

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

**PROGETTO FORMATIVO N° 2:
EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE ED EMATOPATOLOGIA**

Ciclo xxv

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: MED/15

**STUDIO DEI POLIMORFISMI GENICI
DEGLI ANTIGENI MINORI DI ISTOCOMPATIBILITÀ E
GVHD/GVL NEL TRAPIANTO ALLOGENICO
DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE**

Presentata da: Dr.ssa Federica Cattina

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Stefano Pileri

Chiar.mo Prof. Domenico Russo

Esame finale anno 2013

*Varca fiducioso la soglia fratello,
col tuo dolore con la tua speranza,
amore e scienza vegliano
affinché possa nuovamente
sorriderti la vita*

Spedali Civili Brescia

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	1
Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche:.....	1
- la Graft versus Leukemia (GvL)	1
- la Graft versus Host Disease (GvHD)	1
I polimorfismi genici e gli antigeni minori di istocompatibilità (mHAg).....	4
Antigeni minori di istocompatibilità e trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche	7
Il modello delle leucemie Ph ⁺ : la leucemia mieloide cronica (LMC), la leucemia acuta linfoblastica (LAL).....	12
SCOPI DELLO STUDIO.....	15
PAZIENTI E METODI.....	17
mHAg considerati nello studio	17
Metodiche per la genotipizzazione degli mHAg	19
<i>Genotipizzazione mediante iPlex Gold Mass Array Sequenom®</i>	20
<i>Genotipizzazione mediante Sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR</i> ..	25
<i>Genotipizzazione mediante PCR</i>	28
Identificazione dell'immunogenicità di un mHAg	31
Tipizzazione HLA in alta risoluzione	32
<i>Tipizzazione di singoli loci HLA mediante Sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR</i>	33
<i>Definizione della compatibilità per il locus DPB1</i>	35
<i>Tipizzazione HLA PCR-SSO LUMINEX®</i>	36
<i>Tipizzazione HLA mediante NGS</i>	38
Casistica	48
<i>Preparazione degli acidi nucleici per la genotipizzazione</i>	52
Analisi statistica	53
RISULTATI	54
Efficienza di genotipizzazione degli mHAg	54
Efficienza di tipizzazione HLA mediante NGS-.....	58
GS GType HLA® Roche Diagnostics	58
Selezione delle coppie secondo la compatibilità HLA	60
<i>Analisi della compatibilità HLA-DPB1</i>	61
Analisi del numero di differenze a livello degli mHAg	62
Correlazione tra caratteristiche cliniche ed ematologiche e GvHD/GvL.....	64

Correlazione tra mismatch a livello degli mHAgs e GvHD/GvL	69
DISCUSSIONE	79
CONCLUSIONI	84
BIBLIOGRAFIA	85
ALLEGATI	89
RINGRAZIAMENTI	94

INTRODUZIONE

Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche:

- **la Graft versus Leukemia (GvL)**
- **la Graft versus Host Disease (GvHD)**

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-HSCT) è una procedura terapeutica che consiste nell'infusione di cellule staminali prelevate da un donatore sano compatibile, con l'obiettivo di sostituire e ripopolare il sistema emolinfopoietico del ricevente che è stato precedentemente preparato attraverso il regime di condizionamento [1]. Dal punto di vista clinico, l'outcome del trapianto dipende dal tipo di malattia, dallo stadio, dalle condizioni cliniche generali del paziente, dall'età di donatore e ricevente e dal livello di compatibilità. Le principali cause di fallimento sono la recidiva di malattia e le complicanze transplant-related come la malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD), le infezioni e la tossicità d'organo (soprattutto polmonite interstiziale e veno-occlusive disease [VOD] epatica) [2].

L'obiettivo del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche è la ricostituzione del compartimento emopoietico dopo chemio-radioterapia sub letale, ma la scoperta di un profondo effetto anti-tumorale mediato dai linfociti del donatore (GvL), ha permesso di shiftare il paradigma del trapianto allogenico dalla citoriduzione pre-trapianto all'eradicazione del tumore e alla prevenzione della recidiva sostenute dai linfociti del donatore (che permette di utilizzare schemi di condizionamento ad intensità ridotta). L'evidenza della reazione GvL deriva soprattutto da due conoscenze cliniche messe a confronto: da un lato l'elevata incidenza di recidive che si osservano dopo trapianto autologo, singenico o T-depleto e dall'altro la capacità dei linfociti del donatore di indurre remissione di malattia in caso di recidiva post allo-HSCT [3-7]. Le cellule maggiormente implicate in questo processo sono i linfociti T CD4⁺, CD8⁺ e NK.

L'azione anti-tumorale terapeutica della GvL è legata al riconoscimento, da parte dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺, di antigeni non self espressi sulle cellule tumorali. Attraverso questo meccanismo i linfociti del donatore sono in grado di evitare la barriera di tolleranza al self che impedisce ai linfociti autologhi di riconoscere gli antigeni non-mutati presenti sulle cellule tumorali [4-5, 8]. Il ruolo e l'efficacia delle NK è particolarmente rilevante in quei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico T depleto che non esprimono le stesse molecole HLA di classe I del loro donatore. In questo subset di pazienti infatti manca la possibilità di attivare il recettore inibitorio sulle NK e sono quindi libere di svolgere la loro attività di killing [5].

La GvHD è la manifestazione clinica di un attacco dei linfociti T maturi contenuti nel graft contro i tessuti sani del ricevente di un allo-HSCT e rappresenta la maggiore complicanza in termini di prevalenza (50-70%), morbilità e mortalità (14-40%). Dal punto di vista clinico e patogenetico la GvHD si distingue in forma acuta e cronica (GvHDa e GvHDc rispettivamente) [4, 8].

La patogenesi della GvHDa può essere schematizzata in tre fasi distinte:

- Attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APCs) del donatore e ricevente. Questo avviene primariamente per il danneggiamento dei tessuti del paziente causato dalla terapia di condizionamento (chemioterapia e/o radioterapia) che scatena il cosiddetto "cytokine storm". Vengono infatti secrete di citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL-10, IL-1, IL-6, IL-12) le quali sono responsabili dell'incremento dell'espressione di molecole di adesione e di molecole costimolatorie, dell'espressione in membrana dell'HLA di classe II e della creazione di un gradiente chemochinico che insieme agiscono come un segnale attivatorio per le APCs. Questa tempesta citochinica subisce un enhancing derivante dall'LPS che può traslocare dal lume intestinale danneggiato al torrente ematico;

- Attivazione dei linfociti T del donatore. Le APCs stimolate durante la prima fase interagiscono in senso pro-stimolatorio con i linfociti T del donatore presenti del graft e inducono proliferazione, maturazione in senso Th1, differenziazione e migrazione dagli organi linfoidi verso i tessuti target dove causano danno cellulare.
- Danneggiamento degli organi target (cute, fegato e tratto gastroenterico). La cascata infiammatoria secondaria all'attivazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ del donatore, le citochine infiammatorie e le chemochine sono responsabili del danneggiamento degli organi target e dell'induzione di apoptosi delle cellule epiteliali [4, 9-10].

La GvHDa compare tipicamente entro 100 giorni dal trapianto e clinicamente è caratterizzata da interessamento di cute, mucose, fegato e tratto gastroenterico e possibile polmonite idiopatica non infettiva per infiltrazione di linfociti e monociti nell'interstizio polmonare [4, 9]. In trapianti con differenze HLA l'incidenza di GvHDa è direttamente correlata al grado di mismatch.

Le conoscenze relative al sistema HLA e le attuali tecniche di studio della compatibilità permettono di ridurre il rischio di insorgenza di GvHD, ma non sono in grado di annullarlo, infatti nel setting di pazienti HLA identici, l'incidenza di GvHDa è del 40% e questo è probabilmente collegato ad altri fattori (tra cui gli antigeni minori di istocompatibilità sembrano svolgere il ruolo predominante) [4, 11].

La GvHDc è patogenicamente riconducibile a una difettiva ricostituzione immunologica che provoca allorreattività dei linfociti B e T. Questo deficit è prevalentemente causato da una deficitaria funzionalità timica secondaria a atrofia età-dipendente e danneggiamento delle cellule timiche dovuto a terapia di condizionamento, GvHDa, e terapia immunosoppressiva [9]. Caratteristicamente si sviluppa dopo 100 giorni dal trapianto e dal punto di vista clinico-istopatologico rimarca i tratti delle patologie autoimmuni di cui assume prevalentemente l'aspetto fibrotico. Le sedi maggiormente colpite sono la cute, con sclerodermia, le ghiandole salivari e lacrimali con una sindrome Sjogren-like e le piccole vie aeree con una bronchiolite obliterante fibrotica [4, 9].

I polimorfismi genici e gli antigeni minori di istocompatibilità (mHAgS)

Il genoma umano è caratterizzato da un'elevata variabilità che in molti casi è causata dalla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Gli SNPs sono definiti come la variazione di un singolo nucleotide in una specifica posizione del DNA genomico (gDNA) che si riscontri nella popolazione con una frequenza superiore all'1%; identificano quindi singole basi nel gDNA in cui diverse sequenze alternative (alleli) esistono in individui normali. Questi SNP, in alcuni casi, possono indurre variazioni non sinonime che provocano un cambiamento aminoacidico nella proteina corrispondente [12]. Nonostante formalmente non possano essere definiti SNPs, anche brevi inserimenti/delezioni (DIPs) vengono spesso studiati come tali e possono anch'essi essere responsabili della codifica di mHAs [11, 13-15].

Considerando i meccanismi attraverso cui gli SNPs impattano nella fisiologia dell'allo-HSCT, è possibile dividere i polimorfismi in due categorie.

La prima comprende i polimorfismi "di funzione". Questo gruppo è costituito dai polimorfismi presenti sui geni che codificano per le citochine e per alcuni enzimi importanti nel metabolismo dei farmaci. Come già accennato, le citochine e i loro recettori svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della GvHD e l'evoluzione clinica è notevolmente influenzata dal bilancio tra le molecole pro e anti-infiammatorie. Dalla letteratura è evidente come la presenza di uno SNP sia in grado di modificare i livelli di espressione del gene e quindi indurre modificazioni della quantità di citochina prodotta [9, 16-18]. Per quanto riguarda il metabolismo dei farmaci l'enzima più studiato è la glutatione-S-transferasi (GST) che è responsabile del catabolismo del busulfano. Come è noto un'elevata esposizione a questo farmaco può aumentare il rischio di VOD, mentre una ridotta esposizione correla con un aumentato rischio di recidiva e graft failure. Sono stati identificati molti polimorfismi presenti sui geni della GST che potrebbero spiegare, almeno in parte, le differenze di farmacocinetica del busulfano nei diversi pazienti [19].

Il secondo gruppo di polimorfismi è detto di “presentazione”, sono quindi parzialmente responsabili dell’interazione tra le cellule del paziente e il sistema immunitario del donatore. Questo gruppo è essenzialmente rappresentato dagli antigeni minori di istocompatibilità che sono peptidi polimorfici, derivanti da normali proteine intracellulari, presentati nell’ambito delle molecole MHC e in grado di funzionare da allo-antigeni (cioè possono indurre una risposta immunitaria efficace quando due individui mostrano diverso fenotipo) [7, 20-23]. Per quanto riguarda gli mHAGs presenti sui cromosomi non sessuali, questi spesso risultano da SNPs diallelici che generano differenze nella sequenza aminoacidica o differenze nel livello di espressione proteica. Per ogni mHAGs, in presenza o meno dello SNP viene generato un diverso fenotipo che è definito mHAG negativo o positivo rispettivamente. In teoria quindi ogni polimorfismo che modifichi quali/quantitativamente l’esposizione di peptidi self sulla superficie della cellula, può dare origine a una disparità di mHAG in un setting di trapianto MHC identico [11, 20-21].

Inoltre, essendo antigeni derivanti da proteine con svariate funzioni all’interno della cellula, gli mHAG vengono ereditati secondo le teorie mendeliane, senza associazione con l’ereditarietà dei geni dei loci HLA [7, 24].

Classificando i polimorfismi di presentazione secondo il loro effetto sul riconoscimento da parte del sistema immunitario è possibile distinguere due gruppi: polimorfismi che impattano primariamente sul riconoscimento da parte delle cellule T e polimorfismi che impattano sulla presentazione del peptide da parte di molecole MHC. Nel primo caso entrambi gli alleli mHAGs positivo e negativo vengono legati e presentati dalle molecole MHC e successivamente è la specificità del TCR che permette di distinguere la variante self dalla variante non-self. Quindi la variazione aminoacidica indotta dalla variazione allelica è sufficientemente diversa dal normale peptide self da ingaggiare e attivare una risposta T cellulare. Altri polimorfismi impattano invece sulla presentazione del peptide da parte di molecole MHC: i soggetti che risultano mHAGs negativi hanno espressione del peptide, ma questo subisce un blocco durante il processo (trascrizione,

RNA editing, processazione nel corpo del Golgi e traffico intracellulare) che determinerebbe la sua espressione in membrana; al contrario i soggetti positivi esprimono l'antigene che viene processato e presentato in modo da indurre una risposta T efficace [21, 25].

Caratteristiche immunogeniche salienti degli antigeni minori sono quindi: disparità tra donatore e ricevente (la frequenza del fenotipo compresa fra 26 e 78% permette di avere disparità tra donatore e ricevente in una significativa quota di casi), riconoscimento da parte del sistema HLA (soprattutto dagli alleli più frequenti nella popolazione di riferimento), alta immunogenicità come non-self, cioè capacità di essere riconosciuti con alta avidità dai cloni T specifici e abilità nell'indurre risposte mediate da cellule CD4⁺ e CD8⁺ [5, 20-21, 26-28].

Antigeni minori di istocompatibilità e trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

Lo sviluppo di nuove tecniche di tipizzazione HLA ha permesso di migliorare la definizione di compatibilità tra donatore e ricevente; questo ha portato a una riduzione dell'incidenza di GvHD, ma non è in grado di prevenirla completamente. L'incidenza di GvHD acuta è del 28% in trapianti con donatore identico non correlato e del 30% in trapianti con donatore identico familiare [11]. E' quindi possibile che lo sviluppo di GVHD e GVL in coppie HLA identiche sia quindi secondario alla presenza di diverse varianti alleliche tra donatore e ricevente nel repertorio di peptidi normali (in particolare mHAg) che quando vengono presentati da molecole MHC di classe I/II sono in grado di indurre una risposta immunitaria cellulare [3-4, 11, 16, 21, 29-36]. Quindi la patogenesi della GvHD potrebbe essere secondaria al riconoscimento di cellule del ricevente che sono omo/eterozigoti per l'allele che genera l'mHAg da parte delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ di un individuo HLA compatibile, ma omozigote per l'allele mHAg negativo. Questa disparità per essere immunogena deve avvenire in presenza di molecole HLA appropriate alla presentazione dell'mHAg (Fig. 1) [37-39].

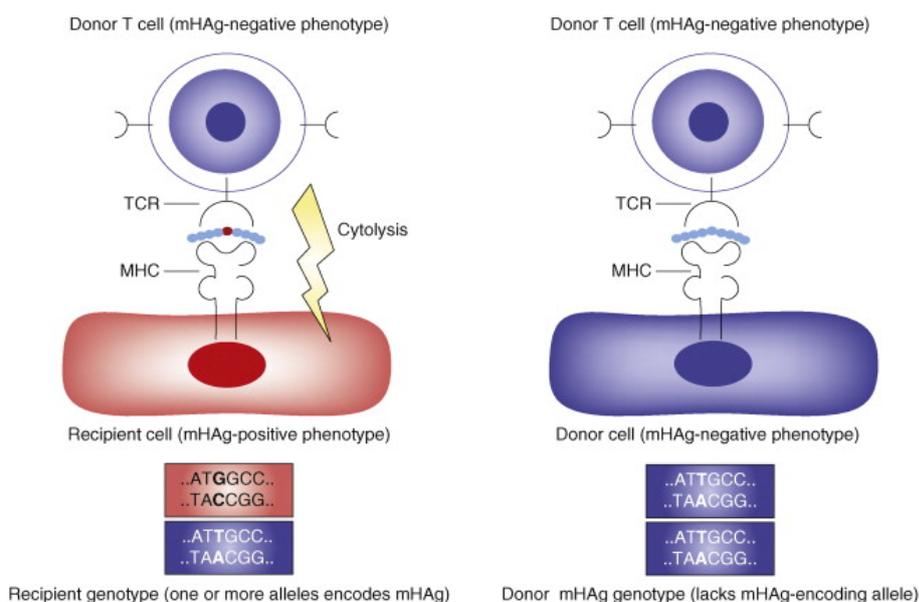


Figura 1: Meccanismo patogenetico della GvH indotto da differenze tra donatore e ricevente a livello di un mHAg [4]

Per questo motivo gli mHAg svolgono un ruolo importante; potrebbero essere gli unici target di GvHD nei setting di trapianti familiari e MUD perfettamente compatibili e potrebbero concorrere nel determinare GvHD in trapianti allogenici con mismatch per un locus HLA [4, 27, 39-40].

Parallelamente all'effetto GvHD però, la reazione del sistema immunitario del donatore mHAg negativo verso il ricevente mHAg positivo, potrebbe indurre un effetto GvL quando ad essere riconosciute sono cellule di malattia eventualmente residue dalle terapie pre-trapianto.

Il ruolo degli antigeni minori di istocompatibilità nel determinare GvL è già stato ampiamente valutato *in vitro*. In coltura i linfociti T citotossici (CTL) specifici per un mHAg sono in grado di lisare cellule di leucemia acuta mieloide e leucemia acuta linfoblastica positive per quell'antigene e di inibire la formazione di colonie [20]. Gli stessi risultati sono stati ottenuti in topo, ottenendo l'eradicazione della leucemia mediante il trasferimento di CTL specifici per un singolo mHAg presente nel topo ricevente [5].

In vivo, la procedura che potenzialmente ricalca questo modello è l'infusione delle DLI. Questa procedura infatti sfrutta l'efficace riconoscimento delle cellule malate del paziente da parte dei linfociti del donatore e tale riconoscimento potrebbe avvenire grazie a differenze a livello degli mHAg.

Questa risposta immunitaria cellulare coinvolge sia i T citotossici (CTLs) che i T helper.

I T CD8⁺ riconoscono mHAg presentati dalle molecole HLA di classe I che sono espresse su tutte le cellule mononucleate, sia sane che tumorali.

La loro azione citotossica verso le cellule target avviene attraverso la liberazione di perforina o granzyme; inoltre liberano citochine infiammatorie che reclutano cellule effettrici addizionali. La capacità degli mHAg di indurre l'espansione di CTLs specifici può venir sfruttata per l'induzione di una risposta antitumorale di tipo cellulare montata attraverso il riconoscimento di mHAg che sono espressi sulle cellule emopoietiche normali o patologiche del ricevente espressi in associazione con molecole HLA di classe I. A causa dell'ubiquitariet  delle molecole HLA di classe I,

però questi CTLs possono indurre non solo GvL, ma anche la controparte negativa, ovvero la GvHD.

I linfociti CD4⁺ riconoscono gli mHAg presentati dalle molecole HLA di classe II e sono in grado di lisare le cellule target attraverso la liberazione di perforina, di promuovere l'attivazione delle APC attraverso la via CD40-CD40L e di produrre citochine che sono in grado di sostenere tali risposte immuni [4]. Svolgono un ruolo antitumorale importante perché sono indispensabili per l'induzione e il mantenimento delle cellule T CD8⁺ ma, sono anche cellule effettrici con attività citolitica diretta contro le cellule tumorali che esprimono HLA di classe II. Siccome in condizioni non infiammatorie o di infiammazione a basso grado le molecole HLA di classe II sono espresse in modo predominante sulle cellule emopoietiche, stimolare le cellule CD4⁺ tardivamente (quando è cessato lo stato infiammatorio legato al condizionamento) può essere una strategia promettente per colpire selettivamente le cellule leucemiche eventualmente residue senza indurre GvHD. Tale ipotesi è suffragata dall'evidenza che i cloni CD4⁺ specifici per mHAg presentati dall'HLA di classe II sono in grado di riconoscere cellule emopoietiche, comprese cellule leucemiche, ma non fibroblasti neppure in condizioni pro-infiammatorie spinte (in presenza di un eccesso di IFN- γ) [26, 41].

In un sistema complesso come l'organismo umano, la possibilità di scindere la GvHD dall'effetto GvL non è solo legata alla presentazione degli mHAg, ma anche alla loro espressione tissutale; un mHAg selettivamente espresso sulle cellule emopoietiche è sicuramente target di GvL, mentre un mHAg ad espressione ubiquitaria (compresi quindi tutti i tessuti epiteliali) può essere responsabile anche dell'effetto GvHD [42]. Un esempio importante ed estremo è dato dagli mHAg originanti da geni localizzati sul cromosoma Y (H-Y); il fatto che siano presenti su tutte le cellule dei portatori di cromosoma Y può essere concausa dell'aumentata incidenza di GvHD in pazienti di sesso maschile che hanno ricevuto trapianto di cellule staminali da donatrice donna [4].

Per quanto riguarda antigeni codificati dagli autosomi, CTLs specifici per HA-8 che è ubiquitario, inducono GvHD severa, CTLs specifici per

UGT2B17 che è espresso prevalentemente sulle cellule epiteliali di fegato e intestino, provocano GvHD epatica ed intestinale protratte, mentre CTLs specifici per HA-1 e HA-2 che sono mHAgS ristretti al sistema emopoietico, non provocano GvHD o la provocano di grado lieve [5, 37, 39, 43-44]. Questo conferma che mHAgS con espressione limitata ai tessuti del sistema emopoietico sono rilevanti per l'attività GvL.

CTLs specifici per mHAgS ristretti al sistema emopoietico sono in grado di lisare le cellule leucemiche sia in vitro che in modelli animali traslazionali. In uno studio clinico è stata poi correlata la remissione completa ematologica e la conversione verso il chimerismo completo del donatore dopo infusione di DLI per la terapia della leucemia mieloide cronica con un rapido incremento nel numero di linfociti T specifici funzionali e diretti contro HA-1 e HA-2.

Le nuove scoperte sugli mHAgS hanno aperto la strada a un nuovo concetto che si propone di separare la GvL dalla GvHD indirizzando i linfociti T del donatore verso gli mHAgS espressi dalle cellule maligne.

Questo si basa sui seguenti assunti:

- Gli mHAgS sono selettivamente espressi sulle cellule emopoietiche, in modo da risparmiare i tessuti non emopoietici e prevenire la GvHD;
- Le proteine da cui originano gli mHAgS sono conservate nelle cellule neoplastiche e sono necessarie per le funzioni della cellula tumorale (per evitare che il clone diventi resistente spegnendo l'espressione dell'antigene);
- La specifica disparità tra donatore e ricevente per l'mHAg è sufficientemente forte da risparmiare dalla lisi T mediata le cellule emopoietiche del donatore che possono attecchire e ricostituire il sistema emopoietico nel ricevente [20, 23].

Per studiarli è necessario valutare i geni selettivamente espressi su cellule emopoietiche e cercare la presenza di SNPs che codifichino una sostituzione aminoacidica non sinonima in una regione biologicamente importante [45].

Per quanto riguarda lo studio della GvHD è necessario considerare gli mHAg ad espressione ubiquitaria, e soprattutto quelli espressi selettivamente nei tessuti target di GvHD [21]. Lo studio degli mHAgS e della loro espressione

preferenziale potrebbe condurre al riconoscimento dei meccanismi immunologici che permettono di ottenere un potenziamento della risposta GvL, con un'assente o minima GvHD [4].

Il ruolo delle differenze sugli mHAgs è supportato da studi che mostrano un'elevata frequenza di GvHDa e ridotta sopravvivenza in pazienti sottoposti a trapianto da donatore familiare, ma con differenze a livello degli mHAgs.

Gli studi presenti in letteratura analizzano il ruolo delle differenze sugli mHAgs in ristrette coorti di pazienti e focalizzano l'attenzione su un ridotto numero di antigeni minori. Per questi motivi i risultati sono parziali e spesso discordanti.

Il ruolo del sistema immunitario nella protezione dalla recidiva della malattia è evidenziato indirettamente dal fatto che le cellule di molte leucemie ricadute dopo trapianto allogenico di CSE sono clonalmente selezionate per evadere il controllo del sistema immunitario del donatore attraverso la riduzione dell'espressione delle molecole MHC che sono essenziali per la presentazione degli mHAgs ai linfociti alloigenici [46].

L'applicazione clinica di queste conoscenze potrà portare al disegno di schemi di immuno-vaccino terapia basati sugli antigeni minori di istocompatibilità [31].

Il modello delle leucemie Ph⁺: la leucemia mieloide cronica (LMC), la leucemia acuta linfoblastica (LAL)

La leucemia mieloide cronica (LMC) è un buon modello di risposta all'immunoterapia allogenica in quanto la traslocazione patognomonica della patologia dà origine a un trascritto di fusione non presente nei peptidi originari e quindi ha un elevato potere immunogeno [20, 47-48]. Studi condotti sul peptide p210 originante dalla fusione delle regioni b3 ed a2 hanno dimostrato che questo è in grado di legare ad alta affinità molecole HLA di classe I (A*02, *03, *11, B*08) dando origine a CTL specifici ed è altresì in grado di legare HLA di classe II (DRB1*1101, *0301, *0402) potenziando la citotossicità attraverso una risposta CD4⁺ specifica. p210 è strategicamente molto importante perché la cellula leucemica non può mettere in atto meccanismi di escape in quanto l'espressione di p210 è direttamente implicata nella leucemogenesi [46, 49-51]. La capacità dei linfociti di indurre remissione completa è stata studiata nei pazienti con LMC in remissione parziale o recidivati dopo allo-HSCT che sono stati trattati con DLI. L'evidenza che la remissione di malattia era indotta dall'azione del sistema immunitario verso la leucemia e non da una risposta generalizzata contro l'ospite deriva dall'osservazione che i linfociti T del donatore erano in grado di riconoscere le cellule di LMC, mentre non erano rilevati CTL diretti verso cellule del ricevente. Pazienti con LMC sono stati arruolati anche in studi condotti per valutare la capacità degli mHAg di stimolare una risposta immunitaria specifica. Anche in questi casi sono stati presi in considerazione pazienti recidivati post allo-HSCT trattati efficacemente con DLI. Il momento dell'ottenimento della remissione di malattia coincideva con un aumento di CTLs specifici funzionali per due mHAg con mismatch tra donatore e ricevente (HA-1 e HA-2) [46-47, 50, 52]. Parallelamente altri studi hanno evidenziato che in un gruppo di pazienti con mismatch per LRH-1 rispetto al loro donatore, dopo l'infusione di DLI avveniva un aumento di CTLs specifici per LRH-1 in concomitanza con la riduzione del numero di cellule bcr/abl positive [43].

Per contro, la leucemia acuta linfoblastica Philadelphia positiva (LAL-Ph⁺), che condivide con la LMC la presenza del cromosoma Philadelphia, oltre ad avere una debole chemiosensibilità ha mostrato una scarsa risposta all'immunoterapia allogenica a causa della sua capacità di stimolare linfociti T specifici, ma a fenotipo helper [47-48, 53]. Studi condotti in vitro su pazienti con LAL-Ph⁺ hanno dimostrato che nonostante sia presente il trascritto di fusione p190 (derivante dal riarrangiamento tra le regioni e1 e a2), il sistema immunitario non è in grado di generare CTL specifici neppure dopo stimolazione con cellule dendritiche attivate. Una possibile spiegazione può risiedere nel fatto che p190 non ha una perfetta conformazione allosterica per il consensus motif della tasca di legame dell'HLA-A*0201 (presente sulle cellule utilizzate per questi esperimenti e frequente nelle popolazioni caucasiche). p190 non è in grado di generare CTL specifici neppure dopo addizione di IL-2 o stimolazione con APC che sono invece in grado di rendere immunogeni peptidi conformazionalmente simili e dotati di bassa affinità per la tasca di legame delle molecole MHC [54]. Il peptide derivante dal riarrangiamento e1a2 è invece presentato efficacemente dal sistema di istocompatibilità di classe II (in particolare DRB1*1501) che stimola selezione ed espansione di linfociti helper specifici (negli studi condotti hanno prodotto efficacemente IFN α , senza però mostrare una spiccata attività antitumorale) [53, 55].

