



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dottorato di Ricerca XXIV ciclo

Scienze Pediatriche

Dipartimento di Scienze Mediche e Pediatriche

Direttore: Ch.mo Prof. Carmelo Erio Fiore

TESI

**Espressione genica e Profilo Fosfoproteomico nella
Malattia del Trapianto contro l'Ospite
in bambini sottoposti a trapianto di cellule
staminali ematopoietiche: confronto tra forma acu-
ta e forma cronica**

Relatore: Ch.mo Prof. Andrea Di Cataldo

Correlatore: Dott. Luca Lo Nigro

Dottoranda: Dott.ssa Manuela Tumino

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

ABBREVIAZIONI	Pag. I
RIASSUNTO	Pag. III
ABSTRACT	Pag. VI
INTRODUZIONE	Pag. 1
1.1 Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche	Pag. 1
1.2 Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche	Pag. 2
1.2.1 Il sistema HLA	Pag. 3
1.2.2 Alloreattività post-trapianto	Pag. 5
1.2.3 Indicazioni all'esecuzione dell'allo-TCSE	Pag. 6
1.2.4 Complicanze post allo-TCSE	Pag. 7
1.2.5 Chimerismo	Pag. 7
1.3 La malattia del trapianto contro l'ospite	Pag. 8
1.3.1 Storia della GvHD	Pag. 8
1.3.2 Cause di GvHD	Pag. 9
1.3.3 Classificazione della GvHD	Pag. 9
1.4 GvHD acuta	Pag. 10
1.4.1 Patogenesi	Pag. 10
1.4.2 Incidenza e fattori di rischio	Pag. 13
1.4.3 Clinica della GvHD acuta	Pag. 14
1.4.4 Classificazione della GvHD acuta	Pag. 15
1.5 GvHD cronica	Pag. 16
1.5.1 Incidenza e fattori di rischio	Pag. 16
1.5.2 Clinica della GvHD cronica	Pag. 17
1.5.3 Diagnosi	Pag. 17

1.5.4 Scoring della GvHD cronica	Pag.	20
1.6 Prevenzione e trattamento della GvHD	Pag.	22
SCOPO DELLA TESI	Pag.	25
MATERIALI E METODI	Pag.	27
3.1 Pazienti	Pag.	27
3.1.1 Criteri di inclusione	Pag.	27
3.1.2 Criteri di esclusione	Pag.	28
3.2 Isolamento delle cellule mononucleate (PBMC)	Pag.	28
3.3 Profilo di espressione genica di citochine	Pag.	30
3.3.1 Estrazione dell'RNA	Pag.	31
3.3.2 Quantifica dell'RNA estratto	Pag.	32
3.3.3 Trattamento con DNAsi	Pag.	32
3.3.4 Sintesi di cDNA: reazione di retrotrascrizione	Pag.	33
3.3.5 Reazione di PCR per ABL	Pag.	33
3.3.6 Gel di agarosio	Pag.	34
3.3.7 SYBR Green Real-Time Quantitative PCR (RQ-PCR)	Pag.	35
3.4 Profilo fosfoproteomico	Pag.	37
3.4.1 Estrazione proteica per analisi con RPPA	Pag.	38
3.4.2 Quantificazione della concentrazione proteica	Pag.	39
3.4.3 Diluizione e bollitura	Pag.	40
3.4.5 Printing dei Reverse Phase Protein Array con 2470 Au shon Arrayer	Pag.	41
3.4.6 Colorazione dei Reverse Phase Array con FastGreen FCF	Pag.	42
3.4.7 Marcatura dei Reverse Phase Array con anticorpi speci fici	Pag.	42
3.4.8 Analisi dei Reverse Phase Protein Array con il software	Pag.	45

MicrovigeneTM	.
3.5 Analisi statistiche	Pag. 45
RISULTATI	Pag. 47
4.1 L'aumento di espressione di IL-22 è associato alla presenza di GvHD cronica in fase attiva di malattia	Pag. 47
4.2 L'aumento dell'espressione dell'IL-22 si correla a quello dell'IL-17	Pag. 53
4.3 Analisi del profilo fosfoproteomico	Pag. 55
4.4 Analisi del profilo di espressione genica di citochine dopo classificazione dei pazienti secondo i criteri NIH	Pag. 55
4.5 Analisi del profilo fosfoproteomico dopo classificazione dei pazienti secondo i criteri NIH	Pag. 60
DISCUSSIONE	Pag. 62
BIBLIOGRAFIA	Pag. 68
APPENDICE	Pag. 76

