MICA-129Met* alleles have an increased risk to experience acute GvHD (121), and homozygous carriers of *MICA-129Val* alleles have an increased risk to experience chronic GvHD (127). Furthermore, homozygotes *MICA-129Met* alleles carriers are at higher risk to experience relapse due to the exhaustion effect (121, 127). Despite the higher risk of relapse and aGvHD, patients with *Met/Met* have better overall survival than *Val/Val* carriers (121, 128). Martin et al. in 2020 implicated that patients receiving *MICA-129Met* graft have decreased risk of non-relapse mortality after HSCT (129). Another study describes a higher risk of CMV infection or reactivation and a higher risk of non-relapse mortality in patients receiving a graft from a donor having *MICA-129Val/Val* (130). The role of an isoform of *MICA-129* may also affect the serum level of soluble MICA (sMICA) (131). In vitro experiments show that *MICA-129Met* clones release more soluble MICA and a higher proportion of the *MICA-129Met* variant is retained in intracellular compartments which could influence HSCT outcome, but it needs to be confirmed in experiments using patients' samples (131). The effect of soluble MICA on chronic GvHD development was described by Boukouaci et al. (127). The patients with sMICA > 80 pg/mL after transplantation have a higher risk of developing cGvHD than patients with sMICA < 80 pg/mL. Soluble MICA seems to be an even more important parameter than allele isoform of *MICA-129* as patients with sMICA > 80 pg/mL have always higher risk of cGvHD development regardless of *MICA-129* variant than patients with sMICA < 80 pg/mL (127).

### MICB and HSCT Outcome

Besides *MICA*, also *MICB* were observed to play a role in HSCT, as their match or mismatch seems to be a very important player in HSCT complications (124). Carapito et al. described the impact of mismatch of amino acid – isoleucine (Ile) and methionine (Met) – at position 98 within *MICB* (*MICB-98*) between donor and patient on GvHD and on overall survival (OS) affected by CMV (132). Although this mismatch occurs in approximately 6% of transplantations, such transplantation of

hematopoietic stem cells from *MICB-98* mismatched but otherwise fully HLA and *MICA* matched donor increases risk of both acute and chronic GvHD development. By monitoring the effect of match/mismatch in *MICB-98* on overall survival affected by CMV, they found that *MICB-98* match significantly reduced the effect of CMV status on overall survival. Patients with matched graft had similar OS, regardless of CMV status. But when the patient received a mismatched graft and was CMV positive, there was fundamentally worse OS than for CMV negative patient with a mismatched graft (132). Match in *MICB-98* between patient and donor is then another parameter which would be good to monitor and which could help to select the optimal donor.

### ULBP and HSCT Outcome

Among ULBPs investigated, only the role of *ULBP6* in allogeneic stem cell transplantation has been described. Antoun et al. defined 2 common *ULBP6* alleles, *ULBP6\*001* or *ULBP6\*002*. Patients with allele *ULBP6\*002* had better 8-year relapse-free survival (44% vs. 25%,  $p < 0.001$ ) and better 8-year OS (55% vs. 39%,  $p = 0.003$ ) than patients lacking this allele (102). Surprisingly, the protein of allele *ULBP6\*002* triggers lower cytotoxicity of NK cells. This seemingly controversial result can be explained by soluble *ULBP6\*002* which is attached to NKG2D with high affinity, disabling other NKG2D ligands to activate NK cells and limiting repeated triggering of NKG2D receptor (133, 134). Zuo et al. explain reduced survival after HSCT of carriers of *ULBP6\*001* variant by reduction of tumor antigen availability or elimination of antigen-presenting cells or T cells, which suppresses the subsequent development of alloreactive T cell immunity (133). These results need to be confirmed in further studies.

### CONCLUSIONS

As described, AML cells can deploy multiple protective mechanisms to survive and to spread. Part of these mechanisms involve NK cells and their recognition abilities. But these general mechanisms are not affecting all NK cells in the same way. Because NK activity is based on the balance of inhibitory and activating signals mediated by an interaction between ligands and receptors, AML cells downregulate some ligands for one of the most critical activating receptor NKG2D.

In various diseases, it has been described that polymorphisms of NKG2D ligands are positively associated with their development. For example, an allelic variant of *MICA-129* was described to be associated with systemic lupus erythematosus (135), *MICA\*002* allele can have an effect in reducing the risk of primary sclerosing cholangitis (136), *MICB\*004* allele is associated with rheumatoid arthritis (137) and expression of *ULBP3* is upregulated in patients with alopecia areata (138). With all above associations and with first findings of the relationship between the different allelic distribution of selected NKG2D ligands in AML patients compared to healthy donors, we believe that individual polymorphisms could have a broader impact on



AML development and progression. Still, more comprehensive studies should be done to draw relevant conclusions.

The importance of NKG2D' and NKG2D ligands' polymorphisms is also evident in studies that showed their correlation to patients' outcome after HSCT. Additional markers may help to estimate the probability of post-transplant complications. Current data show that a match between patient and donor in MICA and in MICB can also be beneficial, but we still know very little about ULBP and about all polymorphisms playing a role in HSCT outcome. It becomes paramount to understand of the pathophysiological role of NKG2D and NKG2D ligands, and their role on HSCT outcome. This can be fundamental for donor selection to improve overall survival with strong GVL affect and low GvHD. This should be now feasible, with NGS sequencing becoming easier, more sensitive, and affordable for larger cohorts.

## REFERENCES

- National Cancer Institute. *Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program Cancer stat facts: Leukemia - acute myeloid leukemia (AML)*. (2016). Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>, cited 2020 18th October.
- Baragaño Raneros A, López-Larrea C, Suárez-Álvarez B. Acute myeloid leukemia and NK cells: two warriors confront each other. *Oncoimmunology* (2019) 8(2):e1539617. doi: 10.1080/2162402X.2018.1539617
- Zhang J, Gu Y, Chen B. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* (2019) 12:1937–45. doi: 10.2147/OTT.S191621
- Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft-versus-tumor, and graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* (2009) 15(7):765–76. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.01.019
- Bendall LJ, Kortepel K, Bradstock KF, Gottlieb DJ. Natural killer cells adhere to bone marrow fibroblasts and inhibit adhesion of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* (1995) 9(6):999–1005.
- Sandoval-Borrego D, Moreno-Lafont MC, Vazquez-Sanchez EA, Gutierrez-Hoya A, López-Santiago R, Montiel-Cervantes LA, et al. Overexpression of CD158 and NKG2A Inhibitory Receptors and Underexpression of NKG2D and NKp46 Activating Receptors on NK Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Med Res* (2016) 47(1):55–64. doi: 10.1016/j.armed.2016.02.001
- Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainy D, Olive D, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* (2007) 109(1):323–30. doi: 10.1182/blood-2005-08-027979
- Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R, et al. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* (2012) 90(1):109–15. doi: 10.1038/icb.2011.15
- Valhondo I, Hassounah F, Lopez-Sejas N, Pera A, Sanchez-Correa B, Guerrero B, et al. Characterization of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE Axis on Circulating NK, NKT-Like and T Cell Subsets in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* (2020) 12(8):2171. doi: 10.3390/cancers12082171
- Godal R, Bachanova V, Gleason M, McCullar V, Yun GH, Cooley S, 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. *Biol Blood Marrow Transplant* (2010) 16(5):612–21. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.01.019
- Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* (2010) 115(21):4293–301. doi: 10.1182/blood-2009-05-222190
- Hercend T, Takvorian T, Nowll A, Tantravahi R, Moingeon P, Anderson KC, et al. Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* (1986) 67(3):722–8. doi: 10.1182/blood.V67.3.722.722
- Arvindam US, Aguilar EG, Felices M, Murphy W, Miller J. Chapter 16 - Natural Killer Cells in GvHD and GvL. In: G Socié, R Zeiser, BR Blazar, editors. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Second Edition)*. Academic Press, Elsevier (2019). p. 275–92.
- Zingoni A, Ardolino M, Santoni A, Cerboni C. NKG2D and DNAM-1 activating receptors and their ligands in NK-T cell interactions: role in the NK cell-mediated negative regulation of T cell responses. *Front Immunol* (2013) 3:408. doi: 10.3389/fimmu.2012.00408
- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Mordli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* (1999) 190(10):1505–16. doi: 10.1084/jem.190.10.1505
- Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* (1997) 186(7):1129–36. doi: 10.1084/jem.186.7.1129
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* (1998) 187(12):2065–72. doi: 10.1084/jem.187.12.2065
- Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* (2009) 94(10):1427–34. doi: 10.3324/haematol.2009.008318
- Wolan DW, Teyton L, Rudolph MG, Villmow B, Bauer S, Busch DH, et al. Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å. *Nat Immunol* (2001) 2(3):248–54. doi: 10.1038/85311
- Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* (2002) 17(1):19–29. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00333-3
- Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* (1998) 48(3):163–73. doi: 10.1007/s002510050420
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* (1999) 285(5428):730–2. doi: 10.1126/science.285.5428.730



23. 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) 285(5428):727–9. doi: 10.1126/science.285.5428.727
24. 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 Res* (2006) 66(1):563–70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2776
25. Hara R, Onizuka M, Matsushita E, Kikkawa E, Nakamura Y, Matsushita H, et al. NKG2D gene polymorphisms are associated with disease control of chronic myeloid leukemia by dasatinib. *Int J Hematol* (2017) 106(5):666–74. doi: 10.1007/s12185-017-2294-1
26. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* (2001) 22(7):378–85. doi: 10.1016/s1471-4906(01)01960-3
27. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cippitelli M, et al. NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Front Immunol* (2018) 9:476. doi: 10.3389/fimmu.2018.00476
28. Kim JY, Son YO, Park SW, Bae JH, Chung JS, Kim HH, et al. Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Exp Mol Med* (2006) 38(5):474–84. doi: 10.1038/emmm.2006.56
29. Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* (2007) 178(2):961–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.961
30. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Rautlet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* (2005) 436(7054):1186–90. doi: 10.1038/nature03884
31. Zou Z, Nomura M, Takihara Y, Yasunaga T, Shimada K. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in  $\text{D}\Phi$  cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *J Biochem* (1996) 119(2):319–28. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021242
32. Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L, et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* (2005) 105(9):3615–22. doi: 10.1182/blood-2004-07-2585
33. Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer* (2017) 116(9):1208–17. doi: 10.1038/bjc.2017.79
34. Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Rautlet DH. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med* (2012) 209(13):2409–22. doi: 10.1084/jem.20120565
35. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Sdf: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev* (2009) 5(1):22–34. doi: 10.2174/157339509787314369
36. Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA, Fainboim L, Zwirner NW. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol* (2002) 71(5):791–7. doi: 10.1189/jlb.71.5.791
37. Tamaki S, Sanefuji N, Ohgi K, Imai Y, Kawakami M, Yamamoto K, et al. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *J Oral Pathol Med* (2007) 36(6):351–6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00539.x
38. Ding W, Ma Y, Zhu W, Pu W, Zhang J, Qian F, et al. Allele Facilitates the Metastasis of KRAS-Mutant Colorectal Cancer. *Front Genet* (2020) 11:511. doi: 10.3389/fgene.2020.00511
39. Fechtenbaum M, Desoutter J, Delvallez G, Brochot E, Guillaume N, Goëb V. MICA and NKG2D variants as risk factors in spondyloarthritis: a case-control study. *Genes Immun* (2019) 20(7):599–605. doi: 10.1038/s41435-018-0044-x
40. Ji M, Wang J, Yuan L, Zhang Y, Zhang J, Dong W, et al. MICA polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8(1):818–26.
41. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* (2000) 76:1–60. doi: 10.1016/s0065-2776(01)76018-x
42. Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, et al. Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet* (2002) 29(1):35–46. doi: 10.1046/j.0960-7420.2001.00275.x
43. Pérez-Rodríguez M, Corell A, Argüello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG, et al. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* (2000) 55(2):162–5. doi: 10.1034/j.1399-0039.2000.550209.x
44. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99(5):2971–6. doi: 10.1073/pnas.052701099
45. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem J* (2013) 454(2):295–302. doi: 10.1042/BJ20130194
46. Seidel E, Le VTK, Bar-On Y, Tsukerman P, Enk J, Yamin R, et al. Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA\*008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Rep* (2015) 10(6):968–82. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.029
47. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* (2009) 83(23):12345–54. doi: 10.1128/JVI.01175-09
48. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(Database issue):D423–31. doi: 10.1093/nar/gku1161
49. Klussmeier A, Massalski C, Putke K, Schäfer G, Sauter J, Schefzyk D, et al. High-Throughput MICA/B Genotyping of Over Two Million Samples: Workflow and Allele Frequencies. *Front Immunol* (2020) 11:314. doi: 10.3389/fimmu.2020.00314
50. Kirijas Or Paneva M, Spiroski M. MICA Polymorphism, Association with Diseases and the Role of Anti-MICA Antibodies in Organ and Stem Cell Transplantation. *Macedonian J Med Sci* (2013) 6:285–95. doi: 10.3889/MJMS.1857-5773.2013.0299
51. Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* (1999) 49(7–8):605–12. doi: 10.1007/s002510050655
52. Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* (2015) 267(1):88–116. doi: 10.1111/imr.12328
53. Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clément O, Wicker S, Gilfillan S, et al. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* (2002) 79(1):114–23. doi: 10.1006/geno.2001.6673
54. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* (2004) 173(2):1078–84. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1078
55. Zöller T, Wittenbrink M, Hoffmeister M, Steinle A. Cutting an NKG2D Ligand Short: Cellular Processing of the Peculiar Human NKG2D Ligand ULBP4. *Front Immunol* (2018) 9:620. doi: 10.3389/fimmu.2018.00620
56. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* (2001) 29(1):207–9. doi: 10.1093/nar/29.1.207
57. Fernández-Messina L, Ashiru O, Agüera-González S, Reyburn HT, Valés-Gómez M. The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. *J Cell Sci* (2011) 124(Pt 3):321–7. doi: 10.1242/jcs.076042
58. Ohashi M, Eagle RA, Trowsdale J. Post-translational modification of the NKG2D ligand RAET1G leads to cell surface expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked isoform. *J Biol Chem* (2010) 285(22):16408–15. doi: 10.1074/jbc.M109.077636
59. Cole DK, Laugel B, Clement M, Price DA, Wooldridge L, Sewell AK. The molecular determinants of CD8 co-receptor function. *Immunology* (2012) 137(2):139–48. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03625.x
60. Cox ST, Arrieta-Bolaños E, Pessoa S, Vullo C, Madrigal JA, Saudemont A. RAET1/ULBP alleles and haplotypes among Kolla South American Indians. *Hum Immunol* (2013) 74(6):775–82. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.030



