



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

**Scuola di Dottorato in**

**Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Corso di Dottorato di Ricerca in Ematologia Sperimentale**

**Ciclo XXIV**

**TESI DI DOTTORATO**

**RICOSTITUZIONE IMMUNITARIA IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A  
TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI  
EMOPOIETICHE: VALUTAZIONI A LUNGO TERMINE**

**Tutor: Prof. Paolo Corradini**

**Candidato: Dr. Antonio Vendramin**

**Matricola N° R08054**

**Anno Accademico 2010-2011**

## **INDICE**

<b>Capitolo I – Introduzione.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Trapianto di cellule staminali emopoietiche.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Fonti di cellule staminali.....</i>	<i>1</i>
1.3 <i>Il sistema HLA e la compatibilità ricevente/donatore.....</i>	<i>2</i>
1.4 <i>Tipologie di trapianto.....</i>	<i>4</i>
1.5 <i>Reazione del trapianto contro l'ospite e contro il tumore (GVHD/GVL).....</i>	<i>6</i>
1.6 <i>Valutazioni post trapianto.....</i>	<i>8</i>
1.7 <i>Ricostituzione Immunitaria.....</i>	<i>10</i>
1.7.1 <i>Ricostituzione immunità innata.....</i>	<i>11</i>
1.7.2 <i>Ricostituzione immunità adattativa.....</i>	<i>12</i>
1.7.3 <i>Ricostituzione immunitaria a lungo termine.....</i>	<i>14</i>
1.7.3 <i>Metodiche di analisi.....</i>	<i>15</i>
<b>Capitolo II - Scopo del Lavoro.....</b>	<b>23</b>
<b>Capitolo III - Materiali e Metodi.....</b>	<b>25</b>
3.1 <i>Caratteristiche dei pazienti.....</i>	<i>25</i>
3.1.1 <i>Condizionamento, trapianto e attecchimento.....</i>	<i>28</i>
3.2 <i>Separazione cellule mononucleate da sangue periferico con gradiente di densità Ficoll-Hypaque.....</i>	<i>28</i>
3.3 <i>Estrazione DNA genomico.....</i>	<i>29</i>
3.4 <i>Estrazione RNA totale.....</i>	<i>30</i>
3.5 <i>Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA.....</i>	<i>33</i>
3.6 <i>Reazioni qualitative per l'amplificazione degli acidi nucleici.....</i>	<i>34</i>
3.6.1 <i>PCR multiplex per l'analisi dei microsatelliti.....</i>	<i>34</i>
3.6.2 <i>PCR per l'amplificazione delle catene <math>\beta</math> del TCR.....</i>	<i>36</i>

## Indice

3.6.3 PCR per l'amplificazione delle regioni CDR3 delle immunoglobuline.....	38
3.7 Reazioni quantitative per l'amplificazione degli acidi nucleici.....	41
3.7.1 Real-time PCR per la quantificazione dei sjTREC.....	41
3.8 Elettroforesi su gel di Agarosio.....	43
3.9 Elettroforesi Capillare.....	44
3.10 Analisi mediante GeneMapper.....	45
3.11 Citometria a flusso.....	45
3.12 Analisi Statistiche.....	49
<b>Capitolo IV - Risultati.....</b>	<b>50</b>
4.1 Risultati Clinici.....	50
4.2 Attecchimento del trapianto e analisi del chimerismo.....	51
4.3 Analisi della Ricostituzione Immune.....	52
4.3.1 Immunofenotipo.....	52
4.3.2 Valutazione della funzionalità timica.....	67
4.3.3 Complessità del repertorio linfocitario T.....	69
4.3.4 Complessità del repertorio linfocitario B.....	70
<b>Capitolo V - Discussione.....</b>	<b>72</b>
<b>Capitolo VI - Conclusioni.....</b>	<b>80</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>83</b>

**Indice Abbreviazioni:**

**aGVHD – GVHD acuta**

**APC – cellule presentanti l'antigene**

**ASO-PCR – reazione a catena della polimerasi oligonucleotide specifica**

**cDNA – DNA complementare**

**CDR – regione determinante la complementarità**

**cGVHD – GVHD cronica**

**DMSO – dimetilsolfossido**

**DNA – acido desossiribonucleico**

**dNTPs – desossinucleotidi trifosfati**

**EDTA – acido etilendiamminotetraacetico**

**FBS – siero fetale bovino**

**FR – regione frame-work**

**GAPDH – gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi**

**G-CSF – fattore stimolante le colonie granulocitarie**

**GVHD – malattia del trapianto contro l'ospite**

**GVT/GVL – reazione del trapianto contro il tumore**

**HGPRT – ipoxantina - guanina fosforibosil transferasi**

**HLA – antigene leucocitario umano**

**HSC – cellule staminali emopoietiche**

**Ig – immunoglobulina**

**IgH – catena pesante dell'immunoglobulina**

**KIR – recettori simil-immunoglobulinici delle cellule natural killer**

**LH – linfoma di Hodgkin**

**LLC – leucemia linfatica cronica**

**LMA – leucemia mieloide acuta**

**LNH – linfoma non Hodgkin**

**MHC – complesso maggiore di istocompatibilità**

**MM – mieloma multiplo**

**MMRD – trapianto da donatore familiare con 1-2 loci HLA di disparità**

**MRD** – *malattia minima residua*

**mRNA** – *RNA messaggero*

**MUD** – *trapianto HLA identico da donatore familiare*

**NK** – *cellule natural killer*

**OS** – *sopravvivenza totale*

**PBS** – *buffer salino fosfato*

**PCR** – *reazione a catena della polimerasi*

**PFS** – *sopravvivenza libera da malattia*

**Real-time PCR** – *PCR quantitativa*

**RNA** – *acido ribonucleico*

**RTE** – *recent thymic emigrants*

**RT-PCR** – *reazione a catena della polimerasi a partire da cDNA*

**STR** – *corte ripetizione nucleotidiche in tandem*

**TBE** – *tris borato EDTA*

**TBI** – *irradiazione di tutto il corpo (total body irradiation)*

**TCR** – *recettore dei linfociti T*

**TdT** – *terminal disossi transferasi*

**TMO** – *trapianto di midollo osseo*

**TMR** – *mortalità legata a procedure trapiantologiche*

**TREC** – *T-Cell Receptor Excision Circles*

**TX** – *trapianto*

**V $\beta$**  – *segmenti variabili della catena  $\beta$  del TCR*

## **CAPITOLO I**

### **INTRODUZIONE**

#### **1.1 Trapianto di cellule staminali emopoietiche**

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche è un'importante opzione terapeutica per la cura di numerose patologie ematologiche sia acquisite (aplasia midollare, neoplasie ematologiche) che congenite (emoglobinopatie). L'obiettivo del trapianto è quello di sostituire il compartimento emopoietico deficitario del paziente con un patrimonio di cellule staminali in grado di ricostruire e sostenere la normale attività emopoietica ed immunitaria a lungo termine. Le prime evidenze sull'applicabilità di questo trattamento derivano da studi effettuati verso la metà del secolo scorso nei quali si dimostra il recupero della funzionalità emopoietica in topi sottoposti ad ablazione midollare ed in seguito infusi con cellule derivate da midollo osseo di topo singenico (geneticamente identico) (Lorenz E *et al*, 1951) o prelevate dal topo stesso prima dell'irradiazione (Mannick JA *et al*, 1960). Le prime applicazioni sull'uomo risalgono al 1959 quando Thomas fu in grado di indurre una remissione clinica in una paziente affetta da leucemia in stadio avanzato dopo trapianto di midollo osseo prelevato dalla sorella gemella (Thomas ED *et al*, 1959). Ulteriori progressi furono compiuti in seguito alla scoperta ed alla tipizzazione del complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex - MHC*) avvenuta negli anni 60 che permise di estendere la tecnica trapiantologica ad un maggior numero di pazienti.

#### **1.2 Fonti di cellule staminali:**

La procedura per il trapianto di cellule staminali emopoietiche prevede l'isolamento delle cellule, attraverso metodiche differenti a seconda della fonte cellulare di partenza, e quindi l'infusione per via endovenosa delle stesse dopo appositi schemi di condizionamento del

ricevente. Una volta in circolo le staminali emopoietiche sono in grado di localizzarsi nel loro microambiente grazie a specifiche chemochine (CXCR4) e molecole di adesione (VLA-4).

Nella pratica odierna le cellule staminali emopoietiche, identificate grazie al marcatore di superficie CD34, possono essere isolate da tre diverse fonti cellulari:

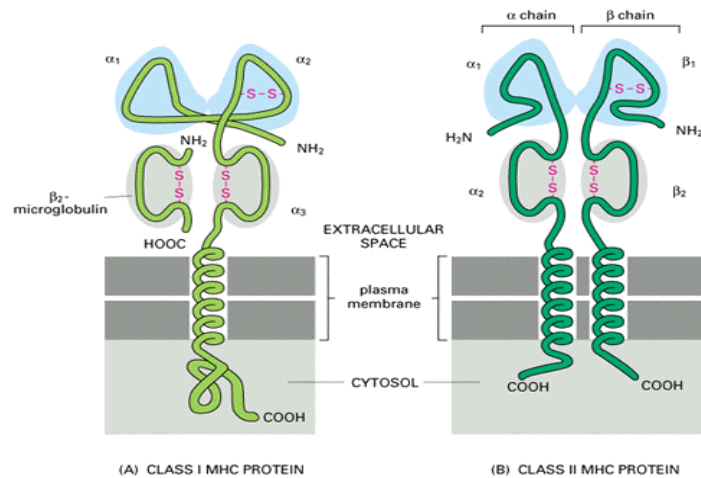
- sangue di cordone ombelicale;
- midollo osseo;
- sangue periferico dopo mobilizzazione con chemioterapia/citochinica (G-CSF).

Le tre fonti cellulari hanno caratteristiche qualitative differenti che incidono sui risultati del trapianto. Delle tre il sangue di cordone ombelicale permette di isolare cellule meno differenziate. Questo riduce l'incidenza di fenomeni avversi come la malattia del trapianto contro l'ospite (*graft versus host disease* - GVHD) ma rallenta l'attecchimento del trapianto prolungando il periodo di neutropenia ed esponendo il paziente ad un aumentato rischio di contrarre infezioni opportunistiche (Hamza NS *et al*, 2004). Inoltre la possibilità di isolare un numero di cellule sufficiente per rendere la procedura applicabile anche in pazienti non pediatrici rimangono limitate. Negli ultimi anni tuttavia si stanno sviluppando approcci di manipolazione cellulare per espandere in vitro sia le cellule staminali che le cellule mature in modo da rendere il trapianto possibile anche in pazienti adulti senza esporli ad un periodo eccessivamente prolungato di neutropenia.

Le altre due fonti cellulari sembrano essere paragonabili in quanto ad efficienza di isolamento e proprietà cellulari (efficacia di attecchimento duraturo, vitalità cellulare). Va però considerato che l'isolamento di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico, dopo mobilizzazione, risulta tecnicamente più semplice e consente di isolare un numero maggiore di cellule totali dal donatore. Questo consente una migliore efficacia nelle strategie di "purging", ovvero nelle metodiche atte a "ripulire" il trapianto dalle frazioni cellulari indesiderate, nonché un aumento nella velocità di attecchimento (JJ Auletta et HM Lazarus, 2005).

### **1.3 Il sistema HLA e la compatibilità ricevente/donatore:**

Uno dei fattori che maggiormente influisce sull'esito del trapianto di cellule staminali emopoietiche è il grado di omologia genetica tra il donatore ed il ricevente per il locus MHC (sistema maggiore di istocompatibilità) dove mappano i geni HLA (*human leukocyte antigens*). I geni che codificano per gli antigeni leucocitari umani sono localizzati sul braccio corto del cromosoma 6 e sono raggruppati in due classi principali. Questi codificano per delle glicoproteine transmembrana coinvolte nei meccanismi di riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti T (Fig. 1.1).



**Fig.1.1: Rappresentazione grafica delle glicoproteine transmembrana codificate dai geni HLA. Sulla sinistra è rappresentata la molecola MHC di classe I mentre sulla destra la proteina MHC di classe II. In entrambi le classi la porzione C-terminale crea una coda citoplasmatica coinvolta nella traduzione del segnale mentre la tasca di legame all'epitopo è formata dalla porzione N-terminale della proteina.**

Le proteine HLA di classe I sono sintetizzate da tutte le cellule nucleate di un individuo e mediano il riconoscimento antigenico da parte dei linfociti T citotossici nonché da parte dei linfociti Natural Killer (NK). Questo meccanismo è fisiologicamente coinvolto nella difesa da infezioni virali e delle trasformazioni neoplastiche. Al contrario le molecole HLA di classe II sono espresse solo da particolari tipi di cellule (o in particolari condizioni) che prendono il nome di APC professionali (cellule presentanti l'antigene o *antigen presenting cells*) (Tab. 1.1). La funzione di queste ultime è quella di stimolare i linfociti T helper attraverso l'esposizione di antigeni non-self con conseguente attivazione della risposta immunitaria adattativa.



Tissue	MHC class I	MHC class II
<b>Lymphoid tissues</b>		
T cells	+++	+*
B cells	+++	+++
Macrophages	+++	++
Other antigen-presenting cells (eg Langerhans' cells)	+++	+++
Epithelial cells of the thymus	+	+++
<b>Other nucleated cells</b>		
Neutrophils	+++	-
Hepatocytes	+	-
Kidney	+	-
Brain	+	- †
<b>Non-nucleated cells</b>		
Red blood cells	-	-

APC

**Tab 1.1:** Schema in cui è sintetizzata l'espressione delle differenti classe di molecole MHC nei vari tipi cellulari. Come si nota le molecole MHC di classe due sono espresse solo dai linfociti B, dai macrofagi, dalle cellule dendritiche e dalle cellule epiteliali del timo.

Alla classe I appartengono i geni HLA-A, HLA-B, HLA-C mentre alla classe II appartengono i geni HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Questi sono raggruppati in regioni cromosomiche ristrette e pertanto la probabilità che avvengano fenomeni di ricombinazione omologa durante la meiosi sono estremamente rari. Ciò implica che gli alleli vengano ereditati insieme come *alotipi*. Sia i geni appartenenti alla classe I che quelli appartenenti alla classe II sono codominanti e sono altamente polimorfici. Per questo motivo è raro che due individui siano geneticamente identici per il loro patrimonio di antigeni maggiori di istocompatibilità.

**1.4 Tipologie di trapianto:**

Esistono due principali tipologie di trapianto che ad oggi trovano impiego nella pratica clinica: il trapianto autologo (o autotrapianto) ed il trapianto allogenico.

Il primo trova applicazione solo nel contesto neoplastico e prevede l'utilizzo di cellule staminali emopoietiche prelevate dal paziente stesso in momenti clinicamente favorevoli (remissione clinica) e conservate fino al momento del trapianto. Questo approccio non da origine a reazioni avverse come il rigetto o la reazione di attivazione del sistema immunitario contro l'ospite ma neanche ad un effetto immunoterapeutico in grado di contrastare la

malattia di base. La funzione di questo trapianto è quella di ristabilire l'emopoiesi in pazienti che vengono sottoposti a trattamenti chemio/raditerapici mieloablativi atti alla completa eradicazione della patologia neoplastica.

Il trapianto allogenico invece prevede che le cellule staminali vengano isolate da un donatore sano. Rispetto al trapianto autologo questa tipologia di trapianto è in grado di diminuire il rischio di ricaduta neoplastica e può essere applicato anche a patologie non neoplastiche. Esistono diversi tipi di trapianto allogenico che prevedono schemi terapeutici differenti e hanno conseguenze variabili in base al tipo di patologia, all'età del paziente ed al regime di condizionamento (Copeland E. *et al*, 2006). In base al grado di omologia tra paziente e donatore è possibile identificare:

- i) Trapianto singenico (da gemello monocoriale);
- ii) Trapianto da donatore familiare HLA compatibile;
- iii) Trapianto da donatore familiare HLA parzialmente compatibile (HLA *mismatch* o aploidentico);
- iv) Trapianto da donatore non familiare HLA compatibile (donatore da banca *match unrelated donor MUD*);
- v) Trapianto da donatore non familiare HLA non compatibile (donatore da banca non compatibile *mismatch unrelated donor MMUD*).

Tutte queste tipologie trapiantologiche necessitano di una fase preparatoria al trapianto che prende il nome di regime di condizionamento. Questo prevede l'esposizione del paziente a diversi schemi radio/chemioterapeutici che hanno primariamente lo scopo di eradicare la malattia oncologica di base, creare spazio nel microambiente midollare per permettere l'attecchimento delle cellule staminali somministrate e immunosopprimere il ricevente in modo da evitare i fenomeni di rigetto. In base grado di aplasia midollare causato dal regime di condizionamento questi possono essere classificati in:

- i) Regimi di condizionamento mieloablativi;
- ii) Regimi di condizionamento a ridotta intensità;
- iii) Regimi di condizionamento minimamente mieloablativi/immunosoppressivi;

I regimi mieloablativi sono associati ad una profonda aplasia midollare che si traduce in una aumentata esposizione a infezioni opportunistiche nonché ad un incremento nella tempistica del recupero emopoietico. Inoltre l'elevata tossicità tissutale, soprattutto a livello delle mucose, a livello epatico ed a livello renale, rappresenta un'ulteriore limitazione a questo approccio soprattutto in pazienti anziani o con comorbidità significative.

I condizionamenti non mieloablativi si basano su evidenze cliniche che hanno dimostrato come le cellule immunitarie mature infuse contemporaneamente alle cellule staminali siano in grado di generare un potente effetto antitumorale (*graft versus tumor - GVT*) (Copeland E. *et*

al, 2006). Grazie a questo effetto immunoterapeutico è possibile evitare di esporre il paziente a trattamenti altamente tossici diminuendo così le complicanze trapiantologiche ed aumentando il numero di soggetti trapiantabili efficacemente. Nei condizionamenti a ridotta intensità si utilizzano chemioterapici in grado di contrastare efficacemente la neoplasia di base. Generalmente questo approccio è adottato per malattie progressive (linfomi ad alto grado, linfomi di Hodgkin) che necessitano di un periodo di riduzione del carico tumorale prima che si sviluppi l'effetto GVT. I regimi minimamente mieloablativi invece si basano sulla somministrazione di soli farmaci immunosoppressori al fine di evitare il rigetto delle cellule staminali somministrate. In questo contesto non vi è alcuna aplasia midollare e l'effetto terapeutico contro le cellule tumorali è mediato esclusivamente dai linfociti del donatore. Questo regime è indicato primariamente per malattie stabili o a progressione molto lenta (mieloma multiplo, linfomi a basso grado).

Maggiore è il grado di divergenza genetica fra donatore e ricevente maggiore è il rischio di sviluppare reazioni avverse quali rigetto e malattia del trapianto contro l'ospite. Per questo motivo i pazienti sottoposti a trapianto con elevato grado di disparità genetica (aploidentici o MUD/MMUD) spesso sono sottoposti a deplezione della frazione T linfocitaria *in vivo* o *in vitro* prima del trapianto.

### **1.5 Reazione del trapianto contro l'ospite (graft versus host disease - GVHD):**

Una delle principali complicazioni nei trapianti allogenici è rappresentata dall'attivazione del sistema immunitario trapiantato oltre che contro le cellule neoplastiche (GVT) anche nei confronti dei tessuti sani dell'ospite (GVHD). Questa reazione, mediata principalmente dai linfociti T citotossici, nel caso dei trapianti HLA-identici, si sviluppa nel 30-50% dei pazienti (Tabbara *et al*, 2002) ed è diretta contro specifici antigeni detti antigeni minori di istocompatibilità (Falkenburg *et al*, 2003). La loro presenza è dovuta principalmente a polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) che causano l'esposizione di epitopi differenti tra donatore e ricevente. Questi possono indurre un'attivazione del nuovo sistema immunitario con conseguente infiammazione e distruzione dei tessuti del paziente.

Nel contesto aploidentico e nei trapianti non perfettamente compatibili queste differenze sono ancora più marcate in quanto oltre agli antigeni minori di istocompatibilità vi è anche una differenza a livello degli antigeni maggiori di istocompatibilità che vengono riconosciuti come non-self dal nuovo sistema immunitario. Nel trapianto aploidentico inoltre va considerata l'alloreattività mediata dalle cellule *natural killer* (NK) che attraverso i loro recettori di membrana interagiscono con le molecole HLA di classe I (Ruggeri *et al*, 2007) e possono

quindi mediare una reazione citotossica contro i tessuti dell'ospite.

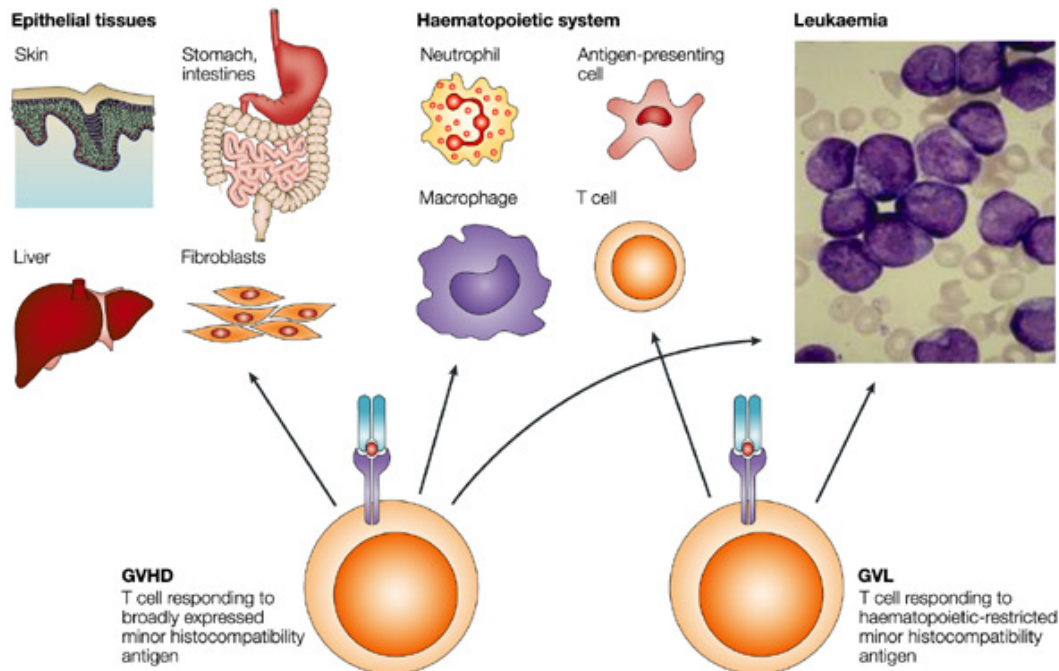
Storicamente la GVHD veniva classificata in due tipologie in base al momento di insorgenza:

- la forma acuta (aGVHD) sviluppatasi entro 100 giorni dal trapianto o in seguito all'infusione di linfociti del donatore; ha una durata relativamente breve e da origine a distruzione di tessuti e organi quali la pelle, fegato, stomaco e intestino;

- la forma cronica (cGVHD) perdura per un periodo di tempo maggiore e da origine a manifestazioni cliniche simili a quelle che si riscontrano nelle malattie autoimmuni.

Recentemente tuttavia questa classificazione è stata rivista stabilendo che il criterio puramente temporale non può più essere un fattore discriminante fra le due manifestazioni.

Lo sviluppo di questo tipo di reazioni è correlato anche al grado di infiammazione indotto dai regimi di condizionamento. Regimi di condizionamento mieloablativi causano danni a livello delle mucose, in particolare quella gastrointestinale, inducendo lo sviluppo di una risposta infiammatoria il cui risultato è l'attivazione della cellule presentanti l'antigene. Queste ultime sono fondamentali nell'esposizione degli antigeni self ai linfociti del donatore con conseguente attivazione della risposta immunitaria (Murai M. *et al*, 2003). (Fig. 1.2)



Nature Reviews | Cancer

**Fig. 1.2: Schematizzazione degli effetti GVHD e GVL nel contesto allogenico. Nella figura vengono indicati i principali tessuti bersaglio di queste risposte. (Bleakley M, 2004)**

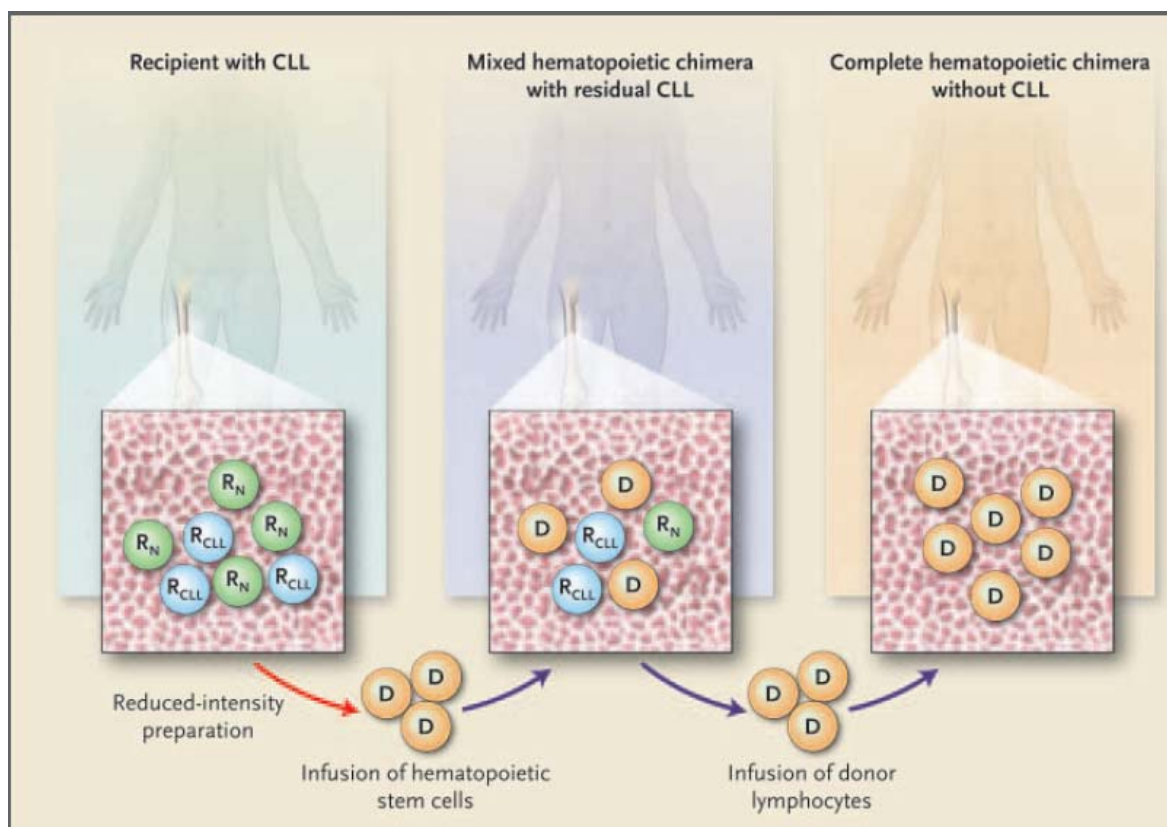
### **1.6 Valutazioni post trapianto di cellule staminali emopoietiche:**

In seguito a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche è necessario monitorare i pazienti al fine di valutare l'esito della procedura. Questo monitoraggio valuta la funzionalità emopoietica, l'origine delle cellule mature nel ricevente ed il tempo di ripresa della funzione immunitaria ed in particolare di quella T linfocitaria.

La prima analisi effettuata è la valutazione dell'attecchimento delle cellule staminali somministrate. Questo viene indagato mediante quantificazione delle sottopopolazioni emopoietiche presenti nel sangue periferico attraverso conta emocromocitometrica. In questo modo è possibile avere una stima della produttività midollare. L'attecchimento del trapianto, indipendentemente dalla tipologia trapiantologia, è avvenuto quando i neutrofilii e le piastrine nel sangue periferico raggiungono una conta rispettivamente superiore a 500/ $\mu$ l e 20.000/ $\mu$ l.

Un'ulteriore analisi che permette di stabilire la buona riuscita del trapianto è la valutazione del chimerismo. Questa viene effettuata a partire da momento dell'attecchimento ed è ripetuta ad intervalli regolari post trapianto al fine di monitorare se le cellule staminali infuse abbiano acquisito la funzione emopoietica e possano quindi sostenere lo sviluppo delle linee mieloidi e linfoidi a lungo termine (Fig. 1.3)

Questa valutazione permette di stabilire la percentuale di cellule del sistema emopoietico originatesi a partire dalle cellule staminali trapiantate del donatore rispetto alla quantità di cellule residue del ricevente.



**Fig. 1.3:** Schema illustrativo del processo di formazione di una chimera completa dopo trapianto di staminali emopoietiche in seguito a regime di condizionamento a ridotta intensità e infusione di linfociti del donatore. Per un periodo di tempo variabile il ricevente presenterà sia cellule del donatore che cellule proprie.

La condizione di completo chimerismo si raggiunge quando la percentuale di cellule del donatore risulta maggiore del 95%.

Esistono molte tecniche di analisi differenti basate sullo studio fenotipico degli eritrociti, sull'identificazione mediante "Ibridazione Fluorescente *In Situ*" (FISH) dei cromosomi del sesso X e Y come marcatori di popolazioni cellulari derivanti da individui di sesso diverso, e sulla presenza di alleli polimorfici altamente variabili tra cellule del donatore e ricevente (Khan *et al*, 2004).

Nel nostro laboratorio si utilizza una tecnica basata sull'amplificazione mediante PCR (più specifica e sensibile rispetto ad altre tecniche) di 9 alleli polimorfici appartenenti alla classe degli *short tandem repeats* (STR). Questi sono frammenti genici di circa 150bp costituiti da una serie di ripetizioni di 2-6 nucleotidi. Gli STR sono elementi sparsi nel genoma (DNA microsatellite) e generalmente fiancheggiati da sequenze uniche che ne permettono l'amplificazione con oligonucleotidi specifici. Il numero delle ripetizioni è variabile da allele ad allele ed è dovuto allo "slittamento" della DNA polimerasi nel processo di duplicazione del DNA.

L'analisi del chimerismo viene effettuata nei giorni +30, +60, +90, +120 e +180 dopo il

trapianto per valutare la presenza delle cellule del donatore nel midollo o nel sangue periferico del paziente.

### **1.7 Ricostituzione immunitaria:**

La valutazione della ricostituzione del sistema immunitario è una procedura fondamentale per il monitoraggio dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico. Infatti l'insorgenza di infezioni opportunistiche, la ricaduta neoplastica e lo sviluppo di neoplasie secondarie sono fenomeni in ultima analisi imputabili ad un alterato funzionamento dell'immunità.