ABBREVIAZIONI

aa	anni
aGvHD	<i>acute Graft versus Host Disease</i>
allo-TCSE	Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche
ATG	<i>Antithymocyte Globulin</i>
BM	<i>Bone Marrow</i>
BSA	Albumina sierica bovina
UCB	<i>Umbilical Cord Blood</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGvHD	<i>chronic Graft versus Host Disease</i>
CSA	<i>Catalyzed Signal Amplification</i>
CSE	Cellule Staminali Ematopoietiche
CXT	Ciclofosfamide
DAB	Diaminobenzidina
ddH ₂ O	Acqua bidistillata
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
dH ₂ O	Acqua distillata
DNA	Acido desossiribonucleico
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
gg	giorni
GvL	<i>Graft versus Leukemia</i>
GvT	<i>Graft versus Tumor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
HRCT	<i>High Resolution Computer Tomography</i>
IBMTR	<i>International Bone Marrow Transplant Registry</i>
IR	IInsufficienza Renale
mHA	<i>minor Histocompatibility Antigens</i>
MCH	<i>Major Hystocompatibility Complex</i>
min	minuti
MMF	Micofenolato Mofetil
MSD	Matched Sibling Donor
MTX	Metotrexate
MUD	<i>Matched Unrelated Donor</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PLT	Piastrine
PMN	Polimorfonucleati
PB	<i>Peripheral Blood</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHA	Fitoemoagglutinina
RNA	Acido ribonucleico
rpm	rotazioni per minuto

RPPA	<i>Reverse Phase Protein Array</i>
SABC	<i>Streptavidin- Biotin Complex</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
Ser	Serina
SI	Sistema Immunitario
SIADH	Sindrome da Inappropriata Secrezione di ADH
SSRTII	<i>Super script Reverse Transcriptase II</i>
TAE	Tris-Acido acetico-EDTA
TAR (Sdr. di-)	Sindrome Trombocitopenica con Assenza di radio
TBI	<i>Total Body Irradiation</i>
TBST	<i>Tris-Buffer Saline-Tween 20</i>
TCSE	Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
VOD	<i>hepatic Venno-Occlusive Disease</i>

RIASSUNTO

INTRODUZIONE E SCOPO. La malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD) rappresenta la principale complicanza del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-TCSE). Si tratta di un disordine immunologico scatenato dalla reazione dei linfociti T del donatore contro gli alloantigeni del ricevente; la gravità di tale processo dipende dalle differenze genetiche (HLA) tra donatore e ricevente, con interessamento di diversi distretti, tra cui cute, tratto gastrointestinale, fegato, polmoni. Secondo la nuova classificazione del *National Institute of Health* (NIH) in vigore dal 2005, vengono distinte due forme di GvHD, acuta e cronica. Se da una parte le conoscenze relative alla patogenesi della forma acuta sono ben note, lo stesso non vale per la forma cronica la cui diagnosi e gestione rappresentano ancora uno dei maggiori problemi del paziente post allo-TCSE. A tutt'oggi, non esistono marcatori biologici in grado di permettere una distinzione tra le due forme nonché la gestione della terapia immunosoppressiva. Dal punto di vista clinico è noto che la forma cronica si presenta con manifestazioni del tutto paragonabili alle malattie autoimmuni (sclerodermia, sindrome di Sjogren, psoriasi, malattie infiammatorie croniche intestinali). Sulla base di questa osservazione, scopo di questo studio è quello di analizzare retrospettivamente l'espressione di marcatori biologici in parte già noti nelle patologie autoimmuni, in pazienti pediatriche sottoposti ad allo-TCSE affetti da GvHD cronica

MATERIALI E METODI. Sono stati analizzati retrospettivamente campioni di sangue periferico di 29 pazienti pediatriche sottoposti ad allo-TCSE nel periodo dal 1995 al gennaio 2012, presso l'Unità Trapianti della Clinica di Oncoematologia di Padova. Secondo la vecchia classificazione temporale e successiva revisione secondo i criteri NIH sono stati inclusi pazienti con GvHD acuta (vecchia classificazione: 11 pazienti; NIH 2005: 13 pazienti), con GvHD cronica preceduta dalla forma acuta (vecchia classificazione: 14 pazienti; NIH 2005: 12 pazienti), pazienti che non avevano sviluppato GvHD (4 pazienti). Sono state eseguite analisi di

espressione genica di citochine mediante *Sybr Green Real Time Quantitative PCR (RQ-PCR)* e studio del profilo fosfoproteomico delle proteine coinvolte nelle principali vie di trasduzione del segnale di proliferazione e attivazione delle cellule B e T e nell'infiammazione mediante *Reverse Phase Protein Array (RPPA)*