61. Antoun A, Jobson S, Cook M, O'Callaghan CA, Moss P, Briggs DC. Single nucleotide polymorphism analysis of the NKG2D ligand cluster on the long arm of chromosome 6: Extensive polymorphisms and evidence of diversity between human populations. *Hum Immunol* (2010) 71(6):610–20. doi: 10.1016/j.humimm.2010.02.018
62. Romphruk AV, Romphruk A, Naruse TK, Raroengjai S, Puapairoj C, Inoko H, et al. Polymorphisms of NKG2D ligands: diverse RAET1/ULBP genes in northeastern Thais. *Immunogenetics* (2009) 61(9):611–7. doi: 10.1007/s00251-009-0394-7
63. Gorgoulis VG, Pefani DE, Pateras IS, Trougakos IP. Integrating the DNA damage and protein stress responses during cancer development and treatment. *J Pathol* (2018) 246(1):12–40. doi: 10.1002/path.5097
64. Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* (1999) 18(53):7644–55. doi: 10.1038/sj.onc.1203015
65. Li H, Lakshminanth T, Garofalo C, Enge M, Spinnler C, Anichini A, et al. Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle* (2011) 10(19):3346–58. doi: 10.4161/cc.10.19.17630
66. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:413–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951
67. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, Eberle J, Steinle A, Diederichs S, et al. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res* (2012) 72(2):460–71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1977
68. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietsky N, et al. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* (2008) 9(9):1065–73. doi: 10.1038/ni.1642
69. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, Konantz M, Steinbacher J, Wang H, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* (2019) 572(7768):254–9. doi: 10.1038/s41586-019-1410-1
70. Gaymes TJ, Shall S, MacPherson LJ, Twine NA, Lea NC, Farzaneh F, et al. Inhibitors of poly ADP-ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica* (2009) 94(5):638–46. doi: 10.3324/haematol.2008.001933
71. Gojo I, Beumer JH, Pratz KW, McDevitt MA, Baer MR, Blackford AL, et al. A Phase 1 Study of the PARP Inhibitor Veliparib in Combination with Temozolomide in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* (2017) 23(3):697–706. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0984
72. Chandhok NS, Wei W, Bindra R, Halene S, Shyr Y, Li J, et al. The PRIME Trial: PARP Inhibition in IDH Mutant Effectiveness Trial a Phase II Study of Olaparib in Isocitrate Dehydrogenase (IDH) Mutant Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Blood* (2019) 134(Supplement\_1):3909–. doi: 10.1182/blood-2019-129168
73. Kohl V, Flach J, Naumann N, Brendel S, Kleiner H, Weiss C, et al. Antileukemic Efficacy in Vitro of Talazoparib and APE1 Inhibitor III Combined with Decitabine in Myeloid Malignancies. *Cancers (Basel)* (2019) 11(10):1493. doi: 10.3390/cancers11101493
74. Nice TJ, Coscoy L, Raulet DH. Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Multi in response to cell stress. *J Exp Med* (2009) 206(2):287–98. doi: 10.1084/jem.20081335
75. Mattioli F, Sixta TK. Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nat Struct Mol Biol* (2014) 21(4):308–16. doi: 10.1038/nsmb.2792
76. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* (2010) 235(1):267–85. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00893.x
77. Thomas M, Wills M, Lehner PJ. Natural killer cell evasion by an E3 ubiquitin ligase from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochem Soc Trans* (2008) 36(Pt 3):459–63. doi: 10.1042/BST0360459
78. Vyas M, Reinartz S, Hoffmann N, Reiners KS, Lieber S, Jansen JM, et al. Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncotarget* (2017) 6(9):e1339854. doi: 10.1080/2162402X.2017.1339854
79. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* (2006) 118(3):684–7. doi: 10.1002/ijc.21382
80. Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, et al. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* (2007) 282(26):18922–8. doi: 10.1074/jbc.M702504200
81. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* (2008) 68(15):6368–76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6768
82. Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* (2010) 184(7):3346–50. doi: 10.4049/jimmunol.0903789
83. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* (2006) 66(5):2520–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2520
84. Zingoni A, Vulpis E, Loconte I, Santoni A. NKG2D Ligand Shedding in Response to Stress: Role of ADAM10. *Front Immunol* (2020) 11:447. doi: 10.3389/fimmu.2020.00447
85. Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* (2011) 35(6):569–74. doi: 10.1042/CBI20100431
86. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and antitumor immune surveillance. *Semin Cancer Biol* (2014) 28:24–30. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.02.010
87. Sharma P, Diergaard B, Ferrone S, Kirkwood JM, Whiteside TL. Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci Rep* (2020) 10(1):92. doi: 10.1038/s41598-019-56542-4
88. Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Agüera-González S, Skepper JN, Reyburn HT, et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* (2010) 285(12):8543–51. doi: 10.1074/jbc.M109.045906
89. Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* (2006) 239(1):22–30. doi: 10.1016/j.cellimm.2006.03.002
90. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* (2010) 70(2):481–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1688
91. Boutet P, Agüera-González S, Atkinson S, Pennington CJ, Edwards DR, Murphy G, et al. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF- $\alpha$ -converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol* (2009) 182(1):49–53. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.49
92. Sépult C, Bellefroid M, Rocks N, Donati K, Gérard C, Gilles C, et al. ADAM10 mediates malignant pleural mesothelioma invasiveness. *Oncogene* (2019) 38(18):3521–34. doi: 10.1038/s41388-018-0669-2
93. McCulloch DR, Akl P, Samaratinga H, Herington AC, Odorico DM. Expression of the disintegrin metalloproteinase, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res* (2004) 10(1 Pt 1):314–23. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-0846-3
94. Ko SY, Lin SC, Wong YK, Liu CJ, Chang KW, Liu TY. Increase of disintegrin metalloproteinase 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* (2007) 245(1–2):33–43. doi: 10.1016/j.canlet.2005.10.019
95. Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, et al. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res* (2009) 15(16):5208–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0886
96. Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated



- with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(4):1285–90. doi: 10.1073/pnas.0711293105
97. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, et al. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* (2012) 189(3):1360–71. doi: 10.4049/jimmunol.1200796
  98. Nüchel H, Switala M, Sellmann L, Horn PA, Dürig J, Dührsen U, et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2010) 24(6):1152–9. doi: 10.1038/leu.2010.74
  99. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* (2003) 102(4):1389–96. doi: 10.1182/blood-2003-01-0019
  100. Luo QZ, Lin L, Gong Z, Mei B, Xu YJ, Huo Z, et al. Positive association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism with leukemia susceptibility in the people of Han nationality of Southern China. *Tissue Antigens* (2011) 78(3):178–84. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01748.x
  101. Baek IC, Shin DH, Choi EJ, Kim HJ, Yoon JH, Cho BS, et al. Association of MICA and MICB polymorphisms with the susceptibility of leukemia in Korean patients. *Blood Cancer J* (2018) 8(6):58. doi: 10.1038/s41408-018-0092-5
  102. Antoun A, Vekaria D, Salama RA, Pratt G, Jobson S, Cook M, et al. The genotype of RAET1L (ULBP6), a ligand for human NKG2D (KLRK1), markedly influences the clinical outcome of allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* (2012) 159(5):589–98. doi: 10.1111/bjh.12072
  103. Mastaglio S, Wong E, Perera T, Ripley J, Blombery P, Smyth MJ, et al. Natural killer receptor ligand expression on acute myeloid leukemia impacts survival and relapse after chemotherapy. *Blood Adv* (2018) 2(4):335–46. doi: 10.1182/bloodadvances.2017015230
  104. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* (2016) 51(6):786–92. doi: 10.1038/bmt.2016.20
  105. BARNES DW, CORP MJ, LOUITT JF, NEAL FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* (1956) 2(4993):626–7. doi: 10.1136/bmj.2.4993.626
  106. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* (1990) 75(3):555–62. doi: 10.1182/blood.V75.3.555.555
  107. Mohty B, Mohty M. Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Blood Cancer J* (2011) 1(4):e16. doi: 10.1038/bcj.2011.14
  108. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* (2006) 43(1):3–10. doi: 10.1053/j.seminhematol.2005.09.001
  109. Ramachandran V, Kollis SS, Strowd LC. Review of Graft-Versus-Host Disease. *Dermatol Clin* (2019) 37(4):569–82. doi: 10.1016/j.det.2019.05.014
  110. Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant* (2001) 28(2):121–9. doi: 10.1038/sj.bmt.1703111
  111. Nassereddine S, Rafiei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft. *Anticancer Res* (2017) 37(4):1547–55. doi: 10.21873/anticancer.11483
  112. Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, et al. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* (2005) 130(3):394–403. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05614.x
  113. Kumar S, Mohammadpour H, Cao X. Targeting Cytokines in GVHD Therapy. *J Immunol Res Ther* (2017) 2(1):90–9.
  114. Yu Y, Wang D, Liu C, Kaosaard K, Semple K, Anasetti C, et al. Prevention of GVHD while sparing GVL effect by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and RORγt in mice. *Blood* (2011) 118(18):5011–20. doi: 10.1182/blood-2011-03-340315
  115. Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* (2003) 21(4):149–61. doi: 10.1002/hon.716
  116. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolf FD, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* (2015) 21(3):389–401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001
  117. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med* (2017) 377(26):2565–79. doi: 10.1056/NEJMra1703472
  118. Petersdorf EW. Which factors influence the development of GVHD in HLA-matched or mismatched transplants? *Best Pract Res Clin Haematol* (2017) 30(4):333–5. doi: 10.1016/j.beha.2017.09.003
  119. Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, et al. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood* (2009) 113(12):2851–8. doi: 10.1182/blood-2008-08-171934
  120. Heidenreich S, Kröger N. Reduction of Relapse after Unrelated Donor Stem Cell Transplantation by KIR-Based Graft Selection. *Front Immunol* (2017) 8:41. doi: 10.3389/fimmu.2017.00041
  121. Isernhagen A, Malzahn D, Viktorova E, Elsner L, Monecke S, von Bonin F, et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med* (2015) 7(11):1480–502. doi: 10.15252/emmm.201505246
  122. Fuerst D, Neuchel C, Niederwieser D, Bunjes D, Gramatzki M, Wagner E, et al. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2016) 128(26):3169–76. doi: 10.1182/blood-2016-05-716357
  123. Parmar S, Del Lima M, Zou Y, Patah PA, Liu P, Cano P, et al. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood* (2009) 114(14):2884–7. doi: 10.1182/blood-2009-05-223172
  124. Carapito R, Jung N, Kwemou M, Untrau M, Michel S, Pichot A, et al. Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood* (2016) 128(15):1979–86. doi: 10.1182/blood-2016-05-719070
  125. Signori A, Crocchiolo R, Oneto R, Sacchi N, Sormani MP, Fagioli F, et al. Chronic GVHD is associated with inferior relapse risk irrespective of stem cell source among patients receiving transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* (2012) 47(11):1474–8. doi: 10.1038/bmt.2012.58
  126. Remberger M, Mattsson J, Hentschke P, Aschan J, Barkholt L, Svernilson J, et al. The graft-versus-leukaemia effect in haematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* (2002) 30(11):761–8. doi: 10.1038/sj.bmt.1703735
  127. Boukouaci W, Busson M, Peffault de Latour R, Rocha V, Suberbielle C, Bengoufa D, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood* (2009) 114(25):5216–24. doi: 10.1182/blood-2009-04-217430
  128. Gam R, Shah P, Crossland RE, Norden J, Dickinson AM, Dressed R. Genetic Association of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome beyond Histocompatibility Genes. *Front Immunol* (2017) 8:380. doi: 10.3389/fimmu.2017.00380
  129. Martin PJ, Levine DM, Storer BE, Nelson SC, Dong X, Hansen JA. Recipient and donor genetic variants associated with mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv* (2020) 4(14):3224–33. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001927
  130. Patd SS, Rybicki LA, Yurch M, Thomas D, Liu H, Dean R, et al. Influence of major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphisms on cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* (2020) 13(1):32–9. doi: 10.1016/j.hemonc.2019.10.001
  131. Isernhagen A, Schilling D, Monecke S, Shah P, Elsner L, Walter L, et al. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. *Immunogenetics* (2016) 68(2):109–23. doi: 10.1007/s00251-015-0884-8
  132. Carapito R, Aouadi I, Pichot A, Spinnhirny P, Morlon A, Kotova I, et al. Compatibility at amino acid position 98 of MICB reduces the incidence of graft-versus-host disease in conjunction with the CMV status. *Bone Marrow Transplant* (2020) 55(7):1367–78. doi: 10.1038/s41409-020-0886-5
  133. Zuo J, Willcox CR, Mohammed F, Davey M, Hunter S, Khan K, et al. A disease-linked *ULBP6* polymorphism inhibits NKG2D-mediated target cell

- killing by enhancing the stability of NKG2D ligand binding. *Sci Signal* (2017) 10(481):eaai8904. doi: 10.1126/scisignal.aai8904
134. Zuo J, Mohammed F, Moss P. The Biological Influence and Clinical Relevance of Polymorphism Within the NKG2D Ligands. *Front Immunol* (2018) 9:1820. doi: 10.3389/fimmu.2018.01820
135. Yoshida K, Komai K, Shiozawa K, Mashida A, Horiuchi T, Tanaka Y, et al. Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2011) 63(10):3058–66. doi: 10.1002/art.30501
136. Norris S, Kondeatis E, Collins R, Satsangi J, Clare M, Chapman R, et al. Mapping MHC-encoded susceptibility and resistance in primary sclerosing cholangitis: the role of MICA polymorphism. *Gastroenterology* (2001) 120(6):1475–82. doi: 10.1053/gast.2001.24041
137. López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, López-Soto A, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, et al. MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatol (Oxford)* (2007) 46(3):426–30. doi: 10.1093/rheumatology/kei331
138. Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, Norris D, Price V, Shimomura Y, et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature* (2010) 466(7302):113–7. doi: 10.1038/nature09114

**Conflict of Interest:** 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 © 2021 Machuldova, Holubova, Caputo, Cedikova, Jindra, Houdova and Pitule. 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.



# Význam receptorů NK buněk u alogenních transplantací krvetvorných buněk u pacientů s akutní myeloidní leukemií

## Role of NK cell receptors in allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia

Machuldová A.<sup>1,2</sup>, Pitule R.<sup>1,2</sup>, Dekojová T.<sup>2,3</sup>, Jindra P.<sup>3</sup>, Holubová M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoř nádorové biologie a imunoterapie, Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

<sup>2</sup> Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni

<sup>3</sup> Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

**SOUHRN:** NK buňky hrají u alogenní transplantace kostní dřeně významnou roli, nejen při eradikaci zbývajících nádorových buněk, ale ovlivňují i rozvoj reakce štěpu proti hostiteli. Je tedy třeba porozumět jejich regulaci a tomu, jakým způsobem může reakce imunitního systému pacienta NK buňky dárce ovlivňovat. Inhibice a aktivace NK buněk je řízena celou řadou receptorů, které reagují na široké spektrum ligandů. Ať už inhibičních, které signalizují NK buňkám, že je cílová buňka v pořádku nebo aktivních, které vyjadřují nějaké poškození cílové buňky. Mezi nejprozkoumanější receptory patří KIR a dále NKG2D se svými ligandy MICA a MICB. Přehledu jejich role v transplantaci kostní dřeně se věnuje tato práce.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** akutní myeloidní leukemie – KIR – NKG2D – MICA – MICB

**SUMMARY:** NK cells play an important role in allogeneic stem cell transplantation; not only as effector cells in the eradication of remaining cancer cells but also as potential inducers of graft versus host disease. Hence, it is important to understand their regulation and how the patient's immune system affects donor NK cells. NK cell inhibition or activation is directed by many receptors which interact with a broad spectrum of ligands. Inhibition ligands signal that the target cell is healthy, and activating ligands reflect that the cell is damaged. The most investigated receptors are KIR together with the NKG2D receptor with its ligands MICA and MICB. This work describes their role in stem cell transplantation.

**KEY WORDS:** acute myeloid leukemia – KIR – NKG2D – MICA – MICB

### ÚVOD

Akutní myeloidní leukemie (AML) je nejčastějším typem akutních leukemií dospělých (až 80 %) [1]. Současně s tím má AML z leukemií nejkratší celkové přežití [2]. AML je v současné době vyléčitelná u 30–45 % pacientů ve věku do 60 let, ale se stoupajícím věkem úspěšnost léčby klesá až na 15–5 %.

Léčba AML spočívá v indukční chemoterapii a konsolidační terapii a u pacientů se středním a vysokým rizikem relapsu je, v případě dovolujícího zdravotního stavu pacienta, jako konsolidace

indikována alogenní transplantace hematopoetických buněk (HSCT) [3,4].