Anche nei pazienti con LAL-Ph⁺ recidivata dopo trapianto allogenico viene utilizzata l'infusione delle DLI, ma l'efficacia è relativamente scarsa. Le possibili spiegazioni sono:

- difetto nella presentazione dell'antigene da parte delle cellule di LAL-Ph⁺;
- inadeguata espressione da parte delle cellule di LAL-Ph⁺ di molecole di superficie come molecole di adesione, molecole costimolatorie e molecole HLA di classe I e II;
- incapacità delle cellule pre-B di funzionare come APC e loro potenzialità nell'indurre tolleranza [47].

-

In questo contesto lo studio degli mHAg ha un ruolo importante perché in coppie donatore-ricevente con mismatch per l'mHAg HA-1, dopo l'infusione di DLI, pur non essendo presenti cloni specifici per p190, è stato evidenziato un aumento dei cloni specifici per HA-1. Quindi, seppur meno potente rispetto alla LMC, è possibile riscontrare anche per le LAL-Ph⁺ una risposta immunologica diretta verso gli mHAg che sottende l'effetto GvL [37, 56-57].

SCOPI DELLO STUDIO

Il progetto è stato focalizzato sullo sviluppo di un metodo di indagine che fosse relativamente semplice, veloce e sensibile e che permettesse la genotipizzazione in un unico step di un elevato numero di mHAg. A tal fine è stata sviluppata una metodologia di indagine di laboratorio basata sulla spettrometria di massa: iPlex Gold Mass Array Sequenom®.

Questa metodologia si basa sull'amplificazione delle regioni di DNA d'interesse, sulla successiva estensione mediante primer specifici che determinano la sintesi di frammenti specifici secondo il template relativo al polimorfismo in esame e sulla conseguente determinazione del genotipo attraverso la spettrometria di massa [58].

Tale metodologia è stata necessaria per valutare contemporaneamente (multiple-genotyping) il genotipo di 23 mHAg in una coorte di 46 pazienti affetti da leucemia mieloide cronica-LMC-Ph⁺ (29 casi) e da leucemia acuta linfoblastica-LAL-Ph⁺ (17 casi) sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (Allo-HSCT), al fine di studiare la possibile correlazione di uno o più mHAg con la Graft versus Host Disease (GvHD) o con la Graft versus Leukemia (GvL).

Nel caso di altri tre mHAg sono state applicate due tecniche di biologia molecolare convenzionale: sequenziamento capillare dei prodotti di PCR (per genotipizzare due mHAg) e la PCR convenzionale (per un mHAg).

Per studiare al meglio l'eventuale correlazione tra mHAg e GvHD e GvL è stato ritenuto fondamentale che tutte le coppie donatore/ricevente incluse nello studio fossero HLA compatibili almeno 6/6 (HLA-A, -B, -DRB1). Nel caso di 15 coppie donatore-ricevente che non avevano una tipizzazione HLA ad alta risoluzione è stato accertato questo grado di compatibilità attraverso l'impiego della tecnologia del sequenziamento massivo di nuova generazione (Next Generation Sequencing-NGS). Per primi in Italia abbiamo applicato questa metodica che ha come vantaggi la rapidità, l'elevata

risoluzione, la relativa facilità, la possibilità di identificare varianti alleliche molto rare e l'assenza di ambiguità di fase.

Gli aspetti rilevanti della ricerca che è stata condotta possono essere sintetizzati in 3 punti:

- messa a punto di un protocollo di laboratorio originale (mediante la tecnologia iPlex Gold Mass Array Sequenom®) in grado di permettere il multiple-genotyping di un numero elevato di mHAgS;
- applicazione della metodica di multiple-genotyping per lo studio della correlazione mHAgS e GvHD/GvL in un modello clinico rappresentato da 29 pazienti affetti da LMC-Ph⁺ e da 17 pazienti affetti da LAL-Ph⁺ allo scopo di valutare possibili correlazioni tra uno o più mHAgS e la GvHD e/o la GvL;
- sviluppo di una metodica innovativa di tipizzazione HLA mediante Next Generation Sequencing (NGS).

PAZIENTI E METODI

mHAgS considerati nello studio

Attraverso l'analisi bibliografica è stato possibile identificare e caratterizzare dal punto di vista biologico-molecolare (identificazione dello SNP responsabile della generazione dell'mHAg, analisi della sequenza fiancheggiante lo SNP, definizione della molecola HLA che presenta l'mHAg al sistema immunitario del donatore) 26 mHAgS (Tab. 1).

mHAg	Gene	Locus genico	Espressione tissutale	SNP reference	Switch nucleotidico	HLA		Bibliografia
						Restrizione	Frequenza Caucasica	
ACC-1	Bcl2A1	15q24.3	Emopoietico	rs1138357	G→A	A*24	25	[5, 37, 39, 43, 69]
ACC-2	Bcl2	15q24.3	Emopoietico	rs3826007	G→A	B*44	17	[5, 37, 39, 43]
ACC-4	Catepsina H	15q24-25	Emopoietico	rs2289702	G→A	A*33:03	0	[4, 37]
ACC-5	Catepsina H	15q24-25	Emopoietico	rs2289702	G→A	A*31:01	0	[4, 37]
ACC-6	HMSD	18q21.33	Emopoietico	rs9945924	G→A	B*44	17	[4]
C19orf48	C19orf48	19q13	Ubiquitario	rs3745526	A→T	A*02:01	46,5	[4, 70]
CD31	PECAM1	17q23	Ubiquitario	rs668	C→G	A*02	52	[10]
CD31	PECAM1	17q23	Ubiquitario	rs12953	A→G/T	A*02	52	[11, 71]
CTL7A7	PANE-1	22q13.2	Emopoietico	rs5758511	C→T	A*03	20	[31, 37, 39]
DPH1	DPH1	17	Ubiquitario	rs35394823	C→G	B*5701	4	[37]
DRN-7	SP110	2q37.1	Emopoietico	rs1365776	G→A	A*03	20	[37, 39]
HA-1	KIA A0223	19p13.3	Emopoietico	rs1801284	A→G	A*02, A*02:06; B*40:01	52, 0, 0	[39]
HA-2	MYOG 1	7p13- p11.2	Emopoietico	rs61739531	G→A	A*02:01	46,5	[5, 11, 27, 37, 39, 43]
HA-3	LBC	15q24-25	Ubiquitario	rs7162168	T→C	A*01	21	[5, 21, 27, 37, 39]
HA-8	KIA A 0020	9p24.2	Ubiquitario	rs2173904	G→C	A*02:01	46,5	[5, 11, 21, 37, 39, 42, 72]
HB-1	HB-1	5q31.3	Emopoietico	rs161557	C→T	B*44:02, B*44:03	7, 20	[5, 37, 39, 43, 57]
HEATR-1	HEATR-1	1q43	Ubiquitario	rs2275687	C→T	B*08:01	10	[43]
LB-ADIR	TOR3A	1q25.2	Emopoietico	rs2296377	T→C	A*02:01	46,5	[37]
LB-ECGF-1H	ECGF	22q13.33	Emopoietico	rs112723255	C→T	B*07	11	[37, 73]
LB-LY75-1K	Ly75	2q24.2	Emopoietico	rs12692566	T→G	DRB1*13:01	11	[26]
LB-MR1-1R	MR1	1	Emopoietico	rs2236410	A→G	DRB3*02:02	nd	[26]
LB-MTHFD1-1Q	MTHFD1	14	Emopoietico	rs2236225	G→A	DRB1*03:01	14	[26]
LB-PTK2B-1T	PTK2B	8	Emopoietico	rs751019	A→C	DRB3*01:01	nd	[26]
LRH-1	P2RX5	17p13.3	Emopoietico	rs5818907	+G	B*07	11	[21, 37, 43]
P2RX7	P2RX7	12	Ubiquitario	rs7958311	A→C/G/T	DRB1*03	16	[43]
UGT2B17	UGT2B17	4q13	Ubiquitario	Del	Del	A*29:02, B*44	4, 17	[5, 37, 39, 43-44]
UTA2-1	C12orf75	12	Ubiquitario	rs2166807	A→G	A*02	52	[5]

Tabella 1: Caratteristiche relative ai mHAgS presi in considerazione nello studio

Tra questi è stato inserito anche un mHAg che non deriva dalla presenza di uno SNP, bensì dall'assenza del gene nel donatore e dalla presenza nel ricevente.

Gli antigeni minori da studiare sono stati suddivisi in 4 categorie (Tab. 2):

- A distribuzione ubiquitaria (con particolare riguardo agli antigeni minori espressi in modo rilevante negli organi target di GVHD), riconosciuti dal sistema HLA di classe I;
- A distribuzione ubiquitaria (con particolare riguardo agli antigeni minori espressi in modo rilevante negli organi target di GVHD), riconosciuti dal sistema HLA di classe II;
- Ad espressione limitata alle cellule emopoietiche, riconosciuti dal sistema HLA di classe I;
- Ad espressione limitata alle cellule emopoietiche, riconosciuti dal sistema HLA di classe II.

	Espressione ubiquitaria	Espressione ristretta ai tessuti emopoietici
Presentato da HLA di classe I	C19orf48; CD31; HA-3; HA-8; UTA2-1; P2RX7; HEATR1; DPH1	ACC-1; ACC-2; ACC-4; ACC-5; ACC-6; CTL7A7; DRN-7; HA-1; HA-2; HB-1; LRH-1; LB-ADIR-1; LB-ECGF-1H
Presentato da HLA di classe II	UGT2B17	LB-LY75-1K; LB-MR1-1R; LB-MTHFD1-1Q; LB-PTK2B-1T

Tabella 2: Classificazione degli mHAggs secondo l'espressione tissutale e la restrizione HLA

Metodiche per la genotipizzazione degli mHAg

In letteratura sono riportate numerose esperienze riguardanti la genotipizzazione di singoli mHAg o inerenti l'utilizzo di metodiche di PCR-SSP, ma comunque limitate a un ridotto numero di SNPs [59]. L'obiettivo principale di questo studio pilota è stato lo sviluppo di una metodica di biologia molecolare moderna, relativamente facile e veloce che possa essere utilizzata per genotipizzare in un unico esperimento un pannello che comprenda tutti gli mHAg riportati in letteratura in un elevato numero di pazienti. E' stata quindi identificata la piattaforma iPlex Gold Sequenom® (Sequenom. Inc, San Diego, CA) che si basa sul riconoscimento degli SNP mediante spettrometria di massa (MassARRAY®) e che consente di raggiungere tale scopo con un'elevata efficienza teorica. L'iPlex Gold però non è adatta per il riconoscimento di delezioni geniche (da cui origina l'mHAg UGT2B17) e neppure per lo studio di mHAg che mappano in regioni genomiche particolarmente polimorfiche (responsabili degli mHAg LRH-1 e LB-MR1-1R). In questi due casi è stato necessario utilizzare rispettivamente una PCR per il primo e il sequenziamento convenzionale di prodotti di PCR per i restanti due.

Genotipizzazione mediante iPlex Gold Mass Array Sequenom®

La genotipizzazione con MassARRAY® (Sequenom, Inc, San Diego, CA) avviene attraverso questi step (Fig. 2):

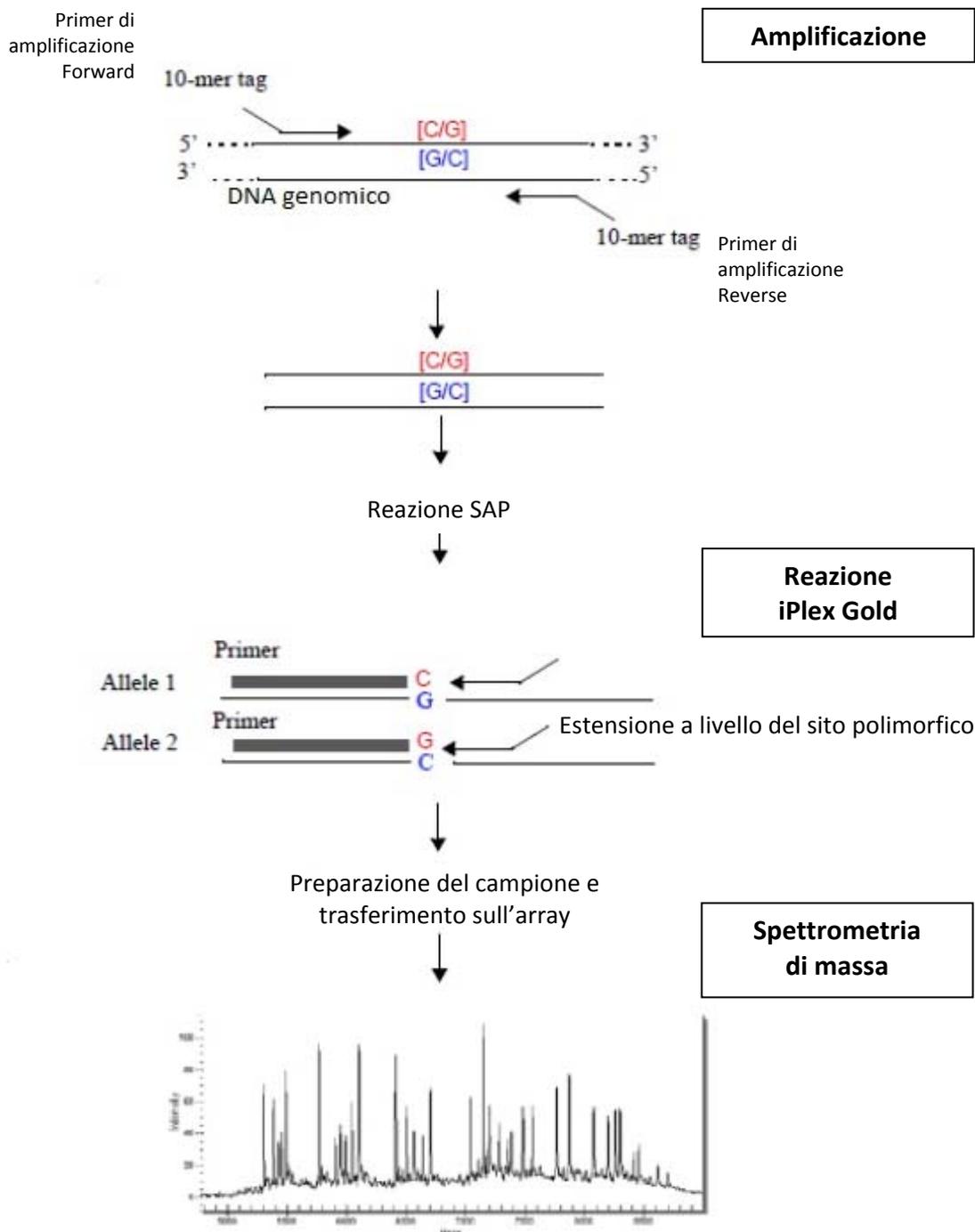


Figura 2: Fasi della genotipizzazione mediante iPlex Gold Mass Array Sequenom® [Adattato da 60]

Isolamento e quantificazione del DNA, amplificazione del DNA, preparazione dei prodotti della reazione iPLEX Gold, trasferimento dei prodotti della reazione iPLEX Gold sullo SpectroCHIP® array, setup dell'esperimento mediante gli appositi software (Assay Editor and Plate Editor) di gestione dello strumento, acquisizione ed analisi dei dati di spettrometria di massa [60].

Questa metodica è risultata idonea per la genotipizzazione di 23 mHAg. Metodologicamente è necessario sottolineare che l'mHAg CD31 è determinato dalla presenza di almeno uno tra due SNP (rs668 e rs12953), al contrario lo SNP rs2289702 è responsabile della genesi di un peptide che è definito ACC-4 o ACC-5 in base alla molecola HLA che lo presenta (HLA-A*3303 e HLA-A*3101).

Il DNA relativo a ciascuna coppia donatore/ricevente è stato diluito alla concentrazione di 50ng/μl.

Per la fase di amplificazione è stata disegnata una coppia di primer per ciascuno SNP al fine di amplificare una regione di 150-200 bp contenente la base polimorfica (Tab. 3). Ciascuna coppia di primer è poi stata testata attraverso il software SEQUENOM's Assay Design (Sequenom. Inc, San Diego, CA) per valutare il rischio di formazione di dimeri e valutare l'idoneità dei primer all'esecuzione di una PCR in multiplex. Infine ad ogni primer è stato aggiunto un Tag costituito da 10 nucleotidi che è 5'-ACGTTGGATG-3'.

L'esperimento è stato realizzato attraverso l'esecuzione di tre multiplex in piastre da 384 well. Con la Multiplex uno sono stati amplificati gli SNPs relativi a: ACC-1, ACC-2, ACC-6, C19orf48, HA-1, HA-2, HA-8, LB-ADIR-1, LB-LY75-1K, LB-MTHFD1-1Q, P2RX7, LB-ECGF-1H e UTA2-1.

Attraverso la Multiplex due sono stati amplificati gli SNPs relativi a: ACC-4/5, CD31 (rs668), CTL7A7, DPH1, DRN-7, HA-3, HB-1, HEATR-1 e LB-PTK2B-1T (Tab. 3).

Con la terza reazione (Multiplex 3) è stato amplificato l'rs12953 relativo a CD31.

			Primer di amplificazione		
	mHAg	SNP	forward	reverse	Primer di estensione
Multiplex 1	ACC-1	rs1138357	ACGTTGGATGTTGGACCTGATCCAGTTGT	ACGTTGGATGTATTTACAGGCTGGCTCAGG	GTGGTATCTGTAGGACG
	ACC-2	rs3826007	ACGTTGGATGTGGTTACAATTCTTCCCCAG	ACGTTGGATGCTGCCAGAACACTATTCAAC	tcCAATTCTTCCCCAGTTAATGATG
	ACC-6	rs9945924	ACGTTGGATGGAAGTCCAGCTCAACTGATA	ACGTTGGATGCACTGCAGCTCAGATGTCTC	TTGTCTTGAAGTGGCTTTA
	C19orf48	rs3745526	ACGTTGGATGCACGCCTAGGCAGGAAACA	ACGTTGGATGTTTTCTGTGTCCTTCCCCTG	GCCTAGGCAGGAAACAGCAGAG
	DRN7	rs1365776	ACGTTGGATGCTTCTTGTACTCTCATC	ACGTTGGATGAGATGTATCTGGTCAACTCC	aaTCTTGTACTCTCATCTTACCTC
	HA-1	rs1801284	ACGTTGGATGGCCTTGAGAACTTAAGGAG	ACGTTGGATGTTGGGTCTGGCTCTGTCTTC	AGGAGTGTGTGTTGC
	HA-2	rs61739531	ACGTTGGATGATGGCCTCAGGCCATACAG	ACGTTGGATGCGCATCTACACCTACATCGG	aTCCTGGTAGGGGTTCA
	HA-8	rs2173904	ACGTTGGATGGTTTTGTTGCAGTCAGCAG	ACGTTGGATGGTTCTAATTTTTCTGGCTG	TGTTGCAGTCAGCAGATCACC
	LB-ADIR1	rs2296377	ACGTTGGATGGTCCGTGGCGCCAGCTTTG	ACGTTGGATGTGGAGGCGCCGCGGGGCTCA	CCAGCTTTGGCTCTTT
	LB-ECGF1	rs112723255	ACGTTGGATGAGGAGGCGCTCGTACTCTC	ACGTTGGATGAAGGAGCTTTATTGCTGCGG	gCGTACTCTCCGACCGC
	LB-LY751K	rs12692566	ACGTTGGATGTGGGTCTTATCAAACCAC	ACGTTGGATGGTCTTGATTAATCTCTAAGC	GGTCTTATCAAACCACATAAGAGA
	LB-MTHFD1	rs2236225	ACGTTGGATGTAACCTACAAACCCTTCTGG	ACGTTGGATGACATCGCACATGGCAATTCC	ccCTGGGCCAACAAGCTTGAGTGCGATC
	P2RX7	rs7958311	ACGTTGGATGTGGTGGTCTTGTCTGCAAGG	ACGTTGGATGAGATCTACTGGGACTGCAAC	gCAAGGCGACGAAACTGTATTTGGGA
UTA2-1	rs2166807	ACGTTGGATGAGCTGAGGTCTGCCTTGATG	ACGTTGGATGACCACATACATCATTGCAAG	CTTGATGGTAAAGTTAATACAGAATTT	
Multiplex 2	ACC-4/5	rs2289702	ACGTTGGATGACCGCAGACGGGGACTCCCA	ACGTTGGATGATGTGGGCCACGCTGCCGCT	TCCCAGGAGCCAGGCC
	CD31	rs668	ACGTTGGATGGCTCAGTTCCAAGGACTCAC	ACGTTGGATGGTACTGTGATTGTGAACAAC	CACCTTCCACCAACA
	CTL7A7	rs5758511	ACGTTGGATGTTGAGCACACCAGGCAAGTC	ACGTTGGATGACGGAGATACCTCGTGGAAG	CACACCAGGCAAGTCCCACACTC
	DPH1	rs35394823	ACGTTGGATGTGCTGCTCTCTGAGATCTTC	ACGTTGGATGATAGCCAGGCAGATACTCAC	CCCAGCAAGCTTAGC
	HA-3	rs7162168	ACGTTGGATGATGATGATGGGGCCCCAGC	ACGTTGGATGTAGAGAGGGAGTGCTCCTTT	cCTGGTGTGAGGGAAGTCA
	HB-1	rs161557	ACGTTGGATGCTCAAGTCTCAGCTAAGCCA	ACGTTGGATGCTTCAACTTCAACCAATTCC	CCATTCTTTCTATAGGTTCTCTG
	HEATR1	rs2275687	ACGTTGGATGCTTCTTTTGGATACCAGC	ACGTTGGATGTGGTTACCTGATCCACCAGA	TTTATAAGTAAAGAGAGAGCAG
LB-PDK2B	rs751019	ACGTTGGATGTGTTTCTTCTGTCAGGAC	ACGTTGGATGTCTCTGGCAACTCACCAT	CCCCATGGTTTATATGAATGATA	
Multiplex 3	CD31	rs12953	ACGTTGGATGGGCTGTGCAGTAATACTCTC	ACGTTGGATGAATGCCACCCAGGCATTTTG	CCCTCCTGTTCTTG

Tabella 3: Primer di amplificazione ed estensione per la reazione iPlex Gold

I reagenti utilizzati per l'amplificazione sono stati:

10x PCR Buffer con 20 mM MgCl ₂	1x (2 mM MgCl ₂)
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTP mix (25 mM each)	500 nM
Primer mix (500 nM each)	100 nM
PCR Enzima (5 U/μL)	1.0 U/rxn
DNA genomico (5-10 ng/μL)	5-10 ng/rxn
Acqua (purificazione HPLC)	Al volume finale di 5 μl

Il protocollo di amplificazione è stato il seguente:

94° C per 2 minuti	
94° C per 30 secondi	45 cicli
56° C per 30 secondi	
72° C per 1 minuto	
72° C per 1 minuto	
4° C infinito	

Gli amplificati sono poi stati preparati per la reazione iPLEX Gold attraverso la reazione SAP che utilizza la fosfatasi alcalina per neutralizzare i dNTPs non incorporati durante la PCR, convertendoli in dNDPs e rendendoli indisponibili per le future reazioni.

Per la SAP è stata necessaria la presenza di

Acqua (purificazione HPLC)	1.53 μL
SAP Buffer (10x)	0.17 μL
SAP enzima (1.7 U/μL)	0.30 μL

E la reazione è avvenuta in un termociclatore con il seguente protocollo:

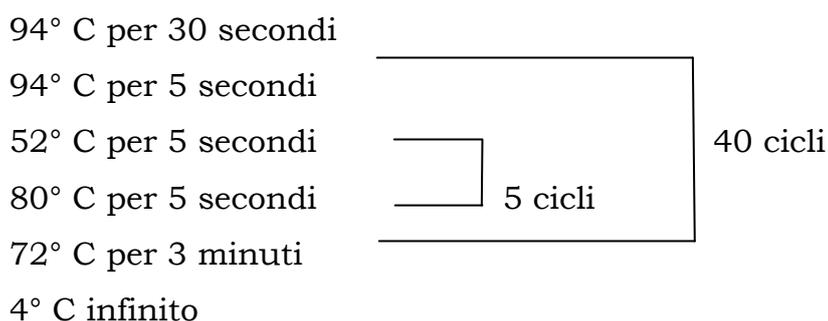
37° C per 40 minuti
 85° C per 5 minuti
 4° C infinito.

Per la successiva reazione iPLEX Gold sono stati utilizzati i primer di estensione disegnati in modo che il 3' di ciascun primer si trovi immediatamente prima rispetto al sito polimorfico (Tab. 3). Durante la reazione, il primer è esteso dai nucleotidi e originano prodotti allele-specifici con differenti masse secondo la sequenza analizzata.

I reagenti utilizzati per l'amplificazione sono stati:

iPlex Buffer Plus (10x)	0.222x
iPlex Termination Mix	0.5x
Primer mix (7 μ M)	0.73 μ M
iPlex Enzima	0.5x
Acqua (purificazione HPLC)	Al volume finale di 2 μ l

Il protocollo di amplificazione è stato il seguente:



Prima della spettrometria di massa, i prodotti della reazione iPlex Gold sono stati desalinizzati e trasferiti in due array SpectroCHIP attraverso il MassARRAY nano dispenser.

Gli SpettroCHIP array sono stati quindi analizzati con il MassArray Analyzer.

Genotipizzazione mediante Sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR

Per genotipizzare LB-MR1-1R e LRH1 sono state disegnate 2 PCR specifiche e gli amplificati sono stati poi utilizzati per il sequenziamento capillare convenzionale.

Per il disegno dei primer è stata utilizzata la sequenza rilasciata da Ensembl Genome Browser (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge) e la scelta tra le possibili coppie di primer è stata operata valutando il rischio di formazione di dimeri tra i primer. La proiezione di questo rischio è stata eseguita mediante il software Oligo Analysis Tool (Eurofins MWG Operon, Huntsville, Alabama).

Per LB-MR1-1R i primer forward e reverse sono stati:

GAAGCGTCTGTCTCTGCCGCAT e GTAGGGAGCACTCGTGTGGGG
rispettivamente. Il protocollo di amplificazione in 25 µl di volume finale contiene 2.5 µl di GeneAmp 10X PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl; Applied Biosystems, Foster City, CA), 5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.5 mM di una miscela dei 4 nucleotidi (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 10 pmoli di entrambi i primer sense e reverse, 1 unità di Taq polimerasi (AmpliAmp Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA) e almeno 20 ng di DNA genomico. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termociclatore automatico (Applied Biosystems, Foster City, CA) con un programma includente la prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, 35 cicli costituiti da denaturazione (95°C per 30”), annealing (65.5°C per 30”), ed estensione (72°C per 30”), una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti e termine della reazione a 4°C.

Per LRH i primer utilizzati sono stati CTCAGAGCCGGGTCCCACTCCA e CCGCCCTCTTTCAGGTAACGCT. Il protocollo di amplificazione è sovrapponibile al precedente, ad eccezione della temperatura di annealing che è stata di 66.5°C.