RISULTATI. Dall'analisi di espressione genica di diverse citochine, l'IL-22 è risultata essere maggiormente espressa nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva rispetto agli altri pazienti (*p value* 0,02). I risultati relativi al tipo di popolazione cellulare responsabile della maggiore produzione di IL-22 sono incompleti, non avendo a disposizione lo studio immunofenotipico completo di ciascun paziente nei diversi momenti post trapianto. Non è stata osservata correlazione positiva tra numero di cellule Natural Killer (NK) ed espressione di IL-22. Nell'ipotesi di un possibile ruolo delle Th17, è stata osservata correlazione tra espressione genica di IL-22 e quella di IL-17 ($\rho=0.7$); tale dato è stato avvalorato dallo studio di fosfoproteomica relativo all'espressione delle proteine coinvolte nel *pathway* di espressione dell'IL-22 nelle Th17 (JAK2, STAT3 e TYK2): secondariamente alla rivalutazione dei pazienti secondo i nuovi criteri NIH del 2005 è stata osservata una tendenza della loro maggiore espressione nel gruppo di pazienti con GvHD cronica in fase attiva rispetto ai pazienti in remissione completa.

CONCLUSIONI. L'IL-22 potrebbe rappresentare un potenziale *marker* di stato attivo di cGvHD. A causa della mancanza di dati completi riguardanti la caratterizzazione immunofenotipica dei pazienti analizzati, non possiamo attribuire l'aumentata produzione di IL-22 a nessun sottotipo cellulare. La mancanza di correlazione tra espressione di IL-22 e numero di NK non esclude un loro possibile ruolo nella GvHD cronica in fase attiva; in particolare mancano in questo studio dati relativi al loro stato di attivazione. La correlazione positiva con l'espressione genica di IL-17 insieme al dato della fosfoproteomica potrebbe indicare un probabile ruolo patogenetico delle Th17. Non possiamo escludere un eventuale contributo dei linfociti T helper 1 (Th1) e T helper 22 (Th22). Tra le prospettive future sarà ne-

cessario aumentare la casistica al fine di validare i dati ottenuti, dosare i livelli plasmatici di IL-22 e valutare la presenza delle sottopopolazioni Th1, Th17 e Th22, nonché studiare lo stato di attivazione delle NK ai vari *timepoint* considerati post allo-TCSE. Inoltre, sarà interessante studiare l'attivazione dei *pathway* a valle del recettore dell'IL-22 nelle biopsie dei tessuti interessati dalla cGvHD.

ABSTRACT

BACKGROUND AND AIM. The major complication of Haemopoietic-Stem Cell Transplantation (HSCT) is the Graft versus-Host Disease (GvHD), an immunological disorder that affects many organs, including gastrointestinal tract, liver, skin, and lungs. GvHD arises in the immunocompromised recipient when donor T cells respond to genetically different proteins on host cells. Since 2005 the Consensus Conference of the National Institute of Health (NIH classification) established new criteria to define chronic GvHD. These new criteria establish that diagnosis of chronic GvHD requires the presence of at least one diagnostic clinical sign of chronic GvHD or the presence of at least one distinctive manifestation confirmed by pertinent biopsy or other relevant tests in the same or another organ. Although the pathogenesis of acute GvHD is well defined, the biological mechanisms that contribute to the insurgence of chronic GvHD are still not well characterized. There is no evidence of reliable biomarkers for chronic GvHD and this makes difficult both the diagnosis and the therapy handling. As well known, clinical manifestations of chronic GvHD are similar to autoimmune diseases (sclerodermia, Sjogren syndrome, psoriasis, chronic inflammatory bowel diseases). Therefore, in order to identify new potential biomarkers for chronic GvHD, main aim of this thesis is studying such molecular pathway involved in autoimmune diseases in allogeneic HSCT pediatric patients affected to chronic GvHD.

MATERIALS AND METHODS. We performed a retrospective study analyzing the peripheral blood of 29 pediatric patients subjected to allo-HSCT between 1995 and 2012 at the Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit of Padova. We included 11 patients with acute GvHD (13 patients with NIH criteria), 14 patients with chronic GVHD after acute GvHD (12 patients with NIH criteria) and 4 patients did not develop GvHD. Cytokine gene expression analysis was performed by means of Sybr Green Real Time Quantitative PCR, in order to study the main autoimmune cytokines expression. Moreover we performed a

phosphoproteomic analysis by Reverse Phase Protein Arrays in order to study the activation state of signal transduction pathways.