Cílem HSCT je vytvoření nové nemaligní krvetvorby, která následně vede také k likvidaci reziduálních leukemických buněk. Kmenové leukemické buňky nicméně vykazují schopnost na svém povrchu nevystavovat antigeny potřebné k navození specifické odpovědi imunitního systému a unikají tak nejen chemoterapii, ale i imunitnímu dohledu [5]. V takové situaci lze využít mechanismu přirozeného imunitního systému, konkrétně NK (*natural killer*, při-

rození zabíječi) buněk, které při setkání s jinou buňkou vyhodnocují přítomnost nebo absenci HLA třídy I (*human leukocyte antigen*, dále HLA-I) komplexu na buňce. V případě, že je HLA-I komplex přítomen, přijímá NK buňka set signálů, které vedou skrz inhibiční receptory (příměně KIR, *killer-cell immunoglobulin-like receptor*), k inhibici reakce NK buňky. V případě absence HLA-I dochází k tzv. *missing-self* efektu, kdy NK buňka nedostává inhibiční signál a rovnováha buňky se posouvá směrem k její aktivaci skrz aktivní receptory [6]. Na ak-

Tab. 1. Inhibiční receptory NK buněk a jejich ligandy [10,11].

Inhibiční receptory NK buněk	Ligandy
KIR2DL1	HLA-C skupiny 2
KIR2DL2/3	HLA-C skupin 1 i 2
KIR2DL5A/B	neznámé
KIR3DL3	neznámé
KIR3DL1	HLA-A a HLA-B alely kódující epitop Bw4
KIR3DL2	HLA-A*03 a HLA-A*11
CD94/NGG2A	HLA-E
LILRB1	HLA třídy I
LAG-3	HLA třídy II
KLRG1	kadheryn
SKLECS	kyselina slaková, gangliosid DSGB5
NKRP1A	LLT1 (lektinu-podobný transkript 1)
PD-1	PD-L1, PD-L2
IRP60	α-Herpes virus, pseudorabies virus, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin
Tactile	PVR
IL1R8	IL-37
TIGIT	PVR
TIM-3	Gal-9, PtdSer, HMGB1, CEACAM1

Tab. 2. Aktivační receptory NK buněk a jejich ligandy [10,11].

Aktivační receptory NK buněk	Ligandy
KIR2DS1	HLA-C skupiny 2
KIR2DS2	Neznámé
KIR2DS3	Neznámé
KIR2DS5	HLA-C skupiny 2
KIR3DS1	HLA-F
KIR2DS4	Několik HLA-C a HLA-A*11
KIR2DL4	HLA-G
CD94/NGG2C	HLA-E
CD94/NGG2E	HLA-E
CD16 (FcγRIII)	Fc část protilátky
CD94/NGG2D	MICA, MICB, ULBP1-6
DNAM-1	Nectin-2 a PVR
CD58	LFA-2
NKp30	B7-H6, HCMV-pp65, heparin sulfát
NKp44	MML5, virový hemaglutinin, PCNA
NKp46	Komplementový faktor P, virový hemaglutinin, heparan sulfát
NKp65	KACL
NKp80	AKL

HLA – human leukocyte antigen; NK – natural killer

tivaci buňky se podílí také okolní prostředí – cytokiny, kostimulační receptory či T lymfocyty [7].

NK buňky na základě recentních dat hrají roli nejen při odpovědi na transformované buňky, ale také v rozvoji GVHD (*graft versus host disease*, reakce štěpu proti hostiteli) [8,9]. Jejich přesná role a to, jakým způsobem mohou NK buňky ovlivňovat výsledek transplantace, je nyní předmětem interzivního zkoumání, na kterém se podílí i naše pracoviště.

### RECEPTORY NK BUNĚK A JEJICH LIGANDY

Každá zralá NK buňka má svůj specifický set receptorů, které řídí její aktivitu směrem k inhibici nebo aktivaci. Nejlépe prozkoumanými NK receptory jsou tzv. KIR receptory, kterým jako ligandy slouží přímě HLA-I proteiny (seznam známých receptorů NK buněk a jejich ligandů dle Boudreau et al., 2018 a Sivori et al., 2019 lze najít v tab. 1 a 2 [10,11]). Mezi nejvýznamnější aktivační receptory patří vedle KIR také NKG2D, jehož ligandy MICA a MICB vykazují zvýšenou expresi v rámci stresové odpovědi [12].

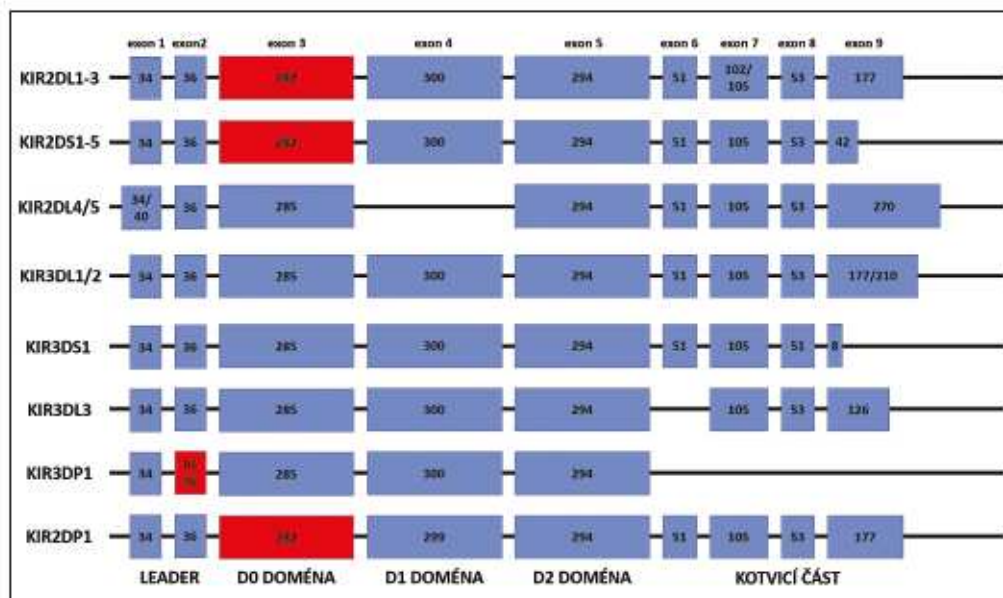
### KIR RECEPTORY

KIR receptory jsou exprimovány přímě na NK buňkách a v nižším množství také na NKT buňkách [13]. Tyto receptory jsou kódovány celou rodinou KIR genů, které se nacházejí na chromosomu 19. K dnešnímu dni známe 15 KIR genů, konkrétně 2DL1-5 (L1, L2/3, L4, L5A a L5B), 3DL1-3 (L1, L2, L3), 2DS1-5 (S1, S2, S3, S4, S5) a 3DS1, a dále 2 pseudogeny, 2DP1 a 3DP1 [14].

KIR geny se skládají z 9 exonů, exony 1 a 2 kódují vedoucí sekvenci, exon 3 doménu D0, exon 4 doménu 1, exon 5 doménu 2 a exony 6–9 pak transmembránovou a cytoplasmatickou část proteinu. Všechny geny nemusejí obsahovat všechny exony a stejně tak se mohou lišit délky jednotlivých exonů (obr. 1).

Názvosloví KIR genů odpovídá jejich proteinové struktuře, kdy první číslo, 2 nebo 3, značí počet extracelulárních domén a pís-





Obr. 1. Struktura genů KIR receptorů, převzato z <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/about/>. Červeně označené jsou pseudoexon 3 a chybějící exon 2 pseudogenu 3DP1. Čísla v boxech značí počet bází. Kotvicí část se skládá ze stonku, transmembránové části a cytoplazmatické části.

mena S a L pak délku intracelulární části proteinu (*short-krátká/long-dlouhá*). S délkou intracelulární části je spojena i funkce proteinu. KIR proteiny s dlouhou intracelulární doménou – L – mají na svém konci zpravidla navázan ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) a jsou tudíž inhibiční, KIR proteiny s krátkou intracelulární doménou – S – mají navázaný ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) a jsou aktivační. Jedinou výjimkou je KIR 2DL4, který může být jak inhibiční, tak aktivační. KIR geny mají vysokou alelickou variabilitu, konkrétně bylo k 05/2023 popsáno 1617 alel [15] (pozn. v roce 2020 jich bylo uvedeno ve stejné databázi IPD-KIR 1100 [16], dá se proto očekávat, že uvedené číslo ještě zdaleka není konečné). Nejvíce alel je popsáno u 3DL3 (229 alel kódujících 113 proteinů), ale nejvíce proteinů je tvořeno alelami genu 3DL2 (116 proteinů, které kóduje 168 alel).

KIR geny jsou děděny v tzv. haplotyech, které známe v základu dva, haplo-

typ A a haplotyp B. Každý z nich obsahuje 2 různé sety genů, ale oba haplotypy obsahují tzv. *framework* geny, tj. geny, které rámuji začátek a konec oblasti KIR genů – 3DL3, 3DP1, 2DL4 a 3DL2. Haplotyp A pak obsahuje pouze jeden aktivační KIR receptor – 2DS4. Ne vždy je ale tento protein nakonec exprimován na povrchu buňky a homozygoti pouze s haplotypem A tak na povrchu svých NK buněk nemusejí mít ve výsledku žádný aktivační KIR receptor [17].

Zatímco je variabilita haplotypu A postavena na alelické heterogenitě, variabilita haplotypu B je dána především kompozicí (přítomností či absencí) genů. Nejvíce zatím známých proteinů tvoří *framework* geny přítomné jak u haplotypu A, tak i B – 3DL2 (116 proteinů), 3DL3 (113) a 2DL1 (74), 3DP1 je *framework* pseudogen, proto proteiny netvoří. Další gen s nejčastějším počtem proteinů je 3DL1, který se nachází jak v haplotypu A, tak i B, který tvoří 94 proteinů (známé k 05/2023) [18].

Stejně jako u dalších genů, ovlivňují genetické polymorfismy také expresi a funkci KIR genů. Již bylo zmíněno, že některé alely 2DS4 nevedou k proteinu exprimovanému na povrchu buňky [17]. Týká se to ale i například 2DL4 [19], 2DL2 [20], 2DL1 [20] nebo 3DL1 [21]. Některé polymorfismy vedou k předčasnému ukončení překladu při tvorbě proteinu, tj. k tzv. *null* alelám. Nejvíce *null* alel, 22, má gen 2DS4 (54 % z celkových 41 alel), následovaný genem 2DL1, který jich má ale výrazně méně, 7 ze 185 (4 %) [18]. Další polymorfismy pak mohou ovlivňovat hladinu exprese na povrchu buňky nebo mohou ovlivňovat sílu vazby receptoru k ligandu, obojí například u 3DL1 [22,23].

#### ROLE HAPLOTYPU, POLYMORFISMŮ KIR RECEPTORŮ A SHODY A NESHODY KIR-HLA PŘI HSCT

Haplotyp A je složen převážně z inhibičních KIR, zatímco haplotyp B obsa-

huje více aktivačních KIR, v teoretické rovině by proto měl štěp dárce s haplotypem B vést k silnější reakci štěpu proti leukémii. U pacientů s AML, kteří podstoupili transplantaci s dárce s alespoň jedním B haplotypem bylo skutečně pozorováno nižší riziko relapsu [24,25]. Také transplantace štěpů od dárce s nižším zastoupením inhibičních receptorů vedly k nižšímu výskytu relapsů a delšímu přežití [26].

Roli hrají ale také jednotlivé alely či polymorfismy daných genů. Typ aminokyseliny na pozici 245 KIR 2DL1 ovlivňuje míru inhibiční funkce tohoto receptoru. Ve studii Bariho a kolektivu bylo prokázáno, že pacienti, kteří dostali štěp od dárce s 2DL1 se silnější inhibiční funkcí, vykazovali lepší přežití a nižší riziko relapsu [27]. Autoři dále popisují, že u buněk se slabší inhibiční funkcí 2DL1 pozorovali u NK buněk signifikantně méně degranulace a sekrece IFN- $\gamma$  [28]. S úplně opačným výsledkem přišel tým Boudreauho et al. [29]. Ti u pacientů se štěpem od dárce s alelami genu 3DL1 vedoucími k slabší nebo žádné inhibici (\*005, \*007 nebo \*004) pozorovali signifikantně nižší riziko relapsu a delší OS oproti pacientům se štěpem se silně inhibičními alelami (\*001, \*002) [29]. Podobných výsledků se dobrali Schaffer et al. [30, 31]. Alely 2DL1\*003 a 2DL3\*003 hrály roli v případě přítomnosti v haploidentickém štěpu pro pacienty s AML. Jejich přítomnost vedla k nižšímu výskytu relapsu [32].

### VLIV KIR – HLA SHODY A NESHODY NA HSC T

KIR – HLA shodu/neshodu mezi dárce a pacientem lze posuzovat dle více přístupů na základě toho, zda dochází k typizaci pouze HLA pacienta, dárce nebo zda je zahrnuta i typizace KIR. Přítomnost jednotlivých ligandů a receptorů, a tedy i případnou aloreaktivitu lze zkoumat jak genotypizací, tak ale i fenotypizací či funkčními testy NK buněk [33].

V případě, že máme informaci pouze o HLA pacienta, je využití model „chybějícího ligandu“ (*missing ligand*), kdy ne-

přítomnost některého z ligandů (HLA-C1, HLA-C2 či HLA-Bw4) pro inhibiční KIR může vést k aloreaktivě (NK nedostává inhibiční signál) v případě přítomnosti takového KIR u dárce. Tuto reakci ale pouze předpokládáme, protože nemáme jistotu, že dárce příslušný inhibiční KIR receptor má [34]. Tuto metodu lze využít v případě haploidentických transplantací, kdy dárce není vždy otypizován kompletně z důvodu předpokladu dědičnosti HLA.

Pokud máme informaci o HLA jak dárce, tak pacienta a u pacienta chybí HLA, které je přítomné u dárce, mluvíme o *missing-self* (nebo také *KIR-ligand* nebo *ligand-ligand missing*) neshodě. Pro představu, dárcovský štěp od dárce s HLA-C1 i HLA-C2 bude postrádat inhibiční signál od pacienta, který má pouze HLA-C1 a dojde tak k aloreaktivě [34]. Stejně jako v předchozím případě, i zde tuto reakci pouze předpokládáme. Tento model je využíván v nepříbuzenských transplantacích, kde jsou pacienti i dárci pro HLA plně typizováni.

Třetím modelem je model neshody receptoru a ligandu (*receptor-ligand mismatch*). V tomto případě známe HLA pacienta a KIR receptory dárce a minimálně jeden inhibiční KIR zůstává bez příslušného ligandu (například přítomnost KIR2DL1 u dárce, ale absence HLA-C2 u pacienta) [35].

Posledním modelem je „přítomnost aktivačního KIR“. Tento model pracuje s předpokladem, že vedle chybějícího inhibičního signálu je potřeba také přítomnost aktivačního signálu pro aktivaci NK buňky. Zde je tedy třeba znát typ aktivačního KIR a přítomnost jeho ligandu u pacienta [36].

Bylo popsáno, že pacienti s AML nebo myelodysplastickým syndromem (MDS), kteří měli KIR – HLA neshodu, měli signifikantně delší přežití bez nemoci (*disease-free survival*, DFS) i celkové přežití (*overall survival* – OS) a nižší riziko relapsu. V případě, že se pacient s dárce navíc neshodovali nejen v jednom, ale ve dvou ligandech, bylo dosahováno ještě lepšího DSF a OS [37].