La cinetica del recupero immunitario può essere suddivisa in tre fasi in base alla suscettibilità ad agenti infettivi ed alla tipologie di cellule immunitarie presenti nel sangue periferico (Fig. 1.4) (Mackall *et al*, 2009):

- i) Fase pre-attecchimento: Fase di aplasia midollare la cui durata è variabile in base all'intensità del regime di condizionamento. Questa fase è prolungata nei pazienti sottoposti a regimi mieloablativi rispetto a pazienti sottoposti a regimi a ridotta intensità mentre pazienti sottoposti a regimi esclusivamente immunosoppressivi non ne sono soggetti. La caratteristica neutropenia è associata in particolare ad un incremento nella suscettibilità a infezioni fungine (aspergillosi) e batteriche (gram positivi, negativi e streptococchi);
- ii) Fase precoce post-attecchimento: Fase successiva all'attecchimento e quindi associata ad un recupero della conta dei neutrofili. Perdura per i primi tre/quattro mesi dall'attecchimento ed è caratterizzata da un difetto dell'immunità cellulo-mediata associata ad una ridotta conta T linfocitaria. La complicanza principale di questo periodo è la riattivazione del Citomegalovirus (CMV) specialmente in pazienti con infezione latente che ricevono cellule da un donatore non immunizzato. Il deficit linfocitario inoltre si traduce in un generale incremento nella suscettibilità ad infezioni virali ed opportunistiche di varia natura. L'insorgenza di GVHD può prolungare questa fase rallentando il recupero immunitario ed incrementando ulteriormente il rischio infettivo;
- iii) Fase inoltrata post-attecchimento: Fase in cui si ha un generale recupero delle conte linfocitarie anche se spesso perdurano deficit immunoglobulinici. Questo espone i pazienti ad una riduzione nella risposta verso batteri capsulati quali *S. Pneumonie*. La ricostituzione immunitaria in questa fase è comunque fortemente influenzata dall'insorgenza di GVHD cronica che può prolungare lo stato di immunodeficienza in modo indefinito.

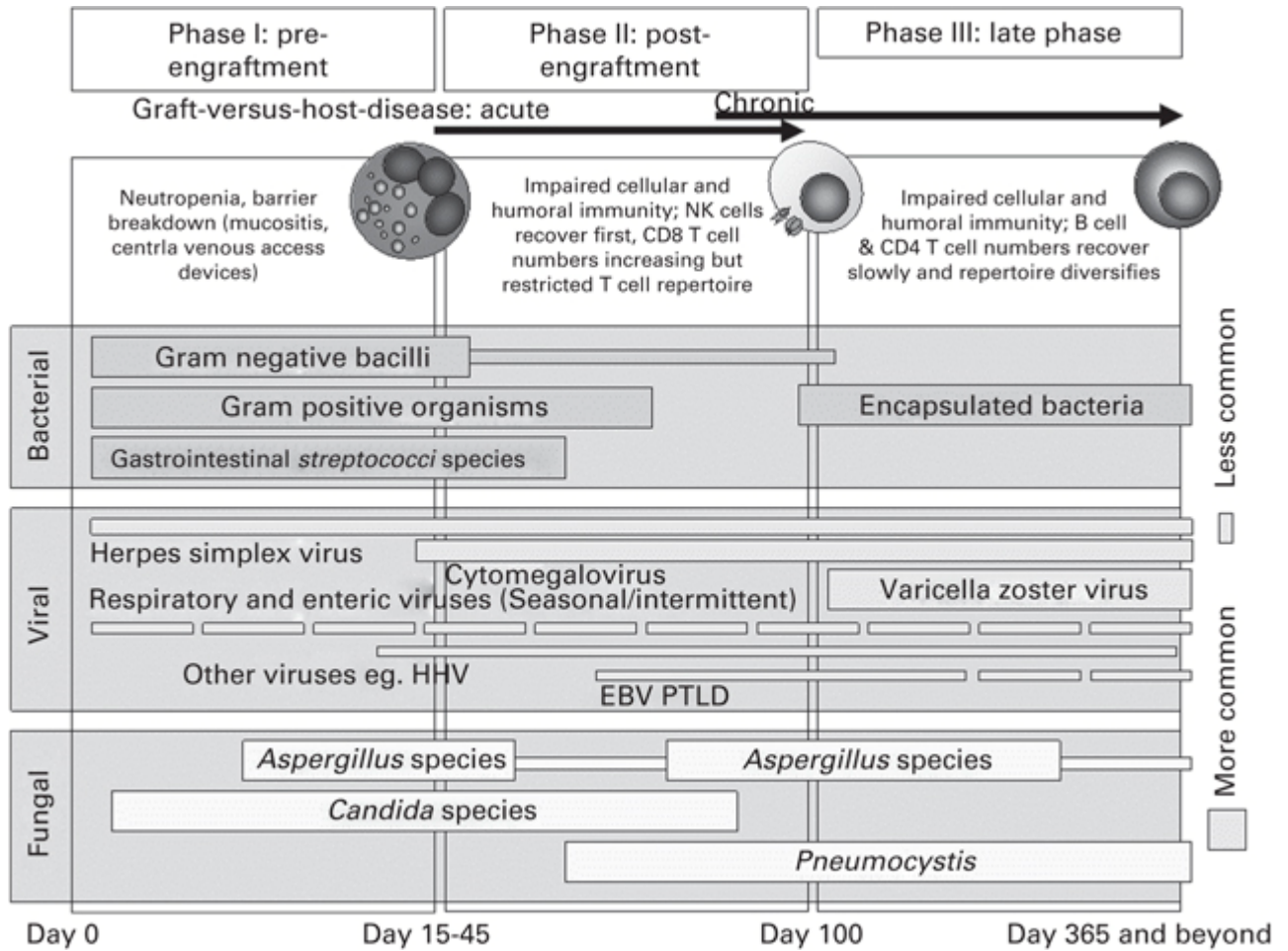


Fig. 1.4: Schema illustrativo del processo di recupero immunitario in base alla suscettibilità agli agenti infettivi ed alle cellule presenti nel sangue periferico.

### 1.7.1 Ricostituzione immunità innata:

L'immunità innata è composta sia da fattori solubili che da popolazioni cellulari impiegati in modo diretto nell'eliminazione dei patogeni oltre che in modo indiretto nell'attivazione dell'immunità adattativa.

I fattori solubili dell'immunità innata quali le proteine della cascata complementare non sono deficienti in pazienti allotrapiantati in quanto sintetizzate principalmente a livello epatico. Tuttavia la loro produzione può essere deficitaria nel caso si sviluppi una reazione GVHD a livello epatico che può ridurre drasticamente i livelli plasmatici (Geddes M e Storek J, 2007).

La neutropenia causata da regimi di condizionamento mieloablativi perdura fino ad una mediana di 16 giorni dal trapianto. L'utilizzo di cellule mobilizzate da sangue periferico e di regimi di condizionamento a ridotta intensità tuttavia hanno velocizzato il tempo di recupero della conta neutrofila fino ad una mediana di 12 giorni (Przepiora D, et al 2001).



Il compartimento macrofagico/monocitario ricostituisce in tempi estremamente brevi (30 giorni) anche se la fonte di cellule staminali e lo sviluppo di reazioni avverse come la GVHD ne possono prolungare il tempo di recupero (Storek J, *et al* 2001).

Le cellule presentanti l'antigene raggiungono conte paragonabili a quelle prima del trapianto in un tempo variabile a seconda della loro sede tissutale, del regime di condizionamento e del tipo di trapianto (manipolato o non). Le cellule del Langerhans (APC epiteliali) recuperano in un tempo medio compreso fra i 3 ed i 6 mesi, anche se lo sviluppo di GVHD ne può prolungare l'assenza. Le cellule dendritiche mieloidi raggiungono i normali livelli di conta nel sangue periferico a 3 mesi dal trapianto mentre il numero di cellule dendritiche plasmocitoidi può rimanere basso fino ad 1 anno ed oltre dal trapianto. Infine le cellule dendritiche follicolari, importanti per il processo di maturazione dei linfociti B a livello dei centri germinativi, rimangono al di sotto di valori normali fino ad 1 anno dal trapianto. Tendenzialmente pazienti che subiscono trapianto di staminali da donatore HLA identico con condizionamento a ridotta intensità hanno un di recupero del compartimento dendritico migliore (Geddes M e Storek J, 2007).

Le *cellule natural killer (NK)* sono cellule di origine linfoide in grado di interagire con le molecole MHC di classe I e sono fisiologicamente coinvolte nella protezione dalle infezioni virali. La loro conta dopo trapianto raggiunge valori normali ad un mese dal trapianto stesso indipendentemente dal regime di condizionamento e dalla fonte cellulare utilizzata (Storek J, *et al* 2001). La loro azione in vivo sembra correlata ad un importante effetto GVL specialmente nel contesto di trapianti aploidentici. In particolare la mancanza di compatibilità donatore/ricevente per i recettori delle cellule NK (KIR, killer immunoglobulinlike receptors) nel contesto aploidentico sembra correlata ad un incremento nella sopravvivenza ed ad un diminuito rischio di recidiva in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (Ruggeri L *et al*, 2002).

### **1.7.2 Ricostituzione immunità adattativa:**

L'immunità adattativa è costituita principalmente da cellule di origine linfoide che permettono di difendere il nostro organismo in modo estremamente efficiente e sensibile. Queste popolazioni cellulari cooperano sinergicamente con le cellule ed i fattori dell'immunità innata per mantenere l'omeostasi dell'organismo.

1. *linfociti B* – linfociti la cui funzione si esplica attraverso la produzione di diverse classi anticorpali. In genere ricostituiscono più precocemente rispetto ai linfociti T ed il loro recupero ricapitola l'ontogenesi fisiologica in assenza di GVHD in quanto la loro

maturazione a livello del midollo osseo non è influenzata dall'età e dall'involuzione timica. Nonostante la loro conta possa essere normale a tre mesi dal trapianto, la loro funzionalità viene recuperata più lentamente. Questa può essere valutata attraverso l'analisi della produzione immunoglobulinica nel siero dei pazienti e attraverso stimoli proliferativi in vitro. In particolare la produzione di IgA può essere deficitaria fino a 2 anni dal trapianto esponendo i pazienti ad un aumentato rischio di infezione delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale (Geddes M e Storek J, 2007). Allo stesso modo anche la produzione di altre classi immunoglobuliniche può essere sub-ottimale fino ad un anno di distanza. Questo sembra essere correlato ad una serie di fattori concomitanti quali la mancanza della funzione helper mediata dai linfociti T CD4<sup>+</sup>, la mancanza di un pattern citochinico adeguato a causa delle perturbazioni indotte dai trattamenti correlati al trapianto, e la mancanza delle cellule dendritiche follicolari, fondamentali per il processo di maturazione dell'affinità e per la produzione di cellule B memoria (Geddes M e Storek J, 2007). Inoltre lo sviluppo di GVHD tende a rallentare in maniera significativa il recupero del compartimento B linfocitario. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab) nei 6 mesi precedenti il trapianto può rallentare la ricostituzione B linfoide. (Buser A, *et al.* 2008)

2. *linfociti T* – questi linfociti svolgono un ruolo centrale sia nel modulare il resto del sistema immunitario (funzione helper) che come effettori diretti dell'immunità cellulare (funzione citotossica). Nel contesto del trapianto di cellule staminali non manipolate il loro recupero può avvenire principalmente attraverso due vie che agiscono in tempi e su popolazioni differenti. La prima via è quella *extratimica* dovuta all'espansione di singoli cloni linfocitari maturi inoculati nel paziente insieme al trapianto o sopravvissuti al regime di condizionamento. Questa via da origine ad un compartimento linfocitario limitato sia dal punto di vista funzionale che da un punto di vista immunofenotipico. I linfociti che si espandono mediante questo meccanismo sono generalmente linfociti CD8<sup>+</sup> (citotossici) e proliferano in seguito all'esposizione ad opportuni stimoli antigenici quali antigeni virali ed antigeni minori o maggiori di istocompatibilità. Per questo motivo la conta dei linfociti CD8<sup>+</sup> raggiunge livelli normali a tre/quattro mesi dal trapianto e diverse evidenze sperimentali sembrano attribuire a questo tipo cellulare lo sviluppo della reazione GVH (Douek *et al.* 2000 ; Peggs *et al.* 2004). La seconda via attraverso cui si realizza la ricostituzione T linfocitaria ricalca la normale ontogenesi e prende il nome di via *timica*. Essa prevede il passaggio delle cellule staminali dal midollo al timo dove, migrando attraverso l'epitelio timico, vengono indotte a differenziarsi in linfociti T CD4<sup>+</sup> (helper) o CD8<sup>+</sup> con singola specificità antigenica.

Questo processo è fortemente influenzato dalla funzionalità timica che diminuisce all'aumentare dell'età per via della fisiologica involuzione timica (Auletta JJ and Lazarus HM, 2005). Inoltre l'epitelio timico è estremamente sensibile ai trattamenti chemioterapici. A causa di questi due processi, nei primi 3 mesi dal trapianto si ha un'inversione nel normale rapporto fra il numero di linfociti CD8<sup>+</sup> e di CD4<sup>+</sup>. Il tempo di normalizzazione della conta dei linfociti T helper nonché del rapporto fra le due popolazioni T è di solito superiore ai 6 mesi (Auletta JJ and Lazarus HM, 2005;). Tuttavia studi funzionali e di complessità del repertorio recettoriale hanno dimostrato che, nonostante il recupero nelle conte cellulari avvenga in tempi relativamente brevi, la funzionalità e la capacità di riconoscere diversi antigeni può essere compromessa fino a 2 anni dal trapianto (Auletta JJ and Lazarus HM, 2005). Nei trapianti in cui si effettua una T deplezione la via extratimica non si instaura e pertanto il recupero T linfocitario è ulteriormente rallentato in quanto la produzione di linfociti è integralmente a carico del timo. Una strategia che viene attualmente impiegata in questo tipo di trapianto è l'infusione di un limitato numero di linfociti del donatore CD8-depleti (10<sup>4</sup>cells/kg) (DLI) al fine di migliorare il recupero immunitario senza indurre risposte di tipo GVH. Infine recenti studi hanno valutato la ricostituzione di una nuova sottopopolazione di linfociti T noti come *invariant NKT (iNKT)*. Queste cellule esprimono una versione conservata del recettore associato ai linfociti T (TCR) che permette il riconoscimento e l'attivazione di queste cellule dopo esposizione ad antigeni lipidici endogeni e microbici presentati sulla molecola CD1d espressa dalle APC (Dellabona P. *et al*, 1994). Nonostante i dati sui tempi di recupero siano contrastanti per via della bassa frequenza di questa popolazione nel sangue periferico, studi su pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico hanno evidenziato un'associazione tra la mancata ricostituzione delle iNKT ed un incremento nel tasso di recidiva neoplastica (de Lalla C. *et al*, 2011).

### **1.7.3 Ricostituzione immunitaria a lungo termine**

Nonostante il monitoraggio del sistema immunitario sia fondamentale per valutare l'andamento clinico di pazienti sottoposti a trapianto allo genico, ad oggi pochi studi sono stati condotti sul recupero a lungo termine della funzionalità immune. La maggioranza dei lavori sono stati condotti studiando la ricostituzione immunitaria nel primo anno successivo al trapianto mentre dati su periodi più prolungati sono scarsi e frammentari. Questi lavori tuttavia hanno permesso di evidenziare alterazioni qualitative e quantitative in diverse

sottopopolazioni linfocitarie anche oltre l'anno dal trapianto. Le principali alterazioni riscontrate sono state a carico dei linfociti T CD3 la cui conta può essere inferiore alla norma fino a due anni da trapianto. Inoltre il rapporto fra linfociti CD4 e CD8 può essere alterato a lungo anche dopo il primo anno dal trapianto e diversi ricercatori hanno evidenziato alterazioni nelle fasi maturative sia dei linfociti B che dei linfociti T (Sanchez-Guijo F.M., *et al.* 2005; R. Quan Le, *et al.* 2011). Inoltre valutazioni sulla funzionalità timica hanno dimostrato una drastica diminuzione nella produzione a lungo termine di emigranti timociti in pazienti oltre i 60 anni d'età con conseguente rallentamento nel recupero immune (Castermans E. *et al.* 2011). Infine lo sviluppo di reazioni di GVHD cronica, eventuali infezioni opportunistiche e fenomeni di ripresa neoplastica sono condizioni che interferiscono inevitabilmente con il recupero di immunitario prolungando in modo indefinibile i tempi di una corretta ricostituzione (Castermans E. *et al.* 2011).

La conferma dell'importanza dello studio della ricostituzione immunitaria a lungo termine è data da un recente lavoro clinico in cui è stata valutata la sopravvivenza a 10 anni di 10632 pazienti sottoposti a trapianto allogenico. Da questo studio emerge che le principali cause di morte, oltre all'età avanzata al momento del trapianto, sono la recidiva di malattia e la GVHD cronica che sono entrambe condizioni associate ad un difetto nella funzionalità del sistema immunitario (Wingard J.R. *et al.* 2011). Per questo motivo una miglior comprensione dei fenomeni di recupero immunitario a lungo termine risulta fondamentale al fine di migliorare ulteriormente l'esito della procedura trapiantologia.

#### **1.7.4 Metodiche di analisi della ricostituzione immune:**

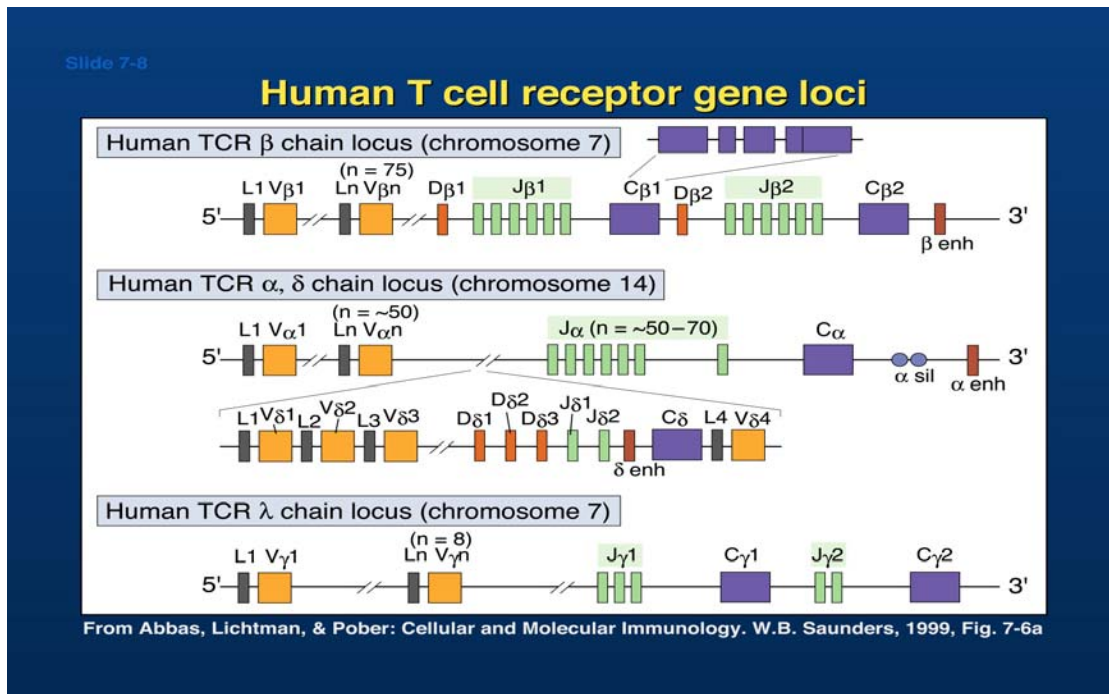
Le analisi che si effettuano per valutare la ripresa della funzione immune dopo trapianto sono principalmente tre: analisi immunofenotipica delle sottopopolazioni leucocitarie, spectratyping per la valutazione della complessità dei linfociti circolanti e la valutazione della funzionalità timica mediante quantificazione dei TREC (*T cell receptor excision circle*).

Queste analisi danno origine a differenti tipi di dati, infatti mentre l'analisi immunofenotipica da origine a dei dati puramente quantitativi le altre due valutazioni permettono di analizzare qualitativamente la funzione nel nuovo sistema immunitario ed in particolare della frazione T linfocitaria.

- *Analisi immunofenotipica* : Questa analisi si effettua mediante citometria a flusso e permette sia di ottenere il numero totale di linfociti circolanti che di valutare i rapporti fra le varie sottopopolazioni cellulari. Nel nostro laboratorio si effettuano delle analisi citofluorimetriche

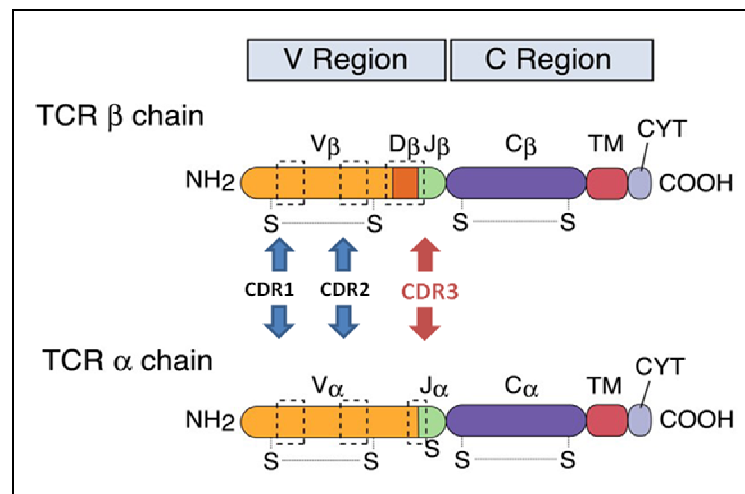
utilizzando anticorpi diretti contro il marcatore CD3 per la valutazione del numero totale di linfociti in campioni di sangue periferico. Allo stesso modo si utilizzano anticorpi diretti contro il marcatore CD19 per quantificare i linfociti B e anticorpi contro le molecole CD4 e CD8 per quantificare il numero di linfociti T helper e citotossici rispettivamente. Viene valutato anche il compartimento NK mediante marcatura con anticorpo diretto contro il CD56. Oltre ai marcatori in grado di discriminare le singole popolazioni linfocitarie è possibile affinare l'analisi citometrica mediante l'utilizzo di antigeni aggiuntivi che permettono lo studio approfondito delle fasi maturative delle popolazioni B e T. In particolare grazie all'utilizzo di anticorpi diretti contro le molecole CD27 e l'immunoglobulina D è possibile caratterizzare i le fasi maturative dei linfociti B (*Naive, Memory IgG e Memory IgM/IgD*: Avanzini M.A. *et al* 2005). Per quanto riguarda i linfociti T è possibile discriminare fra le varie fasi maturative grazie agli antigeni di superficie CD62L e CD45RA. Combinando questi marcatori è possibile discriminare le popolazioni *Naive, Central Memory, Effector Memory e Terminal/Late Memory* (Chattopadhyay PK and Roederer M, 2005).

- *Spectratyping* : I linfociti T esprimono sulla propria membrana cellulare un recettore a singola specificità in grado di riconoscere un unico antigene. Questo recettore prende il nome di TCR (T cell receptor) ed è il risultato di una serie di riarrangiamenti genomici che avvengono durante il processo di differenziamento del progenitore linfoide a livello timico. Il TCR è costituito da due catene glicoproteiche transmembrana legate fra loro da ponti disolfuro. Vi sono due diverse forme di TCR in base alle catene glicoproteiche che si associano: il TCR  $\alpha\beta$  che rappresenta la forma più frequente (95% dei linfociti naive) ed il TCR  $\gamma\delta$ . Il locus genico che codifica per le catene  $\beta$  e  $\delta$  si localizza sul cromosoma 7 mentre il locus genico che codifica per le catene  $\alpha$  e  $\gamma$  si trova sul cromosoma 14. Il locus  $\alpha$  è costituito da 70-80 segmenti V (variabilità), 61 segmenti J (giunzione) e un unico segmento C (costante). Al contrario il locus per la catena  $\beta$  è costituito da 75-80 segmenti V, due gruppi di segmenti J (6 segmenti per gruppo), due gruppi di segmenti D (diversità; 3 segmenti per gruppo) e due segmenti C (Fig. 1.5)



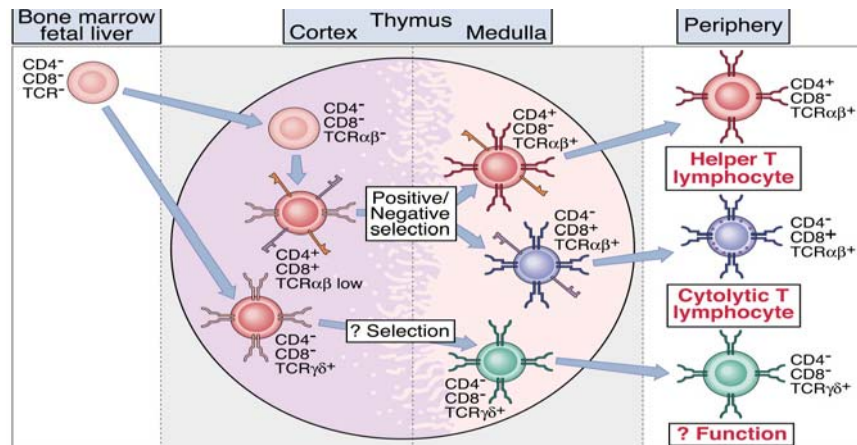
**Fig. 1.5:** Rappresentazione schematica dei loci genici che subiscono il riarrangiamento somatico per dare origine alle catene dei TCR. Per le diverse catene sono rappresentati i rapporti spaziali fra le varie sequenze V, D, J e C.

Durante il processo di riarrangiamento, mediato da specifiche ricombinasi prodotte soltanto in determinati momenti della maturazione linfocitaria, i segmenti V-(D)-J vengono accostati fra di loro a livello di DNA mentre solo a livello di mRNA vengono uniti al segmento costante. Il processo di riarrangiamento somatico avviene in modo casuale ed impreciso. A livello delle giunzioni fra i diversi segmenti genici si può avere la delezione di alcuni nucleotidi (processo che viene definito come giunzione imprecisa) oppure l'aggiunta di altri per via dell'enzima TdT (deossi terminal transferasi). Complessivamente questi processi causano la formazione di sequenze uniche ad ogni riarrangiamento specialmente a livello delle giunzioni fra i vari frammenti. Questa regione prende il nome di sequenza determinante la complementarità 3 (CDR3) e codifica per la porzione di TCR responsabile dell'interazione con l'epitopo antigenico esposto sulla molecola MHC. Vi sono anche altre due CDR (1 e 2) coinvolte nell'interazione fra il TCR e le differenti molecole MHC (Fig. 1.6)



**Fig. 1.6 :Rappresentazione grafica delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  del TCR dopo riarrangiamento. Le frecce indicano le regioni determinanti la complementarietà ed segmenti V, D, J, C transmembrana e citosolici presentano colorazioni diverse.**

Quando il precursore linfoide giunge al timo non esprime né TCR né co-recettori (stadio doppio negativo). Il primo locus a riarrangiare è quello della catena  $\beta$  a livello della corteccia timica. Se questo processo dà origine ad una sequenza in frame, e quindi ad una proteina funzionale, qualsiasi ulteriore riarrangiamento del locus  $\beta$  viene bloccato per effetto della segnalazione del recettore formato dall'associazione della catena  $\beta$  ad un surrogato della catena  $\alpha$ . Questo complesso prende il nome di pre-TCR ed induce la proliferazione cellulare, il riarrangiamento del locus  $\alpha$  e l'espressione sia del co-recettore CD4 che del co-recettore CD8 (stadio doppi positivi). Successivamente si ha l'associazione tra la catena  $\beta$  e la catena  $\alpha$  riarrangiata e la selezione dei linfociti che legano l'antigene esposto sulle molecole MHC a livello dell'epitelio timico con la giusta affinità di legame. Questo processo si svolge a livello della midollare del timo, prende il nome di selezione positiva e causa la selezione di un singolo co-recettore (CD4 o CD8). I linfociti che superano questo passaggio vengono selezionati, sempre a livello della midollare timica, per la loro capacità di non legare molecole self (selezione negativa). Alla fine di questo processo solo l'1% dei precursori linfoidi completa la maturazione e va in circolo come linfocita maturo ed ognuno di questi presenta una specifica regione CDR3 in grado di riconoscere un unico antigene (Fig. 1.7)



**Fig. 1.7: Rappresentazione schematica del processo di maturazione timica del precursore linfoide.**

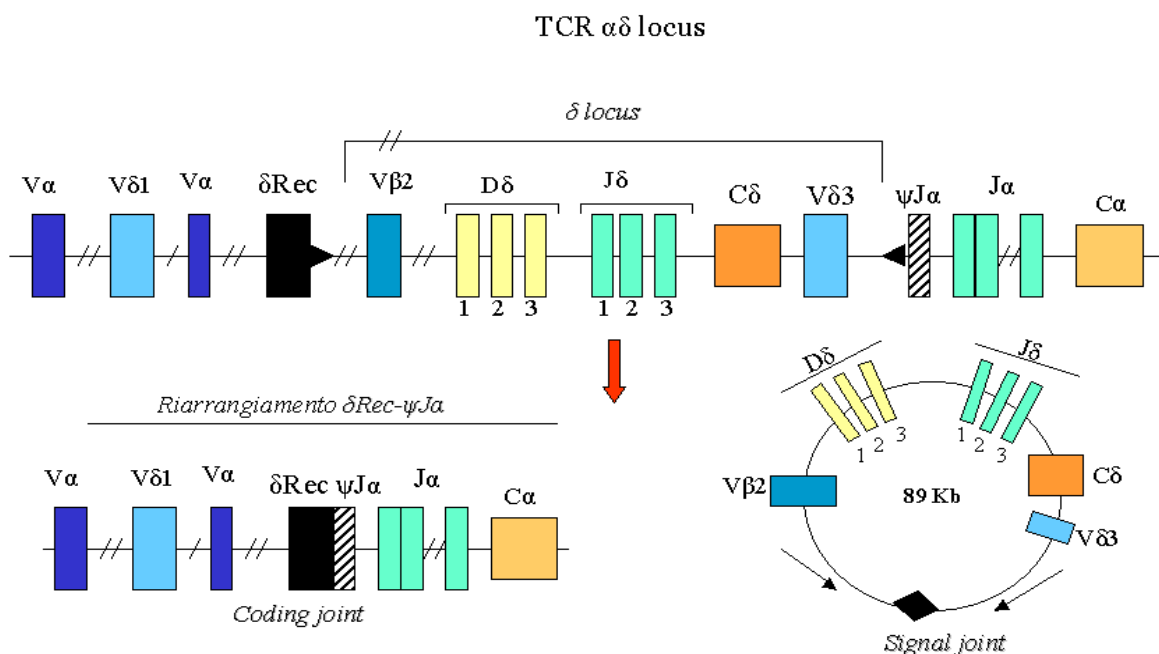
Attraverso una tecnica di RT-PCR con degli oligonucleotidi senso in grado di appaiare a tutti i differenti frammenti V della catena  $\beta$  ed un unico oligonucleotide antisense fluoriscinato che riconosce una regione costante dei due segmenti C, è possibile amplificare tutte le diverse regioni CDR3. I prodotti dell'amplificazione vengono successivamente analizzati mediante elettroforesi capillare. La distribuzione delle varie CDR3 mostra un profilo gaussiano, tipico dei processi di ricombinazione casuale. Attraverso questa analisi si può avere una stima del numero di riarrangiamenti differenti che sono presenti nel paziente e di conseguenza del numero di linfociti con diversa specificità antigenica in grado di rispondere a stimoli differenti. Più complesso è il repertorio linfocitario maggiore è la protezione offerta dal sistema immunitario in quanto sarà in grado di rispondere ad un numero maggiore di stimoli nocivi. Questa tecnica molecolare permette inoltre di valutare la presenza di eventuali espansioni clonali. Diversi lavori hanno messo in evidenza come queste espansioni clonali siano associate a differenti situazioni di attivazione del sistema immunitario come stati di GVHD o infezioni virali (Zhang C. *et al*, 2007; Beck R C *et al*, 2005). Allo stesso modo è stato messo in evidenza come attraverso questo approccio sia possibile individuare e clonare linfociti con attività GVL (Montagna D *et al*, 2006).