RESULTS. By means of gene expression analysis we found that IL-22 is expressed in chronic GvHD patients more than in patients in complete remission ($p=0.02$), patients with acute GvHD and patients who did not developed GvHD. Moreover, also IL-17 tends to be more expressed in chronic GvHD patients even if not as much as IL-22. We obtained these results stratifying patients both with the old criteria and the new NIH classification. The complete immunophenotype data were not available for these patients, thus we could not define which cellular subpopulation could be responsible of the increased IL-22 expression between Natural Killer (NK), T helper 17 (Th17), T helper 1 (Th1) and T helper 22 (Th22) cells. We tried to relate the IL-22 expression with the presence of NK cells, but we did not find any correlation, although we did not study their activation state. Moreover, we searched for a correlation between IL-22 and IL-17 expression and we found that they are positively correlated ($\rho=0.7$). Phosphoproteomic profiling analysis showed that proteins involved in IL-22 production in Th17 cells (JAK2, STAT3 and TYK2), tends to be expressed in chronic GvHD patients diagnosed by NIH criteria more than more than in patients in complete remission.

CONCLUSION. IL-22 could be thus considered as a new potential biomarker of active chronic GvHD. Positive correlation with IL-17 gene expression and JAK2, STAT3 and TYK2 tendency to be activated in NIH classified chronic GVHD patients suggest a possible role for Th17 cells in IL-22 production in chronic GvHD. We can not exclude a contribution of Th1 and Th22 cells. In order to validate this data we plan to increase the number of patients, to measure plasmatic levels of IL-22 and to evaluate the distribution of Th1, Th17 and Th22 subpopulations after allo-HSCT, as well as to study activate state of NK cells. Moreover, it will be interesting to study the activation state of the signal transduction pathways downstream the IL-22 receptor in cGvHD tissue biopsies.

INTRODUZIONE

1.1 IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una procedura complessa che prevede la completa sostituzione del tessuto midollare del ricevente con cellule staminali ematopoietiche (CSE) del donatore, previa completa eradicazione dell'ematopoiesi dell'ospite stesso attraverso un regime massimale di chemio e/o radioterapia, noto come condizionamento [1].

Scopi del condizionamento sono:

- eradicazione del sistema immunitario (SI) del ricevente, per “creare spazio” alle CSE del donatore, con conseguente attecchimento
- eliminazione di eventuali cellule maligne residue (nel caso di malattie oncologiche)

Possibili fonti di CSE sono: midollo osseo (*Bone Marrow*, BM), sangue periferico (*Peripheral Blood*, PB) o cellule derivanti da sangue di cordone ombelicale (*Cord Blood*, CB) [2, 3].

Sulla base del tipo di donatore, si distinguono:

- TCSE allogenico (allo-TCSE): il donatore può essere un familiare, fratello o sorella (*Matched Sibling Donor*, MSD), oppure un non familiare reclutato dalla banca di donatori volontari nazionale o internazionale (*Matched/Mismatched Unrelated Donor*, MUD)
- TCSE autologo: il donatore è il paziente stesso
- TCSE aploidentico: il donatore è un familiare (genitori o altri familiari che condividono un intero aplotipo con il ricevente)
- TCSE singenico: il donatore è un gemello monovulare

Per gli scopi prefissati in questa tesi ci soffermeremo in modo dettagliato sull' allo-TCSE.

1.2IL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATO-POIETICHE

Il trapianto allogenico prevede l'uso di CSE (da BM, PB, CB), prelevate da un donatore familiare (fratello o sorella) o da banca, quest'ultimo qualora nell'ambito della famiglia non sia disponibile un donatore HLA-compatibile.

Una volta infuse, le CSE vanno a colonizzare le nicchie a livello del microambiente midollare (fenomeno di *homing*) e grazie all'interazione di cellule stromali e fattori di crescita, iniziano i processi proliferativi e differenziativi necessari per una completa ricostituzione ematopoietica.

Si definisce attecchimento il momento in cui le CSE del donatore iniziano a produrre cellule midollari nel ricevente. Si parla di attecchimento dei polimorfonucleati (PMN) quando il numero assoluto di PMN è superiore a 500/mm³ per tre giorni consecutivi; di attecchimento piastrinico quando il numero di piastrine (PLT) è superiore a 50.000/mm³ a distanza di una settimana dall'ultima trasfusione.