Per entrambe le reazioni, il risultato è stato valutato attraverso elettroforesi su gel d'agarosio al 2% con etidio bromuro e corsa a 180V per almeno 20 minuti. Gli amplificati sono stati purificati mediante QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le indicazioni fornite dai produttori e quantificate con Nanodrop attraverso lettura a 260 nm. La reazione di sequenza è stata eseguita in un volume di 10 μ l con 40ng di purificato, 3.5 μ M di primer e il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reazione è stata eseguita in un termociclatore automatico con il seguente programma:

96° C per 30 secondi
 96° C per 10 secondi
 60° C per 3 minuti
 4° C infinito

} 25 cicli

I prodotti della reazione di sequenza sono stati purificati dall'eccesso di reagenti attraverso il kit QIA quick Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) e preparati per il sequenziamento capillare automatico secondo la metodica di Sanger su sequenziatore capillare automatico ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le sequenze ottenute sono state visualizzate attraverso il programma Chromas (Informer Technologies, Inc.) per la genotipizzazione delle basi polimorfiche di nostro interesse (Fig. 3 e 4).

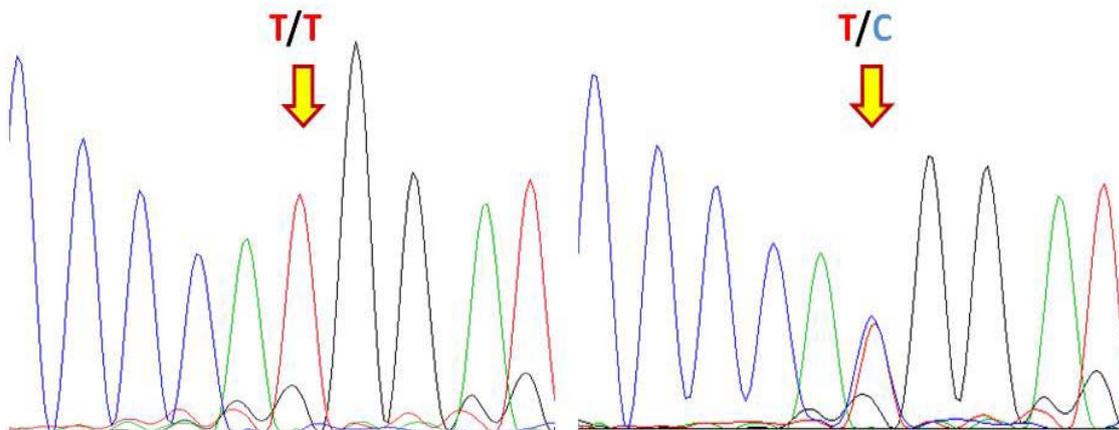


Figura 3: SNP rs2236410 che determina l'mHAg MR1-1R

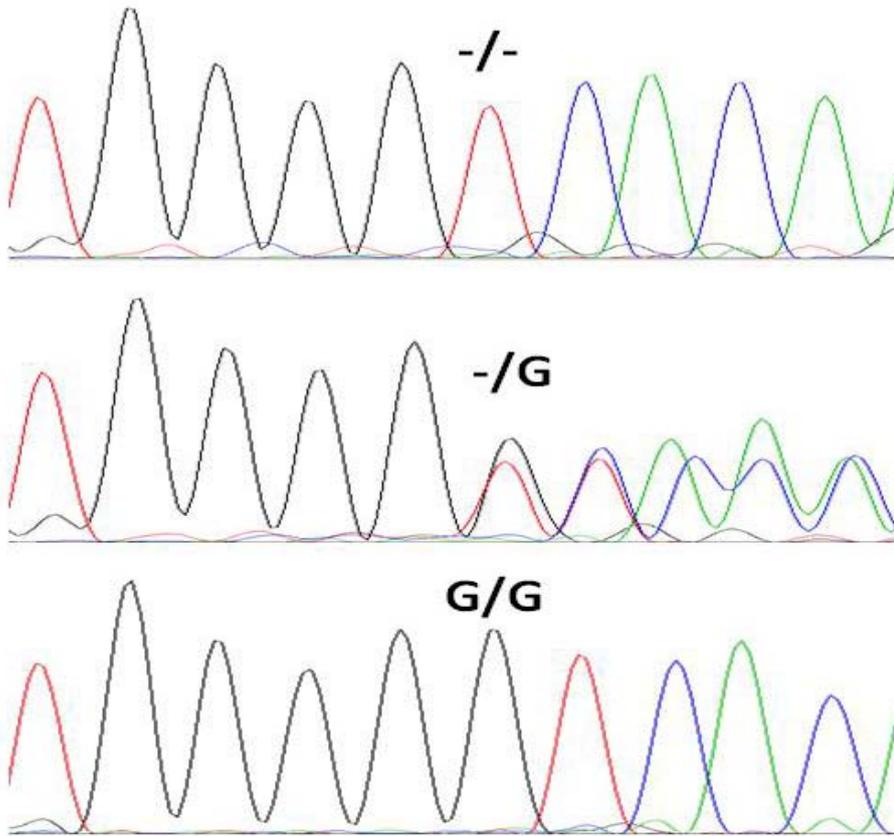


Figura 4: SNP rs 5818907 che determina l'mHAg LRH-1

Genotipizzazione mediante PCR

La presenza o l'assenza dell'mHAg UGT2B17 sono legate alla presenza e normale sequenza del gene UGT2B17 o alla sua delezione rispettivamente. L'integrità del gene stata valutata analizzando, mediante PCR specifiche, 4 frammenti. Il frammento 5' si trova immediatamente a monte rispetto alla regione codificante e serve per valutare la regione del promotore. I CTLs identificati finora e riportati dagli studi pubblicati in letteratura sono diretti contro peptidi che vengono codificati dagli esoni 1 e 6. Per questo motivo, è stato scelto di studiare l'esone 1 (che deve essere suddiviso in due frammenti a e b) e l'esone 6.

La figura 5a mostra la disposizione degli esoni e dei relativi primer.

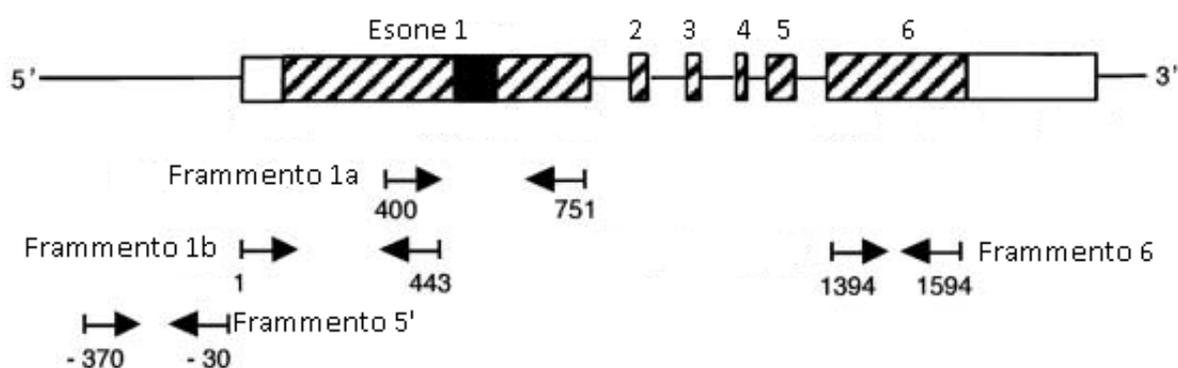


Figura 5a: disegno del saggio per determinare la presenza o la delezione di UGT2B17, Localizzazione dei primer rispetto alla struttura del gene [Adattato da 61-62]

I primer utilizzati per i quattro frammenti sono stati disegnati partendo dalle esperienze pubblicate in letteratura [44, 61-62] e sono i seguenti:

Frammento 5': GGCAGTATCTTGCCAATGT
AGACTCCAAGTGCCAGTT

Frammento 1b: AAATGACAGAAAGAAACAA
GCATCTTCACAGAGCTTATAT

Frammento 1°: TGTTGGGAATATTCTTGACTATAA
CCCACCTTCTTCAGATCATATGC

Frammento 6: GAATTCATCATGATCAACCG
ACAGGCAACATTTTGTGATC

Il protocollo di amplificazione in un volume finale di 25 µl di PCR buffer contiene 2.5 mM di MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ciascuno dei quattro nucleotidi (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany), 10 pmoli di ciascun primer, 1 unità di Taq polimerasi (AmpliTaq Gold; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e almeno 20 ng di DNA genomico.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termociclatore automatico (Applied Biosystems, Foster City, CA) con un programma includente la prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, 35 cicli costituiti da denaturazione (95°C per 30"), annealing a una temperatura specifica per ogni coppia di primer (per 30"), ed estensione (72°C per 30"), e una fase di estensione finale di a 72°C per 7 minuti.

Le temperature di annealing specifiche sono: 59°C per i frammenti 5', 1a e 6; 53.5°C per il frammento 6. I prodotti di PCR sono stati valutati per la presenza o meno del gene mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% con etidio bromuro e corsa a 180V per almeno 20 minuti (Fig. 5b).

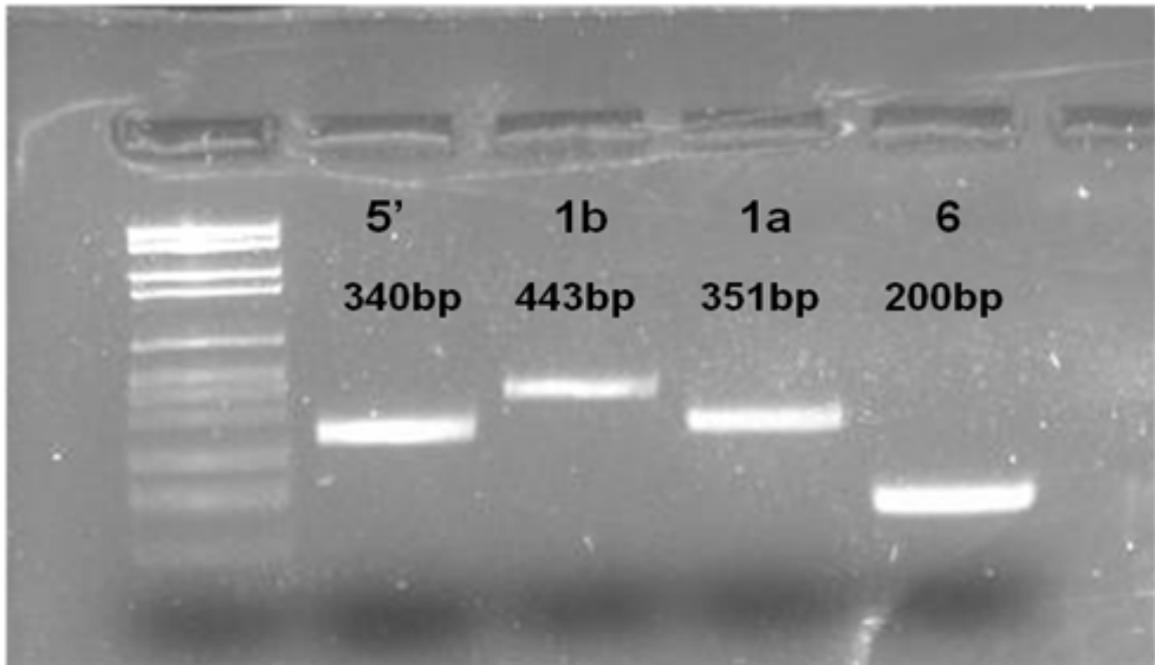


Figura 5b. Elettroforesi su gel d'agarosio dei diversi frammenti

L'assenza contemporanea dei quattro frammenti è indicativa della delezione. Prima di definire un campione delecto, sono state comunque testate la qualità, integrità e capacità di amplificazione del DNA attraverso la valutazione di LB-MR1-1R e LRH1 che sono serviti da "gene di controllo". Per i rari campioni il cui DNA genomico di partenza risultava scarso, per la valutazione di UGT2B17 è stato utilizzato il materiale amplificato attraverso il kit GenomiPhi V2 DNA ((GE Healthcare, Piscataway, NJ)

Identificazione dell'immunogenicità di un mHAg

Lo studio ha come obiettivo principale l'identificazione del ruolo delle differenze a livello degli antigeni minori in grado di stimolare la risposta immunitaria del donatore verso il ricevente. Perché vi sia l'ingaggio di una risposta T cellulare è necessaria la soddisfazione di tutti questi criteri:

- differenza genomica tra donatore e ricevente (HH vs RR; HR vs HH; HR vs RR) per lo SNP responsabile della formazione dell'antigene minore. L'mHAg è codificato da un allele immunogeno H e da un allele non immunogeno R; è quindi possibile ottenere un genotipo omozigote HH o RR e un genotipo eterozigote. Gli individui omozigoti per l'allele immunogeno (HH) o eterozigoti con un allele immunogeno e un allele non immunogeno (HR) sono definiti a fenotipo immunogeno. Gli individui omozigoti per l'allele non immunogeno (RR) sono definiti a fenotipo non immunogeno;
 - essendo ciascun mHAg ristretto per una particolare molecola HLA, perché la diversità sia funzionalmente importante, la coppia donatore/ricevente deve essere positiva per la molecola che è in grado di presentare l'mHAg;
 - la differenza genotipica è definita immunogena quando all'interno della coppia donatore/ricevente, un individuo ha fenotipo immunogeno accompagnato dall'appropriata molecola HLA. Una disparità non immunogena è identificata quando a livello genotipico donatore e ricevente sono diversi, ma fenotipicamente sono concordi oppure quando un fenotipo immunogeno non è accompagnato dall'appropriata molecola HLA.
- Inoltre è importante considerare la direzione della disparità immunogena, è possibile avere: Graft-versus-Host (quando il ricevente ha fenotipo immunogeno e il donatore no) e Host-versus-Graft (quando il donatore ha fenotipo immunogeno e il ricevente no).

Tipizzazione HLA in alta risoluzione

I pazienti inclusi nello studio sono stati trapiantati in epoche diverse, in un ampio range temporale e, conseguentemente, la compatibilità è stata determinata utilizzando metodiche molto diverse (dalla coltura mista linfocitaria, alla tipizzazione sierologica, fino alla molecolare in bassa ed alta risoluzione). La tipizzazione molecolare in alta risoluzione a 4-digit per tutte le coppie donatore/ricevente si è resa necessaria per due ragioni:

- evitare il fattore di confondimento legato alla disparità HLA; Analizzare una popolazione HLA identica almeno 6/6 permette di identificare un possibile ruolo delle disparità sugli mHAg nella patogenesi delle reazioni GvHD/GvL;
- essendo alcuni mHAg HLA ristretti a livello allelico, una tipizzazione in alta risoluzione era necessaria per identificare quali mHAg sono presentati efficacemente da ciascuna coppia.

Le metodiche utilizzate sono state scelte secondo le informazioni di compatibilità che erano a disposizione.

Per le coppie più recenti, per le quali mancavano solo alcuni loci (n=39, 56%) in particolare DPB1 e DRB3/5), sono state disegnate PCR specifiche e sono stati sequenziati con metodo capillare convenzionale i relativi prodotti. Per le coppie definite compatibili con metodica molecolare in bassa risoluzione (n=16, 23%), è stato eseguito il saggio PCR-SSO Luminex® e i restanti loci sono stati studiati con sequenziamento dei prodotti di PCR specifiche. Per le coppie meno recenti (n=15, 21%) che erano state definite compatibili mediante coltura mista linfocitaria è stato utilizzato il sequenziamento massivo di nuova generazione (NGS), con chimica di pirosequenziamento 454 Roche® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Tipizzazione di singoli loci HLA mediante Sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR

Per lo studio di singoli loci HLA di classe II sono state disegnate PCR specifiche e poi ne sono stati sequenziati i prodotti amplificati. I loci analizzati sono stati DRB3, DRB5, DPB1 e secondo gli standard internazionali, è stato indagato il solo esone 2. I primer utilizzati per amplificare i diversi esoni sono stati disegnati basandosi sulle sequenze rilasciate. In particolare i database utilizzati sono stati: Ensembl Genome Browser (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge), IMGT/HLA database [63-64] e dbMHC (NCBI).

Il locus DRB3 è stato amplificato mediante la seguente coppia di primer (a una concentrazione di 10 pmoli ciascuno): forward TCGCTGTCAGTGTCTTCTCAG e reverse TGCTTGCTCGGGATTGAGAG in una miscela di reazione di 25 µl totali costituita da 2.5 µl di GeneAmp 10X PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl; Applied Biosystems, Foster City, CA), 2.5 µM di MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, CA), ciascuno dei quattro nucleotidi (Roche Diagnostics), 1 unità di Taq polimerasi (AmpliTaq Gold) e almeno 20 ng di DNA genomico. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termociclatore automatico (Applied Biosystems, Foster City, CA) con un programma includente la prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, 35 cicli costituiti da denaturazione (95°C per 30"), annealing (59.5°C per 30"), ed estensione (72°C per 30"), una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti e termine della reazione a 4°C.

Il locus DRB5 è stato amplificato mediante la seguente coppia di primer (a una concentrazione di 10 pmoli ciascuno): forward TCTCTGTCAGTATCTTCCCCG e reverse ACAAGGACCCAGGCCCG in una miscela di reazione sovrapponibile al precedente. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termociclatore automatico (Applied Biosystems, Foster City, CA) con un programma standard e annealing a 61°C [denaturazione a 95°C per 5 minuti, 35 cicli costituiti da

denaturazione (95°C per 30”), annealing (61°C per 30”), ed estensione (72°C per 30”), una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti e termine della reazione a 4°C].

Il locus DPB1 è stato amplificato mediante la seguente coppia di primer (a una concentrazione di 10 pmoli ciascuno): forward ATGTCCGCCCCCTCCC e reverse GCCGGCCCAAAGCCC. Il protocollo di amplificazione di questo locus si discosta dagli altri solo per la temperatura di annealing che è di 59°C.

Per tutte le reazioni, il risultato è stato valutato attraverso corsa elettroforetica su gel d’agarosio al 2%. Gli amplificati sono stati purificati mediante QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le indicazioni fornite dai produttori e quantificate con Nanodrop attraverso lettura a 260 nm. La reazione di sequenza è stata eseguita in un volume di 10 µl con 40ng di purificato, 3.5 µM di primer forward, e il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reazione è stata eseguita in un termociclatore automatico (Applied Biosystems, Foster City, CA) con il seguente programma:

96° C per 30 secondi		
96° C per 10 secondi		25 cicli
60° C per 3 minuti		
4° C infinito		

I prodotti della reazione di sequenza sono stati purificati dall’eccesso di reagenti attraverso il QIAquick Purification kit (Quiagen, Hilden, Germany) e preparati per il sequenziamento capillare automatico secondo la metodica di Sanger. Le sequenze ottenute sono state appaiate alle sequenze di riferimento mediante il tool dbMHC (NCBI). Le sequenze di riferimento utilizzate appartengono all’ultimo update: 3.9 del 09/10/2012.

I primer per il locus DPB1 sono stati disegnati nella regione intronica immediatamente fiancheggiante l’esone 2. A causa di questo, per ottenere

l'informazione relativa a tutto l'esone è stato necessario eseguire anche la sequenza con primer reverse.

Le ambiguità originanti da questa metodica sono state risolte avvalendosi delle notizie relative alla frequenza delle diverse varianti alleliche nelle etnie in analisi e delle informazioni relative alla tipizzazione eventualmente precedentemente eseguita sul campione.

Definizione della compatibilità per il locus DPB1

La definizione della compatibilità per il locus DPB1, attualmente, non può limitarsi alla valutazione dell'uguaglianza o meno. In caso di mismatch è necessario eseguire una valutazione basata sulla predizione dell'immunogenicità di ciascun allele espresso da paziente e donatore. Per questo motivo, le coppie con diversità sono state classificate secondo il criterio proposto da Zino E. *et al.* che suddivide i mismatch in permissivi e non permissivi.

Tipizzazione HLA PCR-SSO LUMINEX®

Per le coppie in cui i loci A, B, C e DRB1 erano stati studiati in LR, per ottenere l'informazione in alta risoluzione, è stato scelto di utilizzare la metodica commerciale PCR-SSO Luminex® (Luminex Corporate, Austin, TX) e di implementare lo studio per i loci DRB3, DRB5 e DPB1 con la metodica precedentemente descritta. Le ambiguità sono state risolte principalmente avvalendosi delle informazioni relative alla tipizzazione precedentemente eseguita sul campione e delle notizie relative alla frequenza delle diverse varianti alleliche nelle etnie in analisi. La tecnologia Luminex® (Luminex Corporate, Austin, TX) è veloce, attendibile, e parzialmente automatizzata; sfruttando il principio dell'ibridazione inversa (rSSO) e il fatto che la tecnologia Luminex® (Luminex Corporate, Austin, TX) è una piattaforma multiparametrica si possono ottenere tipizzazioni ad alta risoluzione con identificazione dell'allele a 4 cifre.

Gli esoni amplificati per ciascun locus sono:

HLA-A, -B, -C esoni 2,3;

HLA-DRB1 esone 2;

HLA-DQA1, -DQB1 esoni 2,3.

Il DNA in studio è stato prima amplificato utilizzando primer specifici per i diversi gruppi allelici, successivamente i prodotti di PCR sono stati ibridati a sonde complementari che sono essenziali per la discriminazione di ciascun allele all'interno dei gruppi.

Inoltre, la fase di amplificazione ha utilizzato primer biotinilati che serviranno per rivelare l'avvenuta ibridazione alle sonde. La PCR non si è discostata rispetto alle classiche PCR per quanto riguarda i reagenti, mentre il protocollo seguito dal termociclatore (Applied Biosystems, Foster City, CA) è stato:

denaturazione a 96°C per 3 minuti

5 cicli costituiti da

denaturazione a 96°C per 20 secondi

annealing a 60°C per 20 secondi

estensione a 72°C per 20 secondi

seguiti da 30 cicli costituiti da

denaturazione a 96°C per 10 secondi

annealing a 60°C per 15 secondi

estensione a 72°C per 20 secondi

estensione finale di 10 minuti a 72°C

e termine della reazione a 4°C.

Al termine della reazione, dopo aver valutato l'avvenuta amplificazione mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio, il DNA è stato denaturato chimicamente e i filamenti ibridati alle sonde specifiche coniugate a microsferi di polistirene fluorescenti.

Dopo l'ibridazione, i filamenti di DNA ibridati sono stati separati da quelli che non hanno reagito mediante lavaggi con tampone apposito. La successiva aggiunta di streptavidina, attraverso il legame con la biotina, ha permesso di riconoscere il DNA ibridato.

Infine l'analizzatore a flusso (Luminex[®], Luminex Corporate, Austin, TX) ha identificato la fluorescenza di ciascuna microsfere e quella dovuta alla streptavidina permettendo l'assegnazione della tipizzazione HLA in quanto il pattern di fluorescenza di ciascun campione è stato confrontato i pattern associati alle sequenze dei geni HLA pubblicate.

Tipizzazione HLA mediante NGS

Per i campioni per cui mancava totalmente una tipizzazione a causa di trapianti eseguiti in un'epoca in cui la coltura mista linfocitaria rappresentava il gold standard per la definizione della compatibilità, è stato scelto di utilizzare una metodica basata sull'NGS. Questa tecnologia permette di ottenere tipizzazioni in alta risoluzione in modo relativamente facile, veloce ed economico con il grande vantaggio di non essere inficiata dalle ambiguità di fase che possono essere grave un problema per le metodiche convenzionali.

La tecnologia utilizzata è stata quella sviluppata da Roche Diagnostics attraverso assay GS GType HLA MR® Set e GS GType HLA HR Set® e il successivo pirosequenziamento degli ampliconi mediante GJ Junior 454 Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Questi due kit sono necessari per la sintesi delle sequenza di DNA relative ai loci HLA.

La Tabella 4 riporta gli esoni amplificati nelle diverse reazioni.

Kit MR Primer set		Kit HR Primer set	
HLA-A	Esone 2, 3	HLA-A	Esone 4
HLA-B	Esone 2, 3	HLA-B	Esone 4
HLA-C	Esone 2, 3	HLA-C	Esone 4
HLA-DQB1	Esone 2	HLA-DQB1	Esone 3
HLA-DRB1, 3, 4, 5	Esone 2	HLA-DPB1	Esone 2
		HLA-DQA1	Esone 2

Tabella 4: Disegno dell'assay per la tipizzazione HLA in alta risoluzione mediante NGS

Al fine di ottenere una tipizzazione in alta risoluzione ad almeno 4 digit, è necessario amplificare tutti gli esoni riportati in Tabella 4; al contrario l'amplificazione e lo studio dei soli esoni riportati nella sola parte sinistra permetterebbe di ottenere una tipizzazione a risoluzione medio-bassa. Mediante questi kit è possibile amplificare la regione HLA di 10 campioni diversi contemporaneamente e successivamente sequenziati in due distinte corse dello strumento. La possibilità di studiare più campioni diversi contemporaneamente è garantita dall'utilizzo di identificatori definiti MID (Multiplex Identifier) e posti a monte rispetto all'inizio di ciascun primer.

Il protocollo utilizzato per il sequenziamento mediante tecnologia GJ Junior 454 Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) è costituito dalle seguenti fasi:

- preparazione delle librerie;
- Emulsion PCR;
- Run di sequenziamento

a cui deve far seguito l'analisi dei dati mediante software specifici.

Preparazione delle librerie

Per ottenere la migliore risoluzione possibile è stato necessario disporre di 28 ng di gDNA a una concentrazione di 5 ng/ μ l. La reazione di PCR è avvenuta in piastre da 96 well fornite dai produttori sul fondo delle quali sono adsorbiti i primer liofilizzati.

I primer utilizzati sono stati i seguenti:

Amplicone	Sequenza del primer (5'-3')
HLA-A ex2 Fw	GAAACGGCCTCTGTGGGGAGAAGCAA
HLA-A ex2 Rev	GGTGGATCTCGGACCCGGAGACTGT
HLA-A ex3 Fw	GACTGGGCTGACCTCGGGGT
HLA-A ex3 Rev	GAGGGTGATATTCTAGTGTTGGTCCCAA
HLA-A ex4 Fw	GGTTCTGTGCTCTCTTCCCAT
HLA-A ex4 Rev	GGGCTTGAACCCTCAGTGA
HLA-B ex2 Fw	AGAGCTCGGGAGGAGCGAGGGGACCGCAG
HLA-B ex2 Rev	ACTCGAGGCCTCGCTCTGGTTGTAGTA
HLA-B ex3 Fw	AGAGCTCGGGCCAGGGTCTCACA
HLA-B ex3 Rev	ACTCGAGGGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT
HLA-B ex4 Fw	CTGGTCACATGGGTGGTCC
HLA-B ex4 Rev	AGATATGACCCCTCATCCC
HLA-C ex2 Fw	AGTCGACGAAACGGCCTCTGCGGA
HLA-C ex2 Rev	ACTCGAGGGGCTGGGGTCACTCA
HLA-C ex3 Fw	ACGTCGACGGGCCAGGGTCTCACA
HLA-C ex3 Rev	ACCTCGAGGTCAGCAGCCTGACCACA
HLA-C ex4 Fw	CAAAGTGTCTGAATTTTCTGACTCTTCCC
HLA-C ex4 Rev	TGAAGGGCTCCAGAAGGACTT, TGAAGGGCTCCAGGACTT
DPB1 ex2 Fw	GCTGCAGGAGAGTGCGCCTCCGCTCAT
DPB1 ex2 Rev	CGGATCCGGCCCAAAGCCCTCACTC
DQA1 ex2 Fw	GTTTCTTCCATCATTTTGTGTATTAAGGT
DQA1 ex2 Rev	CCATGACAAGATCTGGGGACCTCT
DQB1 ex2 Fw	AGGATCCCCGCAGAGGATTCGTGTACCA
DQB1 ex2 Rev	TCCTGCAGGACGCTCACCTCTCCGCTGCA
DQB1 ex3 Fw	TGGAGCCCACAGTGACCATCTCC
DQB1 ex3 Rev	AGTGACATCAGGGATAAGAGATGGGAA
DRB1 Fw	CCGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG
DRB1 Rev	CCGAATTCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC

I primer riportati sono stati disegnati da Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, e all'interno della sequenza sono presenti basi degenerate al fine di aumentare l'affinità per le sequenze introniche (caratterizzate da un elevato grado di variabilità) su cui devono appaiarsi, ma non viene dichiarato quali. Al 5' una sequenza analoga è presente per i reverse. Questi oligo sono definiti adattatori e sono necessari per le successive fasi del protocollo.