Ruggeri s kolektivem sledovali 5leté přežití u pacientů s AML, kteří byli transplantováni s nebo bez KIR – HLA neshody. V případě neshody byla pravděpodobnost 5letého přežití kolem 60 %, v opačném případě to bylo méně než 5 % [38]. Podobný efekt – vyšší pravděpodobnost OS ve 4,5 letech v případě neshody (87 vs. 48 %;  $p = 0,006$ ) a vyšší pravděpodobnost DFS (87 vs. 39 %;  $p = 0,0007$ ) sledoval tým Sebastiana Giebela [39]. Ruggeri et al. popsali tentýž trend také u haploidentických transplantací [35]. Ne všechny práce tento efekt potvrdily. Beelen et al. nepozorovali žádný benefit v případě aloreaktivy [40] podobně jako Bornhäuser s kolektivem [41]. Rozdíl ve studiích se dá nepochybně vysvětlit rozdílnou populací pacientů, ale efekt by mohl hrát i KIR – HLA neshoda v případě aktivačních KIR. Tyto receptory by v případě shody naopak měly protektivní efekt s ohledem na relaps [42].

Z toho vyplývá, že interakce mezi KIR a HLA je důležitým faktorem při transplantaci kostní dřeně a je tedy vhodné tento parametr sledovat. To vedlo ke vzniku kalkulátoru shody KIR-HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/ligand/>), který umožňuje pracovitějším tuto interakci sledovat na základě zadání HLA pacienta a HLA dárce. Slabinou tohoto kalkulátoru je ale to, že sleduje příměrně interakci (shodu/neshodu) mezi inhibičními KIR a HLA, což ovšem vychází i z toho, že ligandy pro inhibiční receptory jsou známé lépe než pro aktivační KIR. Tento fakt ale může zkreslit výsledný způsob reakce NK buněk na buňky pacienta a je třeba se lepšímu prozkoumání aktivačních KIR věnovat.

### NKG2D RECEPTOR A JEHO LIGANDY

NKG2 (*natural killer group 2*) receptory jsou transmembránové molekuly typu II s doménou lektinového typu C, které mohou (ale nemusí) dimerizovat s proteinem CD94 na buněčném povrchu. Bylo popsáno 7 typů těchto receptorů, NKG2A, B, C, D, E, F a H [43,44]. NKG2A



a NKG2B jsou receptory inhibiční. Ostatní receptory z této rodiny jsou aktivizační [45–47]. Tato rodina proteinů je přítomná na NK buňkách, ale i na CD8+ a CD4+ T lymfocytech [43,48,49].

NKG2D receptor, kódovaný genem KLRF1, vykazuje oproti KIR receptorům poměrně malou genetickou variabilitu, přesto byly popsány čtyři alely tvořící dva typy haplobloků, které mají vliv na cytotoxicitu buňky. Jedná se o alely LNK1, LNK2, HNK1, a HNK2. To, jestli je alela LNK1 nebo HNK1 je určeno na základě SNP (*single nucleotide polymorphism*) rs1049174 (na této pozici je buď C nebo G). LNK2 vs HNK2 je určeno polymorfismem rs2255336 (G → A). Jak již název napovídá (LNK – *low* NK), spouští LNK alela oproti HNK (*high* NK) alele nízkou cytotoxicitu. Haploblok Hb-1 obsahuje LNK1 a HNK1, které se mohou nacházet ve třech kombinacích – LNK1/LNK1, HNK1/HNK1 a LNK1/HNK1 a stejně tak u haplobloku Hb-2 jde o kombinace LNK2/LNK2, HNK2/HNK2 a LNK2/HNK2 [50]. Hayashi et al popsali, že kombinace HNK1/HNK1 vede ke sníženému riziku rozvoje nádorového onemocnění oproti kombinaci LNK1/LNK1 [50]. Espinoza s kolektivem došli k podobnému výsledku u HSCT, kdy pacienti se štěpem od dárců s HNK1/HNK1 dosahovali lepšího celkového přežití a nižší mortalitě způsobené transplantací [51]. V našem souboru dat nicméně žádný efekt haplotypu NKG2D na výsledek transplantace nebyl pozorován [52].

NKG2D receptor rozeznává ligandy MICA, MICB a ULBP1-6, které jsou exprimované na buňkách v případě, že buňky zažívají buněčný stres (tepelný šok, oxidativní stres, radiace), virovou infekci nebo nádorovou transformaci [49]. Tyto ligandy se mohou vyskytovat i na zdravých buňkách (proliferující buňky, myeloidní progenitorové buňky či zdravé intestinální epitelální buňky a buňky opravující poškozenou tkáň [49]), ale v takovém případě se předpokládá, že samotná přítomnost ligandu není pro reakci buněk s NKG2D receptorem dostatečná a převažuje množství inhibičních signálů [53].

Ligandy MICA a MICB patří do rodiny MIC (MHC class I-related chain), ULBP1-6 do rodiny ULBP/RAET (*human cytomegalovirus Unique Long 16-binding protein/Retinoic acid early transcript*). Obě tyto rodiny jsou příbuzné s HLA-I proteiny, ale na rozdíl od nich neasociují s  $\beta$ 2-mikroglobulinem a není o nich známo, že by na svém povrchu prezentovaly antigen [54]. Žádný antigen tak neovlivňuje způsob jejich vazby na receptor. NKG2D ligandy hrají zásadní roli v regulaci imunitní reakce, proto se cílové buňky naučily různým způsobem ovlivňovat jejich přítomnost na svém povrchu. Geny obou ligandů se skládají z vedoucí sekvence, kódované exonem 1, extracelulárních domén alpha1-3 (exony 2–4) a transmembránové a cytoplazmatické části (exony 5–6) (obr. 2) [55,56].

Oba geny jsou velmi polymorfní, k 03/2023 je v databázi sekvencí IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>) 531 alel pro MICA a 244 pro MICB. Alel ale bude, stejně jako v případě KIR, nepochybně přibývat, v roce publikačního výstupu naší pracovní skupiny, tj. v roce 2021, bylo alel MICA 223 a MICB 138 [49].

### POLYMORFISMY NKG2D LIGANDŮ A JEJICH VLIV NA HSCT

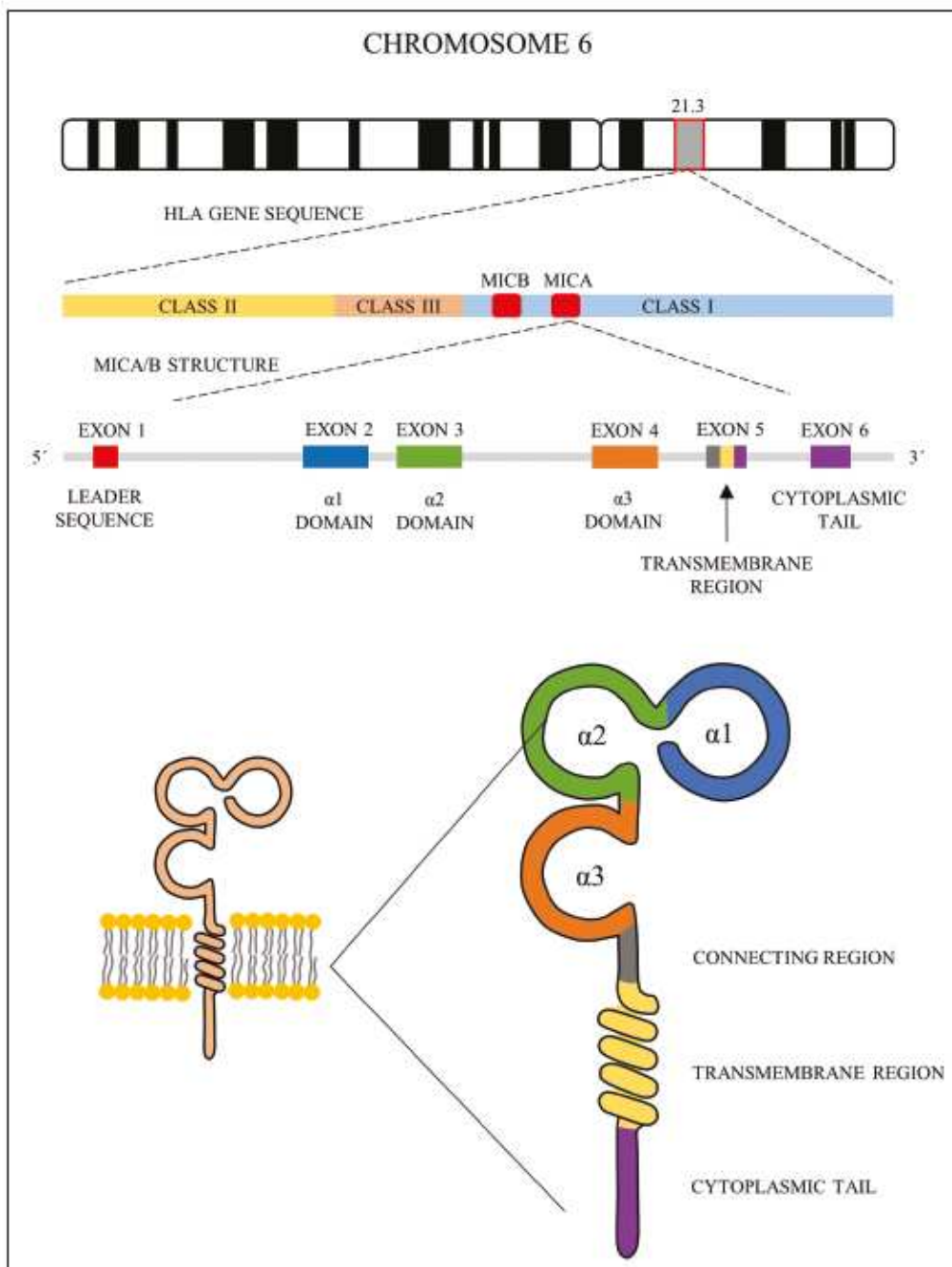
Na základě teorie o shodě mezi ligandy a receptory by měla neshoda mezi dárcem a pacientem v NKG2D ligandech vést k neschopnosti NK buněk tyto ligandy rozeznat a tím vést i k nižší reakci štěpu proti leukémii (GVL), ale na druhou stranu i k nižšímu riziku rozvoje GVHD [49]. Přesto tomu data neodpovídají. Práce kolektivů kolem Simrit Parmar, Raphaela Carapita a Daniela Fuersta popisují, že naopak shoda mezi dárcem a pacientem u MICA vede k nižšímu rozvoji aGVHD [57–59]. A stejně tak nižšímu cGVHD [57]. To může být vysvětleno tím, že přímá způsobují GVHD aloreaktivní  $\alpha\beta$  T lymfocyty, které neshodně NKG2D ligandy rozeznávají jako aloantigeny a přistupují k buňkám stejně jako

v případě neshody v HLA na antigen-prezentujících buňkách [58,60].

U relapsu, tj. při nedostatečné reakci štěpu proti leukémii, ovšem nejsou data tak konsistentní. Parmar a Carapito se svými týmy pozorovali v případě neshody mezi dárcem a pacientem v MICA nižší riziko relapsu [57,58]. Fuerst s kolektivem naopak pozorovali v případě neshody mezi dárcem a pacientem vyšší riziko relapsu. Jejich studie ale byla, na rozdíl od dvou předchozích, postavená na shodě a neshodě v jedné aminokyselině, konkrétně na přítomnosti valinu nebo methioninu na pozici 129 (MICA-129Val/Met) [59].

Tento polymorfismus pak byl sledován v dalších pracích, a to i bez ohledu na shodu mezi dárcem a pacientem. Ligand MICA, který má na pozici 129 methionin, se váže k NKG2D receptoru s vyšší afinitou oproti MICA-129 s valinem, což vede k rozdílné síle i délce trvání odpovědi NK buňky. Zjednodušeně lze říci, že MICA-129Met se naváže silněji, díky čemuž spustí silnější reakci a o to dříve pak dojde k vyčerpání NKG2D receptoru a NK buňky. Homozygotní MICA-129 Met/Met pacienti pak mají z toho důvodu vyšší riziko aGVHD [61]. Naopak, u MICA-129Val je vazba k receptoru slabší, ale o to delší, a je tedy vyšší riziko cGVHD, což potvrdil Boukouaci s týmem [62]. Stejný tým také prokázal vliv solubilních MICA na vyšší riziko rozvoje cGVHD [62]. V našem datasetu hrál roli polymorfismus MICA-14, kdy podání štěpu od dárců s alespoň jednou kopií MICA-14Gly (místo MICA-14Trp) vedlo k signifikantně kratšímu celkovému přežití ( $p = 0,0071$ ) [52].

Co se týče MICB, neshoda v rámci polymorfismu na pozici 98 (MICB-98Ile/Met) zvyšuje riziko rozvoje chronického i akutního GVHD v případě, že dárci a příjemci jsou jinak MICA a HLA shodní a pacient je přitom zároveň CMV pozitivní [63]. V případě, že byl pacient CMV negativní, nehrála neshoda takovou roli a v případě shody v MICB-98, nehrál zase roli CMV status pacienta [63]. V naší studii jsme pozorovali vliv polymorfismu



Obr. 2. Struktura genů a proteinů MICA a MICB. Převzato z Machuldová et al., 2021 [49].



MICB-58, kde přítomnost alespoň jedné kopie MICB-58Lys u pacienta vedla k nižšímu riziku relapsu než v případě, že MICB-58Lys přítomno nebylo. Toto pozorování nicméně nebylo potvrzeno statisticky ( $p = 0,069$ ) z důvodu nedostatečně velkého souboru pacientů.

## ZÁVĚR

Z uvedeného vyplývá, že receptory NK buněk hrají v transplantaci kostní dřeně důležitou roli. Mezi ty zásadní patří shoda mezi dárcem a pacientem v HLA a inhibičními KIR vedoucí k slabší reakci štěpu proti leukémii, byť tento efekt není potvrzen všemi dostupnými pracemi. Taktéž se uvádí, že lepším dárcem pro pacienta s AML je dárc s KIR haplotypem B pro přítomnost většího množství aktivačních KIR oproti haploidentickému dárci s haplotypem A. Popsáno bylo i několik alel a polymorfismů KIR genů, které ovlivňovaly výsledek allo-HSCT, ale tyto informace vyžadují další potvrzení na dostatečně velkém souboru pacientů. Podobné je to s alelami a polymorfismy receptoru NKG2D (LNK/HNK) a jeho ligandů MICA a MICB. Bylo popsáno několik polymorfismů (MICA-129, MICA-14, MICB-98, MICB-58), které se zdají mít na allo-HSCT vliv, ale stejně jako v případě KIR je potřeba dané efekty potvrdit ve studii zahrnující dostatečný počet pacientů. V každém případě ale platí, že si receptory NK buněk a jejich ligandy zaslouží další pozornost.