Analogamente a quanto avviene per i linfociti T anche i linfociti B sono in grado di interagire con specifici antigeni grazie alle immunoglobuline di superficie. Le immunoglobuline sono costituite da tetrameri proteici formati dall'associazione di quattro catene differenti di cui due leggere e due pesanti. Esistono due famiglie di catene leggere ( $\lambda$  e  $\kappa$ ), i cui loci genici sono posizionati sul cromosoma 2, e 5 isotipi di catene pesanti ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\xi$ , e  $\gamma$ , differiscono fra loro solo per la porzione costante) localizzate sul cromosoma 14. Durante la maturazione i linfociti B vanno incontro al riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline. Esistono 3 regioni all'interno del locus della regione variabile delle catene pesanti, chiamate regione variabile



(V), regione della diversità (D) e regione di giunzione (J). Nella conformazione germinale, ovvero prima della differenziazione cellulare, queste sono presenti in un elevato numero di copie simili. Durante la differenziazione, che avviene a livello del midollo osseo, un segmento D si riarrangia con un segmento J, il gene riarrangiato D-J si unisce successivamente ad un segmento V dando luogo al riarrangiamento VDJ. Oltre alla specificità generata dalla scelta dei diversi segmenti V, D, e J, l'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT) inserisce delle basi nucleotidiche in modo casuale nelle sedi di giunzione V-D e D-J, mentre l'enzima esonucleasi effettua delle escissioni casuali. Infine la specificità del riarrangiamento VDJ è generata anche dalla presenza di mutazioni somatiche che coinvolgono prevalentemente la regione CDR3 del segmento D, detta 'terza regione determinante la complementarietà' e in minor misura la regione CDR2. La complessità recettoriale dei linfociti B può essere valutata mediante una tecnica di PCR analoga a quella utilizzata per l'analisi del repertorio T linfocitario. Questa prevede l'utilizzo di un unico oligonucleotide antisense fluoriscinato in grado di appaiare ad una sequenza conservata del segmento J ed una serie di primers senso in grado di riconoscere le diverse famiglie V (Doderò *et al.*, 2009).

- *Valutazione dell'output timico* : Come descritto precedentemente la linfopoiesi T si svolge a livello timico e prevede una serie di passaggi sequenziali di maturazione dei precursori linfoidi. Una fase precoce del processo di commissionamento nella neogenesi delle cellule T è l'excisione del locus  $\delta$ , una porzione interna al locus TCR  $\alpha$ , che genera un frammento episomale di DNA. L'anello che si forma dal riarrangiamento del gene TCR viene identificato con il nome di *T-Cell Receptor Excision Circles* (TREC) (Fig. 1.8). Tale processo si verifica esclusivamente nelle cellule che esprimeranno il recettore TCR  $\alpha\beta$ , durante la maturazione timica e da origine a due tipi di TRECs.



**Fig. 1.8: Rappresentazione grafica del processo di excisione del sjTREC durante il riarrangiamento del locus  $\alpha$  del TCR.**

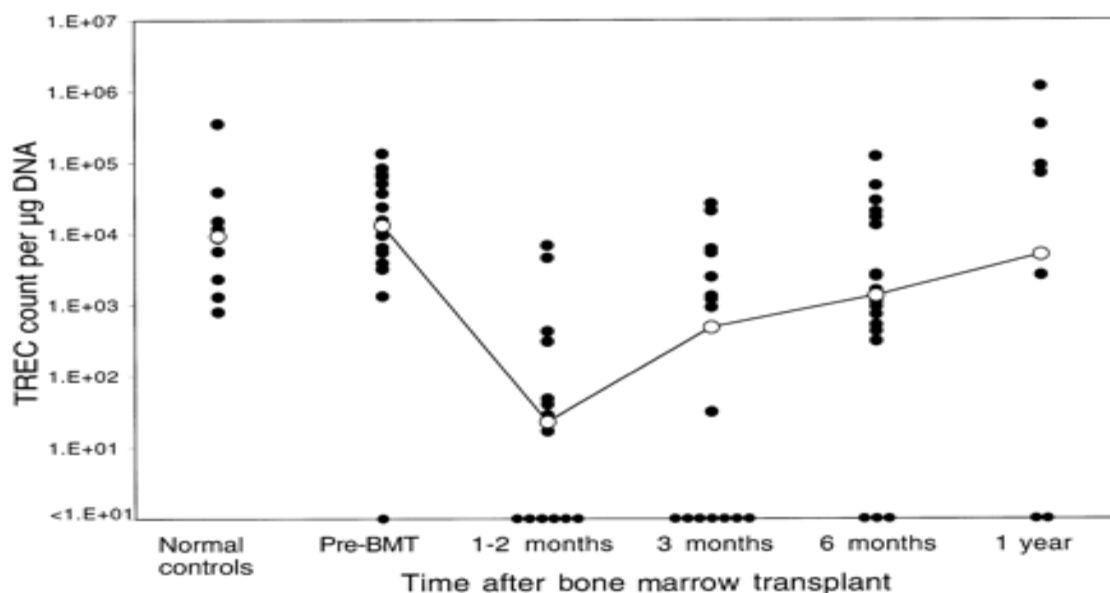
Questi due tipi di TRECs sono il “*signal joint*” TREC (sj-TREC) ed il “*coding joint*” TREC (cjTREC). Il sjTREC si genera nel primo riarrangiamento della catena  $\alpha$  del TCR dal taglio dell’intero locus  $\delta$  e dall’unione delle regioni fiancheggianti: i segmenti  $\delta$ -rec e  $\Psi$ -J $\alpha$ . Essendo queste regioni uniche, ne deriva che il sjTREC contiene sequenze altamente conservate che possono essere sfruttate per analisi con tecniche molecolari. Questi eventi di ricombinazione si verificano in circa il 70% delle cellule TCR $\alpha\beta$ . Il TREC intracellulare non è sottoposto a degradazione, pertanto rappresenta un marcatore stabile delle cellule naive derivanti dallo sviluppo timico (*recent thymic emigrants – RTE*). Un secondo evento di ricombinazione nella stessa catena  $\alpha$  produce l’escissione e l’unione dei segmenti VJ. Tale processo porta alla formazione di un cjTREC altamente variabile a causa dell’alta diversità delle regioni V $\alpha$  e J $\alpha$  che lo costituiscono.

La ricombinazione della catena  $\beta$  causa l’eliminazione delle sequenze spaziatrici tra i segmenti V $\beta$  e DJ $\beta$  e la loro unione. Ne deriva anche in questo caso, un cjTREC con sequenze variabili. A causa della loro diversità, i cjTRECs non possono essere utilizzati nello studio della funzionalità timica e si preferisce considerare come marcatore timico il sjTREC.

Attraverso metodiche di amplificazione molecolare è possibile quantificare la produzione di sj-TREC e sfruttare questo dato come marcatore del numero di RTE presenti in circolo. Questo episoma subisce un fenomeno di diluizione nel tempo. Infatti esso non viene replicato e quindi durante la proliferazione linfocitaria, dovuta a stimoli antigenici, viene semplicemente

ereditato da una delle cellule figlie (Hazenberg *et al.*, 2003).

Vari lavori hanno evidenziato come questa molecola sia un valido marcatore nella valutazione della funzionalità timica sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. Infine diversi studi hanno utilizzato questo marcatore nel contesto del trapianto di cellule staminali come indicatore della produzione di nuovi linfociti T a partire da precursori staminali non differenziati (Hochberg *et al.*, 2001) (Fig. 1.9)



**Fig. 1.9:** Grafico nel quale sono riportati i valori di sjTREC in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche a diversi tempi di monitoraggio dopo il trapianto. (Hochberg *et al.*, 2001)

La quantificazione di questa molecola avviene mediante una tecnica di PCR quantitativa che prevede un difficile processo di messa a punto ed una elevata laboriosità metodologica. Per questo motivo recenti studi hanno indagato se vi fossero dei marcatori di superficie in grado di identificare la popolazione linfocitaria avente elevate concentrazioni intracellulari di sjTREC. Tra i marcatori studiati la molecola di superficie CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1 PECAM-1*), unitamente ad altri marcatori utilizzati per l'identificazione della popolazione naive, sembra essere in grado di discriminare con un'accuratezza inferiore al 5% la popolazione di emigranti timici dalle altre popolazioni linfocitarie. (Kimming S. *et al.*, 2002).

**CAPITOLO II****SCOPO DELLO STUDIO**

Al fine di aumentare il numero di pazienti trattabili con trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche negli ultimi anni diversi gruppi hanno sviluppato procedure trapiantologiche alternative. Tali procedure in particolar modo sono state volte a:

- 1) diminuire la tossicità associata ai regimi di condizionamento pre trapianto con l'introduzione di regimi di condizionamento a ridotta intensità/immunosoppressivi tollerabili anche da pazienti più anziani o affetti da altre comorbidità;
- 2) aumentare il numero di donatori reperibili diminuendo il grado di compatibilità donatore/ricevente (fino ad una compatibilità del 50% - donatori Aploidentici).

Il recupero del sistema immunitario dopo trapianto allogenico rappresenta un fattore cruciale per la buona riuscita di tale procedura. Nel contesto onco-ematologico infatti le principali complicanze trapiantologiche quali la ricaduta neoplastica, lo sviluppo di infezioni opportunistiche e lo sviluppo di una reazione infiammatoria contro i tessuti sani dell'ospite (*graft versus host disease GVHD*), possono in ultima istanza essere ricondotte ad alterazioni nei normali processi immunitari. Nonostante ciò la maggior parte degli studi ha focalizzato la propria attenzione sullo studio della ricostituzione immunitaria nel primo anno post trapianto senza indagare la ricostituzione immunitaria a lungo termine.

Obiettivo primario di questo studio è stato quello di analizzare la ricostituzione a lungo termine (oltre un anno dal trapianto) in pazienti lungo sopravvissuti sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche da donatore alternativo dopo regime di condizionamento a ridotta intensità. Nello studio sono stati considerati due gruppi di pazienti sottoposti a procedure trapiantologiche differenti. Il primo gruppo di soggetti analizzato è stato sottoposto a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare aploidentico associato a T deplezione *in vitro* (immunoselezione) ed *in vivo* (anticorpo monoclonale anti CD52 - *Alemtuzumab*) seguito da somministrazione post trapianto di linfociti isolati dal donatore CD8-

depleti (*donor lymphocyte infusion – DLI*). Il secondo gruppo di pazienti invece è stato sottoposto a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore HLA (*human leucocyte antigens*) identico non familiare (*match unrelated donor – MUD*) associato unicamente a T deplezione *in vivo* (siero anti-linfocitario – *Thymoglobulin*). L'analisi del sistema immunitario è stata condotta attraverso:

- Valutazione del chimerismo post-trapianto mediante analisi delle regioni microsatelliti polimorfiche al fine di correlare la ricostituzione immunitaria con il ripristino di un'emopoiesi completa da parte delle cellule staminali del donatore;
- Caratterizzazione immunofenotipica delle popolazioni linfocitarie circolanti con particolare riguardo alle fasi maturative dei linfociti B e T;
- Analisi della funzionalità timica dei pazienti mediante stima dei livelli dei linfociti T *naive* derivanti dal timo (emigranti timici recenti - *RTE*) attraverso quantificazione del numero assoluto di sjTRECs (*T-cell receptor rearrangement excision circles*);
- Valutazione della complessità del repertorio recettoriale linfocitario T e B mediante *spectratyping* delle regioni determinanti la complementarietà 3 (CDR3);

Parallelamente ai due gruppi di pazienti è stato analizzato un gruppo di donatori sani di età comparabile al fine di confrontare lo stato del sistema immunitario in pazienti lungo sopravvissuti ad una condizione di normalità. Ciò è stato fatto al fine di valutare se pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore alternativo fossero in grado, in assenza di altre complicazioni quali la GVHD o ricadute neoplastiche, di recuperare un'immunità completa e quanto questo processo potesse essere influenzato dallo schema trapiantologico (tipo di donatore, tipo di deplezione linfocitaria, somministrazione di linfociti post trapianto).

## **Capitolo III**

### **Materiali e Metodi**

#### **3.1 Caratteristiche dei Pazienti**

In questo studio sono stati inclusi 24 pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore alternativo dopo regime di condizionamento a ridotta intensità tra il giugno 2004 e il marzo 2008 presso la struttura complessa di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo Allogenico della Fondazione IRCCS - Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Di questi, 6 hanno ricevuto cellule staminali emopoietiche periferiche da un familiare aploidentico e 18 da un donatore volontario non consanguineo. Per ogni paziente era richiesto un follow-up non inferiore ai 900 giorni post-trapianto, la remissione completa della malattia ematologica di base e il non essere in trattamento farmacologico antitumorale al momento delle analisi o nei 3 mesi antecedenti. Quale gruppo di controllo ai fini del nostro studio, sono stati coinvolti 10 donatori comparabili al gruppo in studio per quanto riguarda sesso ed età, senza comorbidità e in particolare non affetti da immunodeficienze note.

Per ogni paziente è stato ottenuto relativo consenso informato scritto per la procedura di trapianto allogenico con condizionamento a ridotta intensità e per le successive eventuali raccolte, stoccaggio ed analisi di campioni ematici a scopo di ricerca. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nelle tabelle 3.1 e 3.2.

**Caratteristiche dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore Aploidentico inclusi nello studio**

	<b>N° o MEDIANA</b>	<b>RANGE</b>
<b>Diagnosi</b>	<b>Linfoma non Hodgkin 3 Leucemia Mieloide Acuta 1 Linfoma di Hodgkin 2</b>	
<b>Età alla diagnosi</b>	<b>33</b>	<b>3-46</b>
<b>Linee precedenti</b>	<b>3</b>	<b>2-5</b>
<b>Trapianti autologhi</b>	<b>1</b>	<b>0-1</b>
<b>RT mediastino</b>	<b>1 pz</b>	
<b>Rituximab</b>	<b>2 pz</b>	
<b>Età al trapianto</b>	<b>34</b>	<b>15-49</b>
<b>Stato di malattia al trapianto</b>	<b>6 RC</b>	
<b>Tempo diagnosi-trapianto</b>	<b>987</b>	<b>359-4503</b>
<b>Regime di condizionamento</b>	<b>Thio/Flu/Cy/TBI2Gy</b>	
<b>Immunosoppressione</b>	<b>Alemtuzumab</b>	
<b>aGVHD</b>	<b>2</b>	
<b>cGVHD</b>	<b>1</b>	
<b>Riattivazioni EBV</b>	<b>0</b>	
	<b>5 Pos/Pos</b>	
<b>CMV status D/R</b>	<b>1 Neg/Pos</b>	
<b>Riattivazioni da CMV</b>	<b>5</b>	
<b>Riprese di malattia</b>	<b>2</b>	

**Tabella 3.1: caratteristiche dei pazienti sottoposti ad allotrapianto da donatore Aploidentico inclusi nello studio. Thio= Thiotepa, Flu=Fludarabina, Cy=Ciclofosfamide, TBI= Total Body Irradiation, D=Donor, R=Recipient.**

**Caratteristiche dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore da banca inclusi nello studio**

	<b>N° o MEDIANA</b>	<b>RANGE</b>
<b>Diagnosi</b>	<b>Linfoma non Hodgkin 11</b> <b>Linfoma di Hodgkin 6</b>	
<b>Età alla diagnosi</b>	<b>37</b>	<b>22-58</b>
<b>Linee precedenti</b>	<b>3</b>	<b>2-5</b>
<b>Trapianti autologhi</b>	<b>1</b>	
<b>RT mediastino</b>	<b>1 pz</b>	
<b>Rituximab</b>	<b>8 pz</b>	
<b>Stato di malattia al trapianto</b>	<b>6 RP</b> <b>12 RC</b>	
<b>Età al trapianto</b>	<b>40</b>	<b>22-60</b>
<b>Tempo diagnosi-trapianto</b>	<b>1950</b>	<b>467-5794</b>
<b>Regime di condizionamento</b>	<b>Thio/Cy</b> <b>Thio/Cy/Mel</b> <b>R/Thio/Flu/Endo</b>	
<b>Immunosoppressione</b>	<b>ATG, CSA, MTX (1MMF)</b>	
<b>aGVHD</b>	<b>10</b>	
<b>cGVHD</b>	<b>3</b>	
<b>Riattivazioni EBV</b>	<b>1</b> <b>6 Neg/Pos</b>	
<b>CMV status D/R</b>	<b>1 Neg/Neg</b> <b>3 Pos/Neg</b> <b>8 Pos/Pos</b>	
<b>Riattivazioni da CMV</b>	<b>10</b>	
<b>Riprese di malattia</b>	<b>4</b>	

Tabella 3.2: caratteristiche dei pazienti sottoposti ad allotrapianto da donatore da banca (MUD) inclusi nello studio. R=Rituximab; Endo=Endoxan; Thio= Thiotepa, Flu=Fludarabina, Cy=Ciclofosfamide, Mel= Melphalan, CSA=Ciclosporina A, MMF= Micofenolato Mofetil, ATG= Siero antilinfocitario, D=Donor, R=Recipient.



### **3.1.1 Condizionamento, trapianto e attecchimento:**

Dei pazienti inclusi nello studio 6/6 del gruppo Aploidentico presentavano uno stato di Remissione Completa (RC) della malattia di base al momento del trapianto, mentre dei 18 pazienti del gruppo sottoposto a trapianto MUD 12 presentavano una RC e 6 una Remissione Parziale (RP) secondo i criteri vigenti al momento della procedura trapiantologica.

Il gruppo di pazienti sottoposti a trapianto Aploidentico ha ricevuto oltre al regime di condizionamento a ridotta intensità, una T deplezione in vivo con Alemtuzumab (MabCampath®) seguita da re infusione di cellule CD34+ selezionate in vitro dopo aferesi. La mediana di CD34+ infuse con il trapianto è stata di  $10,95 \times 10^6/\text{Kg}$  del ricevente (range  $7,4-11,8 \times 10^6 \text{ CD34+}/\text{Kg}$ ) con una quota di CD3+ mediana di  $1,05 \times 10^4/\text{Kg}$  del ricevente (range  $0,8-2 \times 10^4 \text{ CD3+}/\text{Kg}$ ). Per questi pazienti nel post trapianto erano previste infusioni di linfociti del donatore depleti nella frazione citotossica (CD3+/CD8+) ed arricchite in linfociti CD19+ e a dosi crescenti ai giorni +45, +75 e +105, purché in assenza di segni o sintomi di aGVHD (spontanea o provocata); la terapia immunosoppressiva post-trapianto non era prevista da protocollo se non quale trattamento di un'eventuale aGVHD/cGVHD; in tal caso era possibile la somministrazione di Prednisone, Ciclosporina A o Methotrexate a basse dosi.

Il gruppo di pazienti sottoposto a trapianto di cellule staminali da donatore volontario non consanguineo, ha invece ricevuto, con il regime di condizionamento, una T deplezione in vivo con siero antilinfocitario (Thymoglobuline®) prima della re infusione di cellule da aferesi non selezionate. La mediana di CD34+ infuse è stata di  $7,25 \times 10^6 \text{ CD34+}/\text{Kg}$  del ricevente (range  $5,1-10 \times 10^6 \text{ CD34+}/\text{Kg}$ ) mentre la quantità di CD3+ infuse con il trapianto non è stata determinata per ogni paziente di questo gruppo. Successivamente era prevista somministrazione di dosi "short course" di Methotrexate ai giorni +1, +3, +6 e +11. Tutti i pazienti hanno poi seguito una terapia immunosoppressiva prevalentemente con Ciclosporina A o, in casi eccezionali, altri farmaci immunosoppressori (quale Micofenolato-Mofetil) sino a circa 100 giorni post trapianto e, in assenza di segni o sintomi di GVHD, successivamente la terapia immunosoppressiva è stata progressivamente ridotta sino a sospensione.

### **3.2 Separazione cellule mononucleate da sangue periferico con gradiente di densità Ficoll-Hypaque:**

Questa tecnica permette di separare cellule mononucleate (linfociti, monociti) sangue trattato con anticoagulanti (eparina) grazie ad un gradiente di densità di saccarosio ( $\rho=1.077\text{g}/\text{cm}^2$ ). Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

1. Diluire il sangue in 2 volumi di PBS (*phosphate buffered saline*);
2. Stratificare il campione diluito su un volume di ficoll (Sigma-Aldrich, ST.Louis MO);
3. Centrifugare a temperatura ambiente per 30 min a 400g senza freno;
4. Prelevare l'interfaccia arricchita in cellule mononucleate e trasferirla in una nuova provetta e lavare le cellule con 50ml di PBS;
5. Centrifugare a 300g per 10 min con freno e quindi buttare il surnatante;
6. Ripetere il lavaggio in PBS e la centrifugazione;
7. Risospendere il pellet in un volume appropriato di PBS e procedere alla conta mediante cameretta di Burker al microscopio ottico;
8. Per la conta diluire con colorante Turk in modo da visualizzare i nuclei cellulari o con Tripan Blue per valutare la vitalità cellulare;
9. Risospendere le cellule in aliquote di  $5-10 \times 10^6$  cells e dopo aver rimosso il surnatante procedere al congelamento del pellet a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
10. Nel caso di congelamento vitale risospendere le cellule in aliquote da  $10^7$  in una soluzione al 90% di FBS (siero fetale bovino) e 10% di DMSO (dimetilsolfossido);
11. Quindi trasferire le aliquote in appositi criobox per evitare un congelamento troppo rapido fino al trasferimento in azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

### **3.3 Estrazione DNA genomico:**

In base al numero di cellule di partenza sono stati utilizzati due metodi differenti per ottimizzare l'estrazione del DNA dalle cellule dei pazienti:

1. *estrazione mediante DNAzol (Invitrogen, Carlsbad CA)*: si basa sull'utilizzo di una soluzione di detergenti che causano la lisi cellulare in associazione con sali di guanidina che permettono, insieme all'etanolo, la precipitazione del DNA. Mediante questa soluzione è possibile estrarre DNA da aliquote di cellule in numero compreso fra  $6 \times 10^6$  e  $10^7$  cellule. Le indicazioni della ditta prevedono i seguenti passaggi:
  - aggiungere 1ml di DNAzol direttamente su pellet congelato;
  - risospendere il pellet e centrifugare per 10 min a 10000 g a temperatura ambiente in modo da sedimentare i detriti cellulari;
  - recuperare il surnatante in una nuova provetta ed aggiungere 500 $\mu$ l di etanolo freddo al 100%;
  - miscelare in modo da permettere la formazione di un precipitato di DNA visibile a occhio nudo;
  - prelevare il pellet e lavare due volte in 1ml di etanolo freddo al 75%;

- trasferire in una nuova provetta e lasciare evaporare l'etanolo residuo;
- risospendere in un volume appropriato di H<sub>2</sub>O (60-80 µl).

2. *estrazione mediante KIT DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown Maryland)*: si basa sull'utilizzo di colonnine contenenti delle membrane di silica, in grado di legare il DNA in presenza di un'elevata concentrazione di sali caotropici. Questa tecnica viene utilizzata per quei campioni con un numero di cellule inferiore a  $6 \times 10^6$ . Il protocollo consiste nel:

- risospendere il pellett in 200 µl di PBS;
- aggiungere 200 µl di buffer AL (lisante) e 20 µl di proteinasi K ;
- incubare a 56°C per 10 min in modo da permettere alla proteinasi ed al buffer di lisare completamente le cellule;
- aggiungere 200 µl di etanolo 100% temperatura ambiente e agitare ;
- trasferire la soluzione in una colonnina e quindi centrifugare a 6000 g per 1 min in modo da ottenere il legame del DNA fuoriuscito dalle cellule alla membrana di silica;
- trasferire la colonnina in un nuovo tubo collettore ed aggiungere 500 µl di buffer AW1;
- centrifugare a 6000 g per 1 min;
- ripetere il lavaggio con buffer AW2 centrifugando per 3 min a 20000 g in modo da asciugare la membrana da eventuali residui di etanolo (buffer AW1 e AW2 contengono etanolo);
- trasferire la colonnina in una nuova provetta ed eluire il DNA in 200 µl di H<sub>2</sub>O centrifugando per 1 min a 6000 g.

Una volta estratto il DNA genomico viene quantificato allo spettrofotometro. Se la purezza è buona il rapporto fra le assorbanze  $A_{260}/A_{280}$  risulta essere compreso fra 1,6 e 1,9.

I campioni sono successivamente conservati a 4°C.

### **3.4 Estrazione RNA totale:**

Come per il DNA anche per l'RNA sono state utilizzate due tecniche differenti in base al numero di cellule di partenza:

1: *estrazione mediante TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA)*: questo reagente permette la separazione di RNA da contaminanti genomici e proteine in modo da rendere possibile le applicazioni di RT-PCR. Si basa sull'utilizzo di una soluzione monofasica di fenolo e isotiocanato la quale dopo l'aggiunta di cloroformio permette di separare l'RNA che rimane sospeso in una fase acquosa sovrastante mentre DNA, proteine e detriti cellulari rimangono intrappolati nella fase organica sottostante.

Questo reagente viene utilizzato per aliquote di cellule da  $10^7$  e prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere 1 ml di TRIzol su pellet congelato;
- Omogeneizzare con pipetta e siringa da insulina;
- Aggiungere 200  $\mu$ l di cloroformio freddo ogni ml di TRIzol;
- Agitare energicamente la provetta in modo da rendere omogenea la soluzione;
- Incubare in ghiaccio per 2-3 min;
- Centrifugare 15 min a 12000 g in centrifuga raffreddata a 4°C;
- Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta ed aggiungere un volume di isopropanolo freddo per permettere la precipitazione dell'RNA;
- Incubare in ghiaccio per 10 min;
- Centrifugare a 12000 g per 5 min sempre in una centrifuga raffreddata;
- Eliminare il surnatante ed aggiungere 1 ml di etanolo freddo al 75%;
- Ripetere il passaggio di centrifugazione;
- Eliminare il surnatante e lasciare evaporare l'etanolo in eccesso (mantenendo sempre la provetta in ghiaccio);
- Risospendere in un volume opportuno di H<sub>2</sub>O (20-40  $\mu$ l).

2: *estrazione mediante KIT NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren; Germany)*: si basa sull'utilizzo di colonnine contenenti membrane a base di silica e di una serie di buffer in grado di favorire il legame dell'RNA alla membrana nonché di prevenirne la degradazione inattivando le RNasi. Inoltre prevede un passaggio con una DNasi (ricombinante) in modo da evitare qualsiasi tipo di contaminazione da DNA genomico.

Questo kit viene utilizzato per l'estrazione dell'RNA da campioni di  $5 \times 10^6$  cellule. Il protocollo prevede:

- Lisare il pellet cellulare aggiungendo 350  $\mu$ l di buffer RA1 e 3,5  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo al pellet congelato;
- Agitare vigorosamente e filtrare il lisato caricandolo in delle colonnine apposite (rosse);
- Centrifugare per 1 min a 11000 g;
- Recuperare il filtrato ed aggiungere 350  $\mu$ l di etanolo al 75% temperatura ambiente;
- Miscelare la soluzione con la pipetta e trasferirla nella colonnina di legame per l'RNA (blu);
- Centrifugare a 8000 g per 30 sec;
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubo collettore e caricarla con 350  $\mu$ l di MDB (membrane desalting buffer);
- Centrifugare a 11000 g per 1 min;
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubo collettore e caricarla con 95  $\mu$ l di DNase reaction mix;
- Lasciare a temperatura ambiente per 15 min (in modo che la DNasi possa digerire gli

eventuali eccessi di DNA;

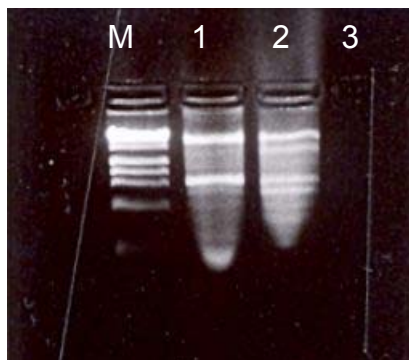
- Caricare 200  $\mu$ l di buffer RA2 (il quale inattiva la DNasi) e centrifugare a 8000 g per 30 sec;
- Trasferire in un nuovo tubo collettore e lavare con 600  $\mu$ l di buffer RA3;
- Centrifugare a 8000 g per 30 sec;
- Ripetere il lavaggio con 250  $\mu$ l di buffer RA3 e centrifugare per 2 min a 11000 g (in modo da asciugare la membrana da eventuali residui di etanolo);
- Eluire l'RNA in 60  $\mu$ l di acqua RNase-free.

L'RNA estratto con i due metodi viene quindi dosato allo spettrofotometro e se l'estrazione è ottimale il rapporto fra le assorbanze  $A_{260}/A_{280}$  è compreso fra 1,7 e 2.

Per valutare la qualità dell'RNA estratto 500ng (2  $\mu$ l) del campione vengono miscelati a buffer denaturante (SDS 0,2%; EDTA 1mM; Tris-HCl pH7,5 10mM) in modo da ottenere un volume finale di 17  $\mu$ l. Quindi vengono incubati a 70 °C per 10 min in bagnetto termostato e successivamente caricati con 1  $\mu$ l di etidio bromuro (500 $\mu$ g/ml) e 2  $\mu$ l di loading buffer 10X (glicerolo 50%; EDTA pH 8.0 100mM; SDS 1%; Blu di Bromofenolo 0,1%) in un gel di agarosio al 2%.

Se il campione è integro è possibile vedere su gel due bande corrispondenti agli RNA ribosomiali 28s e 18s (Fig. 3.1)

Gli RNA vengono quindi conservati a -80°C.



**Fig. 3.1:** Foto di due campioni di RNA dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Come si può notare nel primo pozzetto è stato caricato un campione di buona qualità in quanto sono presenti e distinte le bande dei due RNA ribosomiali mentre il campione caricato nel pozzetto numero 2 mostra molte bande indice di avvenuta degradazione. Il pozzetto 3 è caricato con H<sub>2</sub>O mentre M sta per marcatore.

### **3.5 Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA:**

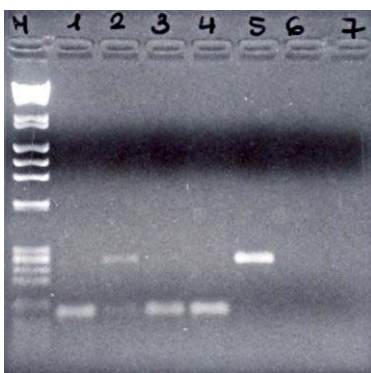
Nel nostro lavoro è stato utilizzato il kit High Capacity cDNA archive (Applied Biosystems, Foster City CA) che permette di retrotrascrivere con elevata efficienza anche grossi volumi di RNA iniziale. Questo kit prevede di effettuare una reazione in un volume finale di 100  $\mu$ l contenente 4  $\mu$ l di dNTPS 25X (100mM), 10  $\mu$ l di Buffer RT 10X, 10  $\mu$ l di Random Hexamers 10X, 6  $\mu$ l di Multiscribe RT (50 U/  $\mu$ l) ed un volume massimo di 70  $\mu$ l di RNA.

Le condizioni di reazione sono 10 min a 25°C per attivare l'enzima, 2 ore a 37°C per permettere la retrotrascrizione di tutto il materiale di partenza e 5 min a 95°C per inattivare l'enzima e terminare la reazione.