La miscela di reazione, a base acquosa in un volume di 25 μ l, è composta da:

Acqua ultrapura: 14.8 μ l

Glicerolo 80% w/v: 3.125 μ l

PCR Buffer II 10x: 2.5 μ l

MgCl₂ 25 mM: 1.8 μ l

dNTPs 10mM: 0.375 μ l

AmpliTaq Gold DNA Polymerase 5 U/ μ l: 0.4 μ l

Il protocollo di amplificazione si discosta dai protocolli comunemente utilizzati in quanto la fase di annealing è sovrapposta alla fase di estensione ed avvengono a 62°C per 30 secondi.

Successivamente gli ampliconi sono stati purificati mediante procedura basata sull'utilizzo di biglie magnetiche (Agencourt) che legano le molecole di DNA sintetizzato e lasciano in soluzione nucleotidi e primer non utilizzati durante l'amplificazione. Il volume di soluzione di biglie è 72 μ l ed è stato definito secondo l'efficienza della reazione di PCR. Avvalendosi di piastre magnetiche che trattengono le biglie e l'acido nucleico adsorbito, i contaminanti vengono eliminati attraverso alcuni lavaggi con etanolo al 70%. Infine l'eluizione dei prodotti di PCR amplificati avviene in 20 μ l di TE buffer. Successivamente avviene la quantificazione degli ampliconi che deve essere molto accurata e precisa. Per questo motivo non è possibile utilizzare i comuni lettori di assorbanza, ma deve essere utilizzata una metodica contenente un fluoroforo che diviene fluorescente a seguito del legame con il

DNA a doppio filamento e non subisce l'interferenza di molecole contaminanti eventualmente residue dalla purificazione. L'emissione di fluorescenza è captata e quantificata mediante lo strumento LightCycler 480 (Roche Applied Science). Il reagente scelto è Quant-it PicoGreen Assay (Invitrogen). Parte integrante del test è la quantificazione di DNA standard in diluizioni seriali (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0.0313, 0.0156, 0 ng/ μ l) che è necessaria per la costruzione di una retta di calibrazione su cui interpolare il valore di fluorescenza emessa da ciascun campione e determinarne quindi la concentrazione. La determinazione della concentrazione in ng/ μ l di ogni amplicone però non è sufficiente, in quanto questa deve essere trasformata stechiometricamente in base alla lunghezza esatta di ogni amplicone al fine di determinare il numero di molecole/ μ l.

Ciascun amplicone è stato quindi diluito a una concentrazione di 10^9 molecole/ μ l. I 14 ampliconi relativi a ciascun campione sono stati uniti in un unico pool (definito sample pool) e poi i sample pool di gruppi di cinque campioni sono stati uniti in un pool finale. Ciascun pool finale è stato successivamente diluito fino a una concentrazione di 10^6 molecole/ μ l che rappresentava il campione da utilizzare per la successiva EmulsionPCR. I sample pool relativi ai campioni negativi sono stati inseriti all'interno di pool finali. Questo è stato necessario per verificare la mancanza di cross contaminazione delle piastre di PCR.

Emulsion PCR

L'elevata sensibilità della metodica NGS 454 si basa sull'amplificazione clonale di singole molecole di DNA adsorbite su biglie. Tale reazione avviene in micro reattori di acqua in fase oleosa e per questo motivo viene definita EmulsionPCR (EmPCR). I frammenti contenuti nel pool sono sintetizzati in modo che al 5' siano presenti la MID e un adattatore (A o B per forward e reverse rispettivamente). In una reazione di EmPCR vengono utilizzate 5×10^6 biglie in grado di adsorbire gli ampliconi con l'adattatore A e 5×10^6 in grado di adsorbire gli ampliconi con l'adattatore B. L'obiettivo è quello di caricare una singola molecola di DNA su ogni biglia, in modo che il materiale post-amplificazione su ciascuna biglia sia clonale e relativo a una singola molecola di DNA di partenza. Per ottenere questo è necessario aggiungere a ciascuna delle due reazioni A e B un quantitativo di molecole di DNA che è pari al rapporto 0.8-1 molecola di DNA/biglia. A causa di un'efficienza di purificazione non ottimale, per alcuni esperimenti ci siamo spinti ad utilizzare 3.5×10^6 molecole di DNA (pari a 0.7 molecole/biglia). Questo rapporto stechiometrico permette di ottenere biglie cariche in una percentuale variabile tra il 5 e il 20% che è ottimale per sequenziare un sufficiente numero di biglie riducendo al minimo la possibilità che su una stessa biglia sia presente più di una molecola di DNA (in questo caso le biglie sono definite mixed). Il limite inferiore della percentuale di arricchimento deriva dal fatto che l'imput richiesto per la run di sequenziamento è 0.5×10^6 biglie. La percentuale superiore è quella consigliata per ridurre al minimo la probabilità inserire nella run di sequenziamento biglie contenenti più di una molecola di DNA (che poi vengono scartate dal sistema di controllo della qualità dello strumento) e che quindi risultano nulle. La reazione è stata preparata in due provette distinte, per distinguere i reagenti relativi all'adattatore A e B rispettivamente. In entrambi i casi i componenti della miscela sono stati: DNA, acqua, additivo, primer di amplificazione A o B, PPiasi, mix di amplificazione e mix di enzimi (per questi ultimi due reagenti la ditta produttrice non specifica i componenti).

L'emPCR è stata eseguita in piastra con un programma che ricalca i cicli di una normale PCR:

94°C per 4 minuti, 50 cicli con denaturazione a 94°C per 30 sec, annealing a 58°C per 4 minuti e 30 sec ed estensione di 30 sec a 68°C, e termine con mantenimento a 10°C.

Al termine della reazione, le biglie sono state raccolte e purificate dall'olio che rappresentava il mezzo di reazione. Per i lavaggi sono stati utilizzati alcoli (isopropanolo ed etanolo) ed un buffer fornito dalla ditta produttrice del kit. Successivamente è necessario distinguere le biglie che hanno legato il DNA da quelle che non l'hanno legato. Per questo viene sfruttato un meccanismo basato sul riconoscimento biotina-streptavidina e sull'utilizzo di biglie magnetiche. In questo momento del protocollo l'acido nucleico sintetizzato si trovava in uno stato di doppio filamento. E' quindi stato necessario separare i due filamenti attraverso una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0.01N; al termine del tempo necessario alla separazione dei due filamenti è stato necessario neutralizzarla da una soluzione fornita dal kit per non danneggiare l'amplicone. Ottenuto il DNA a singolo filamento, sono stati aggiunti due "primer di arricchimento" complementari agli adattatori A e B. La caratteristica di questi primer è quella di avere un frammento biotinilato che servirà poi per il riconoscimento da parte delle biglie contenenti streptavidina. La selezione delle biglie cariche avviene infatti sfruttando il fatto che biglie magnetiche con streptavidina sono in grado di legare la biotina presente sui primer che riconoscono gli adattatori contenuti negli ampliconi legati alle biglie di emulsione. Quindi attraverso il posizionamento del campione in un campo magnetico è stato possibile separare le biglie di emulsione cariche di DNA (inferiori al 20%) da quelle scariche (maggiori dell'80%). Successivamente, sempre sfruttando l'NaOH 0.01N è stato separato il primer biotinilato dalle biglie cariche e viene così ottenuto il reale campione da utilizzare per il sequenziamento. Anche al termine di questo passaggio è stato necessario porre attenzione affinché l'NaOH venga neutralizzata e non danneggi il filamento di DNA. L'ultimo step di questa parte della metodica ha consistito nel legame dei primer di

sequenziamento. Siccome i nostri esperimenti sono disegnati in modo da sequenziare sia il filamento forward che il reverse, anche in questo caso i primer sono complementari sia all'adattatore A (presente sul filamento sense) che all'adattatore B (presente sul filamento antisense).

Compiuto l'annealing con i primer di sequenziamento è stato necessario valutare l'idoneità del numero di biglie cariche ottenute attraverso un piccolo strumento costituito da un alloggiamento per provette Eppendorf da 1.5 ml e indicante le due percentuali di riferimento (5 e 20%). Quando la percentuale di biglie cariche si attesta a livelli <5% è possibile comunque continuare l'esperimento, ma non si ha la certezza di disporre delle 500.000 biglie considerate minime per ottenere una buona resa di sequenziamento. In questo caso è consigliato quindi ri-eseguire la reazione di EmPCR aumentando il DNA di input. Quando il numero di biglie cariche supera il 20% è fortemente indicativo di eccesso di biglie mixed. Quando il numero di biglie cariche si trova correttamente tra il 5 e il 20%, il protocollo prevede di procedere al sequenziamento di un'aliquota che sia pari al 5% delle biglie totali. Secondo la nostra esperienza, la resa migliore è ottenuta utilizzando una quota di biglie cariche pari ad almeno il 10% delle biglie totali.

Sequenziamento

La metodica di sequenziamento prevede l'utilizzo di un device chiamato PicoTiterPlate (PTP) che è costituito da pozzetti all'interno dei quali vengono inserite le biglie e gli enzimi necessari. La reazione di sequenziamento avviene in modo indipendente per ogni biglia caricata e questo è reso possibile dal fatto che ciascun pozzetto della PTP ha una dimensione tale (44 μm) da contenere una sola biglia. La metodica ideata da Roche è definita Pirosequenziamento perché sfrutta la liberazione del pirofosfato inorganico a seguito dell'incorporazione di ogni nucleotide durante la sintesi del filamento. Il primer di sequenziamento è stato appaiato al template di DNA al termine dell'EmPCR e viene utilizzato come innesco per la Polimerasi.

Lo strumento libera ciascun nucleotide singolarmente, secondo una sequenza prestabilita e in flussi intervallati dall'azione dell'apirasi che degrada le basi non incorporate. Quando viene liberato il primo flusso di nucleotidi e questo è complementare alla sequenza, la polimerasi esegue il legame fosfodiesterico, libera una molecola di pirofosfato inorganico (PPi) che poi viene trasformato in ATP dalla sulforilasi. L'ATP così prodotto viene utilizzato dalla luciferasi che trasforma la luciferina in ossiluciferina e si ha produzione di luce. Il segnale luminoso è rilevato dall'apposita camera fotosensibile definita CCD. Dopo il rilevamento, viene aggiunto l'enzima apirasi per la degradazione dei dNTP che non sono stati incorporati e l'ATP prodotto dalla sulforilasi. Al termine di questa degradazione viene aggiunto un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione. Questi cicli vengono ripetuti un numero di volte proporzionale alla lunghezza dell'amplicone da studiare.

Nella pratica, è stato necessario assemblare la PTP mediante la sovrapposizione di 4 strati. Lo strato due conteneva le biglie cariche di DNA che sono state caricate insieme ad altre biglie definite packing beads. Queste ultime servono a stabilizzare le biglie cariche all'interno dei pozzetti. Gli strati uno e tre contenevano gli enzimi necessari al sequenziamento. L'unica differenza è nella concentrazione degli enzimi che sono più

concentrati nello strato tre rispetto allo strato uno. Questa diversità è legata al fatto che il flusso di nucleotidi giungerà dall'alto, lo strato tre sarà quello che ne riceverà di più e conseguentemente essendo lo strato funzionalmente più attivo richiede una maggior quota di enzimi. Infine lo strato quattro conteneva la PPI-asi che degrada il PPI in eccesso ed evita che possa espandere in pozzetti vicini contaminando i risultati.

Per quanto riguarda il protocollo di sequenziamento, nel nostro caso, è stato sufficiente selezionare la modalità "Full Processing For GType HLA" con 200 cicli di flussi di nucleotidi e lo strumento oltre a eseguire il protocollo di sequenziamento ha generato automaticamente il file da importare nei software di genotipizzazione.

Analisi dei dati

Per analizzare i dati relativi al sequenziamento ci siamo avvalsi del software JSI SeqPilot (JSI Medical Systems, GmbH). Dall'output del sequenziatore è stato utilizzato il file ".sff" che è stato direttamente caricato nel software. È stato necessario dichiarare la sequenza dei MID utilizzati ed associarli al codice alfanumerico che contraddistingue ciascun campione utilizzato. Per il confronto con i database di riferimento è stato usato l'HLA version 3.10. Il software è stato automaticamente in grado di restituire la tipizzazione HLA secondo i codici NMDP, con la miglior risoluzione possibile (due digit, quattro o oltre).

Casistica

La casistica che abbiamo selezionato per la validazione del test di multiple-genotyping era costituita da pazienti affetti da LMC-Ph⁺ o LAL-Ph⁺. La scelta di inserire solo pazienti che presentassero il cromosoma Philadelphia è stata dettata dalla necessità di ridurre la variabilità biologica delle patologie incluse, ma soprattutto dalla volontà di studiare il ruolo degli mHAgS in due malattie patogenicamente correlate, ma profondamente diverse sul piano immunogenico e nella risposta allo-immunoterapica.

Tutti i casi erano stati sottoposti ad allo-HSCT da donatore familiare o non correlato HLA full-compatibile (almeno 6/6 per i loci HLA-A, -B, -DRB1).

Per poter ottenere una casistica sufficiente, ci siamo avvalsi della collaborazione di altri Centri Ematologici Italiani, quindi i pazienti oltre ad essere stati selezionati all'interno dei Centri di Brescia e Bologna, sono stati scelti all'interno dei Centri di Udine, Bari, Palermo e Reggio Calabria.

Inizialmente la casistica era composta da 70 coppie donatore/ricevente che si sono ridotte a 46 per due motivi. Il motivo predominante (21 casi) è stata la mancanza di full-compatibilità HLA dopo l'esecuzione del sequenziamento in alta risoluzione, secondo motivo, ma non meno importante che ha portato all'uscita dalla casistica di altre tre coppie è stato il fallimento della genotipizzazione degli mHAgS.

La Tabella 5 riporta le caratteristiche cliniche dei 46 pazienti per i quali abbiamo potuto studiare il ruolo delle differenze a livello degli mHAgS.

Tabella 5: Caratteristiche cliniche dei pazienti

	Totale
N° totale, n (%)	46
Sesso, n (%)	
Maschi	27 (59)
Femmine	19 (41)
Età dei pazienti, mediana (range)	36.5 (17-67)
Diagnosi	
LMC	29 (63)
LAL-Ph ⁺	17 (37)
Rischio Sokal per LMC, n (%)	
Basso	11 (38)
Intermedio	3 (10)
Alto	7 (24)
Non noto	8 (28)
Trascritto di fusione (LMC), n (%)	
b3a2	18 (62)
b2a2	8 (28)
ND	3 (10)
Trascritto di fusione (LAL-Ph⁺), n (%)	
e1a2	7 (41)
e1a3	1 (6)
b2a2/e1a2	1 (6)
b2a2	3 (17)
b3a2	1 (6)
ND	4 (24)
Fase di malattia (LMC), n (%)	
Remissione completa	1 (3)
Fase cronica	17 (59)
Fase accelerata	8 (28)
ND	3 (10)
Fase di malattia (LAL-Ph⁺), n (%)	
Remissione parziale	2 (12)
Remissione completa	11 (65)
Recidiva/malattia resistente	3 (18)
ND	1 (5)
Compatibilità HLA, n (%)	
6/6	9 (20)
8/8	17 (37)
10/10	20 (43)
Donatore, n (%)	
Familiare	29 (63)
MUD	17 (37)
Sesso donatore, n (%)	
Maschio	26 (57)
Femmina	16 (35)
Non noto	4 (8)

Segue a pag. 50

Segue da pag. 49

Sesso di paziente/donatore, n (%)	
F/F	7 (15)
F/M	11 (24)
M/M	15 (33)
M/F	9 (19)
ND	4 (9)
Sorgente di CSE, n (%)	
BM	19 (41)
PB	24 (52)
ND	3 (7)
Regime di condizionamento, n (%)	
Convenzionale	27 (59)
Intensificato	16 (35)
Ridotto	3 (6)
CD34+ 5x10⁶/Kg	5 (2.2-23.9)
CD3+ 13.5x10⁶/Kg	13.6 (4.7-88.0)
Tempo per PLT>20000/mm³, giorni, mediana (range)	21 (14-50)
Tempo per PMN>500/mm³, giorni, mediana (range)	19 (10-33)
Profilassi GvHD, n (%)	
MTX+CyA	44 (96)
CyA+MMF	1 (2)
CyA	1 (2)
GvHD acuta, totale, n (%)	31 (67.4)
Grado I	8 (26)
Grado II	13 (42)
Grado III	9 (29)
Grado IV	1 (3)
GvHD acuta grado ≥2, n (%)	23 (50)
Localizzazione GvHD acuta, n (%)	
Cute	22
Intestino	18
Fegato	16
GvHD cronica, n (%)	23 (53.5)
Lieve	7 (30)
Moderata	8 (35)
Severa	8 (35)
Durata follow up (mesi), mediana (range)	48 (0-263)

In particolare, essendo stato molto ampio il range temporale preso in considerazione, appare molto lungo il tempo mediano di follow up pari a 48 mesi (0-263). L'età mediana dei pazienti è stata di 36.5 anni (17-67) e la distribuzione per sesso è stata di 27 (59%) maschi e 19 (41%) femmine. Per quanto riguarda i pazienti affetti da LMC, al momento del trapianto la

malattia era in fase cronica nel 72.5%, in fase accelerata nel 24% e in crisi blastica in un solo caso (3.5%).

I trascritti di fusione derivanti dal riarrangiamento bcr-abl prevalentemente riscontrati sono stati b3a2 (nel 62% dei casi) per LMC ed e1a2 (nel 41%) dei casi di LAL-Ph⁺.

La tipologia di donatore prevalente è stata familiare (63% Familiare e 37% MUD), la sorgente di CSE con lieve prevalenza è stata il sangue periferico (52%). Il trapianto è stato condotto somministrando una dose mediana di 5×10^6 /kg di CD34⁺ e 13.6×10^6 /kg di CD3⁺. Nonostante il range temporale sia stato così ampio, le procedure trapiantologiche a cui sono stati sottoposti i pazienti sono state piuttosto omogenee. Il regime di condizionamento prevalente è stato il convenzionale e la profilassi della GvHD è stata eseguita per la quasi totalità dei pazienti (96%) con methotrexate e ciclosporina A.

La diagnosi e la valutazione del grado di severità della GvHD acuta e cronica sono state eseguite basandosi prevalentemente sulla sintomatologia clinica secondo le scale di valutazione pubblicate in letteratura [65-66]. In rari casi, tempisticamente più recenti, i dati clinici sono stati confermati da dati strumentali (prove di funzionalità respiratoria) o istopatologici (biopsie cutanee o gastro-intestinali). La terapia nel caso di GvHDa di grado ≥ 2 è stata eseguita prevalentemente con steroidi o con altri immunosoppressori (tacrolimus o micofenolato mofetile). In soli due casi si è verificata GvHDa intestinale che ha portato all'instaurazione di un regime di nutrizione parenterale totale. Tre pazienti hanno inoltre eseguito fotoafesi extracorporea. Per quanto riguarda la GvHDc la terapia è stata molto variabile e sono state utilizzate diverse combinazioni comprendenti steroide, ciclosporina, mofetil-micofenolato, fotoafesi extracorporea, rituximab, endoxan e azatioprina secondo le esigenze cliniche.

La remissione o l'eventuale recidiva di malattia sono state valutate attraverso citogenetica e analisi molecolare quantitativa del trascritto bcr-abl. Durante l'osservazione sono ricaduti 2 pazienti affetti da LMC (7%) e 13 pazienti affetti da LAL-Ph⁺ (76%).

Preparazione degli acidi nucleici per la genotipizzazione

Il materiale biologico dei donatori era stato raccolto durante le procedure di valutazione dell'idoneità alla donazione, durante la donazione stessa o era costituito da un campione di accompagnamento alla sacca utilizzata per il trapianto. Solo nel caso di campioni raccolti al momento della valutazione dell'idoneità alla donazione o durante la raccolta da sangue midollare, le cellule mononucleate sono state selezionate mediante stratificazione su gradiente di densità (Ficoll Plaque- GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ).

Per i pazienti, è stato utilizzato il campione tempisticamente più vicino al momento pre-trapianto e con il miglior grado di remissione di malattia.

Ove possibile, è stato preferito il campione derivante da sangue midollare rispetto a quello da sangue periferico esclusivamente per ragioni legate a una maggiore cellularità e quindi alla probabile presenza di acido nucleico quali/quantitativamente migliore.

Dopo l'ottenimento delle cellule mononucleate, tutte le cellule sono state lisate mediante buffer RLT con aggiunta di guanidinio isotiocinato. Il DNA è stato quindi estratto con metodica manuale e colonnine Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) secondo il protocollo indicato dalla ditta produttrice. Il protocollo è basato sull'utilizzo di colonnine contenenti una membrana costituita principalmente di silice che è in grado di legare il DNA. Il primo step dell'estrazione è stata la lisi meccanica del campione e aggiunta di Proteinasi K. Poi, attraverso il passaggio sulla colonnina, il DNA si è legato alla resina ed è stata possibile l'eliminazione di tutti gli elementi di scarto. Successivi lavaggi, con buffer appositi e applicazione di una forza centrifuga, hanno avuto lo scopo di togliere tutte le molecole contaminanti o che potrebbero agire da inibitori enzimatici per le reazioni che dovranno essere eseguite sul DNA estratto. Infine, il DNA è stato eluito in buffer apposito e valutato quali/quantitativamente. Lo strumento utilizzato è stato il Nanodrop (Nanodrop, Wilmington, Delaware, USA). La lettura dell'assorbanza a 260 nm è stata utilizzata determinare concentrazione in ng/ μ l del campione. Il rapporto tra la lettura a 260 e le letture a 280 e

230 nm ha permesso di definire la purezza del campione in esame rispetto alle proteine e ai sali rispettivamente. Per valutare l'integrità dei campioni risultati quali/quantitativamente scarsi è stata utilizzata tecnica elettroforetica su gel d'agarosio all'1% con etidio bromuro con corsa a 180V per almeno 30 minuti. Tutti i campioni così rivalutati hanno confermato una scarsa concentrazione, ma assoluta integrità dell'acido nucleico.

Per alcuni campioni il quantitativo di DNA risultava molto scarso; al fine di preservare materiale utile per la validazione o la ripetizione di alcuni test, è stata eseguita una reazione di amplificazione con metodica GenomiPhi V4 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

Analisi statistica

Il test t di Student è stato utilizzato per verificare l'uguaglianza tra due medie. Il test Chi-quadro è stato utilizzato per confrontare i gli eventi attesi con i teorici.

Mediante Cox regression è stato valutato il ruolo delle diverse variabili nel determinare gli eventi considerati (analisi uni e multivariata).

Per l'analisi di sopravvivenza è stato utilizzato il metodo di Kaplan-Maier.

RISULTATI

Efficienza di genotipizzazione degli mHAgS

L'applicazione della tecnica iPlex Gold Mass Array Sequenom® in una casistica di pazienti è stata necessaria per definire la fattibilità ed efficienza del metodo di indagine che proponiamo. Per questo motivo sono state genotipizzate tutte le 70 coppie paziente/donatore originariamente inclusi nello studio indipendentemente dalle informazioni relative alla compatibilità HLA (Tab.6). Il successivo studio volto a determinare il ruolo degli mHAgS nell'outcome dei pazienti è stato invece condotto solo sulle coppie HLA identiche almeno 6/6.

Mediante il protocollo che abbiamo messo a punto, è stato quindi possibile analizzare 23 mHAgS per 140 campioni (70 coppie donatore/ricevente). Lo SNP rs2289702 è stato conteggiato una sola volta perché dà origine a due diversi mHAgS in base alle molecole HLA da cui è presentato, mentre sono stati conteggiati due SNP per CD31 in quanto può originare da due diversi polimorfismi. Su un totale di 3220 chiamate, sono stati genotipizzati correttamente 3176 SNPs. L'efficienza di genotipizzazione è quindi stata del 98.6% con un fallimento di 44 SNPs pari all'1.4% (Tab. 6).

In tre casi (2 pazienti e 1 donatore) è fallita la genotipizzazione dei 14 SNP appartenenti alla multiplex uno (Tab. 3) e conseguentemente le relative coppie donatore/ricevente sono state escluse dall'analisi finale. In altri due campioni (1 donatore e 1 paziente) è fallita la multiplex tre; seppur mancando questo dato (relativo a un solo mHAg), le relative coppie sono state mantenute per l'analisi finale.

La multiplex due (Tab. 3) è risultata la più efficiente, permettendo la genotipizzazione di tutti gli 8 SNP contenuti (8 SNP x 140 campioni=1120). La multiplex tre (Tab. 3) è stata eseguita per un solo SNP ed è stata efficace nel 98.6% dei casi (fallendo 2 genotipizzazioni su 140 totali). La multiplex

uno è stata la meno efficace, raggiungendo comunque il 96.25% di efficienza (fallite 42 su 1120 genotipizzazioni).

LRH è stato analizzato mediante sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR ed ha avuto un'efficienza del 99.3% in quanto è stato impossibile amplificare e quindi sequenziare il DNA relativo a un paziente (quantitativamente scarso e di pessima qualità) (Tab. 6).

Anche per LB-MR1-1R è stata disegnata una metodica basata sul sequenziamento convenzionale dei prodotti di PCR ed ha avuto un'efficienza del 98.6%. In aggiunta allo stesso campione per cui era stato impossibile genotipizzare LB-MR1-1R, sono sopraggiunti problemi relativi a un campione che seppur qualitativamente molto buono era in quantità talmente ridotte da non permettere l'esecuzione di tutti i test che erano necessari. Per entrambi questi mHAgS in molti casi è stato necessario ripetere più volte la metodica, eventualmente ripartendo da step intermedi, prima di ottenere un risultato qualitativamente soddisfacente (Tab. 6).

Le reazioni necessarie per valutare l'integrità del gene UGT2B17 si sono dimostrate molto efficaci (permettendo di amplificare anche i campioni falliti con le altre due metodiche) e quindi questo saggio ha avuto efficienza del 100%. Tale metodica, come previsto, si è dimostrata più agevole, di rapida esecuzione e scevra da tutte le possibili cause di fallimento di una metodica legata al sequenziamento capillare. Per UGT2B17 infatti il risultato è ottenuto con la semplice visualizzazione del prodotto di PCR mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio, mentre le altre due metodiche necessitano di ulteriori step propedeutici prima di poter visualizzare il cromatogramma. Le fasi intermedie (purificazione della PCR, reazione di sequenza, purificazione della reazione di sequenza, preparazione della piastra e sequenziamento capillare) tra la PCR e la visualizzazione della sequenza sono cruciali per l'ottenimento di purificati quantitativamente abbondanti e liberi da contaminanti e conseguentemente sequenze qualitativamente buone. Qualunque fattore possa intervenire in una delle fasi della metodica compromette il risultato finale e obbliga alla ripetizione

del test con il rischio di esaurire il materiale biologico a disposizione, senza possibilità di portare a termine l'analisi.

Complessivamente quindi l'efficienza di genotipizzazione è stata del 98.6%.