## Literatura

- Vakiti A, Mewawalla P. Acute myeloid leukemia. In: StatPearls. edn. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2022.
- Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70–87.
- Loke J, Buksa R, Craddock C. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: who, when, and how? *Front Immunol.* 2021;12:659595.
- Giralt S, Bishop MR. Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In, edn.: Springer US. 2009;1–21.
- Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Publisher Correction: Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature.* 2019;572(7770):E19.
- Bertaina A, Andreani M. Major histocompatibility complex and hematopoietic stem cell transplantation: beyond the classical HLA polymorphism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):621.
- Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol.* 2011;2:88.
- Simonetta F, Alvarez M, Negrin RS. Natural killer cells in graft-versus-host-disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:465.
- Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood.* 2010;115(21):4293–4301.
- Boudreau JE, Hsu KC. Natural killer cell education and the response to infection and cancer therapy: stay tuned. *Trends Immunol.* 2018;39(3):222–239.
- Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(5):430–441.
- Zingoni A, Cecere F, Vulpis E, et al. Genotoxic stress induces senescence-associated ADAM10-dependent release of NKG2D MIC ligands in multiple myeloma cells. *J Immunol.* 2015;195(2):736–748.
- Long EO, Colonna M, Lanier LL. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. *Immunity Today.* 1996;17(2):100.
- Margolis DJ, Mitra N, Hoffstad OJ, et al. Association of KIR2DL5, KIR2DS5, and KIR2DS1 allelic variation and atopic dermatitis. *Scient Rep.* 2023;13(1):1730.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D423–D431.
- Dębska-Zielkowska J, Moszkowska G, Zieliński M, et al. KIR receptors as key regulators of NK cells activity in health and disease. *Cells.* 2021;10(7):1777.
- Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol.* 2002;169(9):5118–5129.
- Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D948–D955.
- Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, et al. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):199–211.
- VandenBussche CJ, Dakshnamurthy S, Posch PE, Hurley CK. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *J Immunol.* 2006;177(8):5347–5357.
- Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol.* 2003;171(12):6640–6649.
- Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol.* 2001;166(5):2992–3001.
- Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol.* 2005;175(8):5222–5229.
- Impola U, Turpeinen H, Alakulppi N, et al. Donor haplotype B of NK KIR receptor reduces the relapse risk in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation of AML patients. *Front Immunol.* 2014;5:405.
- Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2009;113(3):726–732.
- Shaffer BC, Hsu KC. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016;29(4):351–358.
- Bari R, Rukhyanont P, Sullivan E, et al. Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2013;31(30):3782–3790.
- Bari R, Bell T, Leung WH, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine 245. *Blood.* 2009;114(25):5182–5190.
- Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, et al. KIR3DL1/HLA-B subtypes govern acute myelogenous leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2017;35(20):2268–2278.
- Shaffer BC, Heller G, Le Luduec J-B, et al. Selection of unrelated allogeneic hematopoietic cell donors based on KIR3DL1 allotypes is feasible and results in improved disease-free survival in transplant recipients with MDS and AML. *Blood.* 2016;128(22):990–990.
- Shaffer BC, Le Luduec J-B, Park S, et al. Prospective KIR genotype evaluation of hematopoietic cell donors is feasible with potential to benefit patients with AML. *Blood Adv.* 2021;5(7):2003–2011.
- Dubreuil L, Maniangu B, Chevallier P, et al. Centromeric KIR AA individuals harbor particular KIR alleles conferring beneficial NK cell features with implications in haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):3595.
- Heidenreich S, Kröger N. Reduction of relapse after unrelated donor stem cell transplantation by KIR-based graft selection. *Front Immunol.* 2017;8:41.
- Symons HJ, Fuchs EJ. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-hap-

- lidentical) related donors. Bone Marrow Transplant. 2008;42(6):365–377.
35. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. Blood. 2007;110(1):433–440.
36. Cheung JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. J Immunol. 2007;179(2):854–868.
37. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. Blood. 2005;105(12):4878–4884.
38. 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.
39. 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.
40. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. Blood. 2005;105(6):2594–2600.
41. Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. Blood. 2004;103(7):2860–2861; author reply 2862.
42. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. Leukemia. 2005;19(8):1446–1451.
43. Borrego F, Masilamani M, Marusina AI, Tang X, Coligan JE. The CD94/NG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. Immunol Res. 2006;35(3):263–278.
44. Kim DK, Kabat J, Borrego F, Sanni TB, You CH, Coligan JE. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. Mol Immunol. 2004;41(1):53–62.
45. Orbelyan GA, Tang F, Sally B, et al. Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. J Immunol. 2014;193(2):610–616.
46. Larier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NG2C NK cell receptors. Immunity. 1998;8(6):693–701.
47. Bellón T, Heredia AB, Llano M, et al. Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activating CD94/kp39 heterodimer. J Immunol. 1999;162(7):3996–4002.
48. Creelan BC, Antonia SJ. The NKG2A immune checkpoint – a new direction in cancer immunotherapy. Nature Rev Clin Oncol. 2019;16(5):277–278.
49. Machuldova A, Holubova M, Caputo VS, et al. Role of polymorphisms of NKG2D receptor and its ligands in acute myeloid leukemia and human stem cell transplantation. Front Immunol. 2021;12:651751.
50. 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 Res. 2006;66(1):563–570.
51. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. Haematologica 2009;94(10):1427.
52. Machuldova A, Houdova L, Kratochvilova K, et al. Single-nucleotide polymorphisms in MICA and MICB genes could play a role in the outcome in AML patients after HSCT. J Clin Med. 2021;10(20):4636.
53. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond stressed self: evidence for NKG2D ligand expression on healthy cells. Curr Immunol Rev. 2009;5(1):22–34.
54. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? Trends Immunol. 2001;22(7):378–385.
55. Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, et al. Further polymorphism of the MICA gene. Eur J Immunogenet. 2002;29(1):35–46.
56. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. Adv Immunol. 2000;76:1–60.
57. Carapito R, Jung N, Kwemou M, et al. Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. Blood. 2016;128(15):1979–1986.
58. Parmar S, Del Lima M, Zou Y, et al. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. Blood. 2009;114(14):2884–2887.
59. Fuerst D, Neuchel C, Niederwieser D, et al. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2016;128(26):3169–3176.
60. Abdelhakim H, Abdel-Aziz H, Saad A. Role of αβ T cell depletion in prevention of graft versus host disease. Biomedicine. 2017;5(3):35.
61. Isernhagen A, Malzahn D, Viktorova E, et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. EMBO Mol Med. 2015;7(11):1480–1502.
62. Boukouaci W, Busson M, Peffault de LaTour R, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. Blood. 2009;114(25):5216–5224.
63. Carapito R, Aouadi I, Pichot A, et al. Compatibility at amino acid position 98 of MICB reduces the incidence of graft-versus-host disease in conjunction with the CMV status. Bone Marrow Transplant. 2020;55(7):1367–1378.

#### PODĚL AUTORŮ NA RUKOPISU

AM – hlavní autor  
PP, TD, PJ, MH – revize dokumentu

#### PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena grantem ministerstva zdravotnictví – číslo NV18-03-00277 a projektem institucionálního výzkumu MZČR – FNPI, 00669006.

#### ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou společností.

Doručeno do redakce dne: 30. 5. 2023.

Přijato po recenzi dne: 15. 6. 2023.

Mgr. Alena Machuldová  
Laboratoř nádorové biologie  
a imunoterapie

Biomedicínské centrum

LF UK v Plzni

Alej Svobody 76

301 00 Plzeň

a Ústav histologie a embryologie

LF UK v Plzni

Karlovarská 48




301 00 Plzeň

e-mail: alena.machuldova@gmail.com



Article

# Single-Nucleotide Polymorphisms in MICA and MICB Genes Could Play a Role in the Outcome in AML Patients after HSCT

Alena Machuldova <sup>1,2,\*</sup> , Lucie Houdova <sup>3</sup>, Katerina Kratochvilova <sup>3</sup>, Martin Leba <sup>3</sup>, Pavel Jindra <sup>4</sup> , Pavel Ostasov <sup>1</sup> , Diana Maceckova <sup>1</sup> , Robin Klieber <sup>1</sup> , Hana Gmucova <sup>4</sup>, Jiri Sramek <sup>2,4</sup> and Monika Holubova <sup>1,4,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Laboratory of Tumor Biology and Immunotherapy, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 323 00 Pilsen, Czech Republic; pavel.ostasov@lfp.cuni.cz (P.O.); maceckod@lfp.cuni.cz (D.M.); KLIEBERR@lfp.cuni.cz (R.K.)
- <sup>2</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 66 Pilsen, Czech Republic; SRAMEKJ@fnplzen.cz
- <sup>3</sup> NTIS, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, 301 00 Pilsen, Czech Republic; houdina@ntis.zcu.cz (L.H.); kkratoch@ntis.zcu.cz (K.K.); lebam@kky.zcu.cz (M.L.)
- <sup>4</sup> Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, 304 60 Pilsen, Czech Republic; jindra@fnplzen.cz (P.J.); GMUCOVAH@fnplzen.cz (H.G.)
- \* Correspondence: alena.machuldova@gmail.com (A.M.); holubovam@fnplzen.cz (M.H.)



**Citation:** Machuldova, A.; Houdova, L.; Kratochvilova, K.; Leba, M.; Jindra, P.; Ostasov, P.; Maceckova, D.; Klieber, R.; Gmucova, H.; Sramek, J.; et al. Single-Nucleotide Polymorphisms in MICA and MICB Genes Could Play a Role in the Outcome in AML Patients after HSCT. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4636. <https://doi.org/10.3390/jcm10204636>

Academic Editors: Thomas R. Chauncey and Alicia Rovio

Received: 8 August 2021  
Accepted: 6 October 2021  
Published: 9 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** NKG2D and its ligands, MICA and MICB, are known as the key regulators of NK cells. NK cells are the first reconstituted cells after the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT); therefore, it is crucial to understand their role in HSCT outcome. In the presented study, we investigated the single amino acid changes across the exons 2–4 of MICA and MICB genes, and point mutations within the NKG2D gene, which defines the type of NKG2D haploblock (HNK/LNK) in the donors ( $n = 124$ ), as well as in patients with acute myeloid leukemia ( $n = 78$ ). In our cohort, we found that graft from a donor with at least one MICA allele containing glycine at position 14 (MICA-14Gly) is significantly associated with deterioration of a patient's overall survival (OS) ( $p < 0.05$ ). We also observed a negative effect of MICB-58 (Lys → Glu) polymorphism on relapse-free survival (RFS), although it was not statistically significant in multivariate analysis ( $p = 0.069$ ). To our knowledge, this is the first work describing the role of MICA-14 and MICB-58 polymorphisms on HSCT outcome.

**Keywords:** allogeneic hematopoietic cell transplantation; graft-versus-host disease; graft-versus-tumor effect; NKG2D; MICA; MICB; NK cells

## 1. Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative treatment for many patients with myeloid malignancies, mostly in patients with acute myeloid leukemia (AML). Despite the significant progress in post-transplant therapy, HSCT is still accompanied by multiple complications. Particularly, graft-versus-host disease (GVHD), infections, and relapse of the disease are the most common and serious [1].

The recovery of the immune system is critical for the success of HSCT. Natural killer (NK) cells are the first lymphocytes reaching the standard numbers within the first few weeks post-transplantation [2], and, therefore, they play a key role in hematopoiesis during the first months after HSCT. NK cells are recognized as crucial cells for early relapse control, and recent data have demonstrated that NK cells also affect GVHD development [3–5]. The exact role of NK cells and crucial parameters, which could help us to improve the outcome of HSCT, are currently broadly investigated.

NK cells' activity is driven via inhibitory and activating receptors [6]. The best-known regulatory receptors of NK cells are the killer immunoglobulin-like receptors (KIR) interacting with their ligands—HLA molecules [7]. Because the virus-infected cells or tumor cells downregulate HLA molecules, KIR cannot interact with inhibitory receptors, and NK cells



are activated more easily through multiple activating receptors, e.g., NKG2D [7]. NKG2D binds stress-induced ligands (MICA, MICB, and ULBP/RAET) present predominantly on damaged cells [8]. NKG2D is a C-type lectin receptor present on NK cells and subsets of T cells [9]. Its gene was described as strongly evolutionarily conserved, but four haplotype alleles playing a role in cytotoxicity have been described—LNK1, LNK2, HNK1, and HNK2. Whether the allele is LNK1 or HNK1 is determined by rs1049174 polymorphism (C → G), while LNK2 vs. HNK2 is determined by polymorphism rs2255336 (G → A). LNK1 and LNK2 initiate low NK cytotoxicity, while HNK1 and HNK2 trigger high NK cytotoxicity. Six different allele combinations create two haploblocks—LNK1/LNK1, LNK1/HNK1, and HNK1/HNK1 form haploblock 1 (Hb-1); LNK2/LNK2, LNK2/HNK2, and HNK2/HNK2 form haploblock 2 (Hb-2) [10]. The haplotype HNK1/HNK1 is associated with a decreased risk of cancer development compared to the LNK1/LNK1 [10]. From the HSCT perspective, transplantation with HNK1/HNK1 donors is related to lower transplantation-related mortality and better OS [11].

The predominant NKG2D ligands, MICA and MICB, are highly polymorphic genes with the main variability in the exons 2–4 encoding extracellular (receptor-binding) domains  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  [12]. The best-known functional polymorphisms with a role in HSCT are in exon 3 of MICA and MICB, called MICA-129 and MICB-98 [13]. MICA-129 with methionine binds NKG2D receptor with higher affinity than the variant with valine causing 1) faster and more intensive activation of NK cells associated with a higher risk of acute GVHD, and 2) the coherent early exhaustion of the receptor increasing the risk of relapse [14]. On the other hand, carriers of MICA-129 with valine are at a higher risk of chronic GVHD because of the longer activity of NK cells [15]. A mismatch between donor and patient in MICA-129 amino acid was described to increase the risk of acute GVHD development, as well as for MICB-98 [16–18]. Accordingly, a lower risk of acute and chronic GVHD was described when full-MICA-allele was matched [17,19]. These results indicate an important role of MICA/MICB gene polymorphisms in HSCT, which should be further studied.

The present study investigates the impact of polymorphisms in the NKG2D gene and the most important exons of its ligands MICA and MICB on the clinical outcome of patients undergoing HSCT.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cohort Description

Clinical data (detailed in Table 1) were collected from 124 patients with myeloid malignancies after HSCT and their donors at the Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen. The samples corresponding donors' cells ( $n = 124$ ) were collected from peripheral blood of patients after the HSCT when donor hematopoiesis was fully regenerated (confirmed by determination of the 100% level of the chimerism using the variable number of tandem repeats (VNTR) estimation by fragment analysis during a routine examination). In a part of the transplanted patients ( $n = 78$ ), pretransplant samples (corresponding to the patients' DNA) were obtained as well.

**Table 1.** Clinical parameters of our cohort. \* DRI was defined according to Armand et al. [20]. \*\* Secondary malignancy is defined as AML after any previous malignancy. \*\*\* Complex karyotype is a karyotype with  $\geq 3$  abnormalities. \*\*\*\* PTCY is post-transplantation cyclophosphamide. \*\*\*\*\* HCT-CI is hematopoietic cell transplantation comorbidity index [21].

Patient Age Group		Type of Donor	
<50	32	Related donor (full match)	25
50–65	65	Unrelated donor	64
>65	27	Haploidentical donor	35

Table 1. Cont.

Patient Age Group		Type of Donor	
Median (years)	58	<b>Conditioning therapy</b>	
Range (years)	23–74	Myeloablative	23
<b>Patient's sex</b>		Reduced	101
Male	72	<b>GVHD prophylaxis</b>	
Female	52	With PTCY ****	34
<b>Diagnosis</b>		Without PTCY	90
AML	118	<b>aGVHD</b>	
MDS	6	Yes	96
<b>Disease Risk Index (DRI) *</b>		No	28
Low	5	<b>cGVHD</b>	
Intermediate	67	Yes	38
High	33	No	64
Very high	7	Unknown	22
Unknown	12	<b>Relapse</b>	
<b>AML as secondary malignancy **</b>		Yes	41
Yes	37	No	82
No	87	Unknown	1
<b>Karyotype</b>		<b>Outcome</b>	
Normal karyotype	58	Dead	62
Complex karyotype ***	16	Alive	62
Other karyotype changes	11	<b>Cause of death</b>	
Unknown	39	Relapse	29
<b>Disease status during HSCT</b>		Infection	16
Active disease	43	Organ failure	7
Complete remission	81	GVHD	6
<b>Graft source</b>		Graft rejection	1
Bone marrow	24	Unknown	3
Peripheral blood stem cells	100	<b>HLA mismatch</b>	
<b>CMV match/mismatch</b>		None	73
Match	75	Haploidentical	35
Mismatch	49	ABC/DP-DR	16
<b>Pretransplant T-cell depletion (patient)</b>		<b>Sex match/mismatch</b>	
Yes	64	Match	65
No	60	Mismatch	59
<b>EBMT risk score</b>		<b>HCT-CI *****</b>	
1–2	24	≥3	34
3	39	<3	81
4	30	unknown	9
5–6	29		
NA	2		



## 2.2. Sample Preparation and Sequencing

DNA was extracted with the Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. PCR cycles were set up to denaturation for 94 °C for 1 min, with 35 cycles consisting of denaturation (94 °C for 15 s), primer annealing (for NKG2D 58.5 °C for 15 s and MICA and MICB 61 °C for 15 s), and extension (in the case of NKG2D, 72 °C for 60 s, and MICA and MICB 72 °C for 120 s). The last extension lasted 10 min at 72 °C for all samples. Total volume of the reaction was 25 µL of the following: 12.5 µL 2 × LA Hot Start Master Mix (Top-Bio, Vestec, Czech Republic), 1 µL forward primer, 1 µL reverse primer, 8.5 µL water, and 2 µL DNA. Primers and corresponding fragment lengths are shown in Table 2.