L'attecchimento delle TCSE infuse richiede in media circa 2-3 settimane, periodo variabile a seconda del numero totale di cellule nucleate e di CD34+ infuse, oltre che della fonte di CSE (Tabella 1.1).

	CSE da PB	CSE da BM	CSE da UCB
PMN	12 gg	20 gg	24 gg
PLT	19 gg	40 gg	60 gg

Tabella 1.1: Tempi medi di attecchimento di PMN e PLT in base alla diversa fonte di CSE.

1.2.1 Il sistema HLA [1, 3]

L'allo-TCSE è stato reso possibile grazie all'identificazione del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), definito nell'uomo sistema HLA (*Human Leucocyte Antigens*). Questo è costituito da un gruppo di geni codificanti per molecole di superficie in grado di legare gli antigeni sottoforma di peptidi e di presentarli sulla membrana cellulare ai linfociti T. Questa stretta interazione risulta essenziale per indurre una risposta immunitaria T-mediata.

Il sistema HLA è localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 6 (p21.3) e comprende una serie di geni che codificano per tre classi di molecole designate rispettivamente come antigeni di classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), rappresentati da eterodimeri formati da due catene, di cui una altamente polimorfica e l'altra costituita dalla β 2-microglobulina, antigeni di classe II (HLA-DR, DQ, DP), formati da una catena α e da una catena β , e antigeni di classe III che comprendono fattori del sistema del complemento (C2, BF, C4A, C4B), o citochine quali il $\text{TNF}\alpha$ e il $\text{TNF}\beta$. Gli antigeni HLA di classe I sono espressi costituzionalmente in quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo e anche sulle piastrine, sono invece assenti sugli eritrociti e sugli spermatozoi. La loro espressione risulta tuttavia estremamente variabile essendo elevata sulle cellule del sistema immunitario e bassa sui fibroblasti, sulle fibre muscolari e sulle cellule nervose. Gli antigeni di classe I sono i principali responsabili del fenomeno della restrizione dell'MHC, grazie al quale i linfociti T-citotossici sono in grado di distruggere cellule infettate da virus o cellule allogeniche dal momento che espongono antigeni *non self* sottoforma di peptidi associati a determinate varianti alleliche di una molecola HLA *self*, viceversa non saranno in grado di riconoscere lo stesso peptide associato a molecole HLA diver-

se [1]. E' evidente quindi come gli antigeni di classe I rappresentino antigeni cruciali sia nelle reazioni di rigetto che in quelle legate alla GvHD.

La distribuzione degli antigeni HLA di classe II è assai più ristretta, questi sono presenti solo su alcune cellule del sistema immunitario: sui B-linfociti, sui monociti circolanti, sulle cellule del sistema reticolo-endoteliale (cellule di *Kupffer* e cellule di *Langerhans*), sui T linfociti attivati e su una piccola percentuale di T-linfociti a riposo.

Gli antigeni HLA di classe I e II sono caratterizzati da un estremo polimorfismo, tale per cui la maggior parte degli individui risultano eterozigoti per tutti i loci HLA. Nonostante ci sia un numero teoricamente infinito di possibili combinazioni, si osserva che certi fenotipi HLA sono osservabili nelle diverse etnie con una frequenza decisamente superiore all'atteso. Questa osservazione pone il presupposto biologico grazie al quale sono stati resi possibili trapianti di progenitori emopoietici tra individui non appartenenti allo stesso nucleo familiare.

La possibilità che vi sia un donatore HLA-compatibile nell'ambito della famiglia, è del 25%. Nei pazienti in cui non vi è un donatore compatibile familiare occorre avviare una ricerca nell'ambito delle banche di donatori volontari di CSE nazionali e internazionali.

Attualmente la tipizzazione ad alta risoluzione dei geni HLA con tecniche che si avvalgono della *PCR* ha soppiantato gli altri metodi [2, 4]. Il *gold standard* consiste in un'analisi dei loci di HLA A; B; C; DRB1 e DQB1. Se donatore e paziente possiedono gli stessi 5 alleli in entrambi gli aplotipi, la situazione si definisce 10/10 *matched* [2]. Nella pratica, donatore e ricevente possono venire analizzati:

- per i loci HLA A, B, C e DRB1, ed in caso di compatibilità per tutti gli alleli la situazione viene definita *8/8 matched*
- per i loci HLA A, B, DRB1 ed in caso di compatibilità per tutti gli alleli la situazione viene definita *6/6 matched*

Sono tollerati più *mismatched* nel caso di trapianti di cellule da cordone ombelicale per la relativa immaturità delle CSE infuse [5].