Al fine di valutare la distribuzione dei diversi alleli nella popolazione in analisi è stato calcolato l'Equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) e controllata la significatività statistica con test χ^2 (Tab. 6). Non sono presenti significative differenze nella distribuzione di frequenza dei genotipi tra donatori e riceventi ad eccezione di LB-LY75-1K e DRN7 in cui le frequenze osservate si discostano dalle attese per il gruppo dei pazienti e donatori rispettivamente (per DRN7 questo dato è già stato riportato in letteratura). Non è stato possibile definire se LB-LY75-1K sia in linkage disequilibrium con altri geni che ne determinino quindi l'uscita dall'HWE.

		Allele maggiore A	Allele minore a	Test di Fisher	<i>Pazienti e donatori</i>					<i>Pazienti</i>					<i>Donatori</i>				
					Falliti %	HWE	AA, %	Aa, %	aa, %	Falliti %	HWE	AA, %	Aa, %	aa, %	Falliti %	HWE	AA, %	Aa, %	aa, %
ACC-1	rs1138357	G	A	0,612	1,2	0,17	62,3	30,9	6,8	1,2	0,514	61,7	32,1	6,2	1,2	0,195	63	29,6	7,4
ACC-2	rs3826007	G	A	0,438	1,2	0,26	63	30,9	6,1	1,2	0,77	63	32,1	5	1,2	0,198	63	29,6	7,4
ACC-4/5	rs2289702	C	T	0,568	0	0,249	78,7	21,3	0	0	0,265	78	22	0	0	0,296	79,3	20,7	0
ACC-6	rs9945924	G	A	0,79	1,2	0,323	54,3	40,7	5	1,2	0,633	55,6	38,3	6,1	1,2	0,198	53,1	43,2	3,7
C19orf48	rs3745526	A	T	0,796	1,2	0,26	63	30,9	6,1	1,2	0,199	66,7	27,1	6,2	1,2	0,737	59,3	34,6	6,1
CD31	rs668	C	G	0,43	0	0,622	26,2	51,8	22	0	0,757	29,3	51,2	19,5	0	0,658	23,2	52,4	24,4
	rs12953	G	A	0,391	1,2	0,311	31,5	45,7	22,8	1,2	0,743	27,2	48,1	24,7	1,2	0,295	35,8	43,2	21
CTL7A7	rs5758511	G	A	0,474	0	0,572	51,8	39	9,2	0	0,843	48,8	41,5	9,7	0	0,537	54,8	36,6	8,6
DPH1	rs35394823	G	C	0,185	0	0,303	85,4	14,6	0	0	0,6	89	11	0	0	0,365	81,7	18,3	0
DRN7	rs1365776	A	G	1	1,2	0,046	40,1	51,8	8,1	1,2	0,503	42	48,1	9,9	1,2	0,03	38,3	55,6	6,1
HA-1	rs1801284	G	A	0,639	1,2	0,453	35,2	50,6	14,2	1,2	0,512	33,3	51,8	14,9	1,2	0,353	37	49,4	13,6
HA-2	rs61739531	C	T	0,167	1,2	0,587	66	29,6	4,4	1,2	0,318	64,2	28,3	7,5	1,2	0,318	67,9	30,9	1,2
HA-3	rs7162168	C	T	0,424	0	0,285	50	38,4	11,6	0	0,222	53,7	35,4	10,9	0	0,579	46,3	41,5	12,2
HA-8	rs2173904	G	C	0,423	1,2	0,659	43,2	43,8	13	1,2	0,503	46,9	40,7	12,4	1,2	0,956	39,5	46,9	13,6
HB-1/HY	rs161557	C	T	0,45	0	0,885	70,1	27,4	2,4	0	0,73	68,3	28	3,7	0	0,511	72	26,8	1,2
HEATR-1	rs2275687	C	T	0,206	0	0,92	39,6	47	13,4	0	0,963	42,7	45,1	12,2	0	0,82	36,6	48,8	14,6
LB-ADIR1	rs2296377	G	A	0,043	1,2	0,705	52,5	40,7	6,8	1,2	0,996	60,5	34,5	5	1,2	0,493	44,4	46,9	8,7
LB-ECGF-1H	rs112723255	C	T	0,346	1,2	0,43	89,5	9,9	0,6	1,2	0,37	86,4	12,4	1,2	1,2	0,73	92,6	7,4	0
LB-LY751K	rs12692566	A	C	0,004	1,2	0,279	64,8	29,6	5,6	1,2	0,044	61,7	28,4	9,9	1,2	0,326	67,9	30,9	1,2
LB-MTHFD1	rs2236225	C	T	0,316	1,2	0,78	34,6	47,5	17,9	1,2	0,176	34,6	42	23,4	1,2	0,296	34,6	53,1	12,3
P2RX7	rs7958311	G	A	0,709	1,2	0,313	58,6	34	7,4	1,2	0,853	58	35,8	6,2	1,2	0,218	59,3	32,1	8,6
LRH	rs5818907	del	G	0,228	3,7	0,681	39,2	45,6	15,2	7,3	0,976	34,2	48,7	17,1	0	0,4125	43,9	42,7	13,4
MR1	rs2236410	T	C	0,696	3,1	0,048	73	27	0	4,9	0,193	74,4	2,6	0	1,2	0,137	71,6	28,4	0
LB-PDK2B	rs751019	C	A	0,356	0	0,312	26,8	53,7	19,5	0	0,449	28	53,7	18,3	0	0,494	25,6	53,7	20,7
UGT2B17	na	+	del	0,804	1,2	na	na	na	na	2,4	na	na	na	na	0	na	na	na	na
UTA2-1	rs2166807	G	A	0,53	1,2	0,118	66,7	32,1	1,2	1,2	0,318	67,9	30,9	1,2	1,2	0,228	65,4	33,3	1,2

Tabella 6: Efficienza e distribuzione dei genotipi, L'allele minore è definito come l'allele con la frequenza inferiore, al contrario, l'allele maggiore è definito come l'allele con la frequenza maggiore. HWE: equilibrio di Hardy-Weinberg

Efficienza di tipizzazione HLA mediante NGS- GS GType HLA[®] Roche Diagnostics

Attraverso la metodica di NGS sopra descritta sono stati analizzati 30 campioni suddivisi in 6 run di sequenziamento le cui caratteristiche salienti sono riassunte in Tabella 7.

ID run	N° Raw Wells	% dot + mixed	% short	N° passed filters
1	189062	19,21	46,2	62132
2	269155	16,93	49,65	87503
3	259075	13,64	41,86	111032
4	262654	16,45	47,09	92318
5	260813	10,51	44,99	121825
6	251196	14,57	51,57	82853
Totale, mediana (range)	259944 (189062-269155)	15.51 (10.51-19.21)	46.6 (41.86-51.57)	89911 (62132-121825)

Tabella 7: Caratteristiche tecniche di performance del sequenziatore NGS Roche Junior applicato alla tipizzazione HLA

Le reazioni di PCR sono state efficienti per tutti gli ampliconi. Le reazioni di EmPCR sono state eseguite mantenendo come riferimento un numero di molecole/biglia pari a 0.8. Con questo parametro la percentuale di arricchimento è stata sempre inferiore al 20% e la scelta è stata confermata dal ridotto numero di pozzetti con sequenze mixed (mediana 15.51, range 10.51-19.21). Siccome tali sequenze derivano da biglie che hanno legato più di una molecola di DNA, sono un parametro adatto per capire la correttezza della quantità di pooling utilizzato per l'esperimento.

Il numero mediano di pozzetti della PTP caricati correttamente è stato 259944 (range 189062-269155) e la mediana delle reads valide è stata di 89911 (range 62132-121825). Il fattore che maggiormente ha determinato la resa degli esperimenti è stata la percentuale di frammenti corti (mediana 46.66%, range 41.86%-51.57%) che si attesta su valori considerevoli a causa

della presenza di imperfezioni nel protocollo di PCR e dell'incapacità della singola purificazione di eliminare completamente i dimeri di primer e le catene brevi.

L'analisi informatica ha poi permesso di allineare le sequenze ottenute a quelle di riferimento e attribuire la corretta nomenclatura HLA. E' stato possibile attribuire il genotipo in modo non ambiguo al 73% degli alleli dei loci A e C, al 67 e 60% dei loci DQA1 e DPB1 rispettivamente. Per i restanti loci (B, DRB e DQB1) sono state riscontrate ambiguità in tutti i casi analizzati e questo è causato dal fatto che i primer dell'amplificazione coprono 5 paia di basi al 5' di ciascun amplicone impedendone la corretta lettura e di conseguenza l'assegnazione di una corretta nomenclatura.

Selezione delle coppie secondo la compatibilità HLA

Le tipizzazioni HLA in alta risoluzione dei loci *A, *B e *DRB1 ottenute per tutte le coppie donatore/ricevente ha portato all'eliminazione dall'analisi di 21 coppie che mostravano un mismatch allelico o antigenico.

I mismatch riscontrati erano così suddivisi:

- locus A, quattro coppie hanno mostrato un mismatch allelico e due antigenico;
- locus B, cinque coppie hanno mostrato un mismatch allelico e tre antigenico;
- locus DRB1, due coppie hanno mostrato un mismatch allelico e cinque antigenico.

Queste coppie escluse erano equamente distribuite tra familiari (10 coppie) e non correlati (11 coppie).

In particolare, 4 pazienti erano stati trapiantati con valutazione della compatibilità basata sulla coltura mista linfocitaria e la tipizzazione molecolare in alta risoluzione eseguita con NGS ha evidenziato che tre di questi pazienti differiscono dai loro donatori con mismatch antigenici a livello dei loci A e DRB1 (una coppia per mismatch in *A e due coppie in *DRB1).

Le 46 coppie rimaste avevano una buona compatibilità in alta risoluzione:

10/10 (A, B, C, DRB1, DQB1) nel 43% dei casi,

8/8 (A, B, C, DRB1) nell'37% e

6/6 (A, B, DRB1) nel 20% dei casi (Tab.5).

Analisi della compatibilità HLA-DPB1

Per tutte le 46 coppie compatibili è stata eseguita la tipizzazione del locus DPB1 con i metodi precedentemente descritti. Nel setting familiare 19 coppie sono risultate identiche, 8 portatrici di un mismatch permissivo e nessuna ha mostrato mismatch non permissivo (per 2 coppie non è stato possibile ottenere la tipizzazione). Il setting dei trapianti da donatore non correlato mostra un trend di compatibilità opposto (Fig. 6): 2 coppie sono risultate identiche, 6 e 7 con mismatch permissivo e non rispettivamente (anche in questo caso per 2 coppie non è stato possibile ottenere la tipizzazione). I nostri dati mostrano HLA-DPB1 identità significativamente maggiore nel setting familiare (65.5%) rispetto al setting MUD (11.8%, Chi-Square test, $p=0.0004$). Parallelamente l'HLA*DPB1 diversità non permissiva è significativamente (Chi-Square test, $p=0.0002$) maggiore nelle coppie MUD (42.2%) rispetto alle familiari (0%).

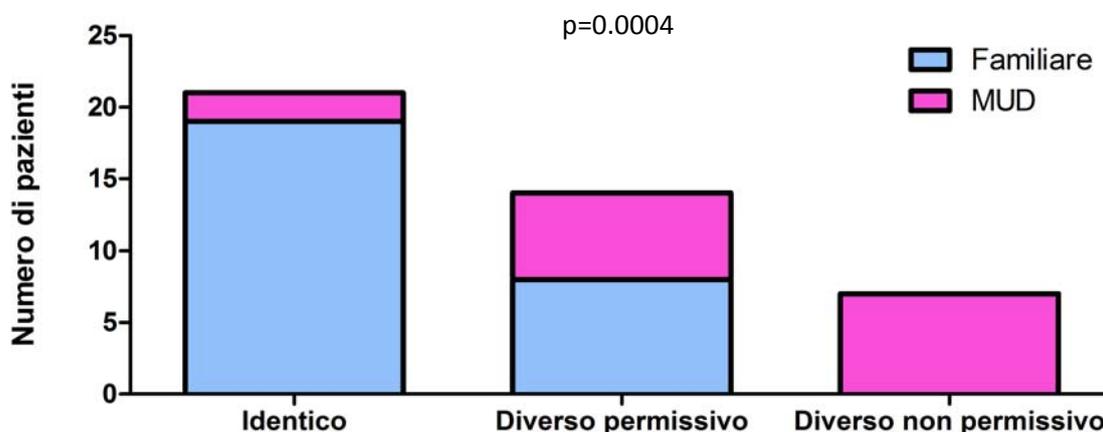


Figura 6: Analisi della compatibilità DPB1 rispetto alla tipologia di donatore (familiare vs MUD)

Analisi del numero di differenze a livello degli mHAgs

La valutazione delle differenze a livello degli mHAgs è stata eseguita considerando i tre parametri utilizzati per la definizione dell'immunogenicità degli mHAgs: differenze genomiche, differenze genomiche che determinano una modifica fenotipica (proteina espressa o meno, oppure cambiamenti strutturali della proteina) e differenze fenotipiche HLA ristrette (Tab. 8). Abbiamo inoltre considerato il verso del mismatch: GvH (il sistema immunitario del donatore può riconoscere come non self cellule del ricevente) che impatta prevalentemente su GvHD e GvL oppure il verso opposto HvG (il sistema immunitario del ricevente può riconoscere come non self cellule del donatore) che impatta prevalentemente sull'attecchimento.

Tutti gli mHAgs sono risultati con un mismatch in almeno una coppia (mediana del numero di coppie per mHAgs 18, range 8-25).

23 mHAgs sono risultati immunogeni in almeno una coppia (mediana del numero di coppie per mHAgs 3, range 1-8) e questo dato è stato molto influenzato dalla frequenza, nella popolazione caucasica, degli alleli HLA in grado di presentare ciascun antigene minore. Ad esempio, se per ACC-4 venisse confermata la sola HLA restrizione per l'allele A*33:03, nella nostra casistica non risulterebbe mai immunogeno perché nessuno presenta quella molecola HLA (che peraltro è rarissima nella popolazione caucasica di cui la nostra casistica è interamente composta).

La prima valutazione eseguita è stata relativa al numero di differenze genomiche tra donatore e ricevente. 30 coppie mostravano almeno un mismatch genomico tra donatore e ricevente sugli mHAgs (16 pazienti erano completamente identici al loro donatore). Il gruppo dei familiari ha mostrato un numero di differenze mediano di 8 (0-15), mentre quello dei MUD di 13 (11-17) e questa differenza è statisticamente significativa (t-test, $p < 0.0001$). In seguito è stata valutata la percentuale di differenze genomiche che producevano differenze fenotipiche a livello del repertorio antigenico presente sulle cellule. Il numero mediano di differenze potenzialmente immunogene a livello degli mHAgs in direzione GvH è stato di 1 (range 0-3) e il numero

mediano in direzione HvG è stato di 0 (range 0-5). Anche in questo caso il gruppo MUD ha mostrato un numero significativamente maggiore rispetto ai familiari (mediana 10 rispetto a 5 con significatività statistica al t-test, $p < 0.0001$). Infine è stato valutato il numero di numero di mHAg che fisiologicamente sono in grado di portare allo sviluppo di una risposta immunitaria specifica (per differenza a livello proteico tra donatore e ricevente e appropriata HLA restrizione) ed anche in questo caso prevale il numero di mismatch a carico delle coppie con donatore non correlato (mediana 3 rispetto a 1 con significatività statistica al t-test, $p < 0.003$).

In figura 7 è rappresentato il grado di diversità tra donatori e riceventi nei diversi setting, ed è evidente come solo una piccola percentuale di tali differenze sia potenzialmente in grado di indurre lo sviluppo di CTLs specifici.

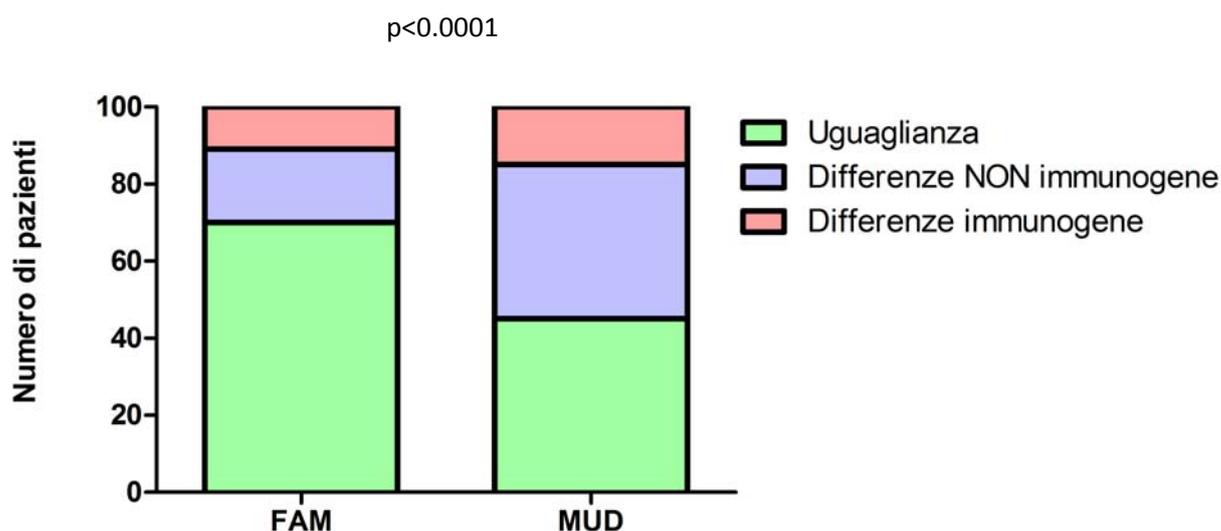


Figura 7: comparazione della compatibilità a livello degli mHAg secondo la tipologia di donatore

Correlazione tra caratteristiche cliniche ed ematologiche e GvHD/GvL

L'esito della procedura trapiantologica è primariamente determinato dalle caratteristiche relative alla malattia di base e al trapianto stesso. Nel nostro lavoro è stato quindi essenziale valutare anche il ruolo di questi parametri nel determinare l'outcome dei pazienti. Gli eventi considerati sono stati, l'insorgenza di GvHDA, GvHDC, la recidiva e la RFS (All. 1).

I pazienti che hanno sviluppato GvHDA di qualunque grado sono stati 31 (67.4%), mentre quelli che l'hanno sviluppata di grado ≥ 2 sono stati 23 (50%). La localizzazione è apparsa così distribuita: cute in 22 casi, tratto gastro-intestinale in 18 casi e fegato in 16 casi. La figura 8 rappresenta l'incidenza cumulativa. Sia in analisi uni che multivariata, nessun fattore clinico ha mostrato un ruolo nel determinare l'insorgenza di GvHDA se considerati tutti i gradi; solo l'utilizzo di CSE da sangue periferico ha mostrato un trend alla significatività nel determinare GvHDA clinicamente significativa (HR 2.4, $p=0.06$).

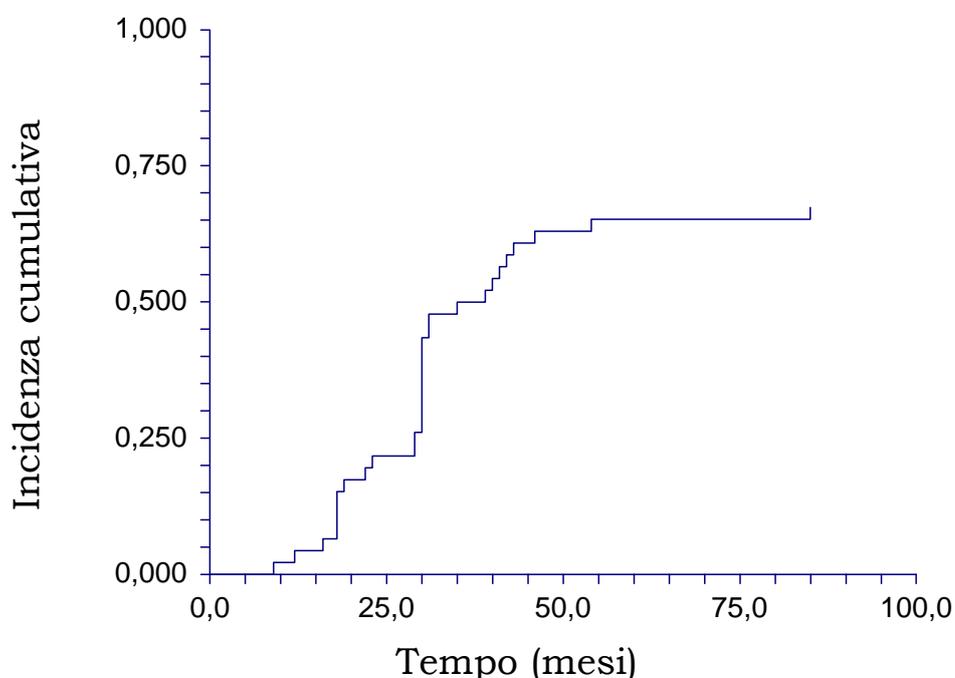


Figura 8: Incidenza cumulativa di GvHDA di qualunque grado

L'incidenza cumulativa di GvHDc è stata 53.6% (SCI 40.71, Fig. 9); la suddivisione secondo la stadi azione è stata: 7 pazienti con GvHDc lieve, 8 con moderata e 8 con GvHDc severa.

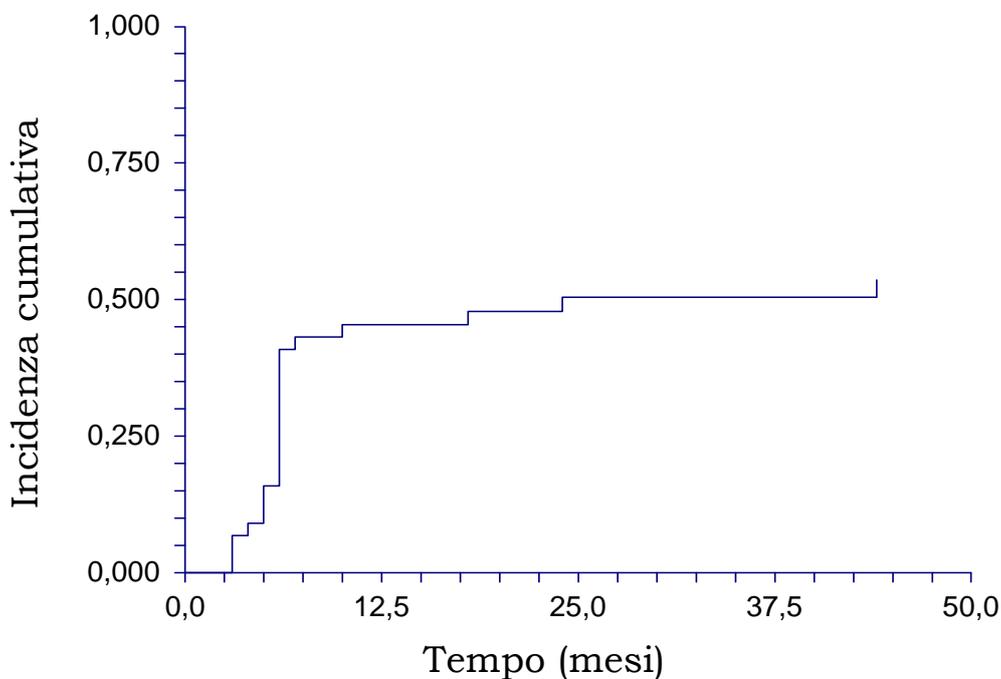


Figura 9: Incidenza cumulativa di GvHDc

Il rischio di sviluppare GvHDc, in analisi univariata, è risultato essere influenzato dall'aver avuto GvHDA di grado ≥ 2 (HR 2.7, $p=0.03$) o essere stati sottoposti a trapianto con cellule staminali prelevate da sangue periferico (HR 2.2, $p=0.09$).

Inoltre la GvHDc è apparsa determinata da due fattori legati alla patologia: l'essere stati sottoposti ad allo-HSCT per LMC aumenta il rischio (HR 2.5, $p=0.08$), mentre essere portatori del trascritto di fusione e1a2 lo riduce (HR 0.2, $p=0.07$). In analisi multivariata, queste evidenze però non sono mantenute.

Per quanto riguarda l'outcome relativo alla malattia, l'incidenza cumulativa di recidiva è stata del 39.8% (CI 27.3-57.9, Fig. 10a) e la RFS a 5 anni è stata del 56.5% (41.6-71.4, Fig. 10b).

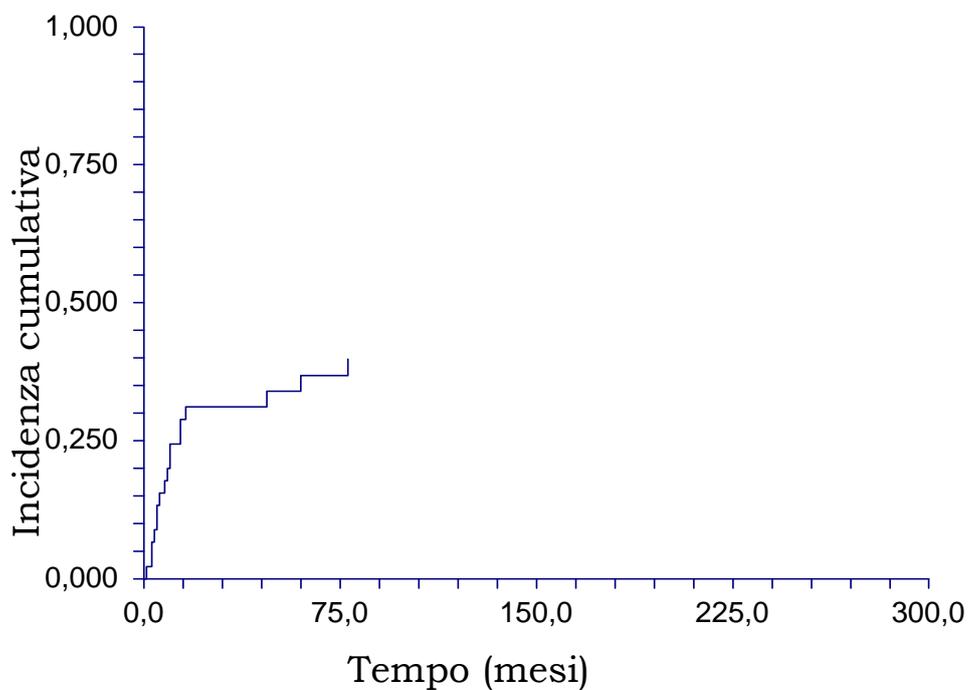


Figura 10a: Incidenza cumulativa di recidiva

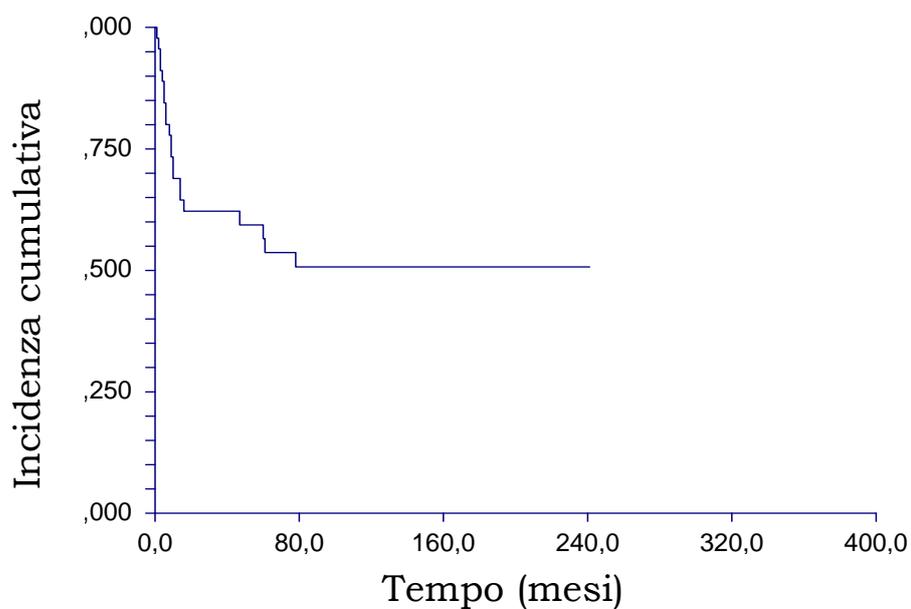


Figura 10b: RFS

Analizzando l'incidenza di recidiva e la RFS, sono risultate ancora molto importanti le variabili legate alla patologia: essere affetti da LMC (HR 0.2, $p=0.0007$), in particolare con trascritto b3a2 (HR 0.2, $p=0.01$), è protettivo conferendo un minor rischio di recidiva e prolungando la RFS (Fig. 11 e 12). Il ruolo protettivo della presenza del trascritto di fusione b3a2 si è mantenuto anche in analisi multivariata (HR 0.2, $p=0.01$) Per quanto riguarda i fattori legati al trapianto la presenza clinica di GvHDc è risultata essere un fattore protettivo nei confronti della recidiva (HR 0.3, $p=0.02$), mentre appare negativo l'impatto sulla RFS (HR 3.7, $p=0.04$).