**Table 2.** Information about PCR primers used in our study.

Sequence of	Length of the Sequence	PCR Primers	Published in
NKG2D-Hb1	253 bp	F: TGCGAGGTATTTATGTTCTG R: ACAGTTTAGGAATACAGCAC	[22]
NKG2D-Hb2	230 bp	F: TTAAGGCTGGAGAATAATGC R: TCAGTGAAGGAAGAGAAGG	[23]
MICA	1.9 kbp (exons 2–4)	F: CCCCTTCTTCTGTTTCATCA R: TGACTCTGAAGCACCAGCAC	[24]
MICB	2.1 kbp (exons 2–5)	F: GGACAGCAGACCTGTGTGTTA R: AAAGGAGCTTCCCATCTCC	[24]

## 2.3. Sequence Evaluation

We were looking for the point mutations of NKG2D which led to a different NK cell activity, while, for MICA/MICB, we used complete sequences of exons 2–4 of both genes for the next analyses.

The point mutation in NKG2D was evaluated within the exon 8 of NKG2D at position 10,372,766 of chromosome 12 (rs1049174) and within the exon 4 of NKG2D at position 10,379,727 of chromosome 12 (rs2255336) [25]. Therefore, only the corresponding parts of the NKG2D gene were sequenced.

In the case of the exons 2–4 of MICA and MICB genes, the reverse and forward sequences of the individual samples were combined in a CAP3 tool [26] and aligned by the Clustal Omega tool within the UGENE program [27] to reference sequences downloaded from the IPD database (3.42 version) [28]. The sequences were then cut into the individual exons by a custom script in Python. The resulting sequences containing ambiguous nucleotides were considered heterozygous. These sequences were then deconvoluted into the combination of the two most common reference sequences. This was achieved by duplication of sequences, with both nucleotide options at each ambiguous position. This was repeated until all ambiguous positions were resolved. Subsequently, all possible sequences were compared with reference sequences, and those without corresponding reference sequences were removed. From the remaining ones, the pairs whose combination would recreate original ambiguous sequences were selected. Sequences that did not meet any of the above conditions were analyzed individually.

The set of all sequences (the sample sequences and the reference sequences downloaded from the IPD database) was then translated into the amino acids by using the “translate” tool at bioinformatics.org [29] for all individual exons. The correctness of the translation was controlled by comparing the results of translation with the amino acid sequence of MICA (sequence Q29983) and MICB (Q29980) available at UniProt [30]. All the following analyses were done with amino acid sequences. The first step with the amino acid sequences of each exon was to cluster them into groups. The groups were created according to the sequence differences by using reference sequences. Each sequence from



our dataset was then included in the group with the same sequence. The second step was to label the sequences of the individuals according to the group the sequences fall into. Samples belonging to one group (homozygous within a particular exon) were labeled as  $S_x/S_x$  (e.g., S1/S1); samples with two different sequences of an exon detected were labeled as  $S_x/S_y$  (e.g., S1/S3). In our analyses, we labeled individuals as fully homozygous only in the case that the sample was homozygous across all three exons.

The combinations mentioned in Table 3 below were then tested by the Kaplan–Meier method for overall survival and relapse-free survival.

**Table 3.** Parameters tested by Kaplan–Meier method for OS and RFS.

OS and RFS Compared within Parameters
MICA/B exons 2–4
MICA-129
MICB-98
MICA/B hetero vs. homozygosity
NKG2D haploblocks 1–2
Match and mismatch within exons 2–4 (MICA/B)
Match and mismatch within MICA-129
Match and mismatch within MICB-98
Match and mismatch NKG2D haploblocks 1–2
Each specific group of each exon compared to the other groups

#### 2.4. Statistical Analysis

Only the combinations of groups containing at least 5 samples were used for multiple-combinations statistical analyses (for example, S1/S1 vs. S1/S2, S1/S4, and S1/S6). The role of presence/absence of a particular group (e.g., samples containing S1 versus samples without the presence of S1) was evaluated in all enrolled samples.

Analyses of the effect of the groups on OS and RFS, and visualizations were performed using Kaplan–Meier analysis and log-rank testing initially. The statistical analysis was performed using R (version 4, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [31] and packages survival (version 3.2) and survminer (0.4.8). Univariate Cox regression was used for the assessment of the effect of clinical parameters on OS and RFS. Statistically significant clinical parameters from univariate analysis were then used for multivariate Cox regression (DRI, AML as secondary malignancy, karyotype, disease status during HSCT, and cGVHD for OS, as well as for RFS). Results with a  $p$ -value lower than 0.05 were assessed as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical Data Evaluation

The demographics of the study population are shown in Table 1 in Section 2. The median post-transplant follow-up was 16 months (range 0.5–143 months). The OS was 63% at year 1, 27% at year 3, and 14% at year 5. RFS after 1, 3, and 5 years was 56.5%, 27%, and 14.5%, respectively. The cumulative incidence of non-relapse mortality (NRM) was 12% at 1 year, and 20% at 5 years. The cumulative incidence of relapse was 17% and 27% at years 1 and 5, respectively. The most common causes of death were relapse (48% of all deaths) and infection (26%), followed by organ failure (11%), GVHD (10%), and one patient died due to graft rejection.

The typical correlation between the clinical parameters and patients' outcomes was observed. A relationship between disease risk score (disease risk index, DRI, [20]) and RFS and OS was observed (both  $p < 0.0001$ ). Contrastingly, the EBMT risk score [32] did not predict longer or shorter RFS or OS (RFS  $p = 0.62$  and OS  $p = 0.23$ ). Shorter RFS was highly associated with the presence of complex karyotype (81% of all patients with complex karyotype had relapse and 69% of all patients with complex karyotype died due to relapse). The most common cause of death in patients with normal karyotype was infection (43%),

followed by relapse (29%). Another negative factor in our cohort was previous malignancy, causing poorer OS ( $p < 0.005$ ) with worse relapse-free survival ( $p < 0.05$ ). The same was observed in patients with active disease present at the time of the HSCT, compared to patients in complete remission (OS  $p < 0.05$ , RFS  $p < 0.05$ ). Patients with acute GVHD (aGVHD) grade III–IV ( $n = 13$ ) have significantly shorter OS than patients with aGVHD grade I–II ( $n = 15$ ) ( $p < 0.01$ ). Oppositely, having chronic GVHD (cGVHD) seems to be protective in comparison with no cGVHD from an OS perspective ( $p < 0.05$ ). Univariate analysis was carried out for all relevant clinical parameters, and results of this analysis are shown in Table 4.

**Table 4.** Results of univariate analysis; statistically significant results are bold. \* HR is hazard ratio. \*\* CI is confidence interval.

	OS				RFS			
	HR *	Lower CI **	Upper CI	p-Value	HR	Lower CI	Upper CI	p-Value
<b>Patient age group</b>								
<50	1				1			
50–65	1.706	0.922	3.155	0.089	1.274	0.602	2.699	0.527
>65	1.105	0.490	2.494	0.809	0.552	0.173	1.763	0.316
<b>Patient's sex</b>								
Female	1				1			
Male	0.939	0.567	1.557	0.809	0.956	0.493	1.856	0.895
<b>Diagnosis</b>								
AML	1				1			
MDS	0.332	0.046	2.398	0.275	0.563	0.077	4.109	0.571
<b>DRI</b>								
Low	1				1			
Intermediate	0.920	0.278	3.050	0.892	1.181	0.152	9.149	0.874
High	3.821	1.151	12.686	<b>0.029</b>	7.450	0.989	56.129	0.051
Very high	8.256	2.095	32.545	<b>0.003</b>	23.261	2.747	196.974	<b>0.004</b>
<b>AML as secondary malignancy</b>								
No	1				1			
Yes	2.106	1.263	3.513	<b>0.004</b>	2.188	1.123	4.261	<b>0.021</b>
<b>Karyotype</b>								
Normal karyotype	1				1			
Other changes	1.542	0.866	2.745	0.141	1.703	0.746	3.887	0.206
Complex karyotype	4.162	2.100	8.251	<b>&lt;0.001</b>	8.404	3.658	19.306	<b>&lt;0.001</b>
<b>Disease status during HSCT</b>								
Active disease	1				1			
Complete remission	0.527	0.320	0.869	<b>0.012</b>	0.510	0.265	0.983	<b>0.044</b>
<b>Graft source</b>								
Bone marrow	1				1			
PBSC	0.829	0.457	1.505	0.538	0.646	0.312	1.341	0.241
<b>Type of donor</b>								
Haploidentical	1				1			
Related	0.648	0.323	1.298	0.221	1.346	0.529	3.424	0.533
Unrelated	0.595	0.333	1.063	0.080	0.974	0.423	2.243	0.950
<b>Conditioning</b>								
Myeloablative	1				1			
Reduced	1.564	0.743	3.291	0.239	0.969	0.424	2.215	0.940



Table 4. Cont.

	OS				RFS			
	HR *	Lower CI **	Upper CI	p-Value	HR	Lower CI	Upper CI	p-Value
<b>GVHD prophylaxis</b>								
No	1				1			
Yes	1.578	0.910	2.736	0.104	0.796	0.348	1.821	0.589
<b>aGVHD</b>								
No	1				1			
Yes	1.139	0.617	2.101	0.678	0.904	0.425	1.923	0.793
<b>cGVHD</b>								
No	1				1			
Yes	0.476	0.243	0.933	<b>0.031</b>	0.232	0.080	0.673	<b>0.007</b>
<b>HCT-CI</b>								
≥3	1				1			
<3	0.753	0.436	1.302	0.311	0.850	0.414	1.745	0.659

3.2. Distribution of Exon Groups and Polymorphisms within the Cohort

The amino acid sequences were distributed into the groups based on the sequences' similarity (for details see Materials and Methods). The amino acid reference sequences of exon 2 of MICA create 10 groups (for amino acid reference sequences' distribution see Supplementary Tables S1–S6). The amino acid sequences of donors and patients belonged to the groups S1, S2, S4, S6, and S7. Exon 3 of MICA was divided into 18 groups; 10 groups were detected within our samples (S1, S2, S5–S9, S13, S15, and S16). The reference amino acid sequences of exon 4 of MICA create 10 groups. The sequences from our dataset fall into the groups S1–S3, S5, S6, and S10. The reference amino acid sequences of exon 2 of MICB created the six groups, as well as for exon 3 of MICB. Exon 4 has three different groups. All amino acid sequences of our samples belong to the groups S1, S2, and S3 for all three exons, except one donor who had S5 within exon 2 of MICB.

In our dataset, 23% of donors and 23% of patients were homozygous within all sequenced exons 2–4 of MICA. The number of homozygous samples on the exon level were similar between patients and donors; 49% of all samples (48% of donors and 50% of patients) were homozygous within exon 2 of MICA, 28% (27% of donors and 28% of patients) within exon 3 of MICA, and 36% (35% of donors and 38% of patients) within exon 4 of MICA.

Regarding the MICB homozygosity, 23% of all donors and 28% of all patients were homozygous in MICB. On the exon level, 39% of all samples (34% of donors and 47% of patients) were homozygous within exon 2 of MICB, 49% (49% of donors and 49% of patients) within exon 3 of MICB, and 87% (88% of donors and 85% of patients) within exon 4 of MICB.

The rest of the samples were heterozygous with different combinations (two exons heterozygous and one homozygous, or other combinations) where we cannot say which combination of alleles of donor or patient is correct.

NKG2D Hb-1 and NKG2D Hb-2 were evaluated as well. In our cohort, 9% donors and 10% patients had HNK1/HNK1 combination, 38% donors and 49% patients had LNK1/HNK1, and 53% donors and 41% patients had LNK1/LNK1 haplotype. Regarding the Hb-2, only 3% of donors and 1% of patients carry HNK2/HNK2, 27% of donors and 38% of patients HNK2/LNK2, and the most represented combination was LNK2/LNK2 with 70% of donors and 61% of patients.

### 3.3. Association of Polymorphism with Clinical Data

#### 3.3.1. Donor MICA Exon 2 Plays a Role in Overall Survival

In the donors' cohort containing 124 samples, we found four homozygous MICA exon 2 combinations (S1/S1, S2/S2, S4/S4, and S6/S6) where S1/S1 was the most frequent one (52 samples). In the heterozygotes group, three groups were mostly detected—S1/S2 (13 samples), S1/S4 (25 samples), and S1/S6 (9 samples). The rest of the groups were too rare (1–5 samples) to be statistically evaluated.

Kaplan–Meier OS analysis of S1/S1, S1/S2, S1/S4, and S1/S6 shows a statistically significant difference between individual groups on OS ( $p < 0.05$ ) (Figure 1). The two worst group combinations—S1/S1 and S1/S4—were then examined by multivariate analysis to confirm that no clinical parameter is responsible for this difference. This analysis showed no effect of the clinical parameters and a 2.8 times higher risk of death for patients with graft S1/S4 than with S1/S1 combination (HR = 2.745 (95% CI, 1.113–6.771,  $p < 0.05$ )).

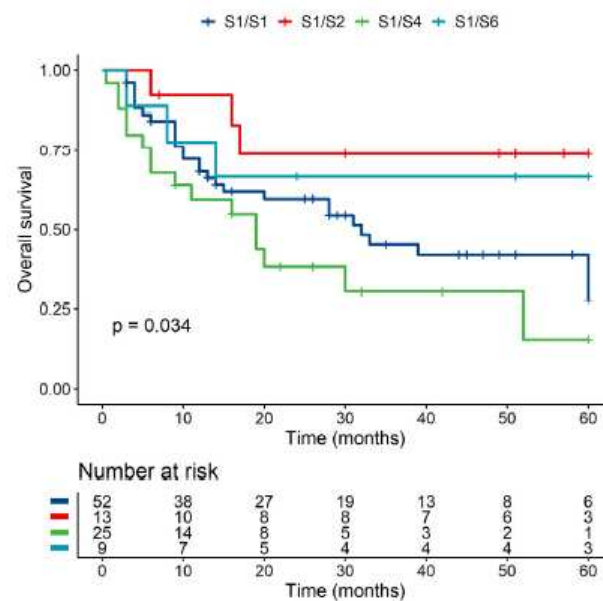
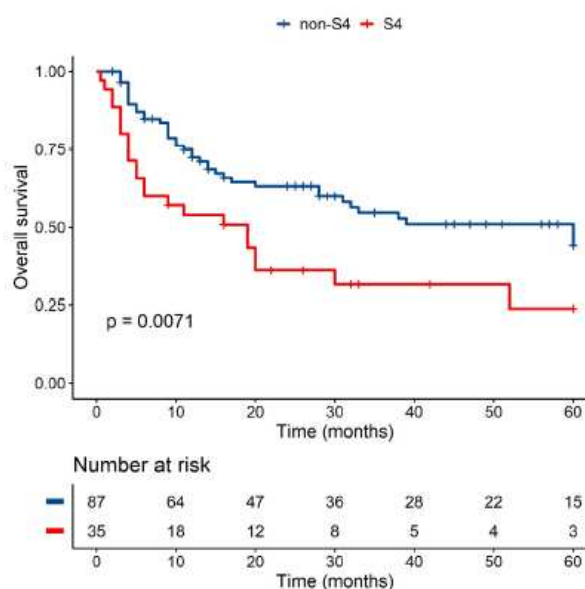


Figure 1. Kaplan–Meier OS analysis of groups within exon 2 of MICA.