Nonostante la compatibilità HLA, ben il 40% dei pazienti sottoposti a trapianto HLA-identico sviluppa una GvHD acuta, dipendente da differenze genetiche in regioni al di fuori del locus HLA, che codificano per proteine dette antigeni minori di istocompatibilità (*minor Histocompatibility Antigens*, mHA). Si tratta di peptidi derivati da proteine polimorfiche cellulari, alcuni dei quali - come HA-3 e HY - sono espressi a livello di tutti i tessuti e sono *target* sia per la GvHD che per la GvL. Altri mHA, per es. HA-1 e HA-2, sono espressi principalmente da cellule emopoietiche (comprese le cellule leucemiche) e sono in grado di amplificare l'effetto GvL senza promuovere l'insorgenza di GvHD [2, 6, 7]. (cfr: 1.3.2: "Cause della GvHD, Alloreattività post trapianto").

1.2.2 Alloreattività post trapianto [2]

Dopo il TCSE tra donatore e ricevente si instaurano reazioni immunitarie alloge- niche bidirezionali. Queste sono responsabili sia delle principali complicanze del trapianto, fallimento dell'attecchimento e GvHD, ma anche, nel caso di patologie oncologiche, del vantaggioso effetto del trapianto contro cellule neoplastiche eventualmente ancora residue (GvL).

L'alloreattività post trapianto è un processo complesso che coinvolge cellule T del donatore e cellule NK che interagiscono con specifici tessuti *target* del ricevente. Questa risposta immune è mediata sia dall'interazione diretta tra cellule *target* e linfociti, sia dalle citochine.

1.2.3 Indicazioni all'esecuzione dell'allo-TCSE [1, 3]

Le patologie per le quali ad oggi è previsto l'uso dell'allo-TCSE sono riportate schematicamente nella Tabella 1.2.

PATOLOGIE MALIGNNE	PATOLOGIE NON MALIGNNE
LEUCEMIE Leucemie (linfatica acuta; mieloide acuta o cronica) Sindromi mielodisplastiche Mielofibrosi acuta DISTURBI LINFOPROLIFERATIVI Linfomi (Hodgkin o non-Hodgkin) Mieloma multiplo TUMORI SOLIDI	S. DA INSUFF. MIDOLLARE Ipoplasie midollari congenite Anemia aplastica severa IMMUNODEFICIENZE Immunodeficienze congenite Sindrome di <i>Wiskott-Aldrich</i> DISTURBI EMATOLOGICI Talassemia major Anemia falciforme Neutropenia congenita Gravi disturbi piastrinici congeniti DISTURBI GENETICI NON EMATOLOGICI Osteopetrosi Mucopolisaccaridosi Leucodistrofie Altre patologie metaboliche rare MALATTIE AUTOIMMUNITARIE

Tabella 1.2: Principali indicazioni all'esecuzione di allo-TCSE.

1.2.4 Complicanze post allo-TCSE

L'allo-TCSE è una procedura complessa con una mortalità trapianto-correlata (TRM) del 10-15%. Tra le complicanze post allo-TCSE si distinguono: 1) ad insorgenza precoce: tossicità correlata al regime di condizionamento; infezioni batteriche, virali e fungine; rigetto o, nel caso di malattie oncologiche, recidiva di malattia; malattia del trapianto contro l'ospite acuta e cronica; 2) ad insorgenza

tardiva: disturbi di crescita, disturbi endocrinologici, cataratta, patologie a carico dell'osso, complicanze neurologiche, cardiopatia, pneumopatia di tipo restrittivo, nefropatia. Va ricordato infine che il paziente precedentemente sottoposto ad allo-TCSE ha una probabilità 6-7 volte maggiore di sviluppare una seconda neoplasia e con un tempo di insorgenza più precoce rispetto alla popolazione generale.[2].