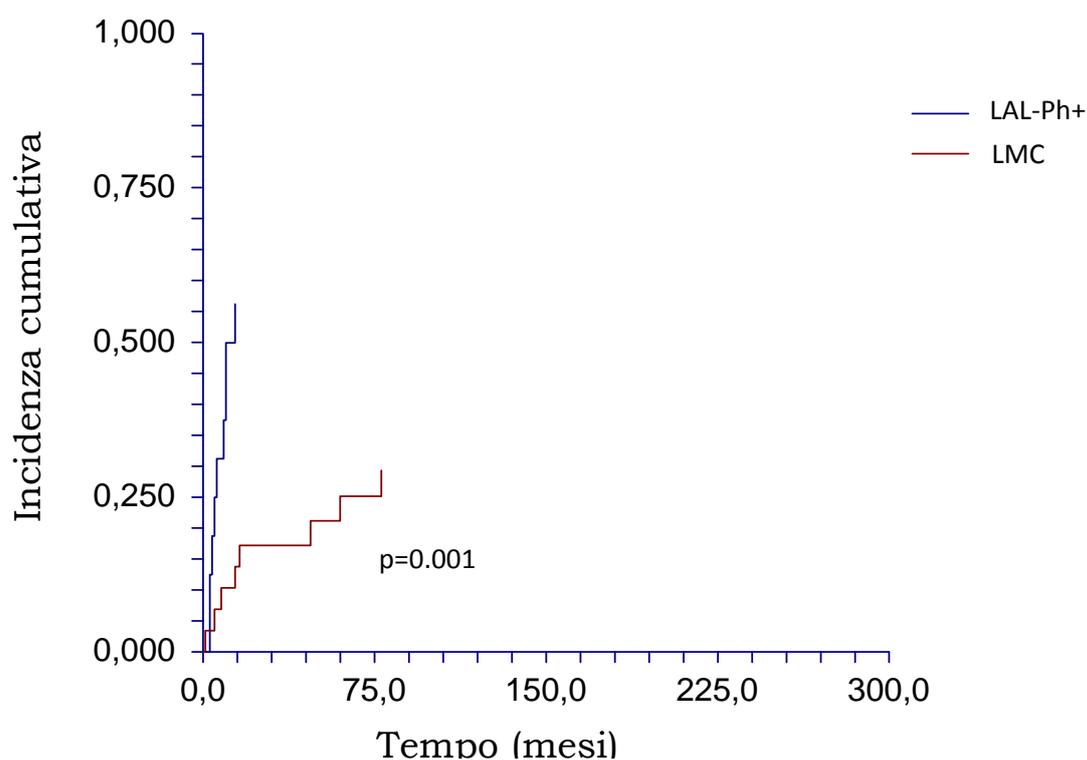


Figura 11: Incidenza cumulativa di recidiva secondo la diagnosi

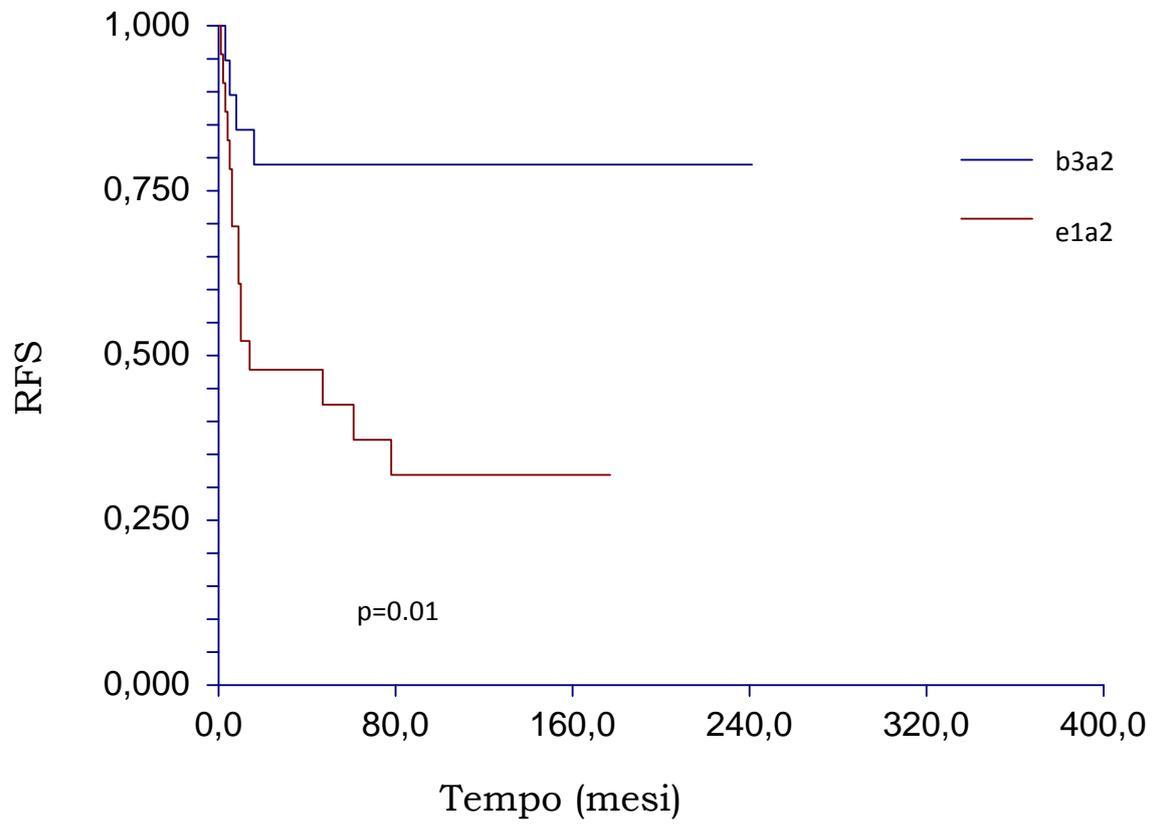


Figura 12: RFS dei pazienti con trascritto b3a2 e e1a2

Correlazione tra mismatch a livello degli mHAg e GvHD/GvL

Per evidenziare il ruolo degli mHAg, come per l'analisi dei fattori clinici, abbiamo utilizzato gli eventi GvHDa, GvHDc, recidiva e la sopravvivenza libera da ricaduta come parametri per valutare l'outcome dei pazienti. L'analisi statistica eseguita mediante Cox Regression è dettagliata in Allegato 2. Considerando che gli mHAg vengono convenzionalmente identificati mediante tecniche di biologia inversa (selezionando i CTLs dei donatori presenti nei pazienti e valutando verso quali peptidi sono rivolti) o secondo predizioni di immunogenicità basata sullo studio allosterico delle proteine, non è stata esclusa la possibilità che ciascun mHAg possa essere presentato anche da altri alleli HLA e che le differenze al livello genomico inducano modificazioni fenotipiche (soprattutto quantitative) non ancora descritte. Per questo motivo, nell'analisi statistica non abbiamo considerato solo i mismatch immunogeni, ma anche i mismatch genomici puri. Anche per queste analisi è stato considerato il verso del mismatch (GvH o HvG) La Tabella 8 riporta il numero di coppie relative a ciascuna categoria per ogni mHAg.

Il numero di mismatch immunogeni (0 vs ≥ 1) come pure il numero di mismatch genomici (sia in numero totale che clusterizzati <7, 7-11, 11-13, >13) non sono risultati significativamente associati a nessuno degli eventi considerati.

mHAgs	Mismatch genomici	Mismatch fenotipici		HLA restrizione potenziale	Mismatch immunogeni	
		GvH	HvG		GvH	HvG
HA-3	21	6	9	9	0	0
CD31	19	4	5	21	3	3
CD31 BIS	22	9	6	21	3	3
UTA2-1	14	5	8	21	2	3
HA-8	22	8	12	17	1	7
LB-ADIR-1	23	8	10	18	3	4
C19orf48	20	1	2	18	0	1
HA-2	18	0	3	18	0	2
CTL7A7	24	4	3	9	0	0
DRN-7	15	1	4	9	0	1
ACC-1	19	7	9	14	5	3
HA-1	21	10	7	18	1	3
ACC-4	11	7	4	0	0	0
ACC-5	11	7	4	6	0	2
UGT2B17	8	5	2	7	1	0
HB-1	13	7	6	6	1	2
ACC-2	19	7	10	7	1	2
ACC-6	18	7	9	7	2	0
LB-ECGF-1H	8	5	3	6	1	1
LRH	17	10	4	6	3	0
HEATR-1	19	8	2	3	0	0
DPH1	14	4	9	1	0	1
P2RX7	17	8	7	6	1	3
LB-LY75	17	1	6	7	0	1
LB-MTHFD1	23	6	9	6	2	1
LB-PTK2B	25	5	5	9	1	2
MR-1	14	6	7	19	4	4

Tabella 8: Numero di coppie con mismatch per ciascun mHAgs

Per quanto riguarda il rischio di sviluppare GvHDa l'analisi univariata è stata sovrapponibile quando abbiamo considerato il grado ≥ 2 o qualunque grado e sono apparsi come fattori predittivi i mismatch immunogeni di ACC-5 (HR 5.3, $p=0.03$) e LB-MTHFD1-1Q (HR 3.9, $p=0.03$) e i mismatch genomici su UGT2B17 (HR 3.4, $p=0.008$) e DPH1 (HR 2.7, $p=0.02$). Nonostante questi due mHAg abbiano un'espressione ristretta ai tessuti emopoietici, sembrano implicati nella GvHDa, probabilmente perché l'attivazione dei CTLs del donatore diretti contro di essi può creare un substrato pro-infiammatorio su cui si instaurano i meccanismi patogenetici della GvHDa. Queste considerazioni legate all'espressione tissutale sono applicabili anche al mismatch immunogeno di ACC-1 (HR 2.2, $p=0.09$) il quale mostra però solo un trend alla significatività.

In analisi multivariata ha mantenuto un ruolo come fattore di rischio per GvHDa il mismatch immunogeno per ACC-5 (HR 4.3, $p=0.06$, Fig. 13) come l'hanno mantenuto i due mismatch genomici legati a UGT2B17 (HR 3.4, $p=0.02$, Fig. 14) e DPH1 (HR 2.8 e 2.2, $p=0.02$ e 0.04, Fig. 15a). Il ruolo di quest'ultimo risulta più evidente visualizzando la curva di sopravvivenza (Fig. 15b). Tra gli mHAg considerati finora, questi ultimi sono gli unici ad espressione ubiquitaria e UGT2B17, in particolare, è prevalentemente espresso dalle cellule epatiche ed intestinali che sono sedi importanti di GvHDa.

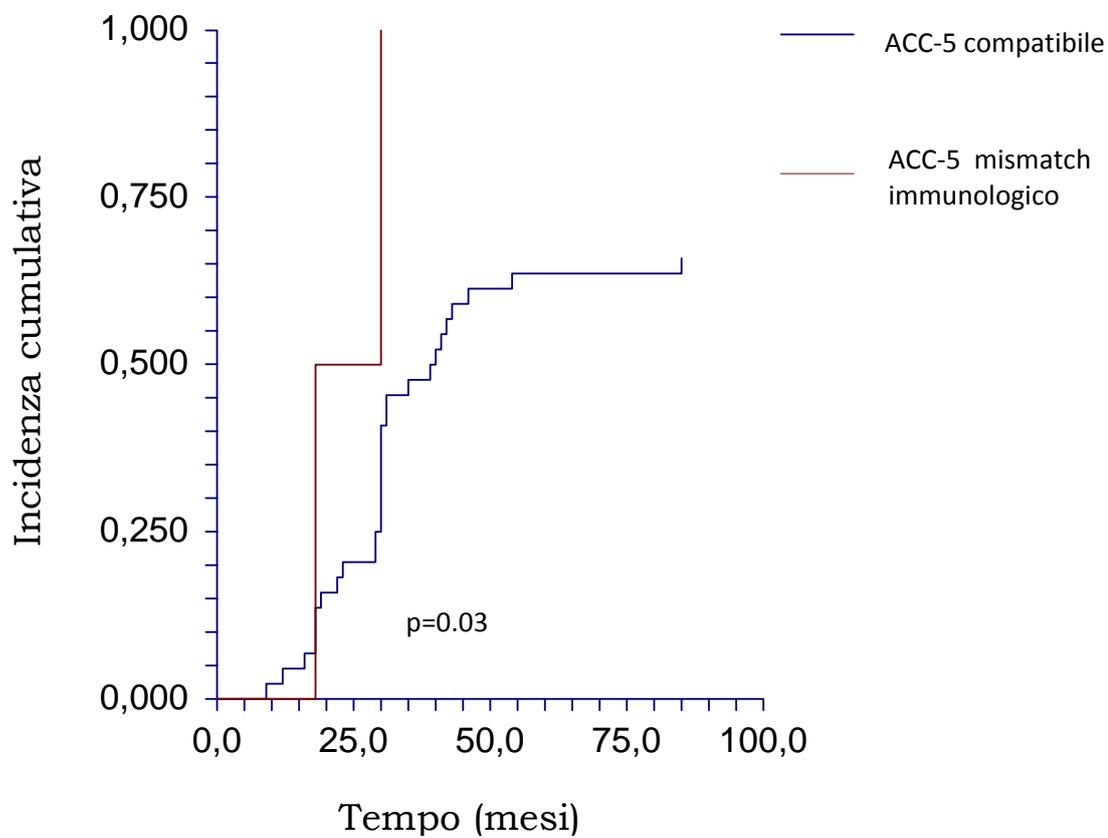


Figura 13: Incidenza cumulativa di GvHDA di grado ≥ 2 con mismatch immunogeno di ACC-5

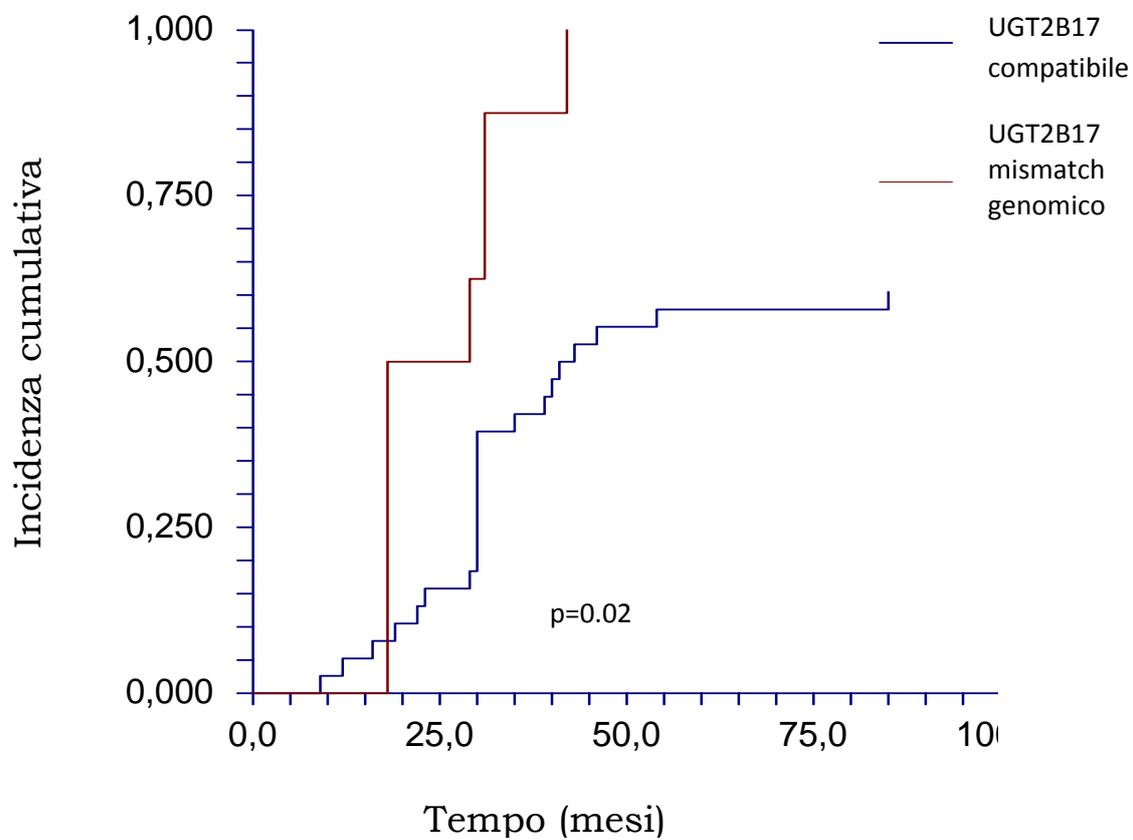


Figura 14: Incidenza cumulativa di GvHDa con mismatch genomico di UGT2B17

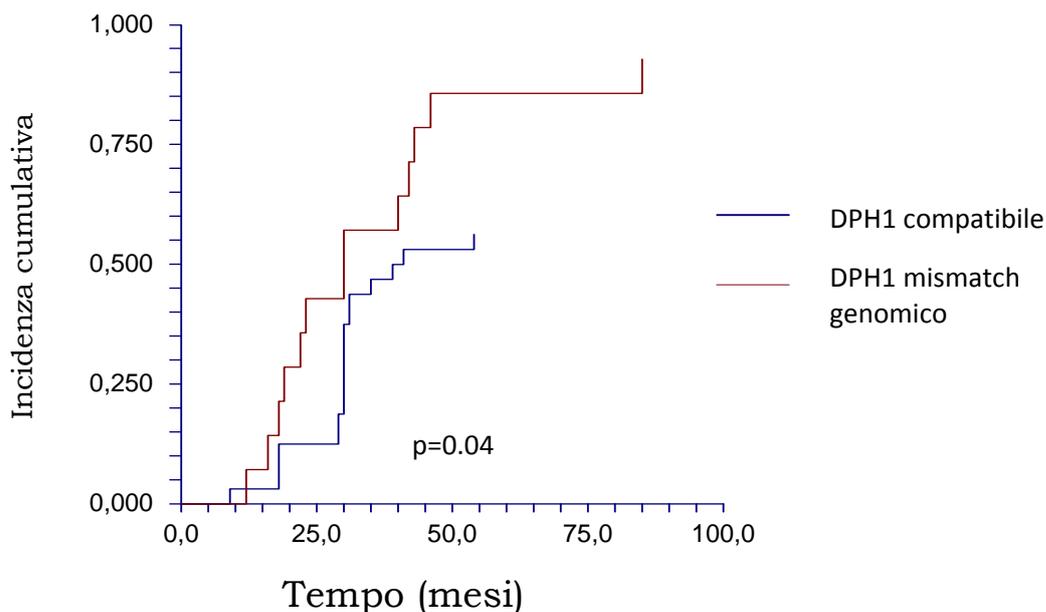


Figura 15a: Incidenza cumulativa di GvHDA di grado ≥ 2 secondo la compatibilità DPH1

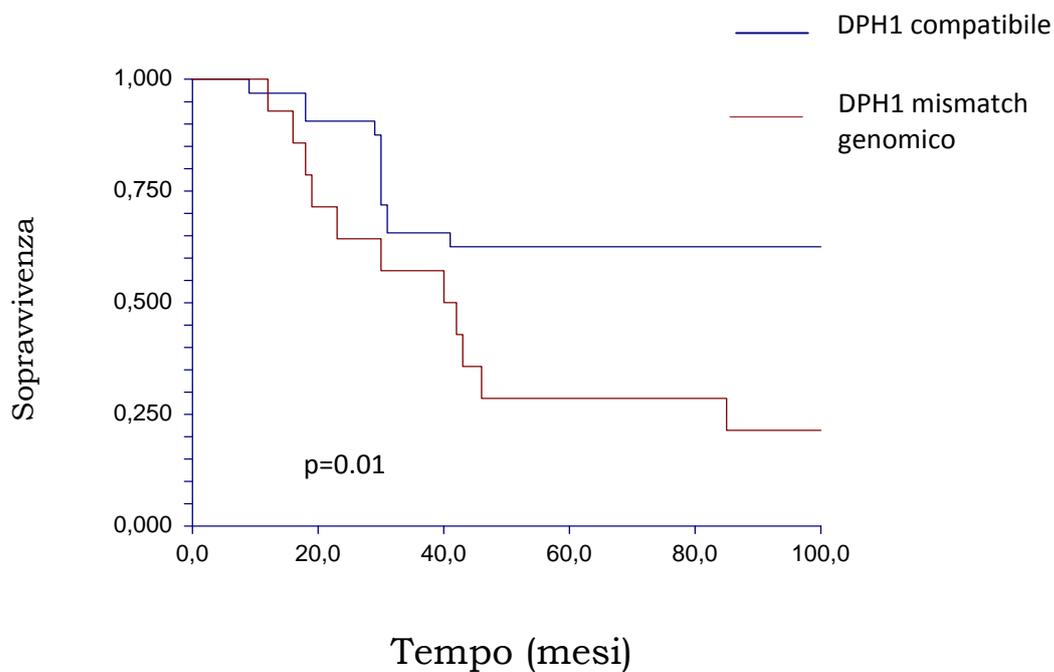


Figura 15b: Sopravvivenza determinata da DPH1

Considerando poi la GvHDc, l'analisi univariata ha sottolineato l'importanza di alcune differenze genomiche. In particolare:

LRH-1 (HR 2.3, $p=0.04$), ACC-4 (HR 2.8, $p=0.02$), ACC-5 (HR 2.8, $p=0.02$) si sono distinti per il ruolo pro-GvHDc.

Al contrario HA-2 (HR 0.36, $p=0.04$), C19orf48 (HR 0.35, $p=0.03$) e ACC-6 (HR 0.4, con un trend di significatività, $p=0.07$) hanno mostrato un ruolo protettivo.

Una parte di questi risultati è inaspettata in quanto LRH-1, ACC-4, ACC-5 sono ristretti ai tessuti emopoietici e sarebbero potenzialmente in grado di indurre un effetto GvL senza GvHD, al contrario, C19orf48 ha espressione ubiquitaria e non era atteso che il suo mismatch potesse essere protettivo verso GvHDc.

In analisi multivariata solo il mismatch genomico per LRH-1 (HR 2.9, $p=0.04$, Fig. 16) ha mantenuto la significatività.

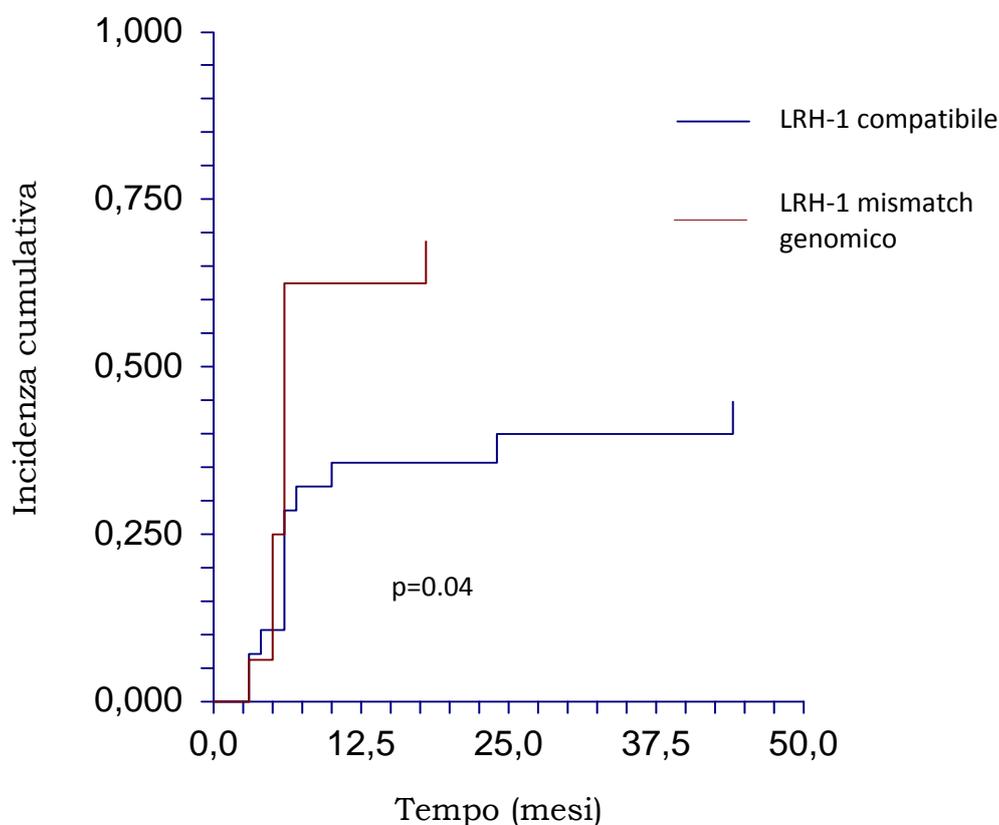


Figura 16: Incidenza cumulativa di GvHDc con mismatch genomico di LRH-1

Infine l'attenzione è stata focalizzata sui fattori in grado di determinare l'outcome in termini di incidenza cumulativa di recidiva e RFS. Alcuni mismatch a livello degli mHAg sono stati correlati ad aumento del rischio di recidiva, mentre altri sono risultati protettivi. Il mismatch immunologico su ACC-1 (HR 2.8, $p=0.03$) e genomico su HA-2 (HR 2.5, $p=0.04$) sono stati correlati a riduzione della sopravvivenza libera da recidiva. ACC-1 ha quindi fallito nel dimostrare la capacità di sostenere un effetto GvL significativo, mentre ha dimostrato un ruolo nell' induzione di GvHD. HA-2 con mismatch genomico correla con un aumentato rischio di recidiva probabilmente perché nonostante sia presente prevalentemente sui tessuti emopoietici, nella nostra casistica non ha mai soddisfatto i criteri per sostenere un effetto GvL.

Al contrario, LB-ADIR1 (per noi è significativo a livello genomico, ma nell'88% dei casi 7/8, induceva anche la variazione nota della proteina) è apparso molto interessante perché è espresso dalle cellule del sistema emopoietico, e il mismatch correla con protezione dalla malattia (chiaro effetto GvL), che si è mantenuta anche in analisi multivariata (HR 0.3, $p=0.03$, Fig. 17a e 17b), senza essere un fattore predittivo di GvHD. Analizzando poi il ruolo di LB-ADIR1 nel determinare l'outcome dei pazienti con LAL-Ph⁺, è possibile evidenziare un trend caratterizzato da una RFS favorevole nel sottogruppo di pazienti con mismatch (Fig. 18). Questa evidenza, però, a causa della ridotta numerosità del campione, non è statisticamente significativa.