From the additional analysis of the presence/absence of a particular group, we confirmed the linkage of group S4 with significantly shorter OS (with  $p < 0.01$  for univariate analysis and  $p < 0.05$  for multivariate analysis with HR = 2.254 (95% CI, 1.058–4.801)) compared to non-S4 groups (Figure 2). The percentage rate of survivors and dead patients with causes of death are summarized in Table 5. The univariate analysis was carried out for the other groups, but no statistically significant difference was observed with them ( $p = 0.61$  for S1  $n = 104$  vs. non-S1  $n = 17$ ;  $p = 0.1$  for S2  $n = 18$  vs. non-S2  $n = 103$ ;  $p = 0.07$  for S6  $n = 13$  vs. non-S6  $n = 108$ ).

We found that the S4 group has glycine at position 14 of MICA, which distinguishes the S4 group from the others which have tryptophan at this position (Table 6).



**Figure 2.** OS of patients transplanted with graft containing at least one copy of MICA-14Gly (S4) versus grafts lacking MICA-14Gly group of MICA exon 2 (non-S4).

**Table 5.** The percentage rate of survivors and dead patients, with causes of deaths for patients transplanted with or without grafts with MICA exon 2 S4 group.

	S4+ Grafts	Non-S4 Grafts
Alive patients	41%	56%
Dead patients	59%	44%
<b>Causes of death</b>		
Relapse	41%	54%
Infection	36%	22%
Organ failure	14%	11%
GVHD	9%	11%
Graft rejection	0%	3%

**Table 6.** Comparison of amino acid sequences of MICA exon 2 (selected part of the sequence, positions are calculated without the leading sequence). The polymorphism MICA-14Gly is labeled.

MICA Exon 2 Amino Acid Sequence from Position 3 to 37 of MICA Protein	
Group	Sequence
Group S1	HSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYD
Group S2	HSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRCD
Group S4	HSLRYNLTVLSG <b>D</b> DGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRCD
Group S6	HSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCD
Group S7	HSLPYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYD

**3.3.2. Patients’ Homozygosity within MICB Seems to Be Linked to a Lower Risk of Relapse in Univariate but Not in Multivariate Analysis**

A statistically significant difference was detected in RFS between MICB homozygous and MICB heterozygous patients ( $p < 0.05$ ) (Figure 3), and a similar situation can be seen in the case of MICB exon 3, where heterozygous patients with two different groups (S1/S3 and S2/S3) have worse RFS than patients with S3/S3 with  $p < 0.05$  in univariate analysis



(Figure 4). None of these analyses were confirmed by multivariate analysis (for MICB homozygosity vs. heterozygosity,  $p = 0.322$ , for MICB exon 3  $p = 0.376$ ). In the donors group, no significant role of homozygosity/heterozygosity for RFS or OS was observed (data not shown).

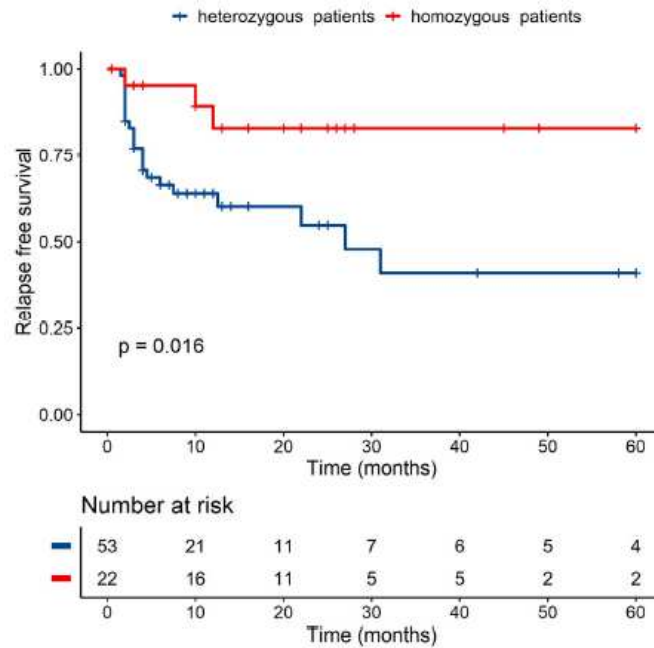


Figure 3. RFS of MICB homozygous versus heterozygous patients using univariate analysis.

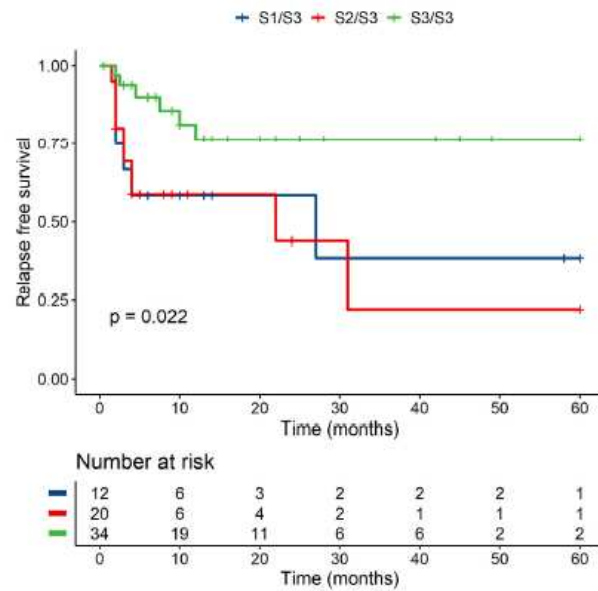
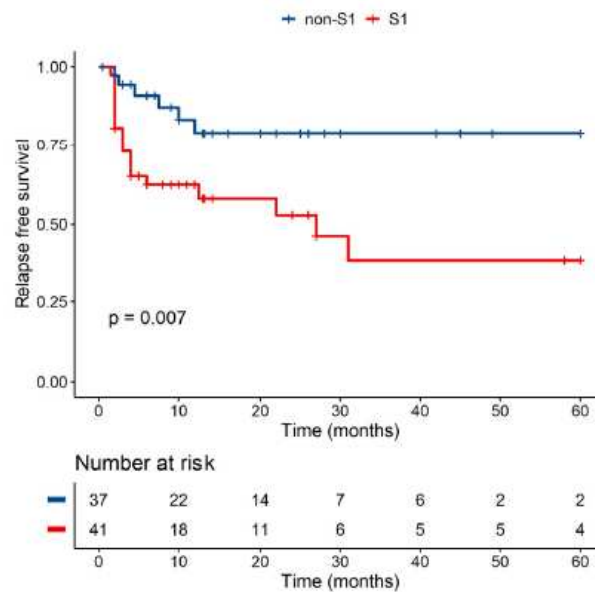


Figure 4. Univariate analysis—RFS of patients according to their exon 3 of MICB.

### 3.3.3. MICB-58Lys Can Be Linked to a Lower Risk of Relapse

We observed the role of the presence/absence of a specific group within exon 2 of MICB. The patients without the S1 group had a significantly lower risk of relapse than patients with S1 in univariate analysis ( $p < 0.01$ ) (Figure 5), but this observation was not confirmed by multivariate analysis ( $p = 0.069$  with HR = 3.764, 95% CI, 0.902–15.707).



**Figure 5.** Univariate analysis—RFS of patients with at least one copy of MICB-58Glu (S1) versus patients lacking MICB-58Glu (non-S1) group of MICB exon 2.

The polymorphism which distinguishes the group S1 from the others is an exchange of lysine to glutamate at position 58 of MICB (the position is calculated without the leading sequence) (Table 7).

**Table 7.** Comparison of the amino acid sequences of MICB exon 2 (selected part of the sequence, positions are calculated without the leading sequence). The polymorphism MICB-58Glu is labeled.

MICB Exon 2 Amino Acid Sequence from Position 49 to 63 of MICB Protein	
Group	Sequence
Group S1	QWAEDVLGAETWDTE
Group S2	QWAEDVLGAKTWDTE
Group S3	QWAENVLGAKTWDTE

### 3.3.4. Role of Known Polymorphisms Was Not Evident in Our Cohort

We also analyzed the effect of known ligand polymorphisms called MICA-129 and MICB-98, and polymorphisms within the receptor NKG2D (HNK1 and LNK1). Our results did not show any difference between grafts from MICA-129Val/Val, MICA-129Val/Met or from MICA-129Met/Met donors ( $p = 0.73$ , data not shown), and we did not detect any difference in OS of patients with any MICA-129 combination ( $p = 0.97$ , data not shown). Focusing on match/mismatch, our cohort did not show any statistically significant result ( $p = 0.42$ ) (Figure 6).

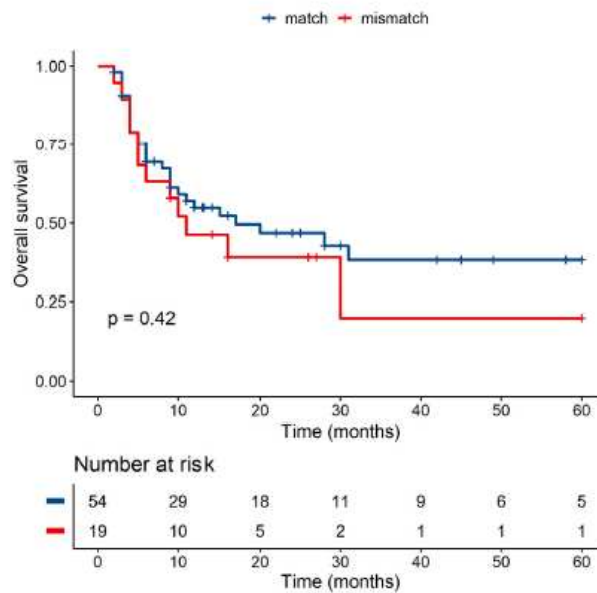


Figure 6. OS of patients with matched graft versus patients with mismatched graft within MICA-129.

Regarding the MICB-98, we did not observe any association of MICB-98 amino acid with RFS or OS. We did not investigate the role of match and mismatch between donor and patient at MICB-98 position because of the low number of mismatched patients (five patients with mismatched graft).

We did not see any difference in HSCT outcome between grafts from HNK/HNK and grafts from HNK/LNK or LNK/LNK in our cohort.

All the above-mentioned results are summarized in Tables 8 and 9.

Table 8. Results of multivariate analysis for OS; statistically significant results are bold.

MICA Exon 2—Comparison of Group Combinations				
	<i>p</i> -Value	Hazard Ratio	Lower CI*	Upper CI
S1/S1		1		
S1/S2	2.062	0.427	0.088	2.062
S1/S4	0.028	2.745	1.113	6.771
S1/S6	0.120	0.193	0.024	1.538
MICA Exon 2 (MICA-14Gly)—MICA-14Gly (S4) Presence Versus Absence (non-S4)				
	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI
Non-S4		1		
S4+	0.035	2.254	1.058	4.801
MICA-129 Match/Mismatch				
	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI
Match		1		
Mismatch	0.155	2.407	0.718	8.069



**Table 9.** Results of multivariate analysis for RFS.

Donor—MICB Homozygote Versus Heterozygote				
	<i>p</i> -Value	Hazard Ratio	Lower CI*	Upper CI
Homozygote		1		
Heterozygote	0.433	1.693	0.454	6.309
Patient—MICB Homozygote Versus Heterozygote				
	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI
Homozygote		1		
Heterozygote	0.322	2.101	0.483	9.134
MICB Exon 3—Eeterozygotes (S1/S3 + S2/S3) Versus Homozygote (S3/S3)				
	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI
S1/S3 + S2/S3		1		
S3/S3	0.376	0.506	0.112	2.286
MICB Exon 2 (MICB-58Glu)—MICB-58Glu (S1) Presence Versus Absence (non-S1)				
	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI
Non-S1		1		
S1+	0.069	3.764	0.902	15.707

#### 4. Discussion

Our study was focused on the detection of single nucleotide substitutions leading to the inclusion of other amino acids within NKG2D, MICA, and MICB, and exploring their potential role in the outcome of patients.

Some amino acid changes associated with an outcome, such as MICA-129 (Val/Met) or MICB-98 (Ile/Met), were already investigated. Multiple works describe the role of MICA-129 polymorphism in GVHD development and OS. Patients' MICA-129Val/Val genotype has an increased risk of cGVHD according to Boukouaci et al. [15]. This was also observed in our study, where 43% of patients with MICA-129Val/Val had cGVHD compared to patients with Val/Met or Met/Met, only 22% of whom developed cGVHD. In addition, Isernhagen and colleagues found that patients with at least one allele with MICA-129Met have better OS, although homozygotes with MICA-129Met/Met experience aGVHD more frequently. However, aGVHD-related mortality is lower in those patients [14]. We did not confirm this association, which is in line with other works [33,34] also not proving this connection.

Besides the role of the patient's MICA-129, the role of the donor's MICA-129 polymorphism was described previously [34]. Patients with a graft from a donor with at least one MICA-129Met allele should have a lower risk of NRM [34]. This trend was not seen in our study, but we observed a potential role of different polymorphism—MICA-14 (rs1063630) on OS. Patients receiving a graft from a donor who has at least one copy of MICA-14Gly (group S4/Sx) had significantly worse OS. MICA-14 polymorphism is found in exon 2 which encodes binding domain  $\alpha$ 1, which directly interacts with NKG2D. This amino acid exchange can lead to a different affinity to NKG2D, causing various reactivity of NK cells, as Chen et al. indicated in their work [35]. Because the described polymorphism played the role when presented on donors' leukocytes, we can speculate about the higher sensitivity of activated immune cells expressing NKG2D ligands to NK cell killing [3].

Apart from studying MICA, the role of MICB-98 match and mismatch between patient and donor was investigated too. Unfortunately, we cannot provide any confirmation of the results from Carapito et al. [18], who stated that the MICB-98 match reduces GVHD incidence as well as an effect of CMV on HSCT outcome, because, in our set of patients/donors, we have only five mismatches, preventing statistical analysis. However, we observed the effect of an amino acid exchange (MICB-58Lys  $\rightarrow$  Glu) within exon 2 of MICB. In contrast to MICA-14, where the effect depended on the donor's polymorphism, this effect is seen

in patients. Patients with at least one allele with MICB-58Glu have a significantly higher risk of relapse than patients without this allele, confirmed by univariate analysis but not by multivariate analysis. The reason why the result of multivariate analysis is not statistically significant can lie in higher representation of patients transplanted with active disease in the S1 group (51% of patients carrying S1 group vs. 19% of patients without S1). The exchange appears in a binding domain  $\alpha 1$  of MICB, and we can speculate that this exchange can influence binding domain structure and change the affinity to the NKG2D receptor. In the case of MICA-129, patients with Met/Met had a higher risk of relapse, and MICA-129Met triggers a stronger but shorter (due to a sooner NKG2D exhaustion) reaction of NK cells than MICA-129Val [15]. Using this logic on MICB-58, we can expect that MICB-58Glu binds NKG2D similarly, i.e., with higher affinity, activating a stronger but shorter NK cell reaction, which can lead to anticancer immune reaction failure. This hypothesis can explain the decreased ability to achieve complete remission in patients carrying MICB-58Glu observed in our cohort.