[1]

1.2.5 Chimerismo

Per il monitoraggio dell'attecchimento si utilizza lo studio dello stato di chimerismo, la cui valutazione post-trapianto può essere condotta con diverse metodiche di analisi citogenetiche classiche (identificazione cromosomi sessuali, polimorfismi di bandeggio all'analisi cariotipica, eventuale presenza nei pazienti con patologie clonali di anomalie citogenetiche caratteristiche), oppure mediante determinazione dei gruppi eritrocitari o tipizzazione HLA per trapianti tra soggetti non identici. Più recentemente vengono impiegate metodiche di biologia molecolare, attraverso tecniche di reazione a catena della polimerasi (*polymerase chain reaction*, PCR), che amplificano regioni del genoma umano altamente polimorfiche (quali ad esempio *variable number tandem repeats*, VNTR). Attraverso queste metodiche, applicabili sia su cellule midollari che su sangue periferico, è possibile stabilire il chimerismo post-trapianto e soprattutto seguirne l'andamento nel tempo. In base alla persistenza o meno di cellule del ricevente a livello midollare o periferico si distinguono tre possibili differenti stati chimerici: chimerismo completo (assenza di residuo cellulare emopoietico del paziente); chimerismo misto (concomitante presenza di cellule del donatore e del ricevente); assenza di chimerismo (ricostituzione emopoietica autologa). Condizioni di perdita dell'attecchimento nel caso delle malattie oncologiche possono rappresentare un primo segnale di ripresa di malattia.

1.3 LA MALATTIA DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE

La malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft-versus-Host disease*, GvHD) è la causa maggiore di morbidità e mortalità dopo allo-TCSE.

Si tratta di un disordine immunologico che interessa diversi distretti, tra cui il tratto gastrointestinale, il fegato, la cute ed i polmoni [4]. E' causata dalla reazione dei linfociti T maturi presenti nell'inoculo contro gli alloantigeni dell'ospite ed insorge in condizioni di immunocompromissione del ricevente, per differenze genetiche del ricevente in grado di indurre l'attivazione delle cellule T [4].

La prevenzione della GvHD è uno degli obiettivi principali nella gestione dei pazienti. Tuttavia, ad oggi non è ancora possibile separare gli effetti negativi della GvHD dagli effetti benefici della GvL, questo comporta la difficoltà di identificare la strategia ottimale per prevenire la GvHD. Una volta insorta la GvHD, il più importante fattore predittivo della sopravvivenza a lungo termine è la risposta primaria alla terapia (cfr: 1.6: "Prevenzione e Terapia della GvHD") [2].

1.3.1 Storia della GvHD

Già con i primi TCSE allogenici venne messo in evidenza che una percentuale elevata di pazienti sviluppava una patologia, definita "*secondary disease*", dopo allo-TCSE non tra gemelli monozigotici. Le manifestazioni cliniche di tale patologia riguardavano principalmente cute, tratto gastro-intestinale e fegato, ed apparivano simili a quelle osservate in topi neonati sottoposti a trapianto allogenico di tessuto splenico e in alcuni pazienti pediatrici con deficit immunitari che avevano ricevuto trasfusioni di sangue [2]

Nel 1966 *Billingham* definì tre condizioni necessarie perché un paziente sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche sviluppi GvHD:

1. Il trapianto deve contenere cellule immunologicamente competenti
2. Il ricevente deve esprimere antigeni tissutali che non sono presenti nel donatore
3. Il paziente deve essere incapace di montare un'efficace risposta immunitaria, tale da eliminare le cellule trapiantate [4]

1.3.2 Cause di GvHD

La GvHD è causata dalla risposta delle cellule T del donatore contro proteine specifiche riconosciute come *non self* sulle cellule dell'ospite.

La frequenza di GvHD è direttamente correlata al grado di discrepanza tra proteine HLA (*HLA mismatched*) [8]. In particolare, per la forma acuta la frequenza varia da un 35-40% in pazienti che ricevono TCSE da fratello *full-matched*, ad un 60-80% in pazienti sottoposti a trapianto MUD con *mismatched* di un solo antigene HLA. Lo stesso grado di *mismatched* in caso di trapianto di sangue cordonale porta ad una frequenza di GvHD minore rispetto al TCSE da BM o PB [9].

1.3.3 Classificazione della GVHD

Fino al 2005 la distinzione tra forma acuta e cronica veniva fatta sulla base del tempo di insorgenza delle manifestazioni cliniche con un limite temporale di 100 giorni dall'infusione delle CSE: <100 giorni GvHD acuta, >100 giorni GvHD cronica. [2, 10, 11];[12, 13].