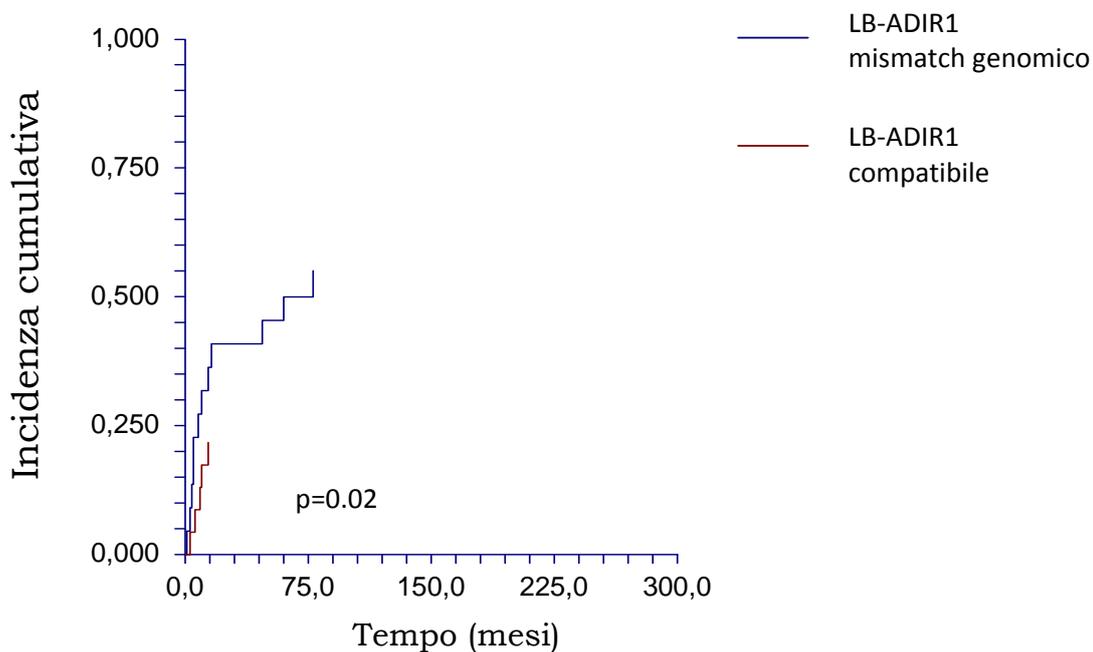


Figura 17a: Incidenza cumulativa di recidiva con mismatch genomico di LB-ADIR1

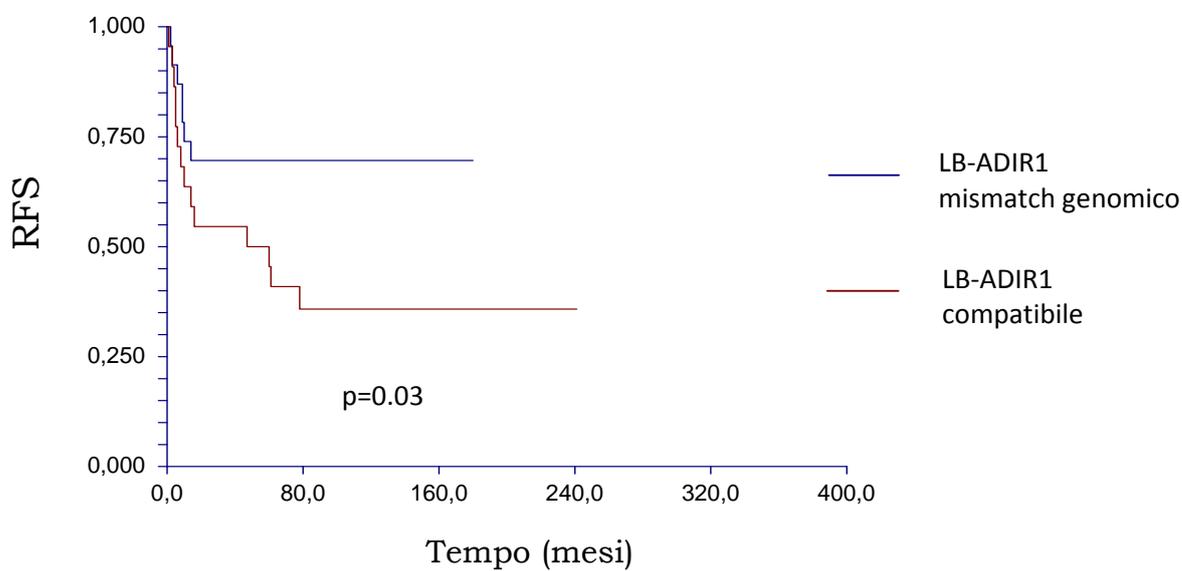


Figura 17b: RFS con mismatch genomico di LB-ADIR1

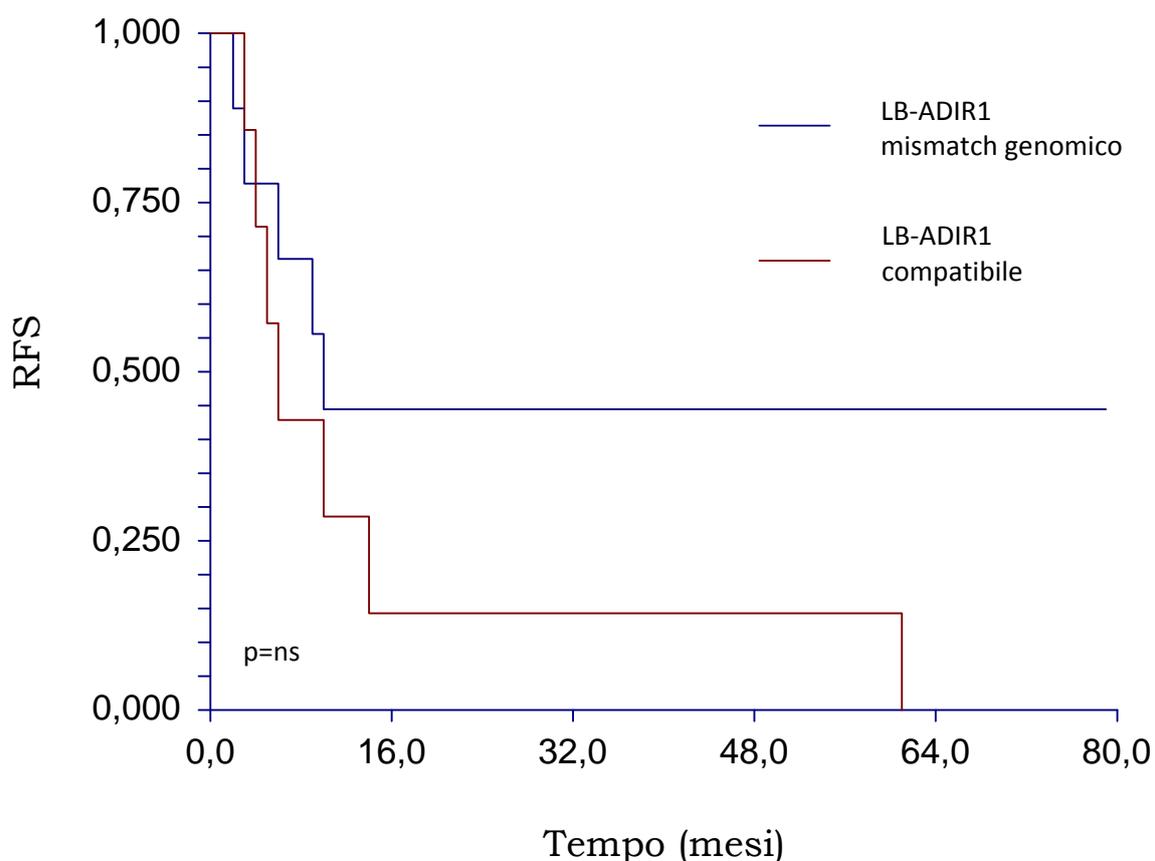


Figura 18: Focus sul ruolo del mismatch di LB-ADIR1 nel determinare l'outcome dei pazienti con LAL-Ph⁺. Pur mancando la significatività statistica, a causa della ridotta numerosità del campione, è possibile ipotizzare che il mismatch di LB-ADIR1 migliori la RFS

DISCUSSIONE

Gli mHAgS svolgono un ruolo potenzialmente importante nel determinare l'outcome dei pazienti sottoposti a allo-HSCT, in quanto risultano coinvolti sia nella GvHD che nella GvL. Attualmente in letteratura sono riportati dati contrastanti circa il loro ruolo effettivo a causa dell'eterogeneità delle casistiche e soprattutto per il fatto che nella quasi totalità dei casi, essi sono stati analizzati singolarmente e quindi risultano mancanti lavori che analizzino contemporaneamente tutti o la maggior parte degli mHAgS finora identificati.

In questo studio abbiamo cercato di condurre questo tipo di analisi e a tal fine è stato messo a punto un metodo innovativo, basato sulla spettrometria di massa (iPlex Gold Mass Array). In un unico procedimento (basato sull'impiego di tre multiplex e due chip per la spettrometria di massa) sono stati analizzati 23 mHAgS, mentre per genotipizzare altri tre mHAgS sono state utilizzate tecniche di biologia molecolare convenzionale.

In questo modo abbiamo potuto analizzare tutti i 26 mHAgS che in letteratura sono stati riportati essere in qualche modo correlati o con la GvHD o con la GvL.

Per valutare il ruolo degli mHAgS in relazione al loro possibile coinvolgimento nella GvHD e/o nella GvL abbiamo scelto una casistica di 46 pazienti, 29 affetti da LMC-Ph+ e 17 affetti da LAL-Ph+ sottoposti a trapianto allogenico familiare o MUD HLA-compatibile.

Per "escludere" o attenuare, il più possibile, il ruolo delle HLA-disparità nell'ambito degli antigeni maggiori di istocompatibilità, era necessario che tutti i pazienti avessero accertata una compatibilità "full". Per questo era assolutamente necessario che tutti i pazienti avessero una tipizzazione HLA ad alta risoluzione. Dal momento che avevamo a disposizione una casistica retrospettiva raccolta lungo un arco di tempo molto lungo e proveniente da più Centri di Trapianto, abbiamo dovuto ricorrere a tipizzare ad alta risoluzione 15 coppie donatore/ricevente.

A questo punto, avendo a disposizione una quantità limitata di DNA e considerando le complessità e le difficoltà di condurre la tipizzazione HLA ad

alta risoluzione con le metodiche di indagine convenzionali, abbiamo utilizzato per primi in Italia un assay basato sul sequenziamento massivo di nuova generazione (NGS) di ampliconi relativi ai più importanti esoni dei loci HLA di classe I e II. L'NGS, in particolare la tecnologia di pirosequenziamento 454 Junior (Roche Diagnostics), si inserisce in questo contesto come una metodica estremamente innovativa e molto promettente in quanto è di facile applicazione, veloce da realizzare, non necessita dell'utilizzo di altre metodiche per giungere al risultato e consente di ottenere sequenze scevre da ambiguità di fase (che sono un problema frequentemente riscontrato con la tipizzazione basata sul metodo di Sanger e per la risoluzione obbligano ad associare saggi diversi). Attraverso questa metodica è stato possibile ottenere la tipizzazione per molti loci dei campioni in esame.

I nostri risultati possono essere così commentati:

- I protocolli che abbiamo messo a punto per la genotipizzazione dei 26 mHAg si sono dimostrati fattibili, efficienti, fattibili e adattabili per un aggiornamento continuo. In particolare, l'approccio di multiple-genotyping mediante iPlex Gold Mass Array Sequenom® è estremamente plastico, cioè sarà sempre possibile valutare la possibilità di modificare le multiplex per inserire lo studio di nuovi polimorfismi che verranno eventualmente identificati come associati a nuovi mHAg;

- La tipizzazione HLA mediante la Tecnologia NGS basata sull'assay GS GType HLA® proposto da Roche Diagnostics ha permesso di ottenere risultati non ambigui per molti loci considerati.

Un importante parametro per valutare questa metodica è la risoluzione: sfruttando il fatto che la metodica si basa sul sequenziamento, è sempre stata elevata e ha permesso di superare i 4-digit. La specificità al contrario non è risultata elevata in quanto l'assay si basa sulle indicazioni NMDP ed è stato disegnato in modo da identificare correttamente il gruppo G a cui appartiene l'allele del campione in esame, senza però la possibilità di discriminare la presenza di alleli null. Questa ridotta specificità è intrinseca

alla definizione di gruppo G che discrimina alleli con la stessa sequenza nucleotidica a livello degli esoni codificanti il dominio di legame con i peptidi (esoni 2, 3, e 4 per la classe I e il solo esone 2 per la classe II), ma non analizza le sequenze introniche responsabili della mancata espressione in membrana della proteina;

- L'analisi descrittiva delle differenze tra donatore e ricevente ha evidenziato come all'interno di una casistica omogenea, full-compatibile (almeno 6/6, ma prevalentemente 10/10) per gli antigeni maggiori di istocompatibilità (HLA), il setting familiare mostri meno differenze rispetto al MUD per quanto riguarda gli mHAgS (Fig. 7). Questa evidenza conferma quanto noto relativamente al fatto che gli mHAgS vengano ereditati secondo le regole mendeliane in assenza di linkage disequilibrium con i geni dell'HLA e ci permette di affermare che la tipizzazione HLA non sia in grado di fornirci un'informazione assolutamente completa sulla compatibilità tra due individui.

Un accenno interessante deve essere fatto a riguardo della compatibilità a livello del locus HLA*DPB1. Nonostante le coppie con donatore identico, ma non correlato abbiano maggiore probabilità di avere diversità *DPB1 non permissiva, appartenere a questo setting non aumenta il rischio di GvHD acuta o cronica (HR 1.4, $p=0.33$);

- Il rischio di sviluppare GvHD, all'interno della nostra casistica, appare correlato a fattori clinici e al mismatch a livello di alcuni mHAgS. Per quanto riguarda i fattori clinici, come atteso, sono emersi l'utilizzo del sangue periferico come sorgente di CSE (fattore di rischio sia per GvHD acuta che cronica, HR 2.4 e 2.2, $p=0.06$ e 0.09 rispettivamente) e il ruolo della pregressa GvHD acuta nell'aumentare il rischio di insorgenza di GvHD cronica (HR 2.7, $p=0.03$).

Tra i 26 mHAgS genotipizzati in questo lavoro, tre hanno dimostrato di avere un ruolo importante nel determinare il rischio di sviluppare GvHD.

Il mismatch, anche puramente a livello genomico, su UGT2B17 influenza fortemente il rischio di sviluppare GvHDa di qualunque grado

(HR 3.1, $p=0.009$ per GvHDA di tutti i gradi e HR 2.8, $p=0.02$ per GvHDA di grado ≥ 2 Fig. 14). Il ruolo di UGT2B17 era noto ed in qualche modo atteso in quanto questo antigene è espresso prevalentemente a livello del tessuto epatico e intestinale che sono sedi caratteristiche di GvHD. Anche nella nostra casistica è emersa l'associazione tra mismatch e l'insorgenza di GvHDA, senza però che fosse limitata o specifica per queste due sedi.

DPH1 sempre con mismatch a livello genomico è in grado di determinare GvHDA di grado ≥ 2 è (HR 2.2, $p=0.04$). La curva di incidenza cumulativa (Fig. 15a) è suggestiva, ma ancora più evidente è il suo ruolo nel ridurre la sopravvivenza precoce (entro i primi 100 giorni, Fig. 15b). L'evidenza del ruolo pro-GvHD dei mismatch su DPH1 è descritta da noi per la prima volta e conferma il nostro modello patogenetico in quanto questo antigene è espresso ubiquitariamente e viene presentato dalle molecole HLA di classe I.

Per la GvHDc l'unico mHAg in grado di determinarla in modo significativo, è il mismatch genomico per LRH1 (HR 2.9, $p=0.04$, Fig. 16). Questa correlazione è descritta per la prima volta e potrebbe essere particolarmente interessante perché l'mHAG LRH-1 è sempre stato correlato a GvL ed è espresso prevalentemente sulle cellule emopoietiche.

- L'effetto GvL è stato analizzato soprattutto in relazione all'incidenza di recidiva e alla correlata sopravvivenza libera da recidiva.

La LMC si è dimostrata una patologia estremamente responsiva all'allo-immunoterapia. Sulla base dei dati presenti in letteratura secondo cui il trascritto di fusione derivante dal riarrangiamento b3a2 è in grado di stimolare la selezione e la proliferazione di CTLs specifici [67] anche nella nostra casistica è stato possibile evidenziare un effetto GvL indirizzato verso il trascritto b3a2. Nel setting di allo-trapiantati per LMC con trascritto b3a2, in analisi multivariata, questo trascritto è risultato essere un fattore determinante (HR 0.2, 0.08-0.5, $p=0.01$) nel migliorare la RFS (Fig. 12). In senso opposto a questo è da considerare il trascritto di fusione e1a2 che correla con un aumentato rischio di recidiva (HR 3.5, $p=0.03$).

Un altro dato emerso dalla nostra casistica e in linea con quanto presente in letteratura riguarda l'identificazione della stretta correlazione tra la presenza di GvHD cronica e la protezione dalla recidiva (HR 0.3, $p=0.02$). Questa evidenza avvalorata le teorie secondo cui GvHD e GvL sono in stretto linkage e conferma il nostro interesse verso gli mHAg che è nato proprio per cercare di comprendere i meccanismi che sottendono queste due reazioni al fine di identificare i fattori biologici importanti per scinderle e poter indurre GvL impedendo l'instaurarsi di GvHD.

L'unico mHAg che ha dimostrato un ruolo nel determinare l'effetto GvL è stato LB-ADIR1. Il mismatch tra donatore e ricevente a livello di questo mHAg è risultato protettivo nei confronti della ricaduta (HR 0.2, $p=0.02$) e parallelamente ha migliorato la RFS (HR 0.3, $p=0.03$). Secondo il modello patogenetico che abbiamo costruito, era atteso che questo mHAg potesse guidare la GvL perché LB-ADIR1 è espresso su cellule del sistema emopoietico e la sua espressione è mantenuta durante la trasformazione neoplastica. Interessante notare che nonostante sia potenzialmente in grado di stimolare il sistema immunitario del donatore, non è associato a GvHD. Per valutare la potenza con cui LB-ADIR1 è in grado di stimolare l'effetto GvL è stato quindi indagato in dettaglio il ruolo di questo mHAg nei pazienti trapiantati per LAL-Ph⁺ con trascritto e1a2, in cui manca la possibilità di induzione di effetto GvL da parte del trascritto di fusione. Visualizzando le curve di RFS dei pazienti con o senza mismatch (Fig. 18) è possibile intuire il ruolo protettivo del mismatch su LB-ADIR1, ma non è raggiunta la significatività statistica probabilmente a causa del ridotto numero di pazienti appartenenti a questo gruppo ($n=7$).

L'aver utilizzato una casistica costituita da due patologie patogenicamente correlate, ma profondamente diverse sul piano immunogenico e i dati che abbiamo ottenuto ci permettono inoltre di affermare che il ruolo degli mHAg non è definito in senso lato, ma può ricoprire un'importanza diversa secondo la patologia di base del paziente.

CONCLUSIONI

Il progetto realizzato nel corso dei tre anni di Dottorato di Ricerca ha consentito di:

- mettere a punto una metodica, che abbiamo definito di "multiple-genotyping", basata sulla spettrometria di massa (iPlex Gold Mass Array Sequenom®) che è in grado di genotipizzare contemporaneamente 23 mHAg. Mediante l'associazione di questo assay con altri tre protocolli di biologia molecolare convenzionale quindi possibile genotipizzare tutti i 26 mHAg attualmente descritti in letteratura. Le procedure da noi messe a punto rappresentano quindi un punto di riferimento metodologico per ulteriori studi sugli mHAg;

- raggiungere un elevato livello di expertise nell'utilizzo dell'NGS (in particolare la tecnologia 454 Junior, Roche Diagnostics) applicato alla tipizzazione HLA. Questa competenza è di fondamentale importanza in quanto l'NGS stato identificato come la tecnologia che potrebbe sostituire tutte le metodiche attualmente esistenti per la tipizzazione degli antigeni maggiori di istocompatibilità;

- individuare, oltre ai fattori clinici noti (legati alla patologia ed alla procedura trapiantologica), quattro mHAg correlati alla patogenesi di GvHD e GvL. Seppur con il limite legato alla numerosità della casistica (n=46) e la conseguente necessità di proseguire con il progetto, è possibile affermare che il mismatch tra donatore e ricevente su UGT2B17 o LRH1 o DPH1 ha un ruolo importante nel determinare il rischio di insorgenza di GvHD. Al contrario il mismatch a livello dell'mHAg LB-ADIR1 appare in grado di sostenere un effetto GvL che potrebbe avere un ruolo fondamentale soprattutto per i pazienti affetti da patologie scarsamente sensibili all'allo-immunoterapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Blume, K.G., S.J. Forman, and F.R. Appelbaum, *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 2004.
2. Ostrovsky, O., et al., *Genetic variations in the heparanase gene (HPSE) associate with increased risk of GVHD following allogeneic stem cell transplantation: effect of discrepancy between recipients and donors*. *Blood*, 2010. **115**(11): p. 2319-2328.
3. Collins, R., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation* 15 (2): 433-444. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(2): p. 433-444.
4. Feng, X., et al., *Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(12): p. 624-632.
5. Bleakley, M. and S.R. SR, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukemia effect*. *Nat Rev Cancer* 2004. **4**: p. 371-380.
6. Ringden, O., et al., *The allogeneic graft-versus-cancer effect*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(5): p. 614-33.
7. Laurin, D., et al., *Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft*. *Transfusion*, 2010. **50**(2): p. 418-28.
8. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Immunologia cellulare e molecolare*.
9. Markey, K.A., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *Impact of cytokine gene polymorphisms on graft-vs-host disease*. *Tissue Antigens*, 2008. **72**(6): p. 507-16.
10. Bertinetto, F.E., et al., *Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation*. *Int J Immunogenet*, 2006. **33**(5): p. 375-84.
11. Spellman, S., et al., *Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants*. *Biol Blood Marrow Transplantat*, 2009. **15**: p. 856-863.
12. Schuler, M.M., et al., *SNEP: SNP-derived epitope prediction program for minor H antigens*. *Immunogenetics*, 2005. **57**(11): p. 816-20.
13. Kwok, P.Y. and M. Xiao, *SNP genotyping and molecular haplotyping of DNA pools*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2003. **68**: p. 65-7.
14. Maresso, K. and U. Broeckel, *Genotyping platforms for mass-throughput genotyping with SNPs, including human genome-wide scans*. *Adv Genet*, 2008. **60**: p. 107-39.
15. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. *Gene*, 1999. **234**(2): p. 177-86.
16. Kikuchi, T., et al., *Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22*. *Immunogenetics*, 2007. **59**(2): p. 99-108.
17. Dickinson, A.M., *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(2): p. 189-207.
18. Dickinson, A.M. and E. Holler, *Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008. **21**(2): p. 149-64.
19. Ansari, M., et al., *Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children*. *Bone Marrow Transplant*, 2010. **45**(2): p. 261-7.
20. Spaapen, R. and T. Mutis, *Targeting haematopoietic-specific minor histocompatibility antigens to distinguish graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008. **21**(3): p. 543-557.
21. Brickner, A.G., *Mechanisms of minor histocompatibility antigen immunogenicity: the role of infinitesimal versus structurally profound polymorphisms*. *Immunol Res*, 2006. **36**(1-3): p. 33-41.
22. Simpson, E., *Minor histocompatibility antigens*. *Immunol Lett*, 1991. **29**(1-2): p. 9-14.

23. Larsen, M.E., et al., *Degree of predicted minor histocompatibility antigen mismatch correlates with poorer clinical outcomes in nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(10): p. 1370-81.
24. Goulmy, E., *Human minor histocompatibility antigens*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 75-81.
25. Engelhard, V.H., A.G. Brickner, and A.L. Zaring, *Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire*. Mol Immunol, 2002. **39**(3-4): p. 127-37.
26. Stumpf, A.N., et al., *Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3684-92.
27. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 281-5.
28. Akatsuka, Y., *[Role of minor histocompatibility antigens in hematopoietic cell transplantation]*. Rinsho Ketsueki, 2006. **47**(10): p. 1353-63.
29. Kirker, B., et al., *Induction of HA-1 specific cytotoxic T-cell clones parallels the therapeutic effect of donor lymphocyte infusion* Br J Haematol, 2002. **117**: p. 935-939.
30. Nishida, T., et al., *Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant*. Br J Haematol, 2004. **124**(5): p. 629-635.
31. Brickner, A., et al., *The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL*. Blood 2006; **107** (9): 3779-3786. Blood, 2006. **107**(9): p. 3779-3786.
32. Mulligan, C. and P. Bardy, *New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p. 127-144.
33. Bleakley, M., et al., *Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4923-33.
34. Van Bergen, C.A., et al., *High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning*. Cancer Res, 2010. **70**(22): p. 9073-83.
35. Dickinson, A.M., J.L. Harrold, and H. Cullup, *Haematopoietic stem cell transplantation: can our genes predict clinical outcome?* Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(29): p. 1-19.
36. Dickinson, A.M., *Non-HLA genetics and predicting outcome in HSCT*. Int J Immunogenet, 2008. **35**(4-5): p. 375-80.
37. Akatsuka, Y., et al., *Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions*. Cancer Sci 2007. **98**(8): p. 1139-1146.
38. Spierings, E., et al., *Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations*. PLoS Genet, 2007. **3**(6): p. e103.
39. Markiewicz, M., et al., *Immunogenic disparities of 11 minor histocompatibility antigens (mHAs) in HLA-matched unrelated allogeneic hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(4): p. 293-300.
40. Terlizzi, S.D., et al., *Therapeutic and diagnostic applications of minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 disparities in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of different populations*. Biol Blood Marrow Transplant 2006. **12**: p. 95-101.
41. Warren, E.H., et al., *Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens*. Blood, 2010. **115**(19): p. 3869-78.
42. Akatsuka, Y., et al., *Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling* Br J Haematol, 2003. **123**: p. 671-675.

43. Spierings, E. and E. Goulmy, *Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens* J clin Invest 2005. **115**(12): p. 3397-3400.
44. Murata, M., E.H. Warren, and S.R. Riddell, *A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1279-89.
45. Bleackley, R.C., *A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing*. Biochem Cell Biol, 2005. **83**(6): p. 747-51.
46. Norbury, L.C., R.E. Clark, and S.E. Christmas, *b3a2 BCR-ABL fusion peptides as targets for cytotoxic T cells in chronic myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2000. **109**(3): p. 616-21.
47. Collins, R., et al., *Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia*. Bone Marrow Transplant, 2000. **26**: p. 511-516.
48. Gallardo, D., et al., *Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation*. Br J Haematol, 2001. **114**(4): p. 931-6.
49. Clark, R.E., et al., *Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein*. Blood, 2001. **98**(10): p. 2887-93.
50. Bocchia, M., et al., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides*. Blood 1996. **87**(9): p. 3587-3592.
51. Clark, R.E. and S.E. Christmas, *BCR-ABL fusion peptides and cytotoxic T cells in chronic myeloid leukaemia*. Leuk Lymphoma, 2001. **42**(5): p. 871-80.
52. Clark, R.E., et al., *HLA-A3 increases and HLA-DR1 decreases the risk of acute graft-versus-host disease after HLA-matched sibling bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **114**(1): p. 36-41.
53. Tanaka, Y., et al., *Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T lymphocytes*. Br J Haematol, 2000. **109**(2): p. 435-7.
54. Kircher, B., et al., *Hematopoietic lineage-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 in graft-versus-leukemia activity after donor lymphocyte infusion*. J Immunother, 2004. **27**(2): p. 156-60.
55. Tanaka, Y., et al., *Generation of Fas-independent CD4+ cytotoxic T-cell clone specific for p190 minor bcr-abl fusion peptide*. Leuk Res, 2002. **26**(3): p. 317-21.
56. Kircher, B., et al., *Induction of HA-1-specific cytotoxic T-cell clones parallels the therapeutic effect of donor lymphocyte infusion*. Br J Haematol, 2002. **117**(4): p. 935-9.
57. Dolstra, H., et al., *A human minor histocompatibility antigen specific for B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. J Exp Med 1999. **189** (2): p. 301-308.
58. Sequenom, *iPlex Gold Brochure*.
59. Spierings, E., et al., *A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications*. PLoS One, 2006. **1**: p. e42.
60. Sequenom, *iPlex Gold User guide*.
61. Wilson, W., 3rd, et al., *Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15*. Genomics, 2004. **84**(4): p. 707-14.
62. Gallagher, C.J., et al., *The UDP-glucuronosyltransferase 2B17 gene deletion polymorphism: sex-specific association with urinary 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronidation phenotype and risk for lung cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(4): p. 823-8.
63. Robinson, J., et al., *The IMGT/HLA database*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D1222-7.
64. Robinson, J., et al., *IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex*. Tissue Antigens, 2000. **55**(3): p. 280-7.
65. Glucksberg, H., et al., *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. Transplantation, 1974. **18**(4): p. 295-304.