L'integrità del campione e la presenza di eventuali contaminazioni da DNA genomico è valutata mediante una PCR con i seguenti primers:

Senso        5'- CTTGCTGGTGAAAGGAC-3'  
Antisenso    5'-GTCAAGGGCATATCCTACAAC-3'

Questi appaiano a due esoni del gene HGPRT separati fra loro da un introne di circa 170bp. In questo modo è possibile amplificare sia il cDNA che l'eventuale DNA genomico e i prodotti di amplificazione avranno lunghezze diverse. La reazione si effettua con 100ng di cDNA, Buffer II (Applied Biosystems) 1x, 2mM di MgCl<sub>2</sub>, 10pmoli di primers e 0,04 U/ $\mu$ l di TaqGold. Le condizioni prevedono 10 min di attivazione dell'enzima a 96°C, 35 cicli di amplificazione e 10 min di estensione finale a 72°C. Ogni ciclo di amplificazione è costituito da 30 sec a 96 °C (denaturazione), 30 sec a 52 °C (ibridazione dei primers) e 30 sec a 72°C (estensione) (Fig. 3.2).



**Fig. 3.2:** Foto di amplificati visualizzati dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Nel pozzetto 1 è caricato un campione di cDNA di controllo, nei pozzetti 2,3 e 4 sono caricati dei campioni retrotrascritti, nel pozzetto 5 è caricato del DNA genomico come controllo negativo mentre nei pozzetti 6 e 7 sono caricate i controlli di reazione (senza templat) rispettivamente della retrotrascrizione e della reazione di PCR. Come si può notare il campione caricato nel secondo pozzetto presenta una contaminazione da DNA genomico evidenziato dalla presenza della banda a più alto peso molecolare.

### 3.6 Reazioni qualitative per l'amplificazione degli acidi nucleici:

#### 3.6.1 PCR multiplex per l'analisi dei microsatelliti:

Il sistema utilizzato per l'amplificazione dei microsatelliti è AmpFfstr Profiler Plus (Applied Biosystems, CA) secondo il protocollo specificato dal fornitore. Questo prevede una reazione di PCR multiplex in una singola provetta con l'utilizzo di 10 coppie di primers per l'amplificazione di 10 loci genici informativi (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820 e amielogenina presente sul cromosoma Y per la discriminazione del sesso) (Tab.3.3). Gli oligonucleotidi sono marcati con 3 fluorocromi differenti (FAM, JOE, NED) in modo da permettere l'analisi degli alleli mediante corsa elettroforetica capillare.

<b>LOCUS POLIMORFICO</b>	<b>LOCAZIONE CROMOSOMICA</b>	<b>UNITA' RIPETUTE</b>	<b>PESO MOLECOLARE</b>	<b>FLUOROCROMI</b>
D3S1350	3p	TCTA(TCTG) <sub>1-3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>	114-142bp	5-FAM
<b>VWA</b>	12p12-pter	TCTA (TCTG) <sub>3-4</sub> (TCTA) <sub>n</sub>	157-197 bp	5-FAM
<b>FGA</b>	4q28	(TTTC) <sub>3</sub> TTTT TTCT (CTTT) <sub>n</sub> CTCC (TTCC) <sub>2</sub>	219-267 bp	5-FAM
<b>Amielogenina</b>	X: p22.1-22.3 Y:p11.2	- -	107 113 bp	JOE
<b>D8S1179<sup>a</sup></b>	8	(TCTR) <sub>n</sub> <sup>b</sup> (TCTA) <sub>n</sub> (TCTG) <sub>n</sub>	128-168 bp	JOE
<b>D21S11</b>	21	[(TCTA) <sub>3</sub> TA (TCTA) <sub>3</sub> TCA (TCTA) <sub>2</sub> TCCA TA] (TCTA) <sub>n</sub>	189-243 bp	JOE
<b>D18S51</b>	18q21.3	(AGAA) <sub>n</sub>	273-341 bp	JOE
<b>D5S818</b>	5q21-31	(AGAT) <sub>n</sub>	135-171 bp	NED
<b>D13S317</b>	13q22-31	(GATA) <sub>n</sub>	206-234 bp	NED
<b>D7S820</b>	7q11.21-22	(GATA) <sub>n</sub>	258-294	NED

**Tab. 3.3: Tabella nella quale sono riportate le caratteristiche dei 10 loci informativi amplificati dal kit per l'identificazione personale AmpFfstr Profiler Plus (Applied Biosystems, CA).**

Una volta avvenuta la reazione di PCR i prodotti vengono diluiti in 1 volume di H<sub>2</sub>O. 1 µl di questo viene poi miscelato a 8,5 µl di formamide, in modo da permetterne la linearizzazione per la corsa elettroforetica, ed a 0,5 µl di marcatore GeneScan<sup>TM</sup>-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City CA). Questo è costituito da una serie di frammenti di DNA aventi lunghezze differenti (da 35bp a 400bp) che permette al software di analisi di dimensionare i

prodotti di PCR. Successivamente la miscela viene portata per 2 min a 94°C e 10 min a 20°C per stabilizzarne la linearizzazione.

Una volta determinato il genotipo del paziente è possibile calcolarne la percentuale di chimerismo. Questa viene determinata utilizzando l' area dei picchi rappresentati nell'elettroferogramma in base alla formula matematica descritta nell' articolo di K. Pindolia *et al* (1999), indicando con D ed R gli alleli del donatore e ricevente rispettivamente:

- 1 Se donatore e ricevente sono entrambi omozigoti senza alleli condivisi, la formula è la seguente:

$$\frac{D}{R + D} \times 100$$

- 2 Se donatore e ricevente sono entrambi eterozigoti ed entrambi gli alleli sono informativi:

$$\frac{D1 + D2}{R1 + R2 + D1 + D2} \times 100$$

- 3 Se donatore e ricevente sono entrambi eterozigoti e presentano un allele informativo e uno condiviso:

$$\frac{D}{R + D} \times 100$$

- 4 Se il ricevente è eterozigote e il donatore è omozigote senza alleli condivisi:

$$\frac{D}{R1 + R2 + D} \times 100$$

- 5 Se il ricevente è omozigote e il donatore è eterozigote senza alleli condivisi:

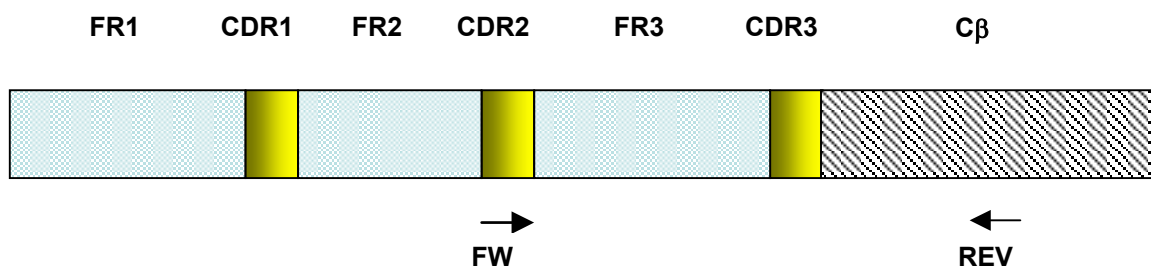
$$\frac{D1 + D2}{R + D1 + D2} \times 100$$

Nel caso in cui un ricevente presenti solo alleli del donatore si definisce chimerismo completo.



### 3.6.2 PCR per l'amplificazione delle catene $\beta$ del TCR:

Le reazioni di amplificazione delle catene  $\beta$  dei TCR sono effettuate utilizzando cDNA con 24 primers senso in grado di appaiarsi a 22 differenti famiglie (2 sono sottofamiglie) di segmenti V (*variabilità*). Il primer antisenso è invece unico per tutte le reazioni ed è disegnato su una sequenza conservata dei due segmenti C (*costanti*) (Fig 3.3 e Tab. 3.4).



**Fig. 3.3:** Rappresentazione schematica del mRNA che codifica per la catena  $\beta$  del recettore dei linfociti con indicati i siti cui appaiono i primers senso e antisenso.

FAMIGLIA	SEQUENZA PRIMER	T <sub>m</sub>
V $\beta$ 1	5' GCACAACAGTTCCTGACTTGC 3'	67,36°C
V $\beta$ 2	5' CAACCATGCAAGCCTGACCT 3'	63,52°C
V $\beta$ 3	5' GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC 3'	61,58°C
V $\beta$ 4	5' ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT 3'	56,7°C
V $\beta$ 5,1	5' ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC3'	55,9°C
V $\beta$ 5,2	5' TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG 3'	58,47°C
V $\beta$ 6	5' AGGCCTGAGGGATCCGTCTC 3'	65,18°C
V $\beta$ 7	5' CCTGAATGCCCAACAGCTCTC 3'	67,47°C
V $\beta$ 8	5' GGA CTGGAGTTGCTCATT TACT 3'	57,49°C
V $\beta$ 9	5' CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC 3'	60,64°C
V $\beta$ 11	5' TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG 3'	61,85°C
V $\beta$ 12	5' TGTCACCAGACTGAGAACCAC 3'	58,71°C
V $\beta$ 13,1	5' CAAGGAGAAGTCCCAAT 3'	54,9°C
V $\beta$ 13,2	5' GGTGAGGGTACA ACTGCC 3'	56,33°C
V $\beta$ 14	5' GTCTCTCGAAAAGAGAAGGGAAT 3'	58,73°C

Vβ15	5' AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT 3'	68,07°C
Vβ16	5' AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC 3'	57,2°C
Vβ17	5' AGGGCAAGGGCTGAGATTG 3'	62,63°C
Vβ18	5' GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA 3'	65,69°C
Vβ20	5' AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC 3'	68,30°C
Vβ21	5' CAGAATAACGGTGTAGTGGATGA 3'	59,03°C
Vβ22	5' CGCTGTGTCCCATCTCTAATC 3'	61,4°C
Vβ23	5' AAAGAGGGAAACAGCCACTCTG 3'	60,85°C
Vβ24	5' CCCAGTTTGAAAGCCAGTGACCC 3'	60,66°C
CβGEN	5'GGCTGCTCCTTGAGGGGCT 3'	63,00°C

**Tab. 3.4:** Tabella nella quale sono riportati tutti gli ologonucleotidi utilizzati in questa analisi con le rispettive temperature di appaiamento.

I primer sono stati disegnati sulla base di studi presenti in letteratura (Choi YW *et al*, 1989; Genevee C. *et al*, 1992).

A seconda della diversa temperatura di melting (Tm) vengono allestite 5 diverse reazioni di PCR (Tab 3.5), due delle quali sfruttano il metodo della Touch-down.

FAMIGLIA	TIPO PCR (T fase appaiamento)
Vβ1, Vβ6, Vβ7, Vβ15, Vβ18, Vβ20	Touch down 69°C → 63°C (gruppo1)
Vβ2, Vβ3, Vβ5,2, Vβ21, Vβ22	PCR Standard 59°C (gruppo 2)
Vβ4, Vβ5,1, Vβ 8, Vβ12, Vβ13,1, Vβ13,2 , Vβ17, Vβ24	Touch down 63°C → 57°C (gruppo 3)
Vβ9, Vβ10, Vβ11, Vβ16	PCR Standard 60°C (gruppo 4)
Vβ14, Vβ23	PCR Standard 58°C (gruppo 5)

**Tab. 3.5:** Tabella che indica i raggruppamenti con cui sono state allestite le reazioni e ne indica le temperature.

Le reazioni sono allestite con 100 ng di cDNA, in un volume finale di 25 µl. Si utilizzano Buffer II (Applied Biosystems) 1x, 10pmoli di primer senso e di primer antisenso, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2mM e 0,04 U/ µl di Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City CA). La reazione si svolge su termociclatore DNA termalcycler (BIORAD). Dopo 10 min a 96°C necessari per l'attivazione dell'enzima, si effettuano 35 cicli di amplificazione, ognuno con uno step di

denaturazione a 96°C di 30 sec, uno step di appaiamento ad una temperatura variabile a seconda dei primer (da 69°C a 55°C) di 30 sec e uno step di estensione a 72°C di 30 sec. Dopo i 35 cicli si ha uno step di estensione addizionale della durata di 10 min sempre a 72°C. Gli amplificati sono separati su gel di agarosio al 2%. Per permettere le successive analisi in elettroforesi capillare (più sensibile rispetto all'elettroforesi su gel di agarosio) il primer antisenso è coniugato ad un fluorocromo (FAM) in posizione 5'.

Valutata la presenza di un amplificato su gel di agarosio i campioni sono successivamente denaturati con formamide e miscelati ad un marcatore di peso molecolare (in questo caso il ROX™500 che contiene frammenti fluoriscinati dalle 35 alle 500 paia di basi) e quindi analizzati mediante elettroforesi capillare.

Anche in questo caso come per la valutazione dei microsatelliti la successiva fase di analisi è effettuata con l'ausilio del software *GeneMapper*. Questa permette di ottenere il punteggio di complessità dei recettori linfocitari. Per ogni prodotto di amplificazione ottenuto con le varie famiglie di primers Vβ si calcola la formula :

$$\text{Punteggio di Complessità} = ( AT / APM ) \times N^{\circ} PM$$

dove AT è la somma delle altezze di tutti i picchi, APM è la somma delle altezze dei picchi maggiori cioè quei picchi la cui altezza rappresenta almeno il 10% della somma delle altezze totali, e N°PM è il numero di picchi maggiori. (Bomberger C. Et al, 1998)

### **3.6.3 PCR per l'amplificazione delle regioni CDR3 delle immunoglobuline:**

Per monitorare il repertorio linfocitario B è stato sintetizzato il cDNA da 4µg di RNA estratto da PBMCs mediante TRIzol (Invitrogen) e retrotrascritto con "High Capacity kit" (Applied Biosystem) secondo protocollo descritto dalla ditta.

Ogni campione è stato amplificato con una metodica di doppia amplificazione (*nested-PCR*) basata sull'utilizzo di due coppie di oligonucleotidi consenso per analizzare i riarrangiamenti produttivi delle IgH (Gokmen E *et al*, 2001). Il protocollo sperimentale si avvale di oligonucleotidi descritti precedentemente da Corradini et al (1999) e prevede l'utilizzo nella prima reazione di *primer consensus* e nella seconda di 7 *primer* specifici per i segmenti variabili dei geni delle immunoglobuline (famiglie IgHV), in modo che la ricostituzione di ogni singola famiglia sia analizzabile individualmente per una maggiore risoluzione della metodica. L'oligonucleotide antisenso *consensus*, JHD, è disegnato sulla regione di giunzione JH (Tab 3.6).

Nome	Sequenza
Primer	
Vh	5'-CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG-3'
Cons1	
Vh	5'-CAGGTRCAGCTGCAGSAGTCRGG-3'
Cons2	
JHD	FAM 5'-CATGGTCCCTTGGCCCCAG-3'
Nested	
JHD	5'- ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT -3'
VH1D	5'- CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG -3'
VH2D	5'- TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA -3'
VH3D	5'- GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA -3'
VH4aD	5'- TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA -3'
VH4bD	5'- CGCTGTCTCTGGTTACTCCATCAG -3'
VH5D	5'- GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA -3'
VH6D	5'- CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG -3'
VH1FS	5'- CAGGTGCAGCTGGTGCARYCTG -3'
VH2FS	5'- CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTG -3'
VH3FS	5'- GAGGTGCAGCTGGTGSAGTCYG -3'
VH4aFS	5'- CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCSG -3'
VH4bFS	5'- CAGGTGCAGCTACARCAGTGGG -3'
VH5FS	5'- GAGGTGCAGCTGKTGCAGTCTG -3'
VH6FS	5'- CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG -3'
VH1LS	5'- CTCACCATGGACTGGACCTGGAG -3'
VH2LS	5'- ATGGACATACTTTGTTCCACGCTC -3'
VH3LS	5'- CCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG -3'
VH4LS	5'- ACATGAAACAYCTGTGGTTCTTCC -3'
VH5LS	5'- ATGGGGTCAACCGCCATCCTCG -3'
VH6LS	5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTC -3'
VH7LS	5'- TTCTTGGTGGCAGCAGCCACA -3'
VH1L	5'- CCATGGACTGGACCTGGAGG -3'
VH2L	5'- ATGGACATACTTTGTTCCAC -3'
VH3L	5'- CCATGGAGTTTGGGCTGAGC -3'
VH4L	5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTT -3'

VH5L	5'- ATGGGGTCAACCGCCATCCT -3'
VH6L	5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT -3'

**Tab. 3.6:** Tabella nella quale sono riportati tutti gli ologonucleotidi utilizzati per l'amplificazione delle CDR3 delle differenti famiglie immunoglobuliniche.

Le reazioni sono allestite con 50ng di cDNA, in un volume finale di 50µl. Si utilizzano Buffer II (Applied Biosystems) 1X, 10pmoli di primer senso e di primer antisenso, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs 0,2mM e 0,04U/µl di Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City CA). Dopo 10 minuti a 96°C necessari per l'attivazione dell'enzima, si effettuano 35 cicli di amplificazione, ognuno con un ciclo di denaturazione a 96°C di 30 secondi, uno di appaiamento ad una T<sub>m</sub> di 62°C per 30 secondi ed uno di estensione a 72°C di 30 secondi. La seconda PCR si effettua diluendo 1:10 il prodotto della prima. Si utilizzano Buffer II (Applied Biosystems) 1X, 10pmoli di *primers* senso e antisenso, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs 0,2mM e 0,04 U/µl di Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City CA). Dopo 10 minuti a 96°C necessari per l'attivazione dell'enzima, si effettuano 28 cicli di amplificazione a 96°C di 30 secondi, 64°C per 30 secondi ed a 72°C di 30 secondi. Dopo i 28 cicli si ha una fase di estensione addizionale di 10 minuti a 72°C.

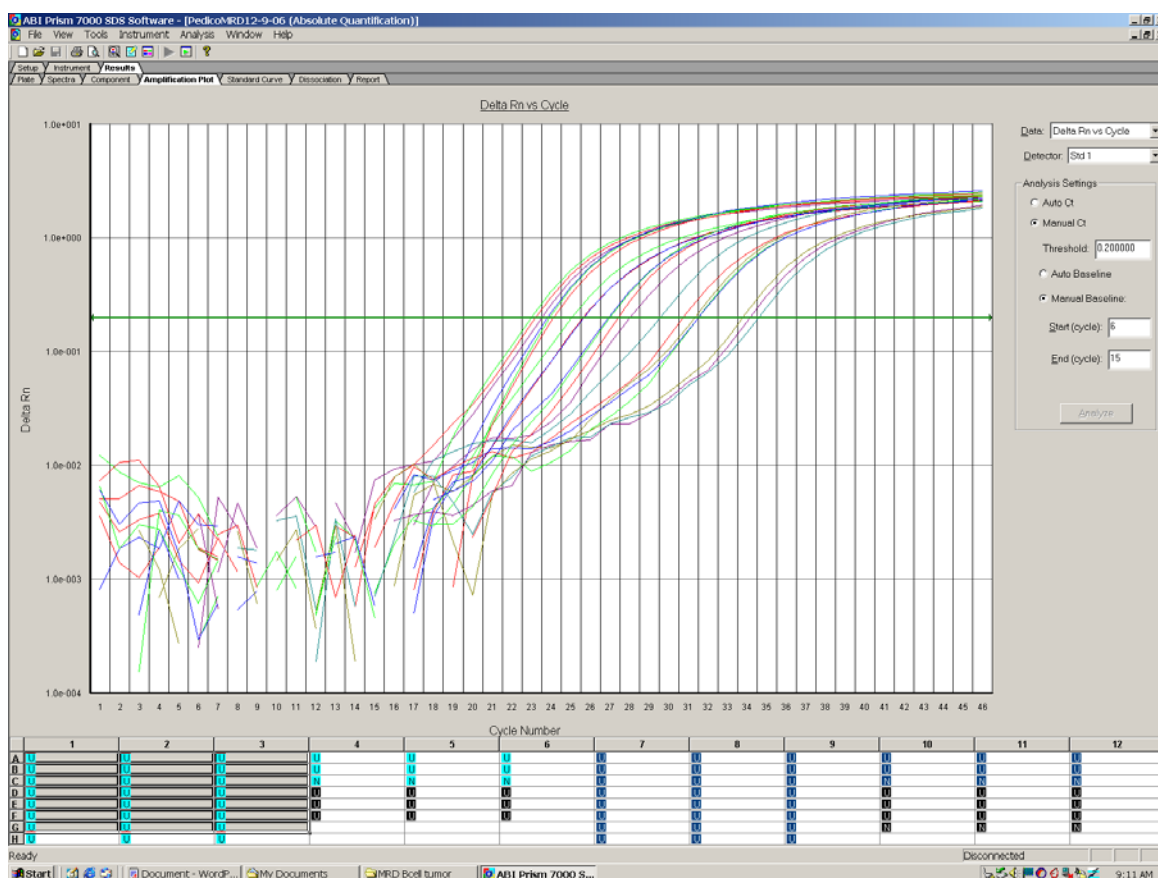
Gli amplificati sono separati su gel di agarosio al 2%. Per permettere le successive analisi in elettroforesi capillare, il primer antisenso è coniugato ad un fluorocromo (FAM) in posizione 5'. Valutata la presenza di un amplificato su gel di agarosio, i campioni sono denaturati con formamide e miscelati ad un marcatore di peso molecolare noto, in questo caso il ROX<sup>TM</sup>500 che contiene frammenti fluoriscinati dalle 35 alle 500 paia di basi. Infine sono analizzati mediante elettroforesi capillare. Il software di analisi GeneMapper (Applied Biosystems), trasforma il segnale di fluorescenza, emesso dai prodotti di PCR, in un picco cromatografico generando un grafico con in ascissa le lunghezze degli amplificati (espresse in paia di basi) e in ordinate l'intensità di fluorescenza (RFU). L'altezza dei picchi rappresenta la quantità relativa di campione. Anche per questa analisi è stata applicata la formula per il calcolo del punteggio di complessità come riportato precedentemente.

### **3.7 Reazioni quantitative per l'amplificazione degli acidi nucleici:**

#### **3.7.1 Real-Time PCR dei sjTREC:**

Per quantificare il numero di sjTRECs nei linfociti derivati da sangue periferico si utilizza un sistema di RealTime PCR con tecnologia TAQMAN. Questa metodica permette di ottenere il numero assoluto di sjTRECS (quantificazione assoluta) e prevede la creazione di 2 curve di taratura, rispettivamente una costituita da diluizioni seriali di un plasmide contenente il frammento costante del sjTREC e una costituita da diluizioni seriali di un plasmide contenente il gene ubiquitario GAPDH. I plasmidi sono ottenuti mediante clonaggio come precedentemente descritto. Le curve sono costituite da 6 diverse concentrazioni seriali partendo da  $10^6$  copie fino a 10 copie di plasmide per punto. Inoltre i plasmidi del sjTREC devono essere diluiti in DNA genomico estratto da cellule K562 (10ng/ $\mu$ l) in modo da riprodurre le stesse condizioni del campione in analisi.

La reazione di PCR viene effettuata in un ABI Prism 7000 Sequence Detector System secondo le indicazioni di letteratura. L'utilizzo della tecnologia TAQMAN prevede l'impiego di una sonda con temperatura di appaiamento  $10^\circ\text{C}$  superiore alla temperatura di appaiamento dei primers utilizzati. La sonda ibrida in posizione intermedia ai due primers ed è coniugata ad un fluorocromo in posizione 3' e ad un Quencher in posizione 5'. Quando la sonda è integra la fluorescenza emessa dal fluorocromo eccitato da un laser viene assorbita dalla molecola quencher. Tuttavia durante la reazione di amplificazione la Taq polimerasi che catalizza l'estensione della sequenza di DNA taglia la sonda grazie alla sua attività esonucleasica 5'-3' dividendo fisicamente il fluorocromo dal Quencher. In questo modo ad ogni ciclo di amplificazione aumenta in modo esponenziale il numero di sonde degradate e quindi di fluorocromi liberi. La fluorescenza emessa può quindi essere detectata e registrata da una CCD camera (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4. Esempio di risultato di una real-time PCR come visualizzato attraverso il programma di interfaccia alla macchina *ABI Prism 7000 SDS Software*.**

Nei nostri esperimenti si utilizzano due sonde coniugate ai fluorocromi FAM e VIC ed al quencher TAMRA:

sonda sjTREC 5'-(FAM)CATAGGCACCTGCACCCCGTGC(TAMRA)-3'

sonda GAPDH 5'-(VIC)CCACCCAGAAGACTGTGGATGGCC(TAMRA)-3'

Per la PCR del TREC vengono utilizzati i seguenti primer:

senso 5'-TGGTTTTTGTAAAGGTGCCAC-3'

anti-senso 5'-GTGCCAGCTGCAGGGTTT-3'

Il gene del GAPDH invece è amplificato con i primer:

senso 5'- ACCACAGTCCATGCCATCACT -3'

anti-senso 5'- GGCCATCACGCCACAGTT -3'

La reazione di amplificazione è effettuata con 100 ng di DNA genomico estratto da cellule mononucleate di sangue periferico, Taqman universal PCR master mix 1X (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 pmoli di primer senso ed antisenso, 1 pmole di sonda e 2% di BSA in un volume finale di 25 µl. Sia le curve standard che i campioni dei pazienti vengono analizzati in doppio. La reazione contiene due controlli negativi: uno costituito dal DNA della linea cellulare K562 (privo del TREC) e il secondo dalla miscela di reazione priva del DNA. Entrambi i geni vengono sottoposti ai seguenti cicli di reazione: 50°C per 2 minuti (step di attivazione dell'enzima), 95°C per 10 minuti (step di denaturazione), seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto (step unico di appaiamento ed allungamento).

Il dato che si ricava è espresso come n°TREC/microgrammo di DNA genomico ed è calcolato sulla base delle curve standard mediante la formula :

$$\text{TREC}/\mu\text{g} = \text{N}^\circ \text{TREC} / \text{GAPDH}/2 * 6,6 \text{ pg}$$

### **3.8 Elettroforesi su gel di Agarosio:**

Questa tecnica permette di separare i prodotti di PCR in base alle caratteristiche chimico-fisiche degli stessi. L'agarosio è un polimero derivato da un'alga che è in grado di organizzarsi in una griglia molecolare a temperatura ambiente. L'agarosio viene sciolto ad elevate temperature in un opportuno volume di TBE (buffer salino) e quindi lasciato polimerizzare a temperatura ambiente. Le dimensioni dei pori della griglia sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'agarosio stesso. Fornendo un campo elettrico, mantenuto all'interno della camera di corsa grazie alla presenza di TBE, è possibile far migrare i prodotti di una reazione di PCR all'interno della matrice polimerica. Il DNA è infatti carico negativamente per via dei gruppi fosfato. La velocità di migrazione dei prodotti in analisi è direttamente proporzionale all'intensità del campo elettrico ed inversamente proporzionale alle dimensioni del frammento di DNA nonché alla concentrazione di agarosio. Nel nostro laboratorio la separazione dei prodotti di PCR viene effettuata su gel di agarosio al 2-3% con un campo elettrico compreso fra i 70 e i 90 Volt. I prodotti di DNA amplificati sono visualizzati grazie all'utilizzo di etidio bromuro. Questo è un'intercalante del DNA che emette fluorescenza se eccitato da raggi UV.

Le dimensioni dei frammenti in analisi sono ricavate mediante un marcatore molecolare contenente frammenti genici a peso molecolare noto (Fig. 3.5).



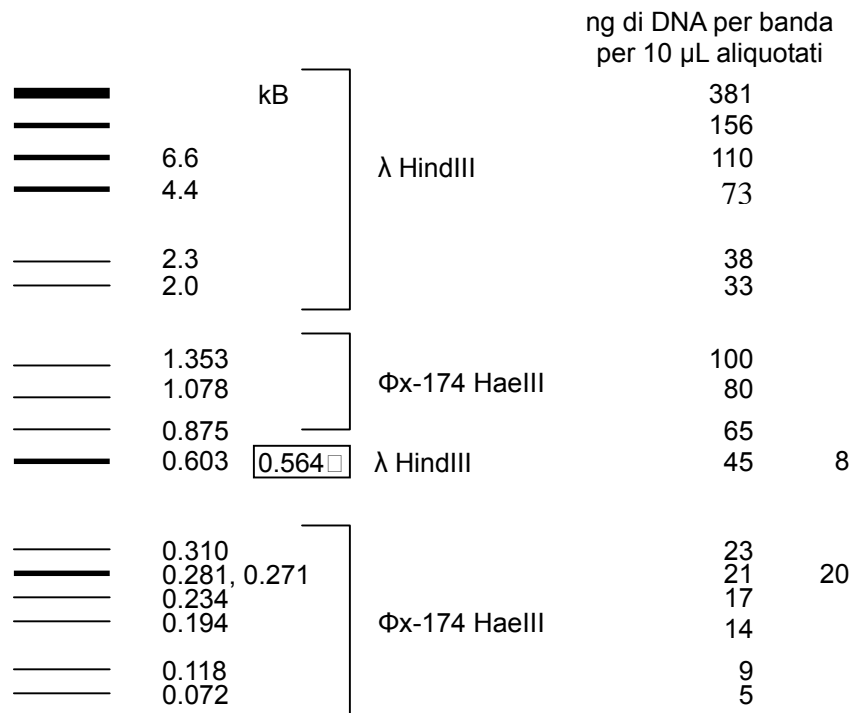


Fig.3.5 : Marcatore molecolare Φx+λ.

### 3.9 Elettroforesi capillare:

La corsa elettroforetica capillare si effettua con un Genetic Analyser®3130 (Applied Biosystems) a 60°C. Questo strumento, costituito da 4 capillari contenenti una matrice polimerica denaturante (POP4), è in grado di prelevare il DNA da una miscela denaturante mediante iniezione elettrocinetica. Il DNA viene quindi posto in un campo elettrico tale per cui, a causa delle sue cariche negative, tende a migrare verso il polo positivo. La velocità di migrazione è direttamente proporzionale all'intensità del campo applicato ed inversamente proporzionale alle dimensioni del frammento ed alle dimensioni del polimero utilizzato. La conducibilità elettrica all'interno dei capillari è mantenuta grazie ad un buffer salino. I vari fluorocromi vengono eccitati da un raggio laser e la fluorescenza emessa viene registrata da un CCD camera.

### 3.10 Analisi mediante GeneMapper:

L'analisi delle corse capillari è effettuata mediante il software *GeneMapper* che visualizza i risultati sotto forma di elettroferogramma con in ascissa le paia di basi (bp) ed in ordinata l'intensità di fluorescenza relativa (rfu) (Fig. 3.6)

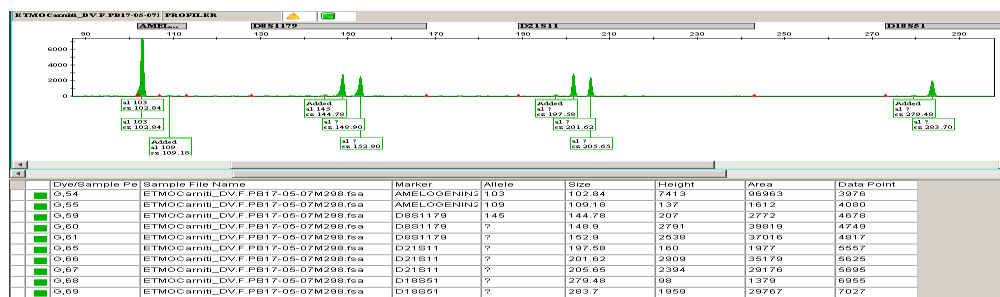


Fig.3.6: Esempio della schermata del programma *GeneMapper*.