The polymorphisms in MICA/MICB genes could also be associated with different cell surface expression and soluble form levels [36,37] and could potentially influence the ligand regulation on transcription [38], translation [39], or post-translation [40] level; therefore, the determination of serum level, as well as surface protein level, should be further investigated.

The last investigated polymorphisms were the HNK haplotypes of the NKG2D receptor. Espinoza et al. observed that patients with the so-called standard-risk disease have improved OS in the case that they received graft with HNK1 [11]. We did not find any statistically significant difference in HSCT outcome between grafts with or without HNK1 ( $p = 0.9$ ). Similar results as ours can be found in the work from Apithy et al. [41].

## 5. Conclusions

We found a new polymorphism (MICA-14Gly) influencing HSCT outcome in our cohort of patients undergoing HSCT for AML. We did not observe the role of already known polymorphisms. Our results, together with the different results for already known polymorphisms, indicate the necessity of integrated multicenter studies that can better evaluate the effect of individual polymorphisms and their potential use in donor selection and risk assessment of post-transplant complications.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10204636/s1>, Tables S1–S6: Amino acid sequences of MICA and MICB distributed into the groups.

**Author Contributions:** Project administration: M.H.; methodology: M.H., H.G., L.H. and P.O.; resources: P.J.; investigation: A.M., M.H., D.M., R.K. and J.S.; formal analysis: L.H., P.J. and P.O.; data curation: L.H., K.K. and M.L.; software: K.K. and L.H.; supervision: M.H. and P.J.; writing: A.M. and M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic—Czech Health Research Council (project no. NV18-03-00277).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and under the World Marrow Donor Association standards. The ethics committee approved the study (joint committee of the Faculty of Medicine in Pilsen and Faculty Hospital Pilsen) on the 26 June 2017.

**Informed Consent Statement:** Informed consent for the study inclusion and results publication was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** With respect to the internal policy of the transplant center and local personal data protection rules, all data are available on request. All data will be provided upon official application. Please contact holubovam@fnplzen.cz.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge Eva Kralovcova for her support within the experiments' execution, Jiri Fatka for bioinformatical support, and Pavel Pitule for his supervision.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Gratwohl, A.; Brand, R.; Frassoni, F.; Rocha, V.; Niederwieser, D.; Reusser, P.; Einsele, H.; Cordonnier, C.; Parties, A.a.C.L.W.; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: An EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transpl.* **2005**, *36*, 757–769. [\[CrossRef\]](#)
2. Bosch, M.; Khan, F.M.; Storek, J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* **2012**, *19*, 324–335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Simonetta, F.; Alvarez, M.; Negrin, R.S. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 465. [\[CrossRef\]](#)
4. Olson, J.A.; Leveson-Gower, D.B.; Gill, S.; Baker, J.; Beilhack, A.; Negrin, R.S. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* **2010**, *115*, 4293–4301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Zhang, P.; Yang, S.; Zou, Y.; Yan, X.; Wu, H.; Zhou, M.; Sun, Y.C.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Xu, K.; et al. NK cell predicts the severity of acute graft-versus-host disease in patients after allogeneic stem cell transplantation using antithymocyte globulin (ATG) in pretreatment scheme. *BMC Immunol.* **2019**, *20*, 46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Lanier, L.L. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 495–502. [\[CrossRef\]](#)
7. Gao, F.; Ye, Y.; Gao, Y.; Huang, H.; Zhao, Y. Influence of KIR and NK Cell Reconstitution in the Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2022. [\[CrossRef\]](#)
8. Zingoni, A.; Molfetta, R.; Fionda, C.; Soriani, A.; Paolini, R.; Cippitelli, M.; Cerboni, C.; Santoni, A. NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One”. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Wensveen, F.M.; Jelenčić, V.; Polić, B. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 441. [\[CrossRef\]](#)
10. 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 Res.* **2006**, *66*, 563–570. [\[CrossRef\]](#)
11. Espinoza, J.L.; Takami, A.; Onizuka, M.; Sao, H.; Akiyama, H.; Miyamura, K.; Okamoto, S.; Inoue, M.; Kanda, Y.; Ohtake, S.; et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* **2009**, *94*, 1427–1434. [\[CrossRef\]](#)
12. Bahram, S. MIC genes: From genetics to biology. *Adv. Immunol.* **2000**, *76*, 1–60. [\[CrossRef\]](#)
13. Machuldova, A.; Holubova, M.; Caputo, V.S.; Cedikova, M.; Jindra, P.; Houdova, L.; Pitule, P. Role of Polymorphisms of NKG2D Receptor and Its Ligands in Acute Myeloid Leukemia and Human Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1010. [\[CrossRef\]](#)
14. Isernhagen, A.; Malzahn, D.; Viktorova, E.; Elsner, L.; Monecke, S.; von Bonin, F.; Kilisch, M.; Wermuth, J.M.; Walther, N.; Balavarca, Y.; et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1480–1502. [\[CrossRef\]](#)
15. Boukouaci, W.; Busson, M.; de Latour, R.P.; Rocha, V.; Suberbielle, C.; Bengoufa, D.; Dulphy, N.; Haas, P.; Scieux, C.; Amroun, H.; et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **2009**, *114*, 5216–5224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Fuerst, D.; Neuchel, C.; Niederwieser, D.; Bunjes, D.; Gramatzki, M.; Wagner, E.; Wulf, G.; Glass, B.; Pfreundschuh, M.; Einsele, H.; et al. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2016**, *128*, 3169–3176. [\[CrossRef\]](#)
17. Parmar, S.; Del Lima, M.; Zou, Y.; Patah, P.A.; Liu, P.; Cano, P.; Rondon, G.; Pesoa, S.; de Padua Silva, L.; Qazilbash, M.H.; et al. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood* **2009**, *114*, 2884–2887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Carapito, R.; Aouadi, I.; Pichot, A.; Spinnhirny, P.; Morlon, A.; Kotova, I.; Macquin, C.; Rolli, V.; Cesbron, A.; Gagne, K.; et al. Compatibility at amino acid position 98 of MICB reduces the incidence of graft-versus-host disease in conjunction with the CMV status. *Bone Marrow Transpl.* **2020**, *55*, 1367–1378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Carapito, R.; Jung, N.; Kwemou, M.; Untrau, M.; Michel, S.; Pichot, A.; Giacometti, G.; Macquin, C.; Ilias, W.; Morlon, A.; et al. Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood* **2016**, *128*, 1979–1986. [\[CrossRef\]](#)
20. Armand, P.; Kim, H.T.; Logan, B.R.; Wang, Z.; Alyea, E.P.; Kalaycio, M.E.; Maziarz, R.T.; Antin, J.H.; Soiffer, R.J.; Weisdorf, D.J.; et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **2014**, *123*, 3664–3671. [\[CrossRef\]](#)
21. Sorrow, M.L.; Maris, M.B.; Storb, R.; Baron, F.; Sandmaier, B.M.; Maloney, D.G.; Storer, B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: A new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* **2005**, *106*, 2912–2919. [\[CrossRef\]](#)



22. Kabalak, G.; Thomas, R.M.; Martin, J.; Ortego-Centeno, N.; Jimenez-Alonso, J.; de Ramón, E.; Buyny, S.; Hamsen, S.; Gross, W.L.; Schnarr, S.; et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Hum. Immunol.* **2010**, *71*, 74–78. [CrossRef]
23. Asl, A.A.; Nezamdoust, F.V.; Fesahat, F.; Astani, A.; Barati, M.; Raee, P.; Asadi-Saghandi, A. Association between rs1049174 NKG2D gene polymorphism and idiopathic recurrent spontaneous abortion in Iranian women: A case-control study. *J. Obstet. Gynaecol.* **2020**, *41*, 774–778. [CrossRef]
24. Field, S.F.; Nejentsev, S.; Walker, N.M.; Howson, J.M.M.; Godfrey, L.M.; Jolley, J.D.; Hardy, M.P.A.; Todd, J.A. Sequencing-Based Genotyping and Association Analysis of the MICA and MICB Genes in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2008**, *57*, 1753–1756. [CrossRef]
25. Vazquez-Gonzalez, W.G.; Martinez-Alvarez, J.C.; Arrazola-Garcia, A.; Perez-Rodriguez, M. Haplotype block 1 variant (HB-1v) of the NKG2 family of receptors. *Hum. Immunol.* **2019**, *80*, 842–847. [CrossRef] [PubMed]
26. Huang, X.; Madan, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **1999**, *9*, 868–877. [CrossRef] [PubMed]
27. Okonechnikov, K.; Golosova, O.; Fursov, M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1166–1167. [CrossRef]
28. Robinson, J.; Barker, D.J.; Georgiou, X.; Cooper, M.A.; Flicek, P.; Marsh, S.G.E. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *48*, D948–D955. [CrossRef]
29. Stothard, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **2000**, *28*, 1102, 1104. [CrossRef] [PubMed]
30. Consortium, T.U. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *49*, D480–D489. [CrossRef]
31. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 6 October 2021).
32. Gratwohl, A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transpl.* **2012**, *47*, 749–756. [CrossRef] [PubMed]
33. Weisdorf, D.; Hakke, R.; Blazar, B.; Miller, W.; McClave, P.; Ramsay, N.; Kersey, J.; Filipovich, A. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* **1991**, *51*, 1197–1203. [CrossRef] [PubMed]
34. Martin, P.J.; Levine, D.M.; Storer, B.E.; Nelson, S.C.; Dong, X.; Hansen, J.A. Recipient and donor genetic variants associated with mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 3224–3233. [CrossRef]
35. Chen, D.; Gyllenstein, U. MICA polymorphism: Biology and importance in cancer. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 2633–2642. [CrossRef]
36. Ashiru, O.; López-Cobo, S.; Fernández-Messina, L.; Pontes-Quero, S.; Pandolfi, R.; Reyburn, H.T.; Valés-Gómez, M. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem. J.* **2013**, *454*, 295–302. [CrossRef]
37. Onyeaghala, G.; Lane, J.; Pankratz, N.; Nelson, H.H.; Thyagarajan, B.; Walcheck, B.; Anderson, K.E.; Prizment, A.E. Association between MICA polymorphisms, s-MICA levels, and pancreatic cancer risk in a population-based case-control study. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217868. [CrossRef]
38. Isernhagen, A.; Schilling, D.; Monecke, S.; Shah, P.; Elsner, L.; Walter, L.; Multhoff, G.; Dressel, R. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. *Immunogenetics* **2016**, *68*, 109–123. [CrossRef]
39. Heinemann, A.; Zhao, F.; Pechlivanis, S.; Eberle, J.; Steinle, A.; Diederichs, S.; Schadendorf, D.; Paschen, A. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 460–471. [CrossRef] [PubMed]
40. Nice, T.J.; Coscoy, L.; Raulet, D.H. Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 287–298. [CrossRef]
41. Apithy, M.-J.; Charbonnier, A.; Desoutter, J.; Diouf, M.; Morel, P.; Garçon, L.; Marolleau, J.-P.; Guillaume, N. Impact of MICA and NKG2D polymorphisms in HLA-fully matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2018**, *53*, 918–922. [CrossRef]



MICA

Group S1	<b>PHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGGQW AEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S2	<b>PHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGQW AEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S3	<b>PHSLRYNLTVLSGDGVSQSGFLAEGHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGQWAE VLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S4	<b>PHSLRYNLTVLSGDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGQW AEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S5	<b>PHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEGHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGQWAE DVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S6	<b>PHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGQW AEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S7	<b>PHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAPQGGQW AEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S8	<b>PQSSL*PHGAVLGWICAVRVSC*GTSGWSALPAL*QAEMQGKAPGTVGRRCP GK*DMGQRDQGLDRERKGPQDDPGSYQGPERR</b>
Group S9	<b>PHSLRYNLTVLSGDGVSQSGFLAEVHLDGQPFLRCRQKGRAPQGGQWAE VLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKE</b>
Group S10	<b>PHSLRYNLTVLSGDGVSQSGFLAASGWSALPAL*QAEMQGKAPGTVGRRCP GK*DMGQRDQGLDRERKGPQDDPGSYQGPERR</b>

Table S1. Amino acid sequences of MICA exon 2 groups. Groups found in our cohort are bold.

Group S1	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQ TLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRT</b>
Group S2	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRA QTLAMNIRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRT</b>
Group S3	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLESEEWTPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRT</b>
Group S4	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTRYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRT</b>
Group S5	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRT</b>
Group S6	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEWTVPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRT</b>
Group S7	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEWTVPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRR</b>
Group S8	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQ TLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRT</b>
Group S9	<b>LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKLYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRT</b>



Group S10	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSSVVLRRT
Group S11	LHSLQEMRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEETWTPQSSRAQT LAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRT
Group S12	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEETWTPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSIVLRRT
Group S13	LHSLREIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRT
Group S14	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEETWTPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRT-
Group S15	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRT
Group S16	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRA QTLAMNVRNFLKEDAVKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRT
Group S17	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEETWTPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESVVLRRR
Group S18	LHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDRELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRT

Table S2. Amino acid sequences of MICA exon 3 groups. Groups found in our cohort are bold.

Group S1	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQW GDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S2	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHDTQQW GDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S3	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWQRDGVSLSHDTQQWG DVLDPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S4	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGD VLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQSFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S5	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQW GDVLPDGNNGTYQTWVATRICEGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S6	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQW GDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHAVPS
Group S7	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWQRDGVSLSHDTQQWGDV LPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS
Group S8	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGD VLPDGNNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSRNNHSTHPVPS
Group S9	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWQRDGVSLSHDTQQWGDV LPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSRNNHSTHPVPS
Group S10	PPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWQRDGLSLSHDTQQWG DVLDPDGNNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS

Table S3. Amino acid sequences of MICA exon 4 groups. Groups found in our cohort are bold.



## MICB

Group S1	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAKPQGQW</b> <b>AEDVLGAETWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKG</b>
Group S2	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAKPQGQW</b> <b>AEDVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKG</b>
Group S3	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAKPQGQW</b> <b>AENVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKG</b>
Group S4	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAKPRDSGQKM</b> <b>SWELRPGTQRPRT*QRMGKTSGGP*LISRTRKE</b>
Group S5	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQSFLRYDRQKRRAKPQGQW</b> <b>AENVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKG</b>
Group S6	<b>PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAE</b> <b>DVLGAETWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKG</b>

Table S4. Amino acid sequences of MICB exon 2 groups. Groups found in our cohort are bold.

Group S1	<b>LHSLQEIRVCEMHEDSSTRGSRHFYNGELFLSQNLETQESTVPQSSRAQT</b> <b>LAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRT</b>
Group S2	<b>LHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYNGELFLSQNLETQESTVPQSSRAQTL</b> <b>AMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRT</b>
Group S3	<b>LHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLFLSQNLETQESTVPQSSRAQTL</b> <b>AMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRT</b>
Group S4	<b>LHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAM</b> <b>NVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGGSPSEQ</b>
Group S5	<b>LHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAM</b> <b>NVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQ*YLKSGVAIRRT</b>
Group S6	<b>LHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAM</b> <b>NVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRT</b>

Table S5. Amino acid sequences of MICB exon 3 groups. Groups found in our cohort are bold.

Group S1	<b>PPMVNVICSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGD</b> <b>VLPDGNNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGTHPVPS</b>
Group S2	<b>PPMVNVTCSSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWG</b> <b>DVLPDGNNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGTHPVPS</b>
Group S3	<b>PPMVNVTCSSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWG</b> <b>DVLPDGNNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPS</b>

Table S6. Amino acid sequences of MICB exon 4 groups. Groups found in our cohort are bold.