66. Filipovich, A.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 945-56.
67. Bocchia, M., et al., *Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial*. Lancet, 2005. **365**(9460): p. 657-62.
68. Cutler, C., et al., *Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3685-91.
69. Nishida, T., et al., *Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant* Br J Haematol 2004. **124**: p. 629-635.
70. Tykodi, S.S., et al., *C19orf48 encodes a minor histocompatibility antigen recognized by CD8+ cytotoxic T cells from renal cell carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5260-9.
71. Maruya, E., et al., *Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants*. Blood, 1998. **92**(6): p. 2169-76.
72. Perez-Garcia, A., et al., *Minor histocompatibility antigen HA-8 mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor allogeneic stem cell transplantation*. Haematologica, 2005. **90**(12): p. 1723-4.
73. Slager, E.H., et al., *Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4954-60.

ALLEGATI

Allegato 1: Ruolo delle caratteristiche cliniche nel determinare GvHD/GvL (Analisi univariata)

	GvHDa		GvHDa grado ≥2		GvHDc		Relapse		RFS	
	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p
Età ≥ mediana	1.95 (0.94-4.1)	0.07	1.6 (0.7-3.8)	0.27	1.4 (0.6-3.2)	0.44	1.6 (0.6-4.3)	0.35	1.8 (0.8-4.5)	0.18
Sesso M	0.78 (0.38-1.6)	0.48	0.94 (0.4-2.1)	0.89	0.6 (0.3-1.5)	0.3	0.8 (0.3-1.8)	0.58	0.9 (0.4-2.2)	0.82
Patologia LMC vs LAL-Ph ⁺	0.82 (0.4-1.7)	0.58	0.86 (0.4-2)	0.73	2.5 (0.91-6.7)	<u>0.08</u>	0.25 (0.09-0.67)	0.006	0.2 (0.08-0.5)	0.0007
Rischio Sokal										
Basso	0.91 (0.3-2.7)	0.86	0.8 (0.3-2.7)	0.76	0.9 (0.3-2.7)	0.87	0.17 (0.02-1.5)	0.12	0.14 (0.02-1.2)	<u>0.07</u>
Intermedio	0.67 (0.1-2.9)	0.60	1.2 (0.2-5.5)	0.83	1.5 (0.3-7.8)	0.58	1.5 (0.2-13.8)	0.71	3 (0.5-16.4)	0.21
Alto	1.3 (0.5-3.7)	0.56	1.1 (0.3-3.8)	0.88	0.9 (0.3-2.9)	0.84	4.1 (0.7-24.8)	0.82	2.7 (0.5-13.6)	0.22
Riarrangiamento										
b2a2	1.6 (0.7-3.3)	0.24	0.82 (0.3-2)	0.65	1.1 (0.4-2.6)	0.89	1.5 (0.5-4.2)	0.43	1.5 (0.6-3.8)	0.34
b3a2	0.8 (0.4-1.6)	0.47	0.97 (0.4-2.3)	0.94	1.8 (0.7-4.4)	0.2	0.3 (0.1-1.1)	<u>0.06</u>	0.2 (0.08-0.75)	0.01
e1a2	0.97 (0.4-2.4)	0.95	1.1 (0.4-3.1)	0.79	0.2 (0.02-1.2)	<u>0.07</u>	3.5 (1.1-11.1)	0.03	4.2 (1.5-11.7)	0.005
Linee terapia pre-TMO >1	1.4 (0.7-3.1)	0.36	0.97 (0.4-2.4)	0.94	1.4 (0.5-3.4)	0.5	1.5 (0.5-5.1)	0.47	1.2 (0.4-3.4)	0.7
Patologia in stadio avanzato pre TMO	0.95 (0.4-2.1)	0.9	0.5 (0.2-1.5)	0.24	1.6 (0.7-3.9)	0.3	1.3 (0.5-3.9)	0.58	1.3 (0.5-3.3)	0.63
Donatore MUD	1.4 (0.7-2.9)	0.33	1.1 (0.5-2.5)	0.86	0.99 (0.4-2.3)	0.99	0.36 (0.1-1.2)	0.11	0.5 (0.2-1.4)	0.2
Donatore M vs F	1.9 (0.9-4.2)	0.11	1.3 (0.5-3)	0.58	1.3 (0.6-3.1)	0.52	1.2 (0.4-3.7)	0.68	1.8 (0.6-5.1)	0.26
Sesso P/D										
F/F	0.6 (0.2-1.8)	0.38	1 (0.3-2.9)	0.98	1.4 (0.5-4.3)	0.5	0.31 (0.04-2.3)	0.26	0.2 (0.03-1.8)	0.16
F/M	1.9 (0.9-4.2)	0.09	0.9 (0.4-2.4)	0.9	1.1 (0.4-2.9)	0.8	2.8 (0.9-8.2)	<u>0.05</u>	2.4 (0.9-6.4)	<u>0.07</u>
M/M	1.1 (0.5-2.3)	0.82	1.3 (0.6-3.1)	0.49	1.2 (0.5-2.8)	0.7	0.4 (0.1-1.6)	0.21	0.8 (0.3-2.2)	0.68
M/F	0.6 (0.2-1.6)	0.31	0.7 (0.2-2)	0.41	0.5 (0.2-1.5)	0.24	1.5 (0.5-4.8)	0.5	1.1 (0.3-3.4)	0.80
Sorgente CSE PB vs BM	1.5 (0.7-3.1)	0.31	2.4 (0.95-6.2)	<u>0.06</u>	2.2 (0.9-5.6)	<u>0.09</u>	0.7 (0.3-1.9)	0.49	1.1 (0.5-2.7)	0.8
Condizionamento										
Ridotto	2.8 (0.8-9.4)	0.1	1.4 (0.3-6.1)	0.63	0.6 (0.08-4.8)	0.66	1.2 (0.1-9.3)	0.85	2.1 (0.5-9.1)	0.33
Intensificato	0.9 (0.4-1.9)	0.77	0.6 (0.2-1.5)	0.27	2.1 (0.9-4.6)	0.1	2.3 (0.7-7.1)	0.14	0.4 (0.1-1.2)	0.11
Convenzionale	0.9 (0.4-1.8)	0.7	1.4 (0.6-3.4)	0.39	0.6 (0.2-1.3)	0.17	0.37 (0.1-1.3)	0.12	1.8 (0.7-4.6)	0.24
N° CD34+ >5 x10 ⁶ /kg	1.0 (0.9-1.1)	0.5	1.9 (0.5-6.4)	0.31	0.4 (0.1-1.4)	0.16	0.7 (0.2-3.4)	0.71	1.3 (0.4-4.4)	0.64
N° CD3+ >13,6 x10 ⁶ /kg	1.3 (0.5-3.3)	0.64	1.4 (0.5-4.3)	0.54	0.4 (0.1-1.4)	0.17	1.3 (0.3-5.1)	0.74	3 (0.9-10.3)	<u>0.08</u>
ATG	1.8 (0.7-4.6)	0.24	1.9 (0.7-5.7)	0.23	0.6 (0.1-2.6)	0.51	0.5 (0.06-3.7)	0.49	0.8 (0.2-3.6)	0.8
Pregr GvHDa					4.7 (1.4-16.3)	0.01	1 (0.4-2.8)	0.9	1.4 (0.5-3.7)	0.47
Pregr GvHDa di grado ≥2					2.7 (1.1-6.6)	0.03	0.7 (0.3-1.9)	0.51	1.1 (0.5-2.7)	0.78
Pregressa GvHDc							0.3 (0.1-0.8)	0.02	3.7 (0.14-0.9)	0.04

Allegato 2: Ruolo degli mHAgS nel determinare GvHD/GvL (Analisi univariata)

	GvHDa		GvHDa grado ≥2		GvHDc		Relapse		RFS	
	HR	p								
ACC-1										
Mm	1.4 (0.7-2.8)	0.35	1.5 (0.7-3.5)	0.3	1.4 (0.6-3.2)	0.4	2.4 (0.9-6.4)	<u>0.08</u>	1.8 (0.8-4.3)	0.17
Mm Imm	2.1 (0.9-4.8)	<u>0.09</u>	2.2 (0.9-5.6)	<u>0.09</u>	1.4 (0.5-3.7)	0.5	3.1 (1.1-8.4)	<u>0.03</u>	2.8 (1.1-6.9)	<u>0.03</u>
Mm Imm GvH	0.6 (0.13-2.7)	0.51	0.3 (0.07-1.8)	0.21	0.8 (0.1-4.9)	0.83	0.2 (0.03-1.3)	0.1	0.3 (0.06-1.7)	0.18
ACC2										
Mm	1.3 (0.7-2.7)	0.43	1.5 (0.6-3.3)	0.36	1.3 (0.6-2.9)	0.51	1.7 (0.7-4.5)	0.25	1.4 (0.6-3.3)	0.43
Mm Imm	0.3 (0.04-2.3)	0.26	NV		1.3 (0.3-5.5)	0.74	1.4 (0.2-10.7)	0.74	1.1 (0.2-8.6)	0.8
Mm Imm GvH	NV		NV		2.4 (0.1-39.7)	0.53	NV		NV	
ACC-4										
Mm	1.8 (0.8-4)	0.12	1.7 (0.7-4.2)	0.22	2.8 (1.1-6.9)	<u>0.02</u>	1.04 (0.3-3.2)	0.93	1.3 (0.5-3.5)	0.53
Mm Imm	NV									
Mm Imm GvH	NV									
ACC-5										
Mm	1.85 (0.8-4.2)	0.12	1.7 (0.7-4.2)	0.22	2.8 (1.1-6.9)	<u>0.02</u>	1.04 (0.3-3.2)	0.93	1.3 (0.5-3.5)	0.53
Mm Imm	3.9 (0.9-16.9)	<u>0.07</u>	5.3 (1.2-24.1)	<u>0.03</u>	1.1 (0.1-0.82)	0.93	1.7 (0.2-1.5)	0.6	1.3 (0.2-10.1)	0.77
Mm Imm GvH	NV									
ACC-6										
Mm	1 (0.5-2.1)	0.93	0.6 (0.2-1.5)	0.29	0.4 (0.2-10)	<u>0.07</u>	1.1 (0.4-2.9)	0.85	1.2 (0.5-3)	0.6
Mm Imm	0.5 (0.07-3.9)	0.54	NV		0.8 (0.1-5.9)	0.83	NV		NV	
Mm Imm GvH	NV									
C19orf48										
Mm	1.4 (0.7-2.8)	0.4	0.9 (0.4-2.1)	0.83	0.35 (0.1-0.9)	<u>0.03</u>	1.4 (0.5-3.7)	0.48	1.2 (0.5-2.8)	0.7
Mm Imm	NV	NV	NV		NV		NV		NV	
Mm Imm GvH	NV	NV	NV		NV		NV		NV	
CD31										
Mm	1.2 (0.6-2.4)	0.68	1.3 (0.6-3)	0.51	1.1 (0.5-2.5)	0.86	1.2 (0.4-3.1)	0.74	1.2 (0.5-2.8)	0.68
Mm Imm	1.2 (0.5-3.4)	0.69	0.99 (0.3-3.3)	0.99	1.4 (0.5-4.1)	0.54	1.3 (0.4-4.4)	0.71	0.9 (0.3-3.4)	0.99
Mm Imm GvH	2.4 (0.4-14.7)	0.36	3.4 (0.3-39.8)	0.33	NV		0.4 (0.04-5.1)		0.4 (0.04-5.1)	0.5
CD31 BIS										
Mm	0.91 (0.5-1.9)	0.8	1.1 (0.5-2.4)	0.85	1.5 (0.7-3.4)	0.34	0.86 (0.3-2.2)	0.76	1.1 (0.4-2.5)	0.89
Mm Imm	0.98 (0.3-2.8)	0.97	0.9 (0.3-3.3)	0.98	0.3 (0.04-3)	0.20	0.87 (0.2-3.8)	0.86	1.1 (0.3-3.7)	0.9
Mm Imm GvH	0.2 (0.02-2.1)	0.2	NV		NV		NV		NV	

segue a pag. 91

segue da pag. 90

	GvHDa		GvHDa grado ≥ 2		GvHDc		Relapse		RFS	
	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p
CTL7										
Mm	0.72 (0.3-1.5)	0.36	0.8 (0.4-1.9)	0.67	0.7 (0.3-1.5)	0.35	1.2 (0.4-3.1)	0.72	1.1 (0.5-2.6)	0.8
Mm Imm	NV		NV		NV		NV		NV	
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
DPH1										
Mm	2.3 (1.1-4.7)	0.02	2.7 (1.2-6.05)	0.02	1.6 (0.7-3.8)	0.3	1.1 (0.4-3.2)	0.8	1.4 (0.5-3.4)	0.43
Mm Imm	5.1 (0.6-45.8)	0.12			NV		NV		NV	
Mm Imm GvH	NV				NV		NV		NV	
DRN7										
Mm	1.3 (0.6-2.8)	0.42	1.2 (0.5-2.8)	0.69	0.9 (0.4-2.3)	0.87	1.2 (0.4-3.2)	0.75	1.1 (0.4-2.7)	0.88
Mm Imm	NV		NV		NV		NV		NV	
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
HA-1										
Mm	1.1 (0.5-2.2)	0.84	0.8 (0.3-1.8)	0.58	1.1 (0.5-2.5)	0.8	0.6 (0.2-1.7)	0.35	0.6 (0.2-1.3)	0.19
Mm Imm	0.2 (0.03-1.6)	0.14	NV		0.5 (0.06-3.5)	0.47	0.6 (0.07-4)	0.57	0.5 (0.08-3.4)	0.44
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
HA-2										
Mm	0.8 (0.4-1.8)	0.7	1.3 (0.6-2.9)	0.53	0.36 (0.1-0.97)	0.04	2.7 (1-7.1)	0.04	2.5 (1.1-5.9)	0.038
Mm Imm	0.6 (0.1-4.7)	0.66	1 (0.1-7.5)	0.99	0.98 (0.1-7.3)	0.98	NV		NV	
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
HA3										
Mm	0.57 (0.3-1.2)	0.13	0.7 (0.3-1.6)	0.4	1.2 (0.5-2.7)	0.66	0.4 (0.1-1.2)	0.12	0.5 (0.2-1.3)	0.18
Mm Imm	NA	NA	NV		NV		Nv		NV	
Mm Imm GvH	NA	NA	NV		NV		Nv		NV	
HA-8										
Mm	1.2 (0.6-2.5)	0.6	1.5 (0.7-3.5)	0.32	1.6 (0.7-3.6)	0.27	0.44 (0.2-1.2)	0.11	0.6 (0.2-1.4)	0.25
Mm Imm	0.73 (0.3-1.9)	0.52	0.8 (0.3-2.5)	0.77	0.9 (0.3-3.4)	0.92	1.2 (0.4-3.8)	0.71	1.3 (0.5-3.5)	0.64
Mm Imm GvH	1.2 (0.1-10.6)	0.9	1.8 (0.2-17.2)	0.62	1.9 (0.2-21.7)	0.6	NV		6.5 (0.4-103.8)	0.19

segue a pag. 92

segue da pag. 91

	GvHDa		GvHDa grado ≥ 2		GvHDc		Relapse		RFS	
	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p
HB-1										
Mm	1.7 (0.8-3.7)	0.15	1 (0.4-2.6)	0.97	1.2 (0.5-3.1)	0.67	0.61 (0.2-2.2)	0.48	0.7 (0.2-2.1)	0.52
Mm Imm	1.1 (0.2-4.5)	0.93	0.7 (0.09-5.08)	0.71	1.5 (0.3-6.4)	0.59	2 (0.2-15.3)	0.51	1.6 (0.2-12.4)	0.63
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
HEATR										
Mm	0.85 (0.4-1.7)	0.66	0.7 (0.3-1.6)	0.38	1.1 (0.5-2.6)	0.78	0.7 (0.3-1.9)	0.5	0.8 (0.3-1.9)	0.66
Mm Imm	NV		NV		NV		NV		NV	
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
LB-ADIR										
Mm	1.8 (0.9-3.7)	0.1	1.9 (0.8-4.5)	0.12	1.1 (0.5-2.4)	0.87	0.37 (0.1-1)	<u>0.06</u>	0.4 (0.2-10.9)	<u>0.08</u>
Mm Imm	0.9 (0.3-2.4)	0.87	0.7 (0.2-2.4)	0.57	0.96 (0.3-3.2)	0.95	0.8 (0.2-3.5)	0.76	0.9 (0.3-3.4)	0.99
Mm Imm GvH	0.7 (0.1-4.1)	0.65	0.5 (0.04-5.3)	0.55	2.7 (0.2-30.6)	0.41	0.8 (0.05-13.4)	0.89	0.5 (0.04-5.3)	0.55
ECGF										
Mm	1.7 (0.7-4.2)	0.23	1.3 (0.4-3.9)	0.61	0.3 (0.05-1.4)	0.13	1.6 (0.5-5)	0.39	1.6 (0.6-4.5)	0.32
Mm Imm	0.8 (0.1-5.9)	0.84	1.3 (0.29-4)	0.82	0.8 (0.1-5.9)	0.85	NV		0.8 (0.1-5.7)	0.8
Mm Imm GvH	NV		NV		2.4 (0.1-39.7)	0.53	NV		1.4 (0.08-23.6)	0.81
LY75										
Mm	0.7 (0.3-1.5)	0.33	0.4 (0.2-1.2)	0.1	1.3 (0.6-3.1)	0.51	0.84 (0.3-2.3)	0.72	0.8 (0.3-1.9)	0.58
Mm Imm	NV		NV		2.9 (0.4-21.9)	0.3	NV		1.7 (0.2-12.5)	0.62
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
MR1										
Mm	1.6 (0.7-3.3)	0.23	1.3 (0.6-3.1)	0.52	1.3 (0.5-3.1)	0.53	2.5 (0.9-6.4)	<u>0.07</u>	2 (0.9-4.9)	0.1
Mm Imm	1.8 (0.8-4.3)	0.15	2.1 (0.8-5.4)	0.12	1.5 (0.6-3.6)	0.4	1.5 (0.5-4.5)	0.5	1.5 (0.5-4.1)	0.44
Mm Imm GvH	0.4 (0.09-1.9)	0.25	0.2 (0.04-1.4)	0.11	0.5 (0.08-3)	0.43	3.2 (0.3-31.2)	0.31	1.7 (0.3-10.4)	0.55
MTHFD										
Mm	1.2 (0.6-2.4)	0.65	1.1 (0.5-2.6)	0.77	0.6 (0.3-1.5)	0.32	1.5 (0.6-3.8)	0.43	1.7 (0.7-4.1)	0.21
Mm Imm	2.6 (0.8-8.7)	0.11	3.9 (1.1-13.3)	0.03	0.5 (0.07-3.7)	0.49	1.9 (0.4-8.9)	0.38	1.5 (0.3-6.5)	0.58
Mm Imm GvH	0.4 (0.02-6.6)	0.53	0.41 (0.02-6.6)	0.53	NV		NV		NV	

segue a pag. 93

segue da pag.92

	GvHDa		GvHDa grado ≥2		GvHDc		Relapse		RFS	
	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p	HR	p
LRH										
Mm	0.86 (0.4-1.8)	0.7	0.98 (0.4-2.3)	0.98	2.3 (1-5.4)	0.04	0.3 (0.09-1.1)	<u>0.07</u>	0.5 (0.2-1.3)	0.14
Mm Imm	1.4 (0.3-5.9)	0.6	0.7 (0.09-4.9)	0.69	1.5 (0.3-6.4)	0.59	NV		0.5 (0.06-3.6)	0.48
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
P2RX7										
Mm	1.6 (0.8-3.4)	0.17	1.1 (0.5-4.5)	0.86	1.4 (0.6-3.3)	0.38	0.6 (0.2-1.8)	0.37	0.6 (0.2-1.5)	0.28
Mm Imm	1.3 (0.4-4.3)	0.65	2.1 (0.6-7)	0.24	0.3 (0.04-2.4)	0.27	2.1 (0.6-7.3)	0.25	1.6 (0.5-5.6)	0.43
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		0.8 (0.07-10.3)	0.92	0.88 (0.07-10.3)	0.91
PTK2B										
Mm	0.9 (0.4-1.8)	0.73	0.6 (0.3-1.5)	0.29	1 (0.5-2.3)	0.9	1.3 (0.3-3.3)	0.62	1.5 (0.6-3.6)	0.35
Mm Imm	0.3 (0.04-2.4)	0.28	0.5 (0.07-3.9)	0.54	0.9 (0.1-6.5)	0.9	0.7 (0.09-5.6)	0.77	0.6 (0.08-4.5)	0.62
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
UGT										
Mm	3.6 (1.6-8.4)	0.003	3.4 (1.4-8.5)	0.008	0.7 (0.2-2.5)	0.65	0.7 (0.1-2.9)	0.8	1.6 (0.6-4.3)	0.93
Mm Imm	NV		NV		NV		3.3 (0.5-30.8)	0.19	3 (0.4-22.8)	0.29
Mm Imm GvH	NV		NV		NV		NV		NV	
UTA2										
Mm	0.7 (0.3-1.5)	0.35	1.3 (0.5-3)	0.59	1.3 (0.5-3.1)	0.57	1.4 (0.5-3.9)	0.46	1.3 (0.5-3.3)	0.54
Mm Imm	0.7 (0.2-2.4)	0.63	1.2 (0.3-4.1)	0.76	1.2 (0.3-3.9)	0.8	1.1 (0.2-4.8)	0.91	0.87 (0.2-3.7)	0.85
Mm Imm GvH	0.4 (0.04-5.8)	0.51	0.4 (0.04-5.1)	0.51	0.6 (0.05-6.3)	0.65	NV		NV	
N° Mm	1.3 (0.6-3.1)	0.52	1.04 (0.9-1.1)	0.41	1.02 (0.9-1.1)	0.66	1 (0.9-1.1)	0.98	1 (0.9-1.1)	0.71
Mm imm	1 (0.8-1.20)	0.97	0.99 (0.82-1.2)	0.99	0.98 (0.8-1.2)	0.84	1.05 (0.8-1.3)	0.68	1 (0.8-1.3)	0.64
Mm imm GvH	0.9 (0.6-1.3)	0.7	0.8 (0.5-1.3)	0.33	1.07 (0.7-1.7)	0.76	1.1 (0.7-1.8)	0.60	1.1 (0.7-1.7)	0.69
Mm imm HvG	1 (0.8-1.3)	0.77	1.1 (0.8-1.4)	0.52	0.9 (0.7-1.2)	0.62	1 (0.7-1.5)	0.82	1.1 (0.88-1.5)	0.70

Mm: mismatch genomico; Mm imm: mismatch immunogeno; Mm imm GvH: mismatch immunogeno in direzione Graft vs Host; Mm imm HvG: mismatch immunogeno in direzione Host vs Graft.

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo Progetto di Dottorato è stata possibile grazie alla preziosa guida del **Prof. Domenico Russo** con la collaborazione di tutto lo Staff della Cattedra di Ematologia dell'Università degli Studi di Brescia.

Inoltre sono stati fondamentali la guida del **Prof. Giovanni Martinelli** e la collaborazione straordinaria ed affettuosa trasformatasi in amicizia con:

Ilaria Iacobucci, Simona Soverini, Emanuela Ottaviani, Carolina Terragna, Maria Teresa Bochicchio, Viviana Guadagnuolo, Caterina De Benedittis, Marina Martello, Claudia Venturi, Anna Ferrari, Flores Dico del Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto di Ematologia "L.&A. Seràgnoli", Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna. Hanno supportato la fase di disegno dell'esperimento, mi hanno permesso l'accesso alla loro Bio-banca e soprattutto hanno dimostrato grande disponibilità nell'accogliermi presso il Laboratorio;

Maria Rosa Motta, Simonetta Rizzi, Elisa Dan del Laboratorio Trapianti, Istituto di Ematologia "L.&A. Seràgnoli", Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna che hanno fornito il materiale biologico relativo a un cospicuo numero di pazienti e donatori;

Francesca Bonifazi, Mario Arpinati e lo Staff Sezione BCM, Istituto di Ematologia "L.&A. Seràgnoli", Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna. Hanno fornito un'importante supporto nell'identificazione dei pazienti da inserire nello studio e hanno permesso la consultazione della documentazione sanitaria necessaria alla raccolta delle informazioni cliniche.

Inoltre ringrazio per l'eccezionale collaborazione:

Vilma Mantovani, Elena Marasco e Massimiliano Bonafè del Centro Unificato di Ricerca Biomedica Applicata, Università di Bologna che hanno dato un contributo fondamentale al disegno e alla conduzione dell'esperimento mediante iPlex Gold Mass Array Sequenom e hanno fornito il materiale biologico relativo ad alcuni donatori;

Graziella Carella e Alberto Malagoli del Laboratorio di Tipizzazione HLA, Cattedra di Immunologia e Reumatologia Clinica, Università degli Studi di Brescia che hanno collaborato eseguendo la tipizzazione HLA mediante tecnologia SSO-Luminex;

Andrea Bontadini, Centro di Tipizzazione HLA, Policlinico S.Orsola Malpighi, Bologna che mi ha gentilmente fornito copia delle tipizzazioni HLA eseguite su alcune coppie donatore/ricevente e ha dato disponibilità all'accesso alla Bio-banca presente nel laboratorio.

Ringrazio immensamente anche:

Katia Accorsi, Michele Iacono e Francesca Dal Pero di Roche Diagnostics per la fornitura degli Assay Gs GType HLA necessari alla tipizzazione HLA mediante NGS e il supporto durante l'esecuzione delle run di sequenziamento;

Geoffrey Henno e Volker Horejschi del JSI Medical Systems che mi hanno dato la possibilità di testare il software necessario all'analisi e alla codifica della nomenclatura HLA dei dati ottenuti mediante NGS.

La realizzazione del Progetto non sarebbe stata possibile senza la preziosa collaborazione dei Centri Ematologici Italiani che hanno contribuito alla definizione della casistica fornendo il materiale biologico e le informazioni cliniche riguardanti i pazienti. Ringrazio quindi infinitamente:

Pina Romeo, Bruno Martino e Giuseppe Console, U.O. Ematologia, Azienda Ospedaliera "Bianchi Melacrino Morelli" di Reggio Calabria;

Alessandra Santoro e Francesco Fabbiano, U.O. Ematologia con UTMO, Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello, Palermo;

Eleonora Toffoletti e Daniela Damiani, Clinica Ematologica, Ospedale di Udine;

Prof.ssa Giorgina Specchia e Domenico Pastore, Ematologia con Trapianto, Policlinico di Bari.