### 3.11 Citofluorimetria a Flusso:

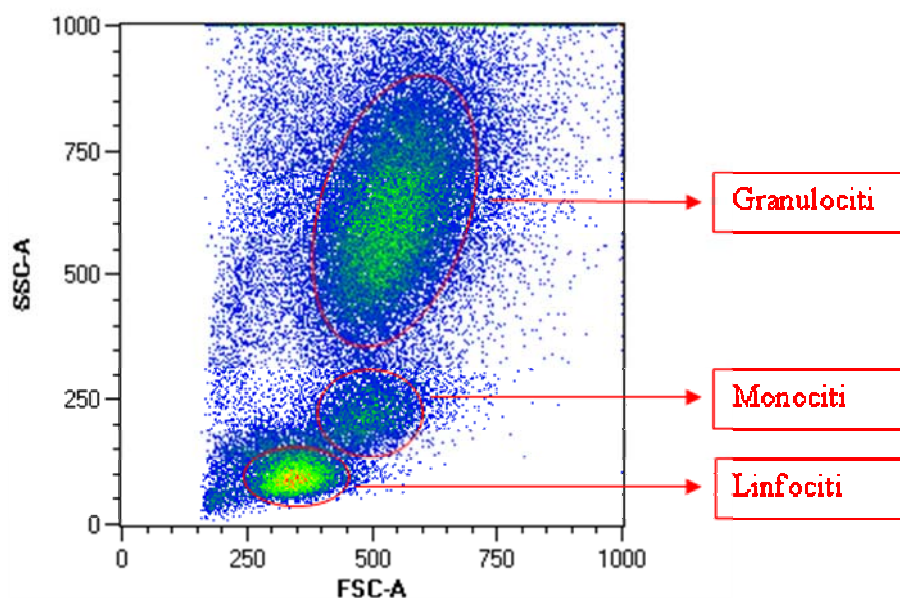
La citometria a flusso è una tecnologia che permette la rapida analisi di particelle microscopiche sospese in un liquido. Mediante questa tecnologia è possibile analizzare particelle aventi dimensioni estremamente variabili quali cromosomi, batteri, cellule eucariote e piccoli aggregati cellulari. Queste, attraverso un sistema di pressione differenziale, vengono convogliate ed un punto di interrogazione dove l'esposizione a raggi luminosi aventi lunghezze d'onda variabili permette la valutazione di diverse caratteristiche chimico/fisiche del campione. Inoltre, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati a sostanze fluorescenti, è possibile valutare la presenza di specifiche molecole sulle particelle in analisi.

Il citometro a flusso è composto da tre sistemi principali:

1. Sistema Fluidico;
2. Sistema Ottico;
3. Sistema Elettronico.

Il sistema fluidico è responsabile del trasporto del campione dal punto di raccolta al punto di interrogazione. Esso genera una differenza di pressione fra il liquido in cui è sospeso il campione ed il liquido che circonda il campione (*sheat fluid*) permettendo l'instaurarsi di un fenomeno noto come focalizzazione idrodinamica. Questo consente di allineare le particelle all'interno della camera di flusso in modo che passino singolarmente dinanzi al punto di interrogazione. Tale processo risulta fondamentale per la corretta funzionalità del citometro in quanto permette l'analisi di una singola particella per volta.

Il sistema ottico è costituito da una sistema di eccitazione e da un sistema di raccolta della luce. Il primo è costituito da una o più fonti luminose e da una serie di specchi e filtri che permettono di convogliare la luce incidente al punto di interrogazione. Il sistema di raccolta invece è costituito da una serie di filtri e specchi in grado di convogliare diverse lunghezze d'onda emesse dal campione ai rispettivi rivelatori. Nei citometri moderni le principali fonti luminose sono costituite da laser in grado emettere luce ad elevata energia e a specifiche lunghezze d'onda. Al punto di interrogazione la luce colpisce le particelle in analisi e da origine a 2 parametri fisici ed ad un numero variabile di segnali di fluorescenza in base al sistema utilizzato. I due parametri fisici rappresentano rispettivamente la luce che è in grado di attraversare la particella (*forward scatter*) e la luce che viene invece deviata a 90° (*side scatter*). Il primo parametro è grossolanamente associato alle dimensioni della particella mentre il *side scatter* è associato alla granulosità ed alla rugosità della superficie cellulare. Analizzando un campione di sangue periferico o midollare mediante questi due parametri è possibile distinguere diverse popolazioni cellulari discriminate in base a dimensioni e morfologia (Fig3.7).



**Fig. 3.7:** Rappresentazione di un campione di sangue periferico dopo lisi dei globuli rossi in base ai parametri fisici FSC e SSC.

L'utilizzo di anticorpi monoclonali in grado di riconoscere specifici epitopi inoltre permette di indagare la presenza di determinate molecole di interesse nel campione. Questi anticorpi possono essere rilevati mediante coniugazione diretta con molecole fluorescenti o mediante marcatura indiretta con un anticorpo fluoriscinato. L'introduzione di coloranti fluorescenti nell'analisi citometrica ha permesso di aumentare notevolmente le applicazioni di questa

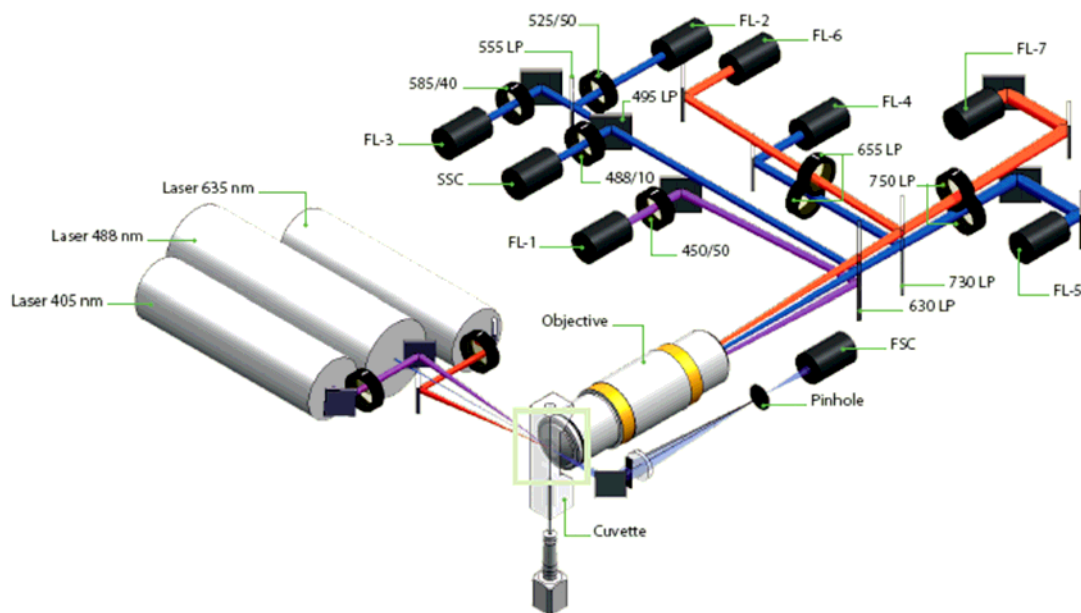
tecnologia. Utilizzando fonti luminose in grado di emettere a lunghezze d'onda differenti è possibile infatti eccitare un ampio spettro di molecole che a loro volta emettono a lunghezze d'onda caratteristiche. Attraverso l'utilizzo di specifici filtri in grado di selezionare lunghezze d'onda differenti è possibile discriminare luce emessa da varie sostanze fluorescenti e quindi valutare contemporaneamente la presenza di diverse molecole. Tuttavia gli spettri di emissione di queste sostanze possono sovrapporsi dando origine a dei segnali falsi positivi. Per questo motivo è necessario un'accurata messa a punto dell'esperimento. Inoltre è possibile togliere la fluorescenza aspecifica dovuta alla sovrapposizione degli spettri di emissione tramite specifici algoritmi in un processo noto come compensazione.

Infine il sistema elettronico è costituito da una serie di fotodiodi e fotomoltiplicatori che consentono di convertire i segnali luminosi emessi dalle particelle in analisi in segnali elettronici elaborabili da un computer.

La citometria a flusso ha trovato ampio utilizzo soprattutto nel contesto onco-ematologico e rappresenta ad oggi una tecnologia fondamentale per la diagnosi di patologie ematologiche (oncologiche e non) nonché per il monitoraggio quantitativo e qualitativo del sistema immunitario.

Nel nostro studio abbiamo monitorato mediante citometria a flusso diverse sottopopolazioni cellulari in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Gli esperimenti sono stati condotti dopo scongelamento delle cellule o su campioni di sangue periferico con un citofluorimetro MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotec®). Questo strumento è dotato di tre laser in grado di emettere luce rispettivamente a 405 nm, 488nm e 635 nm ed è in grado di registrare fino a 7 fluorescenze contemporaneamente oltre ai 2 parametri fisici (FSC e SSC).(Fig 3.8)

MACSQuant Analyzer optical bench



**Fig. 3.8: Schema del banco ottico del citofluorimetro MACSQuant Analyzer**

Il protocollo di marcatura delle cellule prevede di incubare  $10^6$  cellule risospese in 100 $\mu$ l di buffer (PBS al 2% di FBS) con la combinazione di anticorpi specifica per 20min a 4°C. Quindi si procede ad un lavaggio con 1ml di buffer seguito da una centrifugata per 5 min a 200g. Successivamente si elimina il surnatante e si risospendono le cellule in 200 $\mu$ l di buffer. Le cellule vengono poi analizzate entro 2 ore al citofluorimetro avendo cura di tenerle in ghiaccio ed al buio per evitare fenomeni di decadimento nella fluorescenza dei fluorofori. Per la nostra analisi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali murini: CD3VioBlue (Miltenyi biotec), CD3APC-Cy7 (Biolegend), CD4PerCP (Miltenyi biotec), CD4APC (Miltenyi biotec), CD8FITC (Miltenyi biotec), CD56APC (Miltenyi biotec), CD56FITC(BD), CD45RA-APC (Miltenyi biotec), CD45RA-VioBlue (Miltenyi biotec), CD62L PE (Miltenyi biotec), CD62L PE-Cy7 (Biolegend), CD45VioBlue (Miltenyi biotec), CD19 APC (Miltenyi biotec), CD27PerCP (Miltenyi biotec), CD27PerCP-Elfuor710 (EBIOSCIENCE), IgD PE (Miltenyi biotec). Attraverso la combinazione di questi marcatori di superficie è stata possibile l'identificazione delle seguenti popolazioni:

- i) Cellule *Natural Killer*; caratterizzate dall'espressione di superficie del marcatore CD56 ;
- ii) Linfociti B; caratterizzati dall'espressione di superficie del marcatore CD19;
- iii) Linfociti T; caratterizzati dall'espressione di superficie del marcatore CD3;
- iv) Linfociti T helper; caratterizzati dalla coespressione dei marcatori CD3 e CD4;
- v) Linfociti T citotossici; caratterizzati dalla coespressione dei marcatori CD3 e CD8.

Inoltre è stato possibile studiare le fasi maturative delle singole popolazioni come riportato in tabella.

Sottopopolazioni CD4+	Marcatori di superficie
Naive	CD4+/CD45RA+/CD62L+
Central	CD4+/CD45RA-/CD62L+
Effector	CD4+/CD45RA-/CD62L-
Terminal	CD4+/CD45RA+/CD62L

Tab. 3.7: Tabella nella quale sono riportate le combinazioni di marcatori di superficie utilizzati per distinguere le fasi maturative dei linfociti CD4 helper.

Sottopopolazioni CD8+	Marcatori di superficie
Naive	CD8+/CD45RA+/CD62L+
Central	CD8+/CD45RA-/CD62L+
Effector	CD8+/CD45RA-/CD62L-
Terminal	CD8+/CD45RA+/CD62L-

Tab. 3.8: Tabella nella quale sono riportate le combinazioni di marcatori di superficie utilizzati per distinguere le fasi maturative dei linfociti CD8 citotossici.

Sottopopolazioni CD19+	Marcatori di superficie
Naive B cell	CD19+/IgD+/CD27-
Pre-switch Memory/IgM	CD19+/IgD+/CD27+
Post-switch Memory/Switch	CD19/IgD-/CD27+

Tab. 3.9: Tabella nella quale sono riportate le combinazioni di marcatori di superficie utilizzati per distinguere le fasi maturative dei linfociti B CD19.

### 3.12 Analisi Statistiche:

Le analisi statistiche sono state eseguite tramite programma GraphPad Prism5.0. I dati sono stati paragonati fra loro mediante il test non parametrico di Mann-Whitney e sono stati considerati significativi valori di probabilità inferiori a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## CAPITOLO IV

### RISULTATI

#### 4.1 Risultati clinici

Tutti i 24 pazienti inclusi nello studio presentavano normali valori di piastrine ed emoglobina all'esame emocromocitometrico al momento delle analisi citometriche mentre 2 pazienti (uno del gruppo Aploidentico e uno del gruppo MUD) presentavano una conta totale di leucociti lievemente inferiore alla norma; due pazienti sottoposti a trapianto MUD presentavano una leggera linfocitopenia ad un anno dal trapianto all'indagine emocromocitometrica (rispettivamente 700 e 800ucl: range normale per linfociti 900-5200ucl) mentre un paziente, sempre sottoposto a trapianto da donatore non familiare manteneva uno stato linfocitopenico prolungato fino a tre anni dal trapianto (400ucl).

Il dosaggio delle immunoglobuline risultava alterato in una delle tre componenti considerate (IgG, IgA, IgM) al momento dell'analisi in 2 pazienti su 6 (33%) del gruppo sottoposto a trapianto aploidentico e in 3 pazienti su 18 (16%) del gruppo sottoposto a trapianto da donatore da banca (valori normali di riferimento IgG 700-1600, IgA 70-400, IgM 40-230).

Le maggiori complicazioni verificatesi dopo trapianto sono state lo sviluppo di infezioni opportunistiche di natura virale e l'instaurarsi di reazioni avverse, quali la reazione di trapianto contro l'ospite (*graft versus host disease* – GVHD). In tutti i pazienti sono stati riscontrati episodi di riattivazione virale o infezioni opportunistiche di varia natura in seguito a immunodepressione indotta dai regimi di condizionamento e terapia per la GVHD. Un solo paziente sottoposto a trapianto aploidentico (16%) ha sviluppato GVHD acuta (aGVHD) di grado II dopo la terza ed ultima infusione di linfociti del donatore CD8-depleti (giorno +135). Questa è successivamente evoluta ad una forma cronica (cGVHD) limitata che non ha richiesto ulteriori trattamenti. Un secondo paziente ha sviluppato una lieve forma di cGVHD manifestatasi unicamente come discromia del tronco. Nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore familiare non consanguineo l'incidenza di aGVHD è stata del 55% (10/18 pz) di cui

4 casi di grado I, 2 casi di grado II e 4 casi di grado III-IV. Uno di questi ultimi casi si è evoluto in forma cronica mentre un solo caso di cGVHD de novo si è manifestata in un paziente a +200 giorni dal trapianto. Tutti i pazienti appartenenti al gruppo aploidentico tranne uno hanno sperimentato una riattivazione di Citomegalovirus (CMV) anche se in nessuno caso questa si è manifestata come un malattia citomegalica. Nei pazienti MUD la riattivazione di CMV si è osservata in 11 soggetti su 18 ed anche in questo gruppo non in nessun soggetto essa si è tradotta in un malattia citomegalica. Nessun paziente sottoposto a trapianto aploidentico ha manifestato riattivazione del virus di Epstein-Barr (EBV) mentre un unico paziente ha manifestato tale problematica tra i pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare.

#### **4.2 Attecchimento del trapianto e analisi del chimerismo**

L'analisi del chimerismo è stata effettuata mediante amplificazione delle regioni microsatelliti su DNA genomico estratto da cellule di sangue periferico o midollare.

Al giorno +30 post trapianto tutti i pazienti analizzati mostravano un chimerismo completo ossia la presenza di un'emopoiesi del ricevente superiore al 95%. Per il gruppo di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico il tempo mediano di recupero dei neutrofili (> a 500/ucl) è stato di 14,5 giorni (*range* 11-17 giorni), mentre la mediana di recupero delle piastrine (> 20000/ucl) è stata di 11,5 giorni (*range* 7-17 giorni). I pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare compatibile hanno invece recuperato la conta dei neutrofili ad una mediana di 10,5 giorni (*range* 9-13 giorni) mentre la mediana di recupero delle piastrine è stata di 12,5 giorni (*range* 5-16 giorni).

Pertanto in tutti i pazienti è stato osservato un buon attecchimento del trapianto con ripresa della funzionalità emopoietica ad un mese dal il trapianto.



### 4.3 Ricostituzione immunitaria

La valutazione della ricostituzione immunitaria dopo trapianto allogenico è stata condotta mediante quattro metodiche di analisi: studio delle popolazioni linfoidi circolanti mediante letture immunofenotipiche; valutazione della funzionalità timica mediante misurazione dei livelli degli emigranti timici utilizzando come marcatore il *T-cell receptor rearrangement excision circle* (TREC); valutazione del repertorio del gene per la catena  $\beta$  del recettore dei linfociti T ( $V\beta$  *T-cell receptor - TCR*); valutazione del compartimento linfocitario B mediante studio della complessità del gene della catena pesante delle immunoglobuline (*Immunoglobulin heavy chain - IgH*).

#### 4.3.1 Immunofenotipo

Il regime di condizionamento pre-trapianto e la deplezione T linfocitaria creano nel paziente allotrapiantato una situazione di aplasia midollare che si manifesta con un grado variabile di immunodeficienza dovuta ad una ridotta produttività midollare. Questa si manifesta con una diminuzione nella quantità di cellule circolanti nel sangue periferico ed espone i pazienti ad aumentato rischio infettivo. Ad oggi la maggior parte degli studi ha focalizzato la propria attenzione sulla valutazione delle popolazioni linfocitarie fino ad un anno dal trapianto. Tuttavia diverse evidenze sembrano confermare il perdurare di una situazione di deficit immunologico anche oltre l'anno dal trapianto (Sanchez-Guijo F.M., *et al.* 2005; Quan Le R. *et al.* 2011). Per questo le nostre analisi si sono concentrate su punti inoltrati post trapianto ed in particolare abbiamo valutato mediante citofluorimetria a flusso le diverse popolazioni cellulari ad 1 anno, 1 anno e mezzo, 2 anni, 3 anni e oltre 4 anni dal trapianto. Al fine di valutare l'influenza del tipo di trapianto sul recupero delle diverse sottopopolazioni linfoidi per ogni punto di analisi sono stato confrontati un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico ed un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore di banca non familiare (*match unrelated donor – MUD*). Per tutte le analisi i dati ottenuti dalle due coorti di pazienti sono stati successivamente confrontati ad un gruppo di 10 donatori sani con età paragonabile a quelle dei pazienti al momento del trapianto.

##### *i) Linfociti Natural Killer:*

L'analisi dei linfociti natural killer è stata condotta mediante marcatura con anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene di superficie CD56 (*neural cell adhesion molecule - NCAM*) espresso in modo selettivo da questi linfociti. Queste cellule sono fisiologicamente coinvolte in meccanismi di controllo dalle infezioni virali nonché nel controllo di eventuali

trasformazioni neoplastiche e rappresentano mediamente il 5-15% dei linfociti circolanti. Come si può osservare dai grafici l'andamento di questa popolazione oltre l'anno dal trapianto non presenta differenze statisticamente significative né paragonando i gruppi a differente tipologia di trapianto né rispetto ai donatori sani in nessuno dei punti analizzati. (Fig 4.1) Questo dato è concorde con la letteratura che dimostra come tra le diverse classi linfocitarie questa sottopopolazione sia quella in grado di recuperare più precocemente (nei primi 3 mesi dal trapianto). (Auletta J.J. *et al*, 2005)

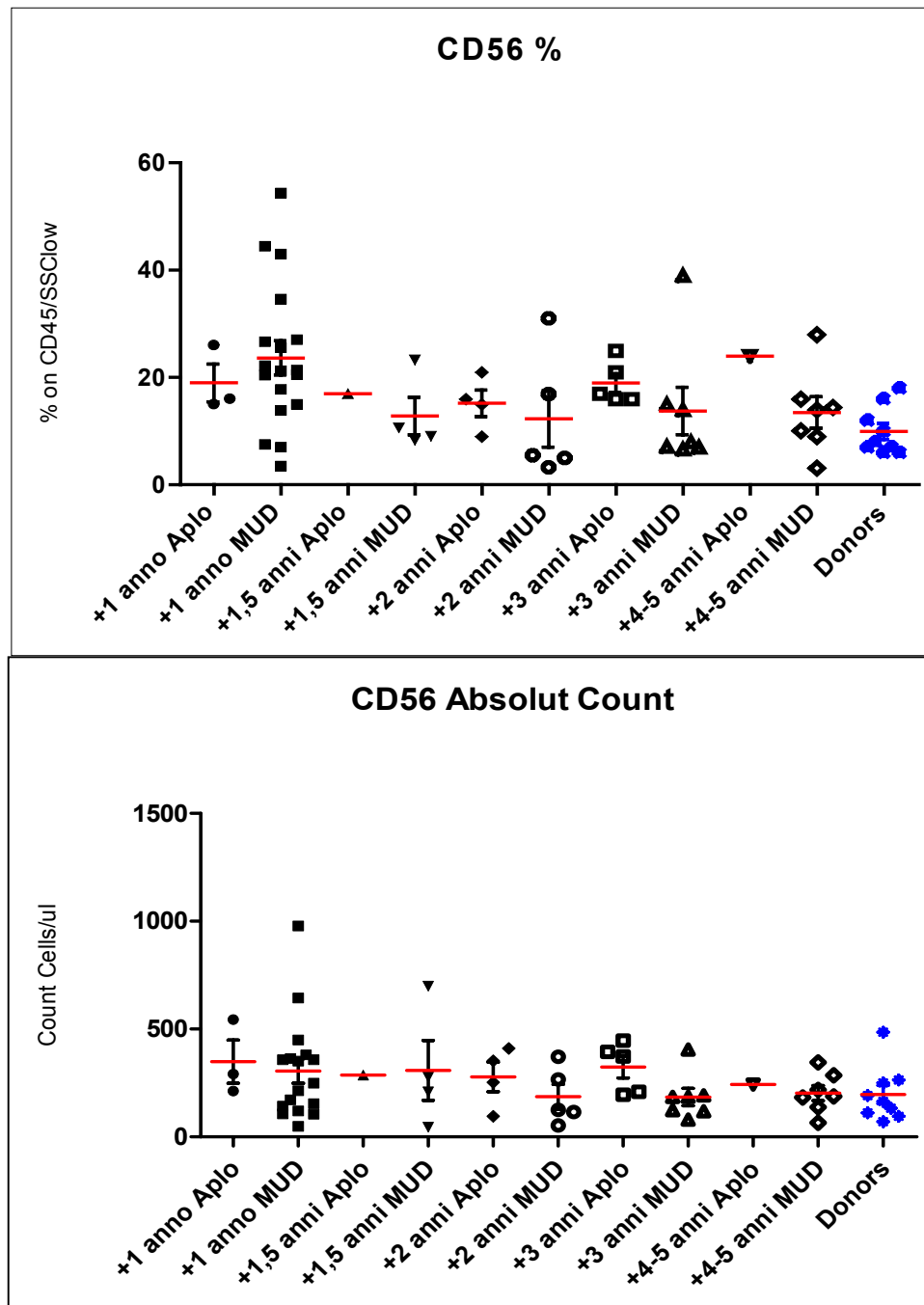
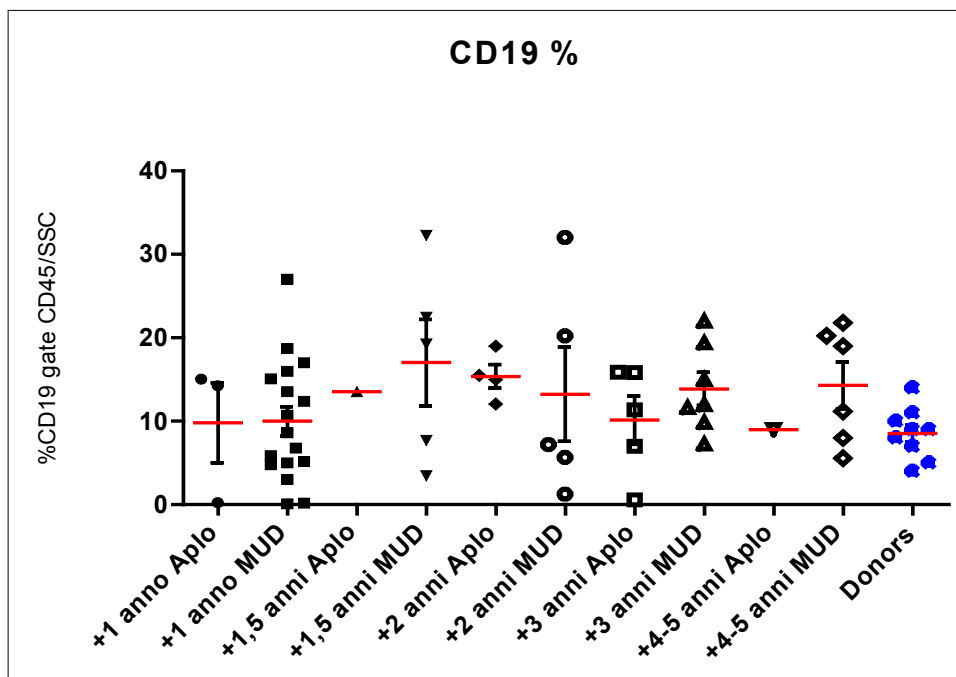


Fig. 4.1: Andamento delle cellule Natural Killer (NK – CD56+) oltre un anno dopo trapianto nelle due coorti di pazienti. Nel grafico in alto sono rappresentati i valori percentuali su linfociti totali

identificati mediante elevata espressione del marcatore CD45 e basso side scatter. Nel grafico in basso sono riportate le conte assolute su microlitro.

- *Linfociti B:*

I Linfociti B sono caratterizzati dall'espressione di superficie della molecola CD19 (*cluster of differentiation 19*) e diversi autori hanno descritto un conta ridotta di questa popolazione anche oltre i due anni post trapianto (Storek J. *et al*, 2001; Sanchez-Guijo F.M., *et al*. 2005). Fisiologicamente queste cellule sono responsabili dell'immunità umorale e della produzione di anticorpi e sono coinvolte nella difesa da agenti microbici principalmente di origine batterica. A livello periferico rappresentano un numero variabile tra i 5 e il 10% dei linfociti circolanti. Come si può osservare dai grafici sottostanti non vi sono differenze statisticamente significative confrontando i due gruppi di pazienti fra loro in nessuno dei punti analizzati. Tuttavia sembra esservi un leggero incremento sia nella percentuale che nel numero assoluto di tali linfociti nei pazienti sottoposti a trapianto MUD rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto aploidentico. (Fig 4.2) Confrontando la quantità di linfociti B circolanti nei pazienti rispetto ai donatori infine sembra esservi un incremento di tale popolazione in entrambe le tipologie di pazienti (specialmente nei pazienti MUD) anche ai punti di analisi post trapianto più avanzati. Il risultato però non mostra significatività probabilmente per via dell'esiguità dei campioni.



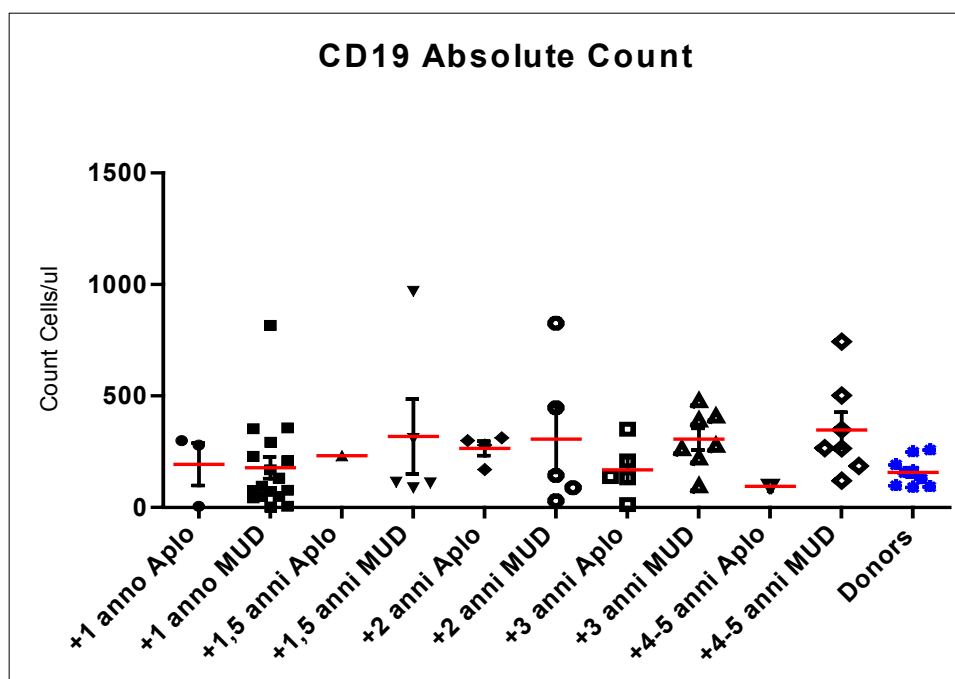


Fig. 4.2: Andamento dei linfociti B (CD19+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Nel grafico in alto sono rappresentati i valori percentuali su linfociti totali identificati mediante elevata espressione del marcatore CD45 e basso side scatter. Nel grafico in basso sono riportate le conte assolute su microlitro.

### iii) Linfociti T totali:

L'identificazione della popolazione T linfocitaria è stata effettuata mediante marcatura con un anticorpo monoclonale anti-CD3 (*cluster of differentiation CD3*). Queste cellule rappresentano la maggior parte dei linfociti circolanti (65-80%) ed intervengono a tutti i livelli della risposta immunitaria adattativa, sia in modo diretto attraverso un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata che in modo indiretto attraverso la produzione di una serie di citochine che coordinano il processo immune. La nostra analisi ha messo in evidenza una leggera riduzione nelle percentuali di linfociti CD3 fra i pazienti trapiantati, indipendentemente dal tipo di trapianto, e i donatori a tutti i punti analizzati. Tuttavia l'analisi della conta assoluta di questa popolazione non ha evidenziato differenze significative né fra i gruppi analizzati ai diversi punti post trapianto né fra i pazienti trapiantati e i donatori sani.

Da questi dati si può osservare come sia nel contesto del trapianto aploidentico che in quello da donatore non familiare si ha un buon recupero T linfocitario oltre un anno dal trapianto e che il tipo di donatore non sembra influenzare il recupero a lungo termine di questa popolazione.