Nel *Diagnosis and Scoring Document* sono state delineate due categorie principali di GvHD, ciascuna suddivisa in due sottocategorie (Tabella 1.3):

Categorie	Periodo di insorgenza dopo il trapianto	Presenza di manifestazioni cliniche	
		Acuta	Cronica
GvHD acuta - forma classica	≤100 giorni	si	no

- forma persistente, ricorrente o ad esordio tardivo	>100 giorni	si	no
GvHD cronica			
-forma classica	senza limite temporale	no	si
-sindrome “overlap”	senza limite temporale	si	si

Tabella 1.3: Categorie delle GvHD, modificato da *Bone Marrow Transplantation*, 2006;38:645-65

Ne consegue che, in assenza di segni clinici o reperti istologici tipici di GvHD cronica, la persistenza, ricorrenza o nuova comparsa di lesioni cutanee, gastrointestinali ed epatiche caratteristiche sono da considerarsi esordio di GvHD acuta. [13]. Alla luce di tali evidenze, nel 2005, durante la *Consensus Conference* del *National Institute of Health* (NIH) sono stati rivisti i criteri di valutazione della forma cronica di GvHD ed è stata proposta una nuova classificazione sulla base di segni e sintomi caratteristici della forma cronica.

1.4 GVHD ACUTA

1.4.1 Patogenesi

La GvHD acuta è la conseguenza di una risposta infiammatoria mediata da linfociti del donatore infusi nel ricevente, che riconoscono gli antigeni maggiori e minori del sistema HLA dell'ospite.

Classicamente si distinguono tre fasi che conducono alla GvHD, illustrate nella Tabella 1.4.

	Fase	Popolazioni cellulari responsabili	Citochine, chemochine interessate
1	Effetto del condizionamento	Cellule APC dell'ospite (cellule dendritiche) Danno del tessuto epite-	TNF- α , IL-1 molecole di adesione, LPS

liale			
2	Attivazione delle cellule T	Linfociti T del donatore (soprattutto CD4+) Cellule APC dell'ospite	IL-2 IFN- γ
3	Fase infiammatoria effetttrice	Cellule effettrici: CTL NK	“cascata citochinica” TNF- α , IL-1, NO

Tabella 1.4: Biologia e Immunologia della aGvHD, modificata da: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008. Legenda: APC: Antigen Presenting Cells, LPS: Lipopolisaccaride, NK: Natural Killer, CTL: Citotoxic T lymphocytes, (linfociti T citotossici), NO: ossido nitrico

1. **Attivazione delle cellule APC (*Antigen Presenting Cells*)**, indotta dal regime di condizionamento che determina un danno tissutale, in particolare a livello della mucosa intestinale. Questo comporta la produzione di citochine proinfiammatorie (TNF α , IL-1 e IL-6) e chemochine da parte del ricevente, che amplificano l'attivazione precoce delle APC, oltre ad incrementare l'espressione di molecole di adesione, antigeni HLA, e molecole costimolatorie a livello delle APC stesse [14, 15]. Inoltre, la lesione del tratto gastrointestinale causata dal condizionamento è particolarmente importante perchè porta alla traslocazione sistemica di ulteriori stimoli infiammatori, come ad esempio prodotti microbici quali l'LPS (lipopolisaccaride) o altre PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) che penetrano attraverso la mucosa intestinale danneggiata, attivando la risposta del sistema immunitario innato e promuovendo il rilascio delle citochine infiammatorie [16]. Il sito iniziale di interazione tra le cellule APC dell'ospite ed i linfociti T del donatore risiede probabilmente a livello delle placche di *Peyer*, il tessuto linfatico secondario del tratto gastrointestinale [17].

2. **Attivazione delle cellule T** del donatore da parte delle APC dell'ospite, con conseguente loro proliferazione e differenziazione. In tale fase sembrerebbero avere un ruolo preponderante i linfociti T helper 1 (Th1), con rilascio di citochine

proinfiammatorie quali IL-2, TNF α , IFN γ , il cui ruolo causale nella aGVHD è tuttavia ancora controverso.

L'attivazione delle cellule immunitarie ha come conseguenza l'attivazione di una rapida cascata biochimica intracellulare, che induce la trascrizione di una serie di proteine, tra cui le citochine ed i loro recettori.

3. **Fase infiammatoria effettrice:** qui entrano in gioco diversi tipi cellulari (linfociti T citotossici, cellule NK, *Large granular Lymphocytes*, LGL), molecole infiammatorie solubili (IFN γ , TNF α , IL-1, ossido nitrico macrofagico) e chemochine che guidano la migrazione dei linfociti T dagli organi linfoidi ai tessuti bersaglio. Il sistema immunitario innato (LGL) e adattativo (linfociti T alloreattivi) lavorano in sinergia per amplificare il danno tissutale e inoltre promuovono l'infiammazione e la distruzione dei tessuti target.

In figura 1.1 sono schematizzate le tre fasi della patogenesi della GvHD acuta.