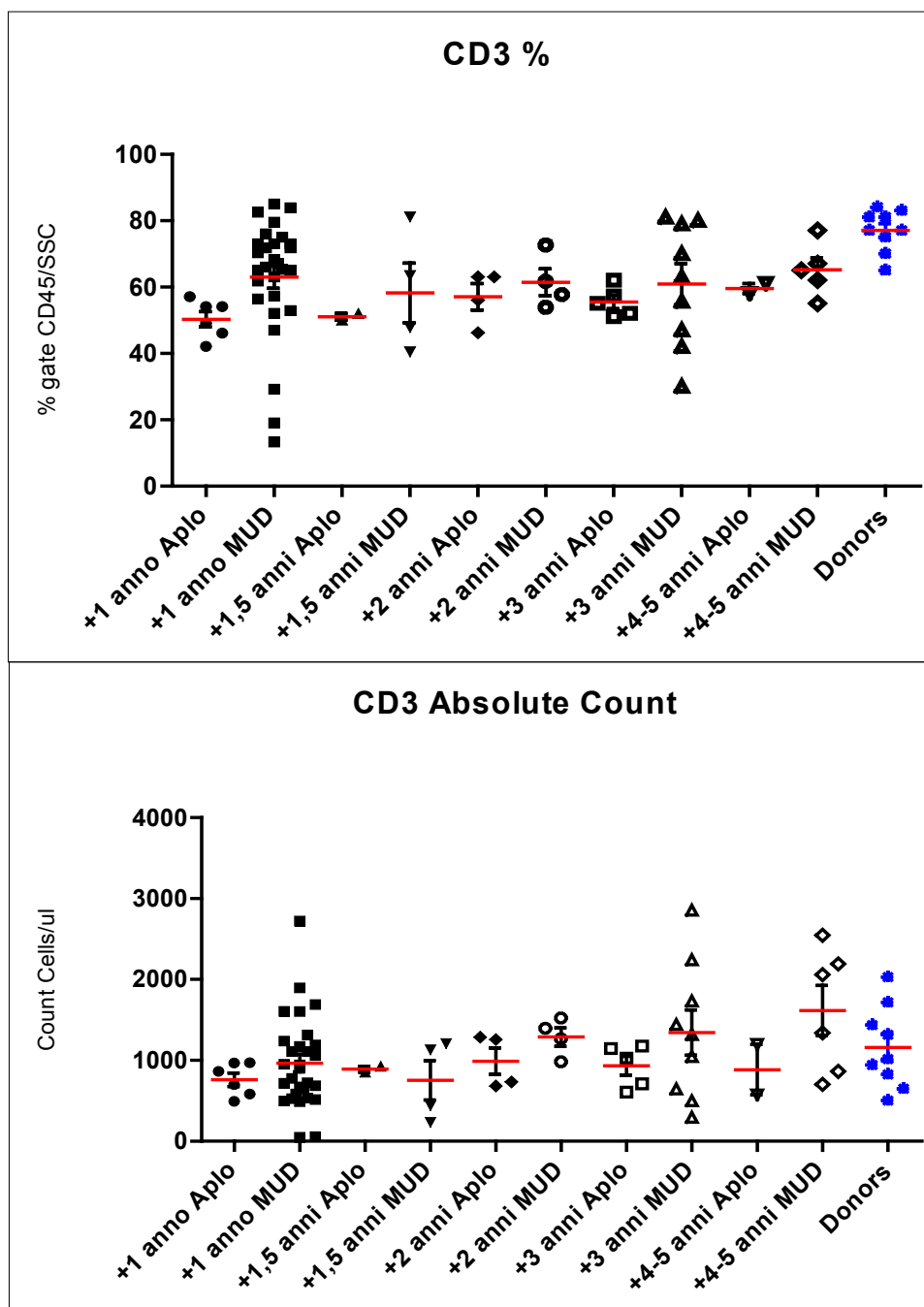
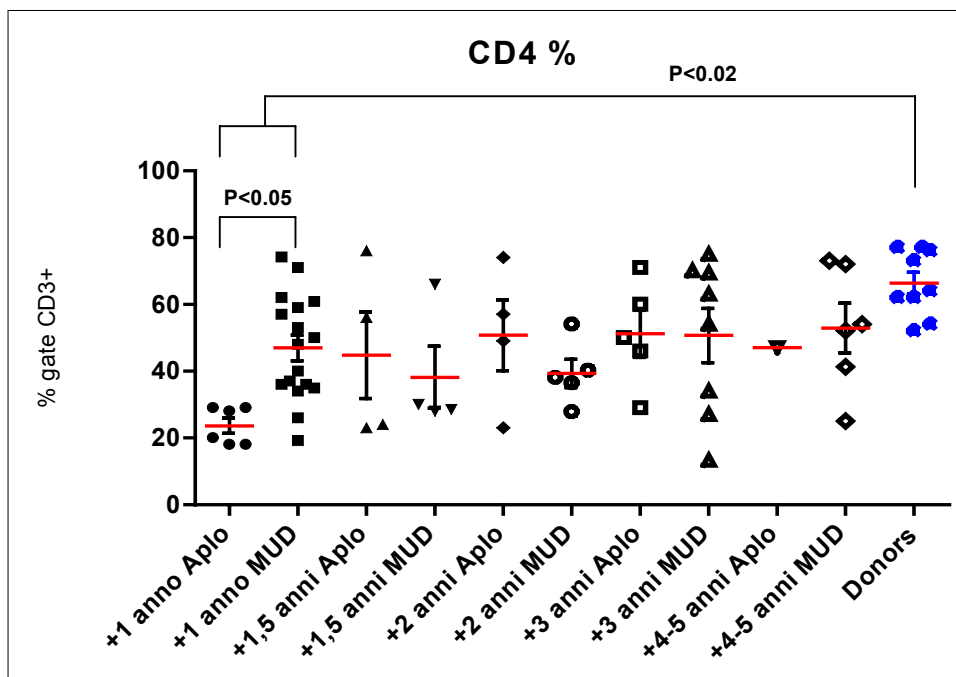


Fig. 4.3: Andamento dei linfociti T (CD3+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Nel grafico in alto sono riportati i valori percentuali su linfociti totali identificati mediante elevata espressione del marcatore CD45 e basso side scatter. Nel grafico in basso sono riportate le conte assolute su microlitro.

iv) *Linfociti T helper:*

Attraverso il marcatore di superficie CD4 (*cluster of differentiation CD4*) è possibile identificare, all'interno dei linfociti T CD3<sup>+</sup>, la sottopopolazione di linfociti T helper. Questi rappresentano il 40-60% dei linfociti T circolanti ed intervengono nei processi immunologici attraverso una serie di meccanismi, giocando un ruolo fondamentale nel dirigere la risposta

immunitaria. L'analisi di questa sottopopolazione evidenzia una riduzione statisticamente significativa fra i pazienti ed i donatori ad un anno dal trapianto sia confrontando il numero assoluto di linfociti CD4<sup>+</sup> circolanti che confrontando la percentuale di CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (P<0,05). Tuttavia questa significatività si perde nei punti di indagine successivi anche se nei pazienti non vengono mai raggiunte conte uguali a quelli dei donatori sani. Inoltre risulta significativa la differenza fra la quantità di linfociti T helper ad un anno dal trapianto fra i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico e quelli sottoposti a trapianto MUD, anche in questo caso sia a livello percentuale che a livello di conta assoluta. (Fig 4.4). Nei punti di analisi successivi però tale differenza si annulla dimostrando che il recupero della popolazione T helper oltre l'anno dal trapianto procede in modo paragonabile fra le due tipologie di trapianto.



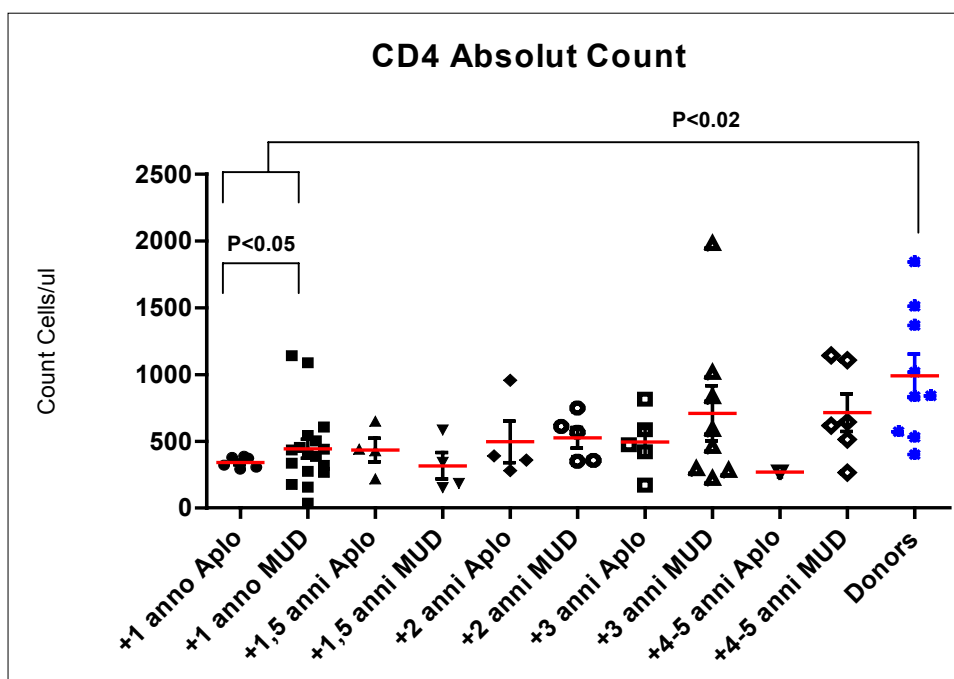
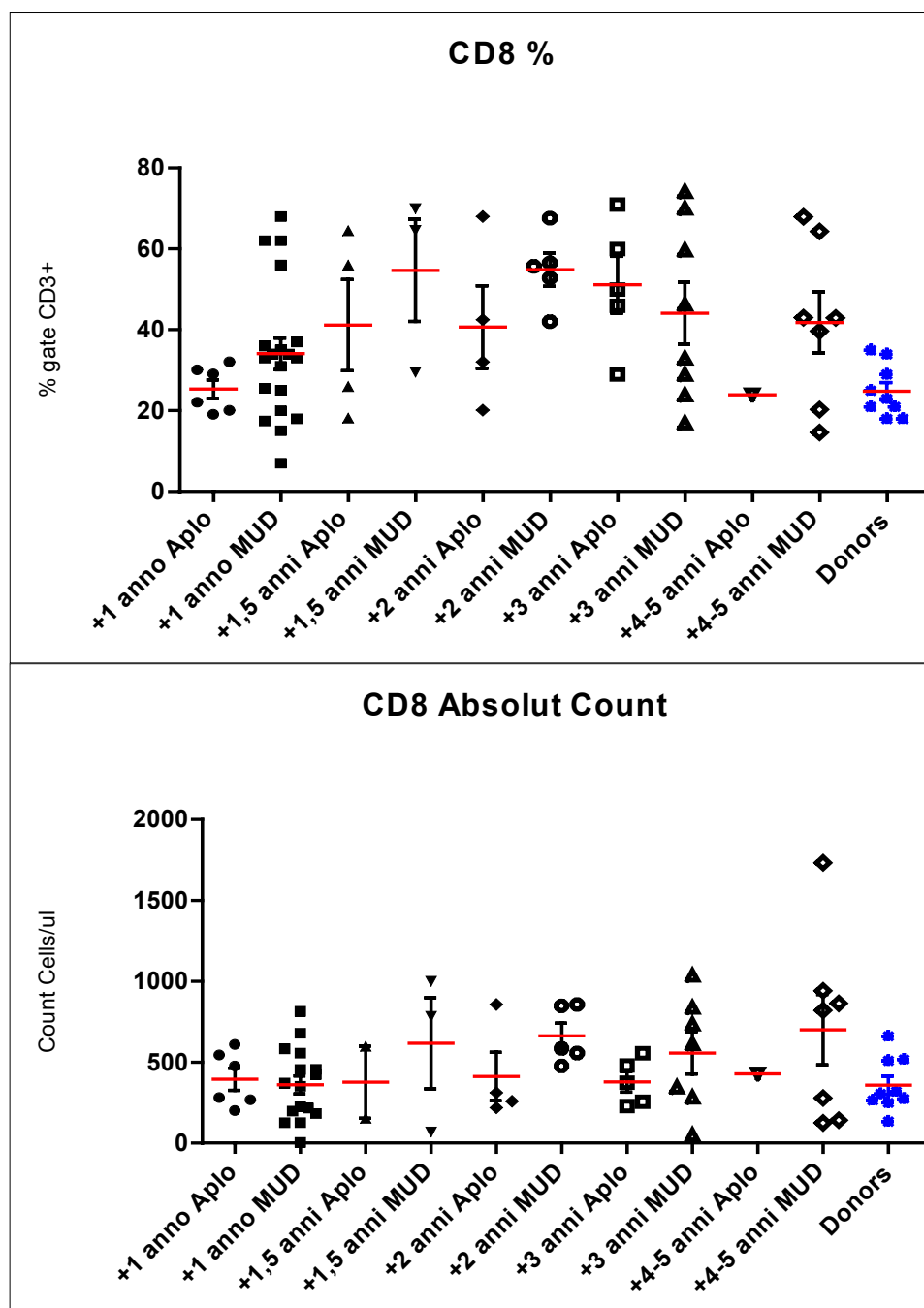


Fig. 4.4: Andamento dei linfociti T helper (CD3+/CD4+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Nel grafico in alto sono rappresentati i valori percentuali su linfociti T totali identificati mediante l'espressione dell'antigene CD3. Nel grafico in basso sono riportate le conte assolute su microlitro.

#### v) Linfociti T Citotossici:

I linfociti T citotossici vengono identificati dal marcatore di superficie CD8 (*cluster of differentiation 8*) e svolgono la loro funzione attraverso meccanismi di citotossicità diretta. Normalmente rappresentano il 20-40% dei linfociti T CD3<sup>+</sup> circolanti e diversi lavori hanno evidenziato un coinvolgimento diretto di questa popolazione nello sviluppo di reazioni di tipo GVHD (Riddell S.R. *et al*, 2003). L'analisi immunofenotipica di questa popolazione ha evidenziato un leggero incremento nelle percentuali di linfociti citotossici fra i pazienti trapiantati ed i donatori a tutti i tempi analizzati tranne ad un anno dal trapianto. Tuttavia le due coorti di pazienti non presentavano differenze significative fra di loro in nessun punto di analisi e tale incremento non è comunque risultato statisticamente significativo. L'analisi delle conte assolute ha confermato un leggero incremento nel numero di linfociti citotossici presenti nei pazienti rispetto ai donatori ma anche in questo caso il dato non ha potenza statistica.(Fig 4.5)



**Fig. 4.5:** Andamento dei linfociti T citotossici (CD3+/CD8+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Nel grafico in alto sono rappresentati i valori percentuali su linfociti T totali identificati mediante l'espressione dell'antigene CD3. Nel grafico in basso sono riportate le conte assolute su microlitro.

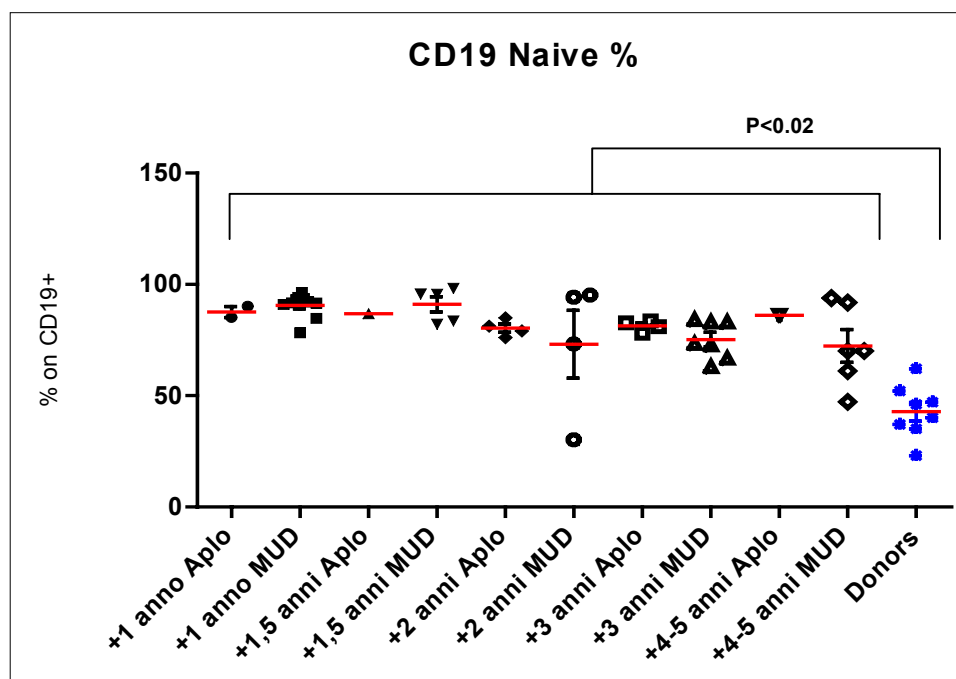
*vi) Fasi maturative dei linfociti B (CD19+)*

Attraverso l'utilizzo di 2 marcatori di superficie aggiuntivi e stato possibile caratterizzare in modo accurato le diverse fasi maturative dei linfociti B presenti a nel sangue periferico dei pazienti allotrapiantati. Nello specifico sono stati utilizzati i marcatori CD27 (molecola



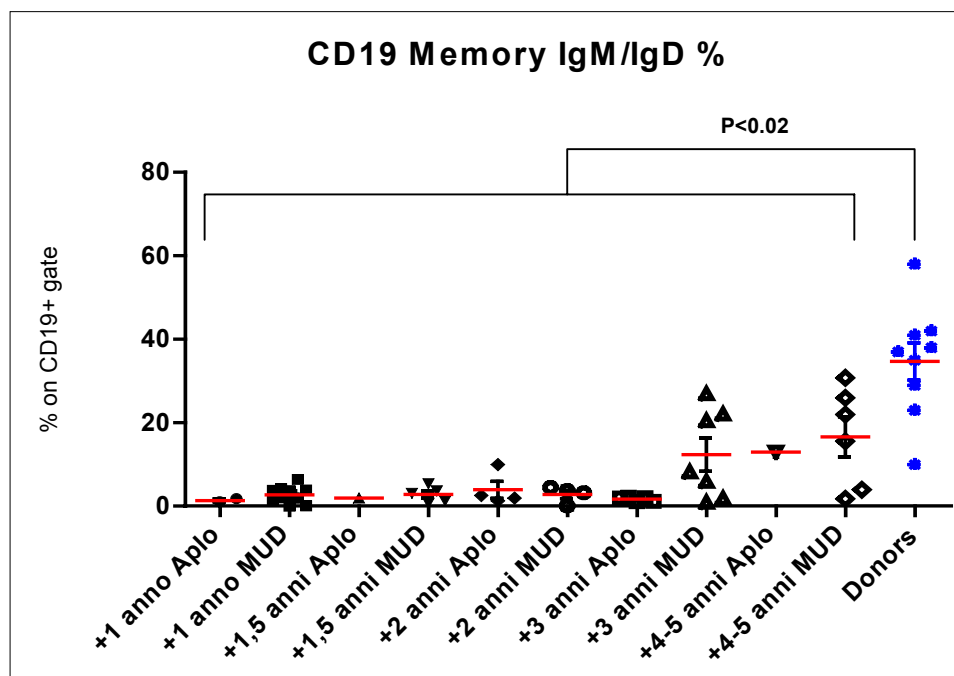
appartenente alla famiglia dei recettori per il *tumor necrosis factor - TNF*), che è un antigene espresso dai linfociti B solo in seguito ad attivazione cellulare successiva all'esposizione a specifici antigeni, e l'immunoglobulina di classe D che rappresenta il primo isotipo di immunoglobulina prodotta dal linfocita B naive. Combinando questi antigeni è possibile distinguere 3 diverse popolazioni a diverso grado di differenziamento: linfociti B Naive ( $CD27^- IgD^+$ ); linfociti B Memory IgG ( $CD27^+ IgD^-$ ); linfociti B Memory IgM/IgD ( $CD27^+ IgD^+$ ).

I linfociti B naive  $CD27^- IgD^+$  rappresentano il primo passaggio maturativo dei linfociti B (40-60% dei linfociti B circolanti) e come si può vedere nel grafico (Fig 4.6) risultano essere significativamente più rappresentati nei pazienti trapiantati, indipendentemente dal tipo di trapianto, che nei donatori sani. Questa alterazione non risulta invece significativa confrontando i pazienti fra loro a nessun punto dell'analisi.



**Fig. 4.6:** Andamento dei linfociti B naive citotossici ( $CD27^- IgD^+$ ) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti.

La popolazione Memory IgM/IgD  $CD27^+ IgD^+$  è costituita dai linfociti B circolanti che hanno già incontrato l'antigene e sono stati attivati ( $CD27^+$ ) ma che ancora non hanno subito il processo di maturazione isotipico (*switch* isotipico). Al contrario della popolazione naive questa sottopopolazione è scarsamente rappresentata nei pazienti rispetto ai donatori sani anche se sembrerebbe esservi un miglioramento nel numero di questi linfociti nei prelievi oltre i tre anni dal trapianto. Anche per questa sottopopolazione il paragone fra le due coorti di pazienti non evidenzia differenze significative. (Fig 4.7)



**Fig. 4.7:** Andamento dei linfociti B Memory IgM/IgD (CD27<sup>+</sup>gD<sup>+</sup>) ad un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Questa popolazione non raggiunge mai i livelli dei donatori sani anche se sembra esservi un incremento nei punti di analisi superiori ai 3 anni.

I linfociti B memory IgG CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> sono la popolazione di linfociti B che ha subito lo switch isotipico (20-30% linfociti B circolanti) e che quindi presenta sulla superficie delle immunoglobuline non più di tipo D ma di tipo G. Questa popolazione risulta ridotta nei pazienti rispetto ai donatori ( $P < 0.05$ ) ed in particolare nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico. Paragonando i due gruppi di pazienti la riduzione non risulta significativa anche se le percentuali nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore non consanguineo sono leggermente superiori. Anche per questa popolazione inoltre sembrerebbe che vi sia una tendenza al miglioramento nella quantità di cellule nei punti più avanzati dal trapianto (3 anni ed oltre) (Fig. 4.8).

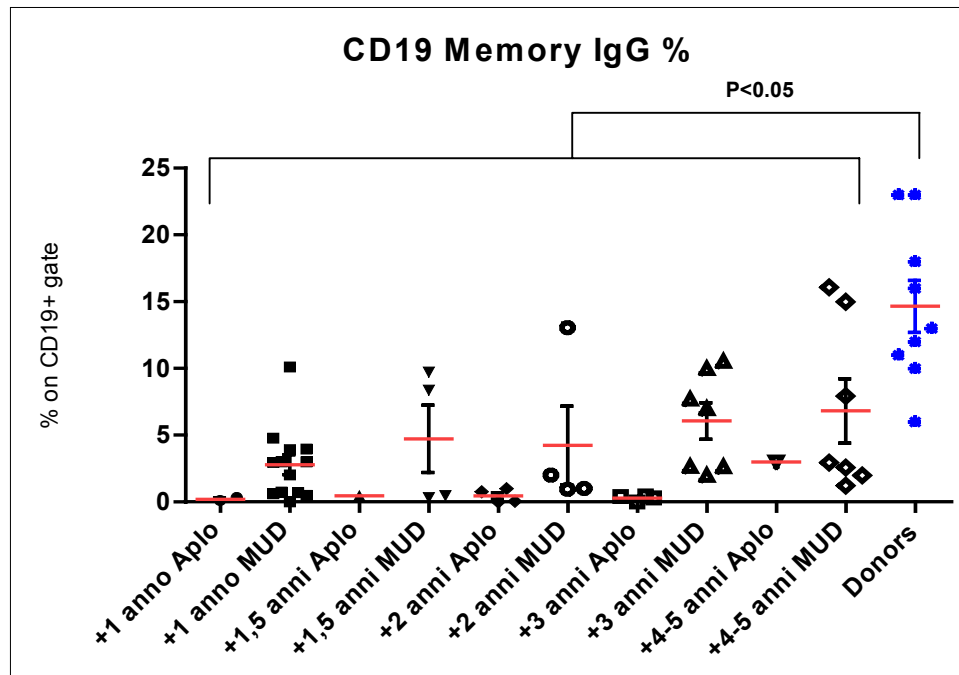
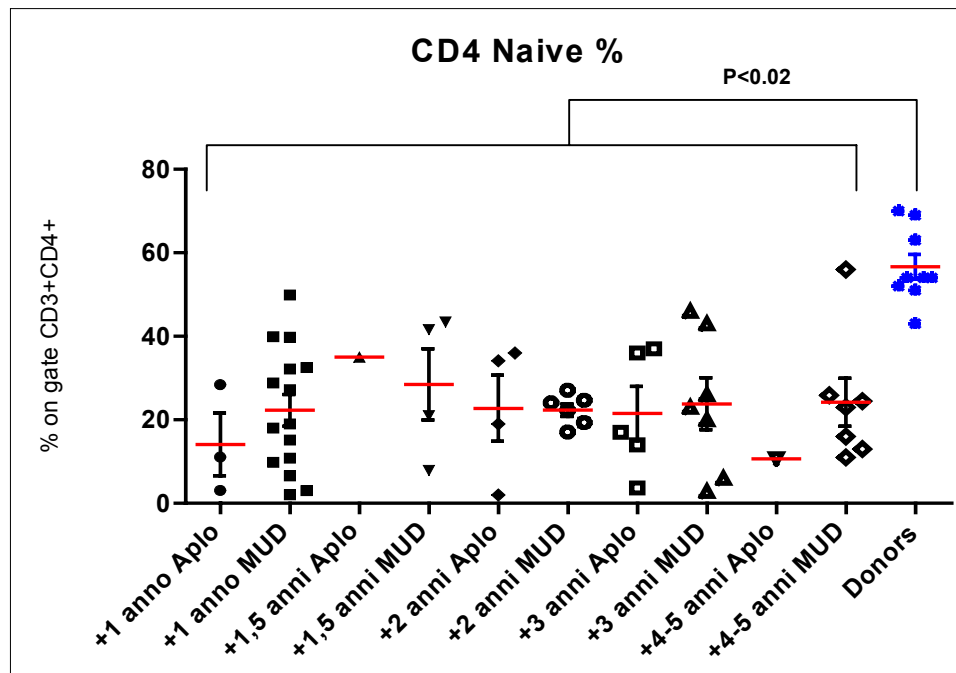
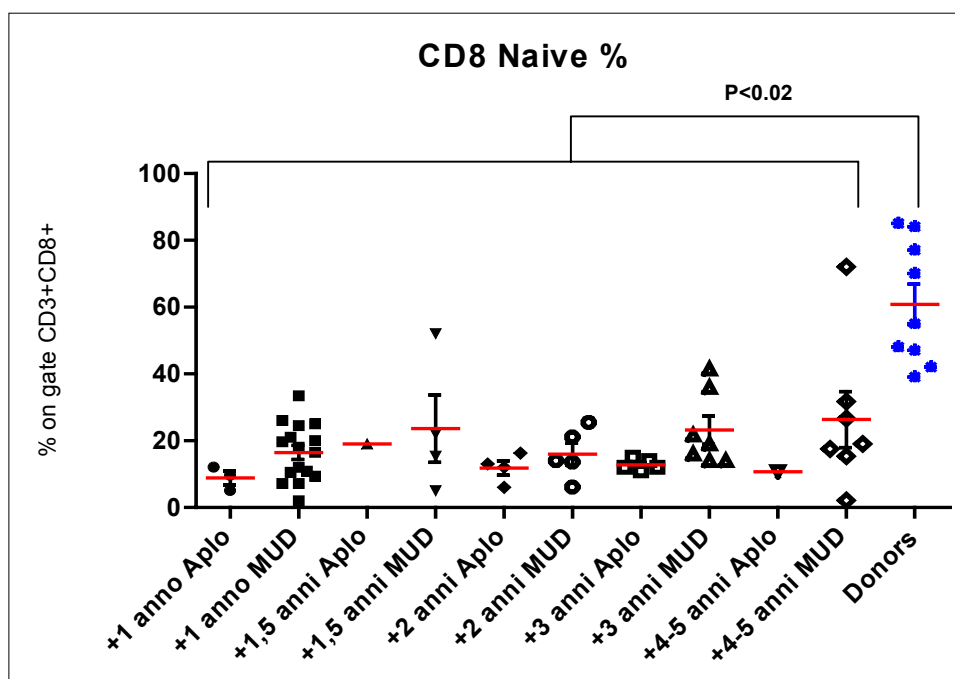


Fig. 4.8: Andamento dei linfociti B Memory IgG (CD27+gD-) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. Questa popolazione non raggiunge mai i livelli dei donatori sani anche se sembra esservi un incremento nei punti di analisi superiori ai 3 anni.

vi) Fasi maturative Linfociti T helper (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) e citotossici (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)

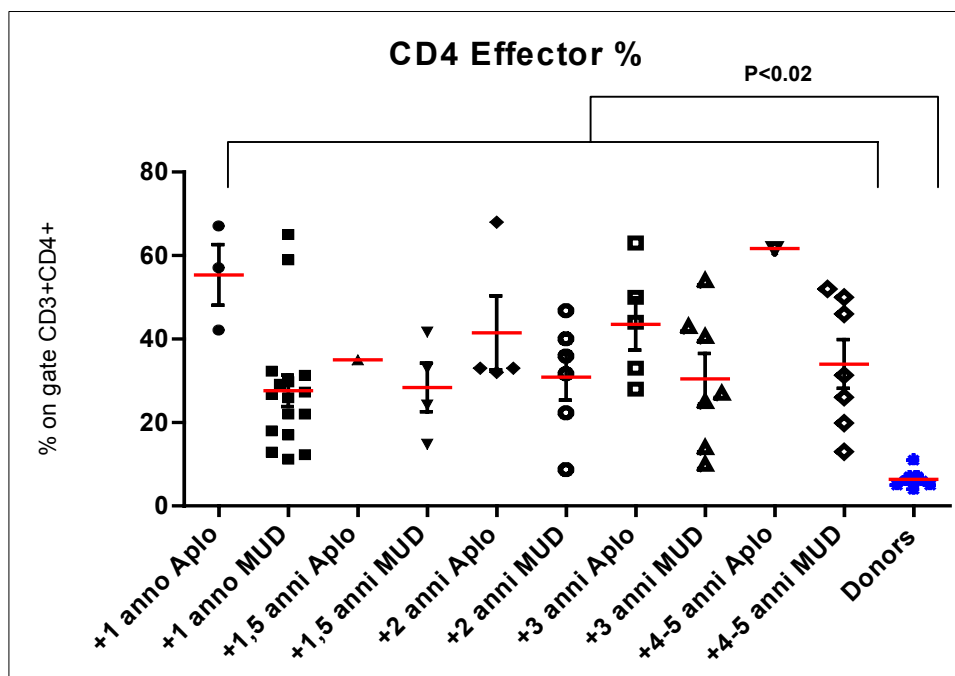
La caratterizzazione delle fasi maturative dei linfociti T helper (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) e dei linfociti T citotossici (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) può essere effettuata mediante la valutazione di due antigeni di superficie differenzialmente espressi durante il processo di maturazione. Questi marcatori sono il CD62L (*L-selectin*) ed il CD45RA (*Protein tyrosine phosphatase receptor type C - PTPRC*). La prima è una molecola di adesione coinvolta nei processi di reclutamento linfocitario a livello linfonodale dove avviene l'interazione tra linfociti e cellule presentanti l'antigene mentre la seconda è una isoforma specifica dei linfociti naive che viene trasformata in CD45RO in seguito ad attivazione cellulare. Grazie alla combinazione di questi marcatori è possibile distinguere 4 stadi maturativi sia per la popolazione di linfociti T helper che per quelli citotossici: linfociti Naive (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>); linfociti Central Memory (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>); linfociti Effector Memory (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) e linfociti Terminal Memory (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). I linfociti T Naive CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> rappresentano lo stadio maturativo iniziale di questa popolazione e l'analisi di queste cellule sia per linfociti helper (CD4<sup>+</sup>) che per i linfociti citotossici (CD8<sup>+</sup>) ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa nella loro percentuale nei pazienti rispetto ai donatori a tutti i punti analizzati. Tuttavia anche in questo caso non vi sono differenze significative fra i due gruppi di pazienti in nessuno dei punti post-trapianto analizzati (Fig. 4.9).

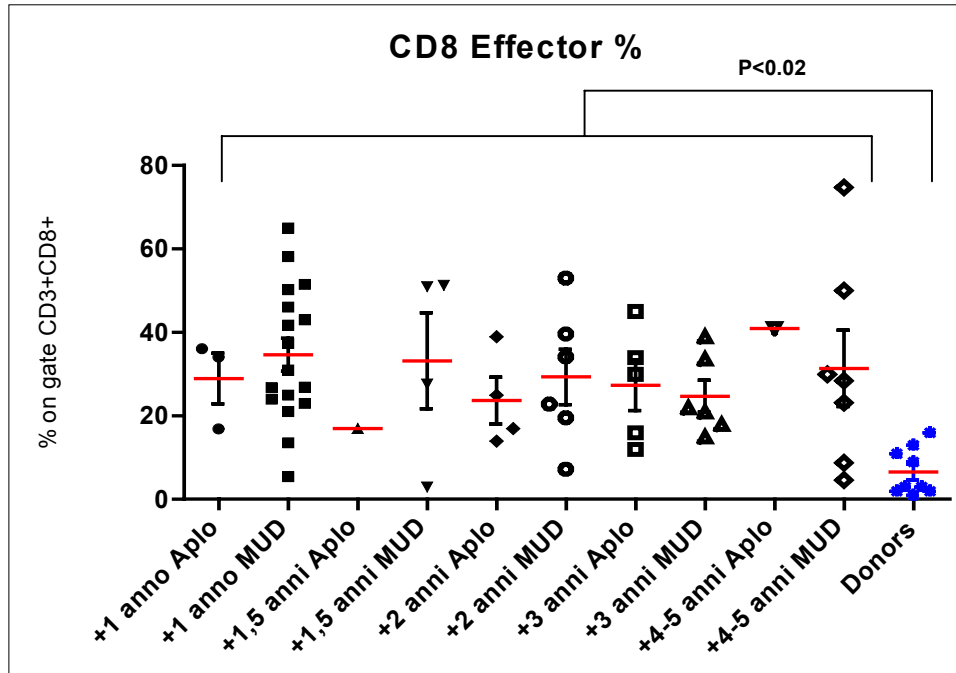




**Fig. 4.9:** Andamento dei linfociti T naive (CD62L+CD45RA+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. In alto è rappresentata la popolazione di linfociti helper CD4+ mentre in basso è rappresentata la popolazione di linfociti citotossici CD8+.

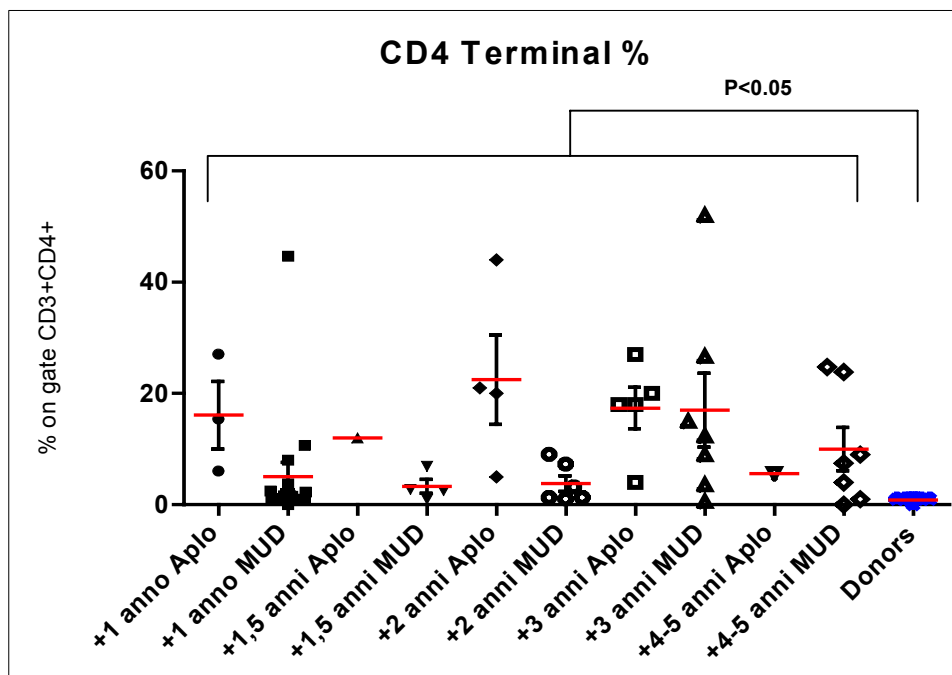
L'analisi dei linfociti effettori CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> ha evidenziato un incremento significativo di questa popolazione sia per quanto riguarda i linfociti T helper che per quanto riguarda i linfociti T citotossici nei pazienti rispetto ai donatori sani a tutti i punti analizzati (Fig 4.10). Il confronto fra le due coorti di pazienti invece non ha evidenziato differenze statisticamente rilevanti.

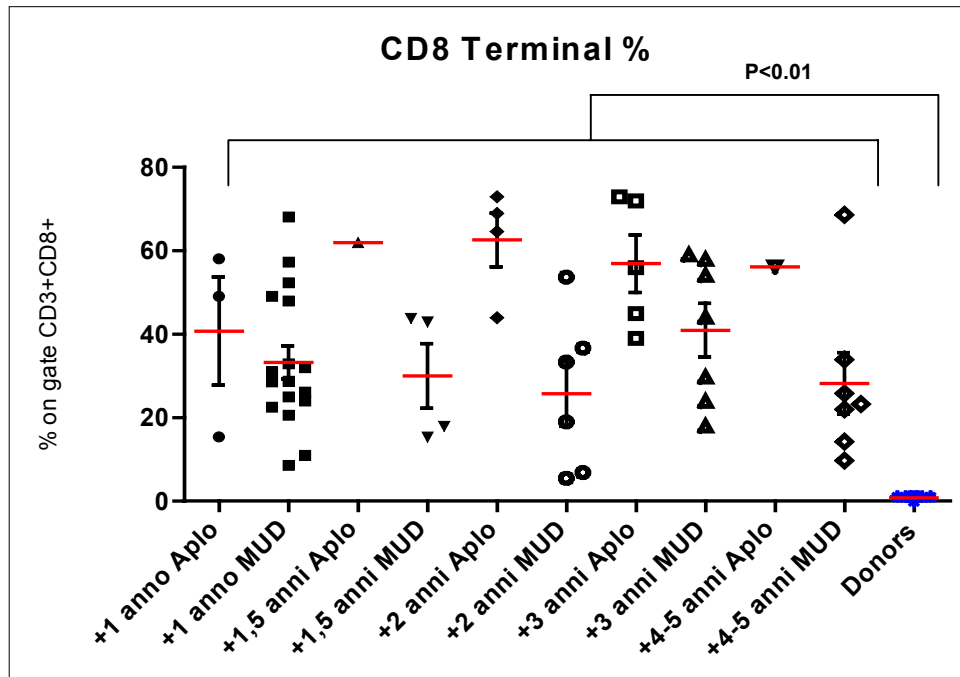




**Fig. 4.10:** Andamento dei linfociti T effector (CD62L-CD45RA-) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. In alto è rappresentata la popolazione di linfociti helper CD4+ mentre in basso è rappresentata la popolazione di linfociti citotossici CD8+.

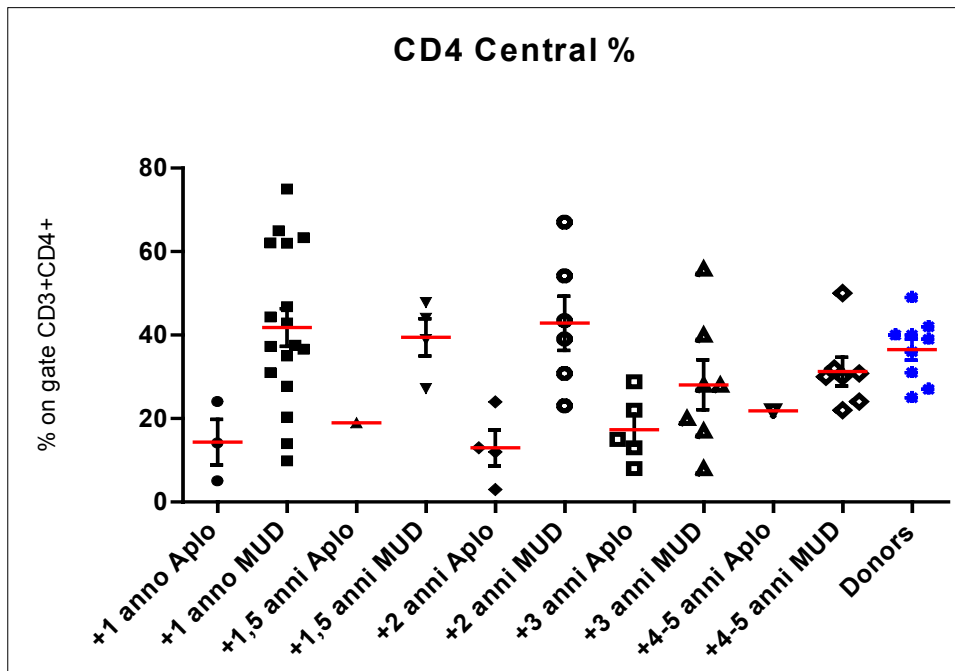
I linfociti T helper e citotossici terminal memory CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> analizzati nei nostri pazienti risultano significativamente incrementati in tutti i pazienti rispetto ai donatori sani. Inoltre nei primi punti di analisi (dopo 1 anno, dopo 1,5 e dopo 2 anni) risultano maggiori nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare. Tuttavia questa differenza tende normalizzarsi nei punti di analisi superiori ai due anni. (Fig. 4.11)





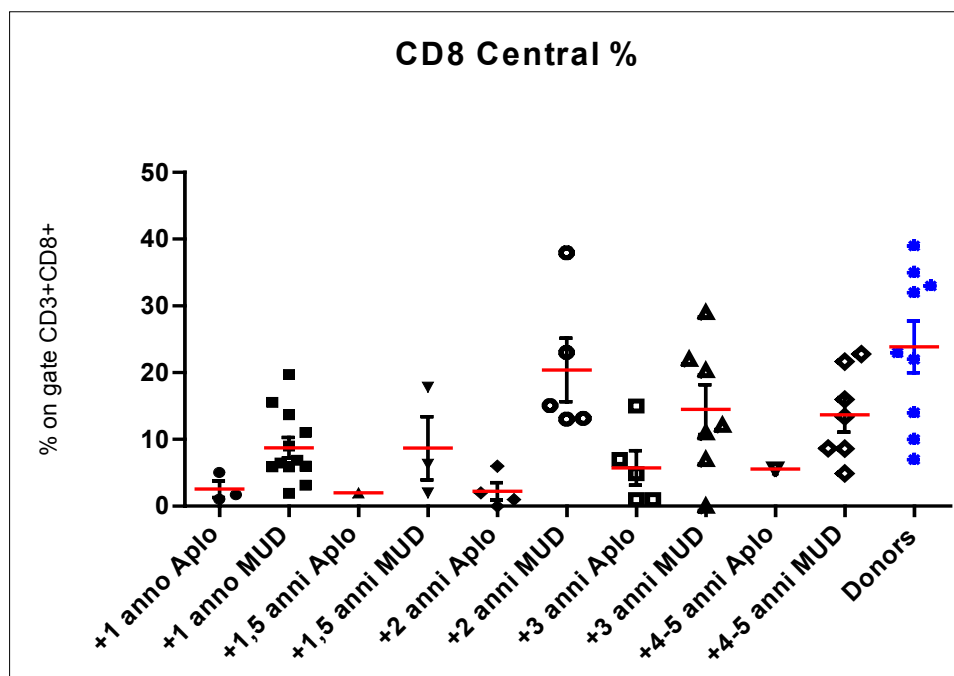
**Fig. 4.11: Andamento dei linfociti T terminal (CD62L-CD45RA+) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti. In alto è rappresentata la popolazione di linfociti helper CD4+ mentre in basso è rappresentata la popolazione di linfociti citotossici CD8+.**

Infine l'analisi dei linfociti central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> nella popolazione helper (CD4<sup>+</sup>) ha evidenziato come questa sottopopolazione risulti significativamente ridotta nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico fino a due anni dal trapianto rispetto alla popolazione di controllo (P<0,002) e al gruppo di pazienti sottoposti a trapianto MUD (P<0,05) (Fig. 4.12).



**Fig. 4.12: Andamento dei linfociti T helper central memory (CD62L+CD45RA-) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti.**

Per quanto riguarda i linfociti citotossici (CD8<sup>+</sup>) questa popolazione tende ad essere ridotta in modo significativo ad un anno dal trapianto in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai donatori sani (aploidentici: P<0,01; MUD: P<0.001). A tempi di analisi più inoltrati tuttavia questo deficit perde valore statistico nella popolazione sottoposta a trapianto da donatore non familiare mentre permane per i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico. Paragonando fra loro le due coorti di pazienti tuttavia tali differenze non risultano essere significative (Fig. 4.13).



**Fig. 4.13: Andamento dei linfociti T citotossici (CD8+) central memory (CD62L+CD45RA-) oltre un anno dal trapianto nelle due coorti di pazienti.**

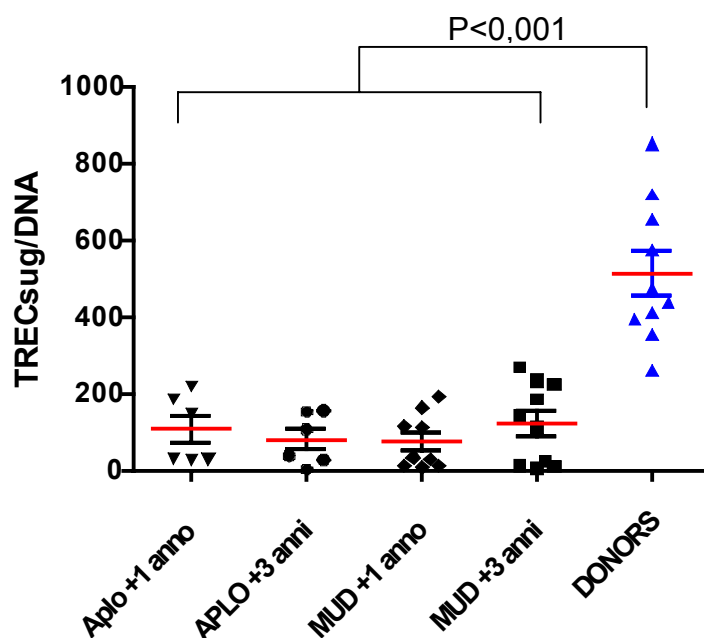
### 4.3.2 Valutazione funzionalità timica

La funzionalità timica si determina stimando i livelli di linfociti T naive derivanti dal timo (*recent timic emigrants - RTE*) attraverso quantificazione mediante *real time* PCR della molecola sjTREC (*signal joint T-cell receptor rearrangement excision circles*) nel sangue periferico. Il sjTREC è un epistema di DNA prodotto dal riarrangiamento delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  del recettore dei linfociti T (TCR) durante la maturazione timica. Questa molecola non viene successivamente replicata nelle cellule che vanno incontro a proliferazione e quindi rappresenta un marcatore stabile delle cellule vergini T $\alpha\beta$ . Come dimostrato da diversi autori nonché dal nostro stesso laboratorio, la quantità di sjTREC presenti in circolo in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche, indipendentemente dalla tipologia di



trapianto, risulta ridotto fino ad un anno post trapianto (Dodero A *et al*, 2009). Tuttavia non si hanno dati significativi sulla quantificazione di questa molecola oltre tale tempistica. Il numero assoluto dei sjTREC è stato valutato su DNA genomico estratto da cellule mononucleate di sangue periferico ad un anno ed a tre anni dal trapianto in modo da poter valutare l'eventuale miglioramento nella produzione di emigranti timici.

I dati ottenuti hanno evidenziato che il numero mediano di sjTREC è significativamente inferiore al *range* di normalità sia ad un anno che soprattutto a tre anni dal trapianto per entrambe le corti di pazienti ( $P < 0,001$ ). Tuttavia confrontando i pazienti fra loro non sono riscontrabili differenze statisticamente significative. Il numero di sjTREC non aumenta nel corso del tempo e sembra che il tipo di trapianto (donatore aploidenti o donatore MUD) non influenzi l'andamento di tale recupero. (Fig 4.14) Questa osservazione conferma quanto già emerso dall'analisi immunofenotipica nella quale si osservava una riduzione statisticamente significativa delle popolazioni naive (sia helper che citotossici) rispetto alla quantificazione effettuata sui donatori anche nei punti di analisi più inoltrati post trapianto. Inoltre anche in quell'analisi non erano evidenziabili differenze significative fra i due gruppi di pazienti.

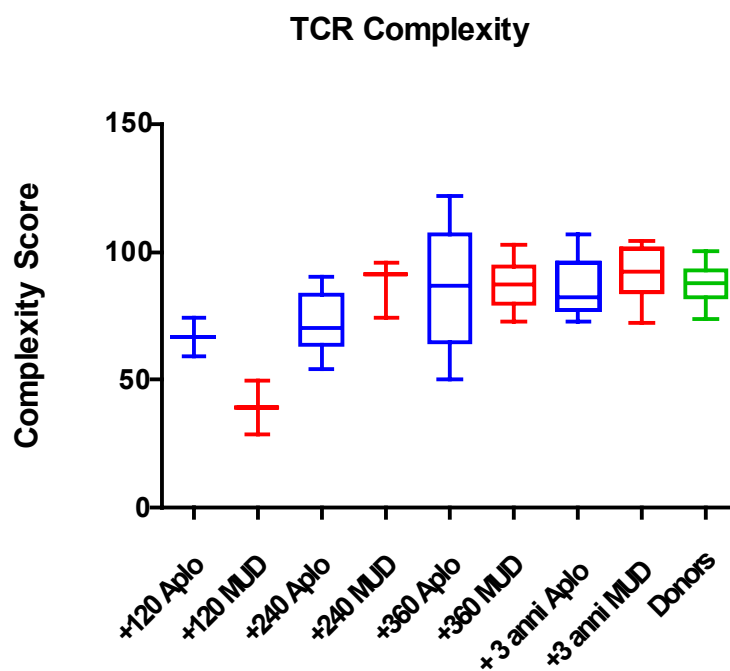


**Fig. 4.14:** Cinetica di ricostituzione dei TREC (*T-cell receptor excision circle*) in nei due gruppi di pazienti rispettivamente ad un anno e a 3 anni dal trapianto. In blu sono rappresentati i valori ricavati da 10 donatori sani di età comparabile.

### 4.3.3 Complessità del repertorio linfocitario T

La valutazione del repertorio linfocitario si basa sullo studio dei differenti riarrangiamenti della regione CDR3 della catena  $\beta$  del recettore dei linfociti T (TCR). Questa analisi permette di identificare e quantificare la presenza nel sangue periferico di popolazioni linfocitarie con diversa specificità antigenica. L'analisi del repertorio linfocitario è stata condotta sui due gruppi di pazienti anche a tempistiche precoci post trapianto (+120 e +240 giorni post trapianto) in quanto diversi lavori (Dodero *et al*, 2009) hanno evidenziato che la complessità recettoriale può essere recuperata già ad un anno dal trapianto. In base a studi presenti in letteratura, è stato assegnato un valore di complessità del repertorio basato sulla distribuzione gaussiana e sul numero di picchi presenti in ogni sottofamiglia TCR V $\beta$  (Bomberg C *et al*, 1996).

Analogamente alla quantificazione dei TREC, è stato valutato un gruppo di donatori sani (n=10), con età comparabile, sui quali si è determinato un valore mediano di complessità del repertorio TCR pari a 91 (*range* 79-98) (Figura 4.15).



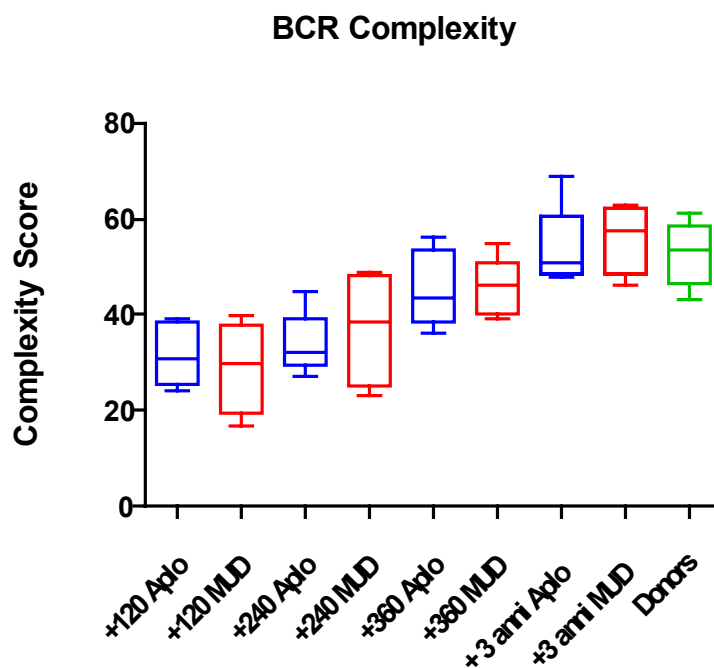
**Fig. 4.15:** Cinetica di ricostituzione del repertorio T linfocitario nei due gruppi di pazienti. In verde sono riportati i valori ottenuti da una corte di 10 donatori sani.

Nei due gruppi di pazienti analizzati la complessità della regione CDR3 della catena  $\beta$  del TCR raggiunge valori paragonabili al gruppo dei donatori sani ad un anno dal trapianto sia

per i pazienti sottoposti a trapianto da donatore familiare aploidentico che per i pazienti sottoposti a trapianto da donatore di banca. Conformemente a studi presenti in letteratura, il repertorio linfocitario risulta profondamente alterato nei primi mesi post-trapianto, probabilmente per via dell'espansione di cloni linfocitari in risposta ad eventuali infezioni opportunistiche o all'insorgenza di GvHD. L'analisi ha inoltre dimostrato che tale repertorio rimane ad elevata complessità anche nei punti di analisi oltre l'anno dal trapianto confermando il buon recupero della complessità recettoriale indipendentemente dal tipo di trapianto effettuato.

#### 4.3.4 Complessità del repertorio linfocitario B

La valutazione della complessità del repertorio immunoglobulinico è stata condotta parallelamente all'analisi per la valutazione del repertorio recettoriale T. Anche in questo caso i due gruppi di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico e quelli sottoposti a trapianto da donatore non familiare sono stati paragonati a diversi punti post trapianto. In particolare sono stati analizzati a 120, 240, 360 e oltre 2 anni dal trapianto. Per ogni sottofamiglia IgH è stato assegnato un punteggio di complessità del repertorio basato sulla distribuzione gaussiana e sul numero di picchi presenti (Bomberg C *et al*, 1996; Doderò A. *et al*, 2009). Così come per le altre analisi anche per quest'ultima sono stati valutati una serie di donatori sani (n=10) con età comparabile, sui quali si è determinato un valore di complessità di riferimento del repertorio immunoglobulinico che è risultato essere 52,73 (*range* 43,2-61,3) (Fig. 4.16).



**Fig. 4.16: Cinetica di ricostituzione del repertorio B linfocitario nei due gruppi di pazienti. In verde sono riportati i valori ottenuti da una corte di 10 donatori sani.**

Nel gruppo di pazienti analizzati la complessità della regione CDR3 raggiunge valori normali dopo un anno dal trapianto in entrambi i gruppi di pazienti. Come già osservato per il repertorio T linfoide anche il repertorio linfocitario B risulta alterato nei primi mesi post-trapianto senza tuttavia evidenziare differenze significative fra le due coorti di pazienti. Oltre l'anno dal trapianto quindi sembra che la complessità del repertorio immunoglobulinico ritorni a livelli paragonabili a quelli di un donatore sano confermando quindi la capacità di recupero in pazienti allo trapiantati indipendentemente dalla fonte cellulare.

## CAPITOLO V

### DISCUSSIONE

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche rappresenta un'importante opzione terapeutica per la cura di numerose patologie ematologiche acquisite o congenite. Nel contesto oncologico in particolare questo approccio terapeutico si è dimostrato altamente promettente grazie alla capacità delle cellule del sistema immunitario trapiantato di sviluppare una reazione nota come GVT (*graft versus tumor*) che permette un'efficace controllo della malattia neoplastica di base. Tuttavia la procedura trapiantologica presenta delle limitazioni importanti. In primo luogo la possibilità di reperire donatori compatibili per i geni dei complessi maggiori di istocompatibilità (*major histocompatibility complex - MHC*) è limitata a causa dell'elevata variabilità interindividuale in questi loci. Per questo sempre più studi hanno focalizzato la loro attenzione sull'utilizzo di donatori alternativi con un grado variabile di compatibilità. L'utilizzo di questo tipo di donatori tuttavia aumenta in modo significativo la possibilità di sviluppare reazioni avverse di attivazione del sistema immunitario trapiantato contro i tessuti sani dell'ospite (reazione *graft versus host GVH*). Inoltre i regimi di condizionamento pre trapianto, necessari per creare spazio nel microambiente midollare, per eradicare la malattia neoplastica di base e per eliminare il vecchio sistema immunitario, hanno un grado variabile di tossicità d'organo ed espongono i pazienti ad un periodo più o meno prolungato di aplasia midollare. Questa causa un aumento nella suscettibilità a infezioni opportunistiche ed alla riattivazione di agenti virali (CMV, Herpes Virus) con conseguente incremento nella mortalità associata alle procedure trapiantologiche (*transplant related mortality – TRM*) specialmente in soggetti anziani o affetti da altre comorbidità. In base all'intensità del regime di condizionamento la durata di questo periodo di deficit immunitario può essere prolungata a lungo post trapianto. L'introduzione di regimi di condizionamento a ridotta intensità/immunosoppressivi e l'utilizzo di donatori compatibili al 50% (Aploidentici) hanno in parte risolto le limitazioni legate a questo approccio clinico. La maggior parte degli studi sulla ricostituzione immunitaria si sono focalizzati sulla

caratterizzazione delle principali popolazioni linfocitarie (linfociti B, T ed NK) nel primo anno post trapianto. Pochi lavori hanno invece preso in considerazione quanto avviene dopo tale periodo e la maggior parte di questi ha analizzato casistiche di pazienti sottoposti a regimi di condizionamento mieloablativi. Da questi studi emerge che pazienti allotrapiantati possono presentare alterazioni qualitative e quantitative nelle sottopopolazioni linfocitarie anche a lungo post trapianto (fino a 5-10 anni) indicando quindi il perdurare di alterazioni a carico del sistema immunitario anche ben oltre l'anno dal trapianto (Sanchez-Guijo F.M., *et al.* 2005; R. Quan Le, *et al.* 2011). Inoltre la maggioranza di questi studi sono stati condotti su pazienti sottoposti a trapianto da donatore HLA identico familiare (*siling*) e ad oggi dati sulla ricostituzione a lungo termine in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche isolate da donatori non familiari ed in particolare da donatori familiare aploidentici sono estremamente limitati (Castermans E. *et al.*, 2011).

Per questi motivi è stato condotto uno studio sulla ricostituzione immunitaria a tempistiche superiori ad un anno dal trapianto in due coorti di pazienti sottoposti a trapianto da donatore alternativo (aploidentico - 6 pazienti; età media al trapianto 34 anni; *range* 15-49; donatore non familiare - 18 pazienti; età media al trapianto 40; *range* 22-60) dopo condizionamento a ridotta intensità trattati presso la struttura complessa di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo Allogeneico della Fondazione IRCCS – Istituto Nazionale dei Tumori di Milano tra il giugno 2004 ed il dicembre 2008. I risultati ottenuti dall'analisi delle singole coorti sono stati paragonati ad un gruppo di 10 donatori sani di età comparabile (media 37 anni; *range* 23-55). L'analisi della ricostituzione immunitaria è stata condotta attraverso diversi approcci metodologici:

- valutazione citometrica delle popolazioni linfoidi circolanti, con particolare riguardo alle fasi maturative dei linfociti B e T;
- analisi della produttività timica mediante quantificazione della molecola sjTREC;
- analisi della complessità dei repertori recettoriali T e B mediante valutazione dei riarrangiamenti CDR3.

La valutazione citometrica dei linfociti *Natural Killer* (NK - CD56<sup>+</sup>) ha evidenziato come questa popolazione presenti conte paragonabili a quelle dei donatori sani a tutte le tempistiche post trapianto analizzate. In particolare la quantità di questi linfociti è leggermente aumentata ad un anno dal trapianto (anche se tale dato non è significativo) e tende a diventare sempre più simile a quella dei donatori nei punti più avanzati. Non vi sono differenze rilevanti fra le due coorti di pazienti a nessuna tempistica analizzata suggerendo che il recupero di tale popolazione non dipenda dal grado di differenze genetiche presenti fra donatore e ricevente. In questo contesto la presenza di allo reattività donatore/ricevente (nel nostro caso presente in 3 pazienti su 6 del gruppo aploidentico) non sembra avere effetti rilevanti oltre un anno

dopo il trapianto. Il fatto che i linfociti NK raggiungano livelli di conte paragonabili a quelle dei donatori sani riflette quanto già emerso da diversi lavori (Storek J *et al*, 2001; Doderò A *et al*, 2009) in cui è stato dimostrato come questo tipo cellulare sia il primo a recuperare nel post trapianto (entro i primi mesi) dove svolge un ruolo fondamentale nel controllo da infezioni/riattivazioni virali. La velocità di recupero di questa popolazione si spiega col fatto che i linfociti NK subiscono un processo di maturazione a livello del midollo osseo che non richiede riarrangiamenti somatici dei propri recettori. Per questo motivo non necessitano di processi maturativi in altri tessuti velocizzando così il periodo di recupero periferico. L'importanza di tale popolazione nel contesto trapiantologico è stata dimostrata in pazienti sottoposti a trapianto aploidentico dove si è osservato come questi linfociti svolgano un ruolo fondamentale nel controllo della malattia di base (Ruggieri L *et al*, 2002). Inoltre recenti studi hanno dimostrato come questa popolazione possa esercitare un importante effetto GVT anche nel contesto di trapianti non aploidentici ed in particolare nel contesto di trapianti da donatori non consanguinei (Giebel S. *et al*, 2003; Hsu K.C. *et al*, 2006).

L'analisi dei linfociti B (CD19<sup>+</sup>) ha evidenziato un leggero incremento di questa popolazione rispetto ai donatori sani in entrambi i gruppi di pazienti a tutti i punti post trapianto anche se il dato non è statisticamente significativo. Questo concorda con alcuni lavori riportati in letteratura nei quali diversi gruppi hanno osservato un aumento nel numero di linfociti B circolanti in pazienti allo trapiantati anche a 5 e 10 anni dal trapianto (Quan Le R. *et al*, 2011). Inoltre la nostra analisi ha evidenziato un lieve incremento di questi linfociti nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto da donatore aploidentico. Tale discrepanza può essere imputabile al fatto che ai pazienti sottoposti a trapianto aploidentico vengano somministrate solo cellule staminali selezionate e quindi private sia dei linfociti B che dei linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>) necessari per la maturazione di tale popolazione mentre i pazienti trapiantati da donatore non familiare vengono trattati con cellule mobilizzate non manipolate. L'incremento di tali linfociti non è comunque associato ad una alterazione significativa nella produzione anticorpale la cui quantificazione non ha mostrato variazioni di rilievo. L'aggiunta di due marcatori di superficie addizionali (CD27 e IgD) ha permesso di effettuare una valutazione più approfondita sul recupero dei diversi stadi maturativi dei linfociti B. I linfociti B naive (CD27<sup>-</sup>/IgD<sup>+</sup>) rappresentano il primo stadio maturativo e sono cellule non secernenti prodotte a livello del midollo osseo. L'analisi di tale popolazione ha evidenziato un incremento significativo nei pazienti rispetto ai donatori sani in tutti i punti dell'analisi mentre non sono state riscontrate differenze fra le due coorti di pazienti. Parallelamente si è riscontrata una riduzione significativa sia dei linfociti Memory IgM/IgD (CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>) che dei linfociti Memory IgG (CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) nei pazienti rispetto ai donatori a tutte le tempistiche post trapianto. I linfociti B Memory IgM/IgD sono responsabili

della risposta precoce T indipendente contro antigeni microbici e sono in grado di secernere immunoglobuline di classe M mentre i linfociti B Memory IgG sono responsabili della risposta ad elevata affinità, coadiuvata dai linfociti T helper, e sono in grado di migrare a livello del midollo osseo per trasformarsi in plasmacellule secernenti (IgG). I dati ottenuti dal nostro studio riflettono quanto riportato in letteratura, infatti diversi autori hanno riscontrato una diminuzione nelle popolazioni memory (sia IgM/IgD che IgG) ed un incremento nella popolazione naive fino ad un anno dal trapianto (D'Orsogna L.J. *et al* 2009; Avanzini M.A. *et al* 2005). Questi autori giustificano tali alterazioni attraverso due spiegazioni: la prima sostiene che la mancanza di linfociti T helper follicolari dopo trapianto (per via della T deplezione) influenzi negativamente la maturazione dei linfociti B naive a livello del centro germinativo mentre la seconda sostiene che il regime di condizionamento sia responsabile di un danno strutturale a livello del centro germinativo stesso con conseguente alterazione nello sviluppo dei linfociti B. Entrambi questi meccanismi potrebbero quindi concorrere ad un blocco maturativo con conseguente accumulo a livello periferico di linfociti naive e riduzione nelle popolazioni memory. Questo spiega il motivo per cui nei nostri pazienti si osserva un incremento nei linfociti B circolanti senza che questo sia associato ad un incremento nella produzione immunoglobulinica che al contrario rimane entro valori di normalità. Interessante da notare è che nei nostri pazienti sembra esservi una maggior quantità di linfociti B Memory IgG nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto aploidentico (anche se entrambi sono statisticamente inferiori rispetto ai donatori sani). Anche questo dato potrebbe essere riconducibile alla diversa modalità trapiantologica fra i due gruppi di pazienti (non manipolato nei MUD e CD34 selezionate nei pazienti aploidentici).

I linfociti T sono stati quantificati grazie alla molecola di superficie CD3 ed il loro numero è risultato mediamente inferiore nei pazienti rispetto ai donatori nei punti precoci dell'analisi (+1 anno e +1,5 anni) anche se tale dato non è risultato statisticamente significativo e tende a normalizzarsi nei punti di analisi più avanzati. All'interno della popolazione linfocitaria totale la conta dei linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>) ha permesso di evidenziare un deficit di tale popolazione fra i pazienti ed i donatori sani ad un anno dal trapianto per entrambi i gruppi di pazienti (P<0,02). Questa riduzione nel numero di linfociti helper circolanti è stata riscontrata in tutti i punti analizzati anche se dopo l'anno tale dato ha perso la sua potenza statistica. Inoltre è risultata significativa la differenza fra la quantità di linfociti CD4<sup>+</sup> presenti ad un anno post trapianto fra pazienti sottoposti a trapianto aploidentico e pazienti sottoposti a trapianto da donatore familiare non consanguineo (P<0,05). Questi ultimi presentavano una quantità di linfociti helper circolanti superiore rispetto ai pazienti aploidentici anche se queste differenze si annullano nei punti di analisi successivi. Presumibilmente anche questo effetto potrebbe



essere una conseguenza della diversa tipologia di trapianto. Analogamente all'analisi dei linfociti helper anche l'analisi dei linfociti citotossici (CD8<sup>+</sup>) ha permesso di evidenziare delle differenze fra pazienti e donatori. Infatti in tutti i punti analizzati tranne ad un anno dal trapianto si è osservato un leggero incremento (non statisticamente significativo tuttavia) della popolazione CD8<sup>+</sup>. Fisiologicamente il rapporto fra la popolazione helper e quella citotossica è circa 3:1 ma varie condizioni possono alterare tale rapporto. Diversi lavori hanno evidenziato la persistenza di alterazioni nei rapporti relativi di queste due popolazioni anche a lungo post trapianto allogenico (fino a 5 anni; F.M. Sanchez-Guijo, *et al.* 2005). Nel nostro gruppo di pazienti 1 paziente sottoposto a trapianto da donatore familiare aploidentico e 6 pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare presentava un'alterazione in tale rapporto in tutti i punti analizzati. Va sottolineato che due di questi pazienti (entrambi appartenenti al gruppo MUD) hanno mostrato ripresa di malattia di base (entro un anno dal trapianto) che ha richiesto trattamento radioterapico. Il perdurare di questa alterazione potrebbe essere imputabile a due meccanismi paralleli: in primo luogo vi può essere una lenta ricostituzione nel comparto helper presumibilmente per via della lenta produttività timica come già dimostrato da altri autori (F.M. Sanchez-Guijo, *et al.* 2005) mentre il secondo meccanismo può essere associato ad un'espansione periferica di linfociti citotossici in risposta a stimoli di varia natura. Nei nostri due pazienti che hanno sperimentato una ripresa di malattia si potrebbe supporre l'alterazione del rapporto CD4/CD8 possa essere dovuta all'espansione periferica di cloni reattivi CD8<sup>+</sup> attivatisi in seguito ed esposizione alle cellule tumorali. In quest'ottica la valutazione del rapporto helper/citotossici potrebbe rappresentare un interessante marcatore di ricaduta.

L'analisi delle fasi maturative dei linfociti T helper e citotossici è stata condotta mediante l'utilizzo di due molecole di superficie (CD62L e CD45RA) la cui espressione differenziale permette di distinguere quattro stadi maturativi. I linfociti Naive (CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) rappresentano i linfociti a singola specificità antigenica che non sono ancora state attivate dall'incontro con l'antigene specifico. La valutazione di questa popolazione sia nei linfociti citotossici che nella popolazione helper ha evidenziato una riduzione significativa ( $P < 0,02$ ) rispetto ai donatori sani a tutti i punti post trapianto analizzati. Tuttavia paragonando le due coorti di pazienti fra loro non vi sono differenze significative. Questo dato è in accordo con la letteratura esistente, infatti diversi gruppi hanno evidenziato un'alterazione nella produzione di linfociti naive fino a 10 anni dal trapianto (Quan Le R. *et al.*, 2011; Castermans E. *et al.*, 2011). Paragonando fra loro i due gruppi di pazienti non vi sono differenze statisticamente significative a conferma che il tipo di donatore e lo schema trapiantologico non sembrano influenzare la percentuale di linfociti T naive circolanti nel lungo termine. Parallelamente ad una riduzione nella popolazione naive si osserva un incremento statisticamente significativo

della popolazione effector memory (CD62L<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai donatori sani sia per la popolazione CD4 che per la popolazione CD8. L'analisi tra i due gruppi di pazienti non evidenzia differenze statisticamente significative per tale popolazione. Questo dato risulta particolarmente interessante in quanto recenti lavori condotti su modelli murini hanno proposto questo tipo cellulare quale il principale fattore dell'effetto GVT e quindi del controllo della malattia in pazienti allotrapiantati (Chen B.J. *et al*, 2004). A parziale conferma di questa ipotesi sta la considerazione che al momento delle analisi tutti i pazienti inclusi in questo studio erano in remissione clinica. Queste considerazioni meritano ulteriore approfondimento su casistiche di pazienti maggiori in quanto l'analisi delle fasi maturative dei linfociti T potrebbe rappresentare un indicatore utile al monitoraggio dell'andamento clinico dei pazienti, permettendo eventualmente di identificare precocemente ricadute neoplastiche o lo sviluppo di altre reazioni indesiderate. Oltre ad un incremento nella popolazione effector è stato riscontrato un aumento della popolazione terminal/late memory (CD62L<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) sia nei linfociti helper che nei linfociti citotossici paragonando i pazienti ai donatori sani. Questo dato sembra in sintonia con quanto osservato per la popolazione di linfociti effector. Infatti un incremento di queste popolazioni potrebbe essere conseguenza di uno stato di attivazione prolungato del sistema immunitario associato ad una maggior efficienza nel controllo della malattia di base. I pazienti sottoposti a trapianto aploidentico presentano un numero significativamente maggiore di linfociti terminalmente differenziati (sia helper che citotossici) rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto da donatori non familiari nelle prime tempistiche analizzate. Tuttavia queste differenze tendono a diminuire e perdono la loro significatività a partire dai due anni post trapianto. Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico vengono trattati con somministrazioni di linfociti T CD4<sup>+</sup> selezionati (DLI) post trapianto. Questi linfociti vanno incontro a proliferazione a livello periferico con conseguente aumento nella quantità di linfociti terminalmente differenziati, sia helper che citotossici, presenti in circolo. All'aumentare della tempistica post trapianto questi linfociti vanno incontro a senescenza e morte cellulare ristabilendo conte paragonabili a quelle nel gruppo di pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare. Infine i linfociti T helper central memory (CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) risultano statisticamente ridotti nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico rispetto ai donatori sani fino ai due anni dal trapianto mentre tale differenza perde la potenza statistica oltre tale momento di analisi. Nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore da banca invece tale popolazione non risulta significativamente alterata a nessun momento dell'analisi. Questa discrepanza può presumibilmente essere ancora una volta dovuta ad una differente tipologia di trapianto (manipolato e non) anche se non vi sono dati di letteratura a conferma di tale ipotesi. Infine la popolazione di linfociti citotossici central memory (CD8<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) è

significativamente ridotta in entrambi le coorti di pazienti e rimane particolarmente bassa nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico. Nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore non consanguineo invece si ha una tendenza al miglioramento nella quantità di tale popolazione con perdita della significatività oltre i due anni dal trapianto anche se non vengono mai raggiunte conte paragonabili a quelle dei donatori sani.

Complessivamente questi dati permettono quindi di effettuare una serie di osservazioni importanti: in primo luogo nonostante le conte assolute tendano a normalizzarsi nei pazienti oltre un anno dal trapianto permangono delle differenze importanti a livello delle sottopopolazioni maturative anche a lungo dopo il trapianto (4 anni) nei pazienti allo trapiantati rispetto ai donatori sani. Inoltre l'analisi condotta fra i due gruppi di pazienti non evidenzia differenze sostanziali per quel che riguarda il recupero delle popolazioni analizzate tranne che per le popolazioni di linfociti B switch memory (incrementate nei pazienti sottoposti a trapianto da donatore MUD) ed i linfociti helper e citotossici central memory (diminuiti in pazienti sottoposto a trapianto aploidentico). Queste alterazioni sono presumibilmente imputabili alle differenti procedure trapiantologiche ma sembrano comunque perdere significatività nei punti più inoltrati post trapianto (oltre i due anni).

L'analisi della funzionalità timica è stata condotta mediante reazione di PCR atta alla quantificazione della molecola di sjTREC (*signal joint T cell Receptor Excision Circle*). Questa molecola è un episoma formatosi in seguito al riarrangiamento a livello timico della catena  $\beta$  del recettore dei linfociti T e la sua quantificazione a livello periferico è direttamente proporzionale alla quantità di linfociti generati de novo. La nostra analisi ha evidenziato una drastica riduzione nel numero di sjTREC in periferia nei pazienti rispetto ai donatori sani sia ad un anno dal trapianto che a punti di analisi più inoltrati (tre anni). Questo dato è concorde con quanto riportato in letteratura dove diversi gruppi hanno dimostrato una ridotta produttività timica in pazienti allo trapiantati sia ad un anno (Doderò A *et al*, 2009) che a punti più avanzati post trapianto (Castermans E. *et al*, 2011). Inoltre quest'analisi non ha evidenziato differenze significative fra i due gruppi di pazienti sottoposti a procedure trapiantologiche differenti né ad un anno dal trapianto né a 3 anni dallo stesso. Tale osservazione è concorde con quanto precedentemente emerso dall'analisi immunofenotipica che evidenziava una diminuzione significativa a tutti i punti post trapianto indagati delle popolazioni linfocitarie T naive (sia effector che citotossici). Molti lavori presenti in letteratura hanno evidenziato come uno dei principali fattori in grado di influenzare la produzione di nuovi linfociti a singola specificità antigenica a livello timico è l'età. Infatti all'aumentare dell'età aumenta il processo di involuzione timica e recenti studi hanno dimostrato che la produzione di emigranti timici sia praticamente nulla in pazienti oltre i 60 anni (Castermans E. *et al*, 2011). Per via dell'esiguità del campione non è stato possibile condurre un'analisi

accurata suddividendo i pazienti in base all'età ma l'analisi della quantità di sjTREC*s* in tre pazienti oltre i 55 anni di età sottoposti a trapianto da donatore non consanguineo ha mostrato una quantificazione molto limitata di tale molecola. L'evidenza di una ridotta produttività timica è in accordo con quanto emerso dall'analisi immunofenotipica dalla quale era emersa una riduzione significativa in entrambi i gruppi di pazienti nella quantità di linfociti naive circolanti.

La valutazione della complessità del repertorio linfocitario T è stata condotta mediante studio dei riarrangiamenti della regione CDR3 (*complementary determining region 3*) del recettore dei linfociti T (*T cell receptor - TCR*). Questa analisi permette di ottenere un'indicazione sulla quantità di linfociti a differente specificità antigenica presenti in circolo e pertanto sul grado di protezione offerto da questa popolazione cellulare all'individuo. Il repertorio linfocitario risulta profondamente alterato nei primi mesi post-trapianto in entrambi i gruppi di pazienti, probabilmente dovuto all'espansione di cloni linfocitari in risposta ad infezioni opportunistiche e all'insorgenza di GvHD (Dodero *et al*, 2005). Nel nostro studio l'andamento della cinetica di rigenerazione linfocitaria T raggiunge valori normali dopo un anno dal trapianto. In accordo con dati già pubblicati in letteratura su pazienti allo trapiantati da donatori familiari HLA (*human leucocyte antigens*) identici (Quan Le R. *et al*, 2011) tale complessità si mantiene elevata anche nei punti di indagine più inoltrati post trapianto nonostante l'evidenza di una ridotta funzionalità timica. Questo può essere dovuto ad un fenomeno di evoluzione periferica del compartimento linfocitario che causa la selezione nel tempo di un certo tipo di cloni a discapito di altri al fine di mantenere elevata la complessità recettoriale permettendo il riconoscimento di un elevato numero di antigeni (Quan Le R. *et al*, 2011).

Infine la valutazione del repertorio immunoglobulinico è stata condotta mediante amplificazione della CDR3 della catena pesante delle immunoglobuline (*Immunoglobulin heavy chain – IgH*). Anche in questo caso l'analisi permette di quantificare i cloni a diversa specificità antigenica. Come per la valutazione del repertorio recettoriale T anche l'analisi del repertorio B linfocitario ha evidenziato la capacità di recuperare un elevato grado di complessità ad un anno dal trapianto indipendentemente da tipo di trapianto. Tale complessità viene mantenuta anche nei punti di indagine più distanti dal trapianto ad indicare un recupero efficace del compartimento B linfocitario. Tale osservazione è in accordo con quanto emerso dall'analisi immunofenotipica delle sottopopolazioni maturative B dalla quale è emerso un incremento significativo nella popolazione naive in entrambi i gruppi di pazienti.

## CAPITOLO VI

### CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio hanno evidenziato che pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore alternativo (aploidentico o *matched unrelated donor* – MUD) dopo regime di condizionamento a ridotta intensità sono in grado di ricostituire il sistema immunitario a lungo termine. Le conte cellulari delle popolazioni linfocitarie B, T ed NK raggiungono valori normali già ad un anno dal trapianto e non sono riscontrabili differenze significative paragonando tali valori rispetto ad un gruppo di donatori sani di età comparabile. Allo stesso modo anche la valutazione della complessità dei repertori recettoriali T e B evidenzia un recupero elevato nel numero di cloni circolanti già a partire da un anno post trapianto.

Nonostante i due gruppi di pazienti analizzati vengano trattati secondo due diversi schemi trapiantologici (T deplezione in vitro ed in vivo associata a somministrazione di linfociti CD8 depleti nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico ed unicamente T deplezione in vivo per i pazienti trapiantati da donatore compatibile non familiare) le differenze nel grado di ricostituzione immunitaria in pazienti in remissione clinica oltre un anno dal trapianto sono estremamente limitate. In particolare tali differenze tendono ad annullarsi oltre i 2 due anni dalla procedura trapiantologica. Questo dato risulta particolarmente significativo in quanto dimostra che, nel caso il paziente non sviluppi complicanze correlate alle procedure trapiantologiche o reazioni croniche di attivazione del sistema immune contro i tessuti sani dell'ospite, le due tipologie di donatori ed i due schemi terapeutici (aploidentico e MUD) sono equivalenti. In particolare tale osservazione è importante nel caso non sia disponibile un donatore HLA compatibile (né nel nucleo familiare né nei registri internazionali) in quanto la possibilità di identificare un donatore familiare aploidentico è praticamente del 100% per tutti pazienti. Tuttavia va sottolineato che l'età dei pazienti analizzati in questo studio al momento del trapianto è mediamente inferiore nei soggetti sottoposti a trapianto aploidentico (media

34; *range* 15-49) rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto MUD (media 40; *range* 22-60). Tale differenza potrebbe giustificare almeno in parte la buona riuscita della procedura trapiantologica nei pazienti aploidentici in quanto l'età inferiore è associata ad un migliore e più rapido recupero immunitario (Castermans E. *et al*, 2011). A conferma di questa considerazione è l'analisi immunofenotipica delle popolazioni linfoidi T e B effettuata su pazienti con meno di 40 anni di età al momento del trapianto (3 pazienti per il gruppo aploidentico, età media 26, *range* 15-34; e 6 pazienti nel gruppo sottoposto a trapianto da donatore MUD, età media 29, *range* 22-40). Nonostante il risultato non mostri significatività, probabilmente per il ridotto numero di pazienti e per l'elevato grado di dispersione dei dati, le medie delle conte risultano più alte nei pazienti trapiantati da donatore non familiare rispetto ai pazienti trapiantati da donatore aploidentico fino a 3 anni dal trapianto (dato non mostrato). Un'ulteriore conferma all'importanza dell'età nel modulare la ricostituzione immunitaria deriva dall'analisi dei sjTREC. Infatti anche questa valutazione non ha evidenziato differenze nella produzione timica a lungo termine (+3 anni) fra le due tipologie di pazienti ma andando ad analizzare solo pazienti con età inferiore ai 40 anni il valore medio delle copie di sjTREC in pazienti sottoposti a trapianto MUD risulta 170,2 mentre per i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico è 110,3. In quest'ottica è sicuramente necessario aumentare la casistica di pazienti analizzati in modo da poter comprendere in modo più completo quanto l'età possa effettivamente influenzare la ricostituzione immune a lungo termine nelle due tipologie di pazienti e quindi migliorare ulteriormente l'approccio terapeutico.

L'analisi delle fasi maturative fra i due gruppi di pazienti non ha rivelato differenze significative. Tuttavia confrontando questi dati rispetto ai valori ottenuti da un gruppo di donatori sani si sono osservate delle differenze che erano sfuggite alla sola analisi delle principali popolazioni linfoidi. In entrambe le condizioni trapiantologiche sono state osservate delle alterazioni ricorrenti. Anzitutto è stata osservata un incremento nella quantità di linfociti B Naive ed una diminuzione nella quantità di linfociti B Memory (sia Memory IgM/IgD che Memory IgG) fino 4-5 anni post trapianto. Tale alterazione è stata riportata anche da altri autori e potrebbe suggerire un ruolo di queste popolazioni nel mantenimento di uno stato di immunocompetenza nei pazienti allotrapiantati. La presenza di molti linfociti Naive implica la presenza di molti cloni a differente specificità e quindi la capacità di riconoscere un numero maggiore di agenti microbici. Tuttavia l'assenza di popolazioni Memory potrebbe essere associata ad una diminuita responsività o capacità differenziativa di tali linfociti. Sicuramente lo studio di queste popolazioni merita di essere approfondito. Un'altra alterazione ricorrente che è stata riscontrata nei pazienti allotrapiantati rispetto ai donatori sani è stata una ridotta quantità di linfociti T Naive circolanti (sia helper che citotossici) associata ad un aumento nella quantità di linfociti T Effector Memory. La prima osservazione è in sintonia con quanto

evidenziato dall'analisi dei TREC dalla quale emerge che, indipendentemente dal tipo di trapianto, il numero di emigranti timici è ridotto rispetto ai donatori sani anche oltre i tre anni dal trapianto. L'analisi della complessità recettoriale tuttavia non evidenzia differenze significative nella quantità di cloni a differente specificità fra i pazienti ed i donatori oltre un anno dal trapianto. Questo dato viene spiegato da alcuni autori (Quan Le R. *et al*, 2011) come la conseguenza di un fenomeno di evoluzione periferica del repertorio T linfocitario ma potrebbe anche essere dovuta ad un limite tecnico della metodica di quantificazione della complessità recettoriale. Infatti quest'analisi raggruppa differenti alleli del recettore dei linfociti T in famiglie. Questo potrebbe causare una diminuzione della sensibilità della metodica quando la quantità di riarrangiamenti raggiunge dei livelli elevati, limitando in tal modo la possibilità di discriminare correttamente le eventuali alterazioni presenti. L'incremento nella quantità di linfociti T Effector Memory invece risulta particolarmente interessante in quanto recenti studi su modelli murini hanno proposto un coinvolgimento diretto di tale popolazione nella risposta immunitaria contro le cellule tumorali (GVT) (Chen B.J. *et al*, 2004). L'analisi nei nostri pazienti è stata condotta sempre in momenti di remissione clinica a suggerisce che questa popolazione potrebbe effettivamente giocare un ruolo nel controllo della malattia di base. In quest'ottica monitorare tale popolazione in modo sequenziale in pazienti allo trapiantati rappresenterebbe un importante surrogato per la valutazione clinica dei pazienti anche se tale dato va sicuramente verificato su una casistica maggiore di pazienti.

I dati ottenuti in questo studio necessitano sicuramente di ulteriori conferme su casistiche più ampie ma mettono in luce come il recupero a lungo termine non sembra influenzato dal tipo di donatore né dalle differenti procedure trapiantologiche. Inoltre lo studio delle sottopopolazioni maturative dei linfociti B e T può essere uno strumento importante per aumentare la conoscenza sulle cinetiche di recupero immunitario nonché per lo sviluppo di eventuali marcatori surrogati al monitoraggio clinico dei pazienti. In quest'ottica sarebbe sicuramente interessante analizzare parallelamente alle popolazioni linfoidi anche popolazioni di origine mieloide quali le cellule dendritiche circolanti o le cellule soppressorie di origine mieloide (*myeloid derived suppressor cells – MDSC*) le cui proprietà nella regolazione dei processi immuni stanno emergendo con sempre maggiore rilievo.

## ***Bibliografia***

- Alyea EP, Soiffer RJ, et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4<sup>+</sup> donor lymphocyte for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* 1998;91:3671
- Amrolia P J, Muccioli-Casadei G, Huls H, et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797
- Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, Thomas ED, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol* 1990;29:79-91
- Ash RC, Horowitz MM, Gale RP et al. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:443
- Auletta JJ and Lazarus HM, Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target (review article). *Bone Marrow Transplantation*, 2005;35:835-857
- Avanzini MA et al. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27<sup>+</sup> B cells. *Experimental Hematology* 2005;33: 480-486.
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF. Treatment of high-risk leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339:1186-1193
- Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felicini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, Martelli MF. Full haplotype-mismatched



- hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-3454
- Bleakley M, Riddell S R. molecules and mechanisms of the graft-versus-leukemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371
  - Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerriero A, et al. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors. *Blood* 1998;91:2588-2600
  - Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, et al. Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;:337
  - Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years old. *Haematologica*. 2011;96(2):298-306
  - Chakraverty R et al. Limiting transplantation related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071
  - Chattopadhyay PK, Roeder M. Immunophenotyping of T cells subpopulations in HIV disease. *Current Protocols in Immunology* 2005, Unit 12.12
  - Chen BJ et al. Transfer of allogeneic CD62L- Memory T cells without graft-versus-host-disease. *Blood*, 2004;103:1534-1541
  - Choi YW et al, Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8941-8945
  - Copeland Edward A. Hematopoietic stem-cell transplantation (review article). *N Engl J Med* 2006;354:1813
  - Corradini P, Voena C, Astolfi M, Ladetto M, Tarella C, Boccadoro M, Pileri A. High-dose sequential chemotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood* 1995;85:1596-1602
  - Corradini Paolo et al, Reduced-intensity conditioning containing low-dose alemtuzumab before allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: graft-versus-host disease is decreased but T-cell reconstitution is delayed, *Experimental Hematology* 2005;33: 920-927
  - Corradini Paolo et al. Reduced-intensity conditioning followed by allografting of hematopoietic cells can produce clinical and molecular remissions in patients with poor risk hematologic malignancies. *Blood* 2002;99: 75

- D'Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, Allogenic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of both switch and igh memory B cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(7):795-803
- de Lalla C, Rinaldi A, Montagna D, et al, Invariant NKT cell reconstitution in pediatric leukemia patients given HLA-haploidentical stem cell transplantation defines distinct CD4+ and CD4- subsets dynamics and correlates with remission state. *J Immunology* 2011;186(7):4490-4499
- Dodero A, Carniti C, Raganato A, Vendramin A et al. Haploidentical stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen for the treatment of advanced hematological malignancies: posttransplant CD8-depleted donor lymphocyte infusions contribute to improve T-cell recovery. *Blood*, 2009; 113:4771-4779
- Dodero A, Carrabba M, Milani R, Reduced-intensity conditioning containing low-dose alemtuzumab before allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: graft-versus-host disease is decreased but T-cell reconstitution is delayed. *Exp Hematol.* 2005;33(8):920-7
- Donovan J W, Ladetto M, et al. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95:2651-2658
- Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000;355:1875
- Eyrich M, Lang P, Lal S, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel PG. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol* 2001;114:422-432
- Falkenburg JH, et al. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematology* 2003;17:2049
- Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation (review article). *Best Practice & Research Clinical Hematology* 2007;20:329
- Genevee C. et Al, An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T

- cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction, *Eur J Immunology* 1992;22:1261-1269
- Giebel S, et al survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003,102: 814-819
  - Gratwohl A et al. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantation in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:3877
  - Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B, Cavazzana-Calvo M, Morgan G, Bertrand Y, Fasth A, Porta F, Cant A, Espanol T, Müller S, Veys P, Vossen J, Fischer A. Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency : a European retrospective study of 116 patients. *Blood* 1998;91:3646-3653
  - Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G et al, Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbelical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogenic transplantation in adults. *Br J Haematol* 2004;124:488-498
  - Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, et al. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003;4:97
  - Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, et al. Quantification of T-cell noegenesis in vivo after allogeni bone marrow transplantation in adults. *Blood* 2001;98:1116
  - Hsu K.C et al KIR ligands and prediction of relapse after Unrelated Donor Hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy, *Biol blood and marrow transplant* 2006;12:828-836
  - Imamura M, Tsutsumi Y, Miura Y, et al. Immune reconstitution and tollerance after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology* 2003;8:19
  - Khan F, Agawal a, Agarwal S. Significance of chimerism in hematopietc stem cell transplantation : new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:1-12
  - Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al. Two subsets of naïve t helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002;195(6):789-794
  - Kondo Y, Shiobara S, Nakao S. Identification of T-cell clones shoing expansion associated with graft-vs-leukemia effect on chronic myelogenous leukemia in vivo and in vitro. *Experimental Hematology* 2000;29:471-476

- Lewalle P, Triffet A, et al. Donor lymphocyte infusions in adult haploidentical transplants: a dose finding study. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:39
- Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-201
- Mackall C, Fry T, Gress R, et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplantation* 2009;44:457-462
- Mannick JA, Lochte HL jr, Ashley CA, Thomas ED, Ferrebee JW. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total body irradiation. *Blood* 1960; 15:255-256
- McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high dose cytotoxic therapy with graft versus tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-3400
- Michalek J, Collins R H, Hill B J, et al. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *The Lancet* 2003;361:1183
- Montagna D, Maccario R, Locatelli F, et al Emergence of anti-tumor cytotoxic T cells is associated with maintenance of hematological remission in children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;10:1182
- Montagna D, Daudt L, Locatelli F, Montini E et al. Single-Cell cloning of human, donor derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction. *Cancer Res* 2006;66:7310-7316
- Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003;4:497
- Orsini E, Bellucci R, Alyea EP, Schlossman R, Canning C, McLaughlin S, Ghia P, Anderson KC, Ritz J. Expansion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones in patients with relapsed myeloma after donor lymphocyte infusion. *Cancer Res.* 2003;63:2561-2568
- Peggs KS, Mackinnon S, Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. (review article) *Br J Haematol.* 2004;124:407
- Pindolia K, Janakimaran N, Kasten-Sportes C, et al. Enhanced assessment of allogeneic bone marrow transplant engraftment using automated fluorescent based typing. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:1235

- Ping Y and Kischner D E. Reevaluation of T-cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *The Journal of Immunology* 2002;169:4968
- Przepiorka D, Smith TL, Folloder J et al. Controlled trial of filgrastim for acceleration of neutrophil recovery after allogenic blood stem cell transplantation from human leukocyte antigen matched related donors. *Blood* 2001;97:3405
- Quan Le R, Melenhorst J, Battiwalla M, et al. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogenic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(19):5250-5256
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097
- Ruggeri L, et al. Donor natural killer allorecognition of missing self in haploidentical hemopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* 2007;110:433
- Sanchez-Guijo FM, Sanchez-Abarca LI, Bueno C, et al. Long term immune recovery of patients undergoing allogenic stem cell transplantation: a comparison with their respective sibling donors. *Biol Bone Marrow Transplant* 2005;11(5):354-361
- Sarasquete M E et al. Minimal residual disease monitorino in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372
- Storek J, Dawson MA, Storer B et al. Immune reconstitution after allogenic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:3380
- Tabbara I A, et al Allogenic hematopoietic stem celltransplantation: complications and results. *Arch Intern Med.* 2002;162:1558
- Tayebi H, Kuttler F, Saas P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotipical and functional properties of immune cells. *Exp Hematol* 2001;29:458
- Thomas ED, Lochte HL jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Super lethal whole body irradiation and isologous transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716
- Truitt RL, The Mortimer M. Bortin Lecture: to destroy by the reaction of immunity: the search for separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:505

- Volpi I, Perruccio K, Tosti A et al. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* 2001;97:2514
- Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, et al. Long term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 29(16):2230-2239
- Wu C J, Chillemi A, Alyea P, et al. Reconstitution of T-cell repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood* 2000;95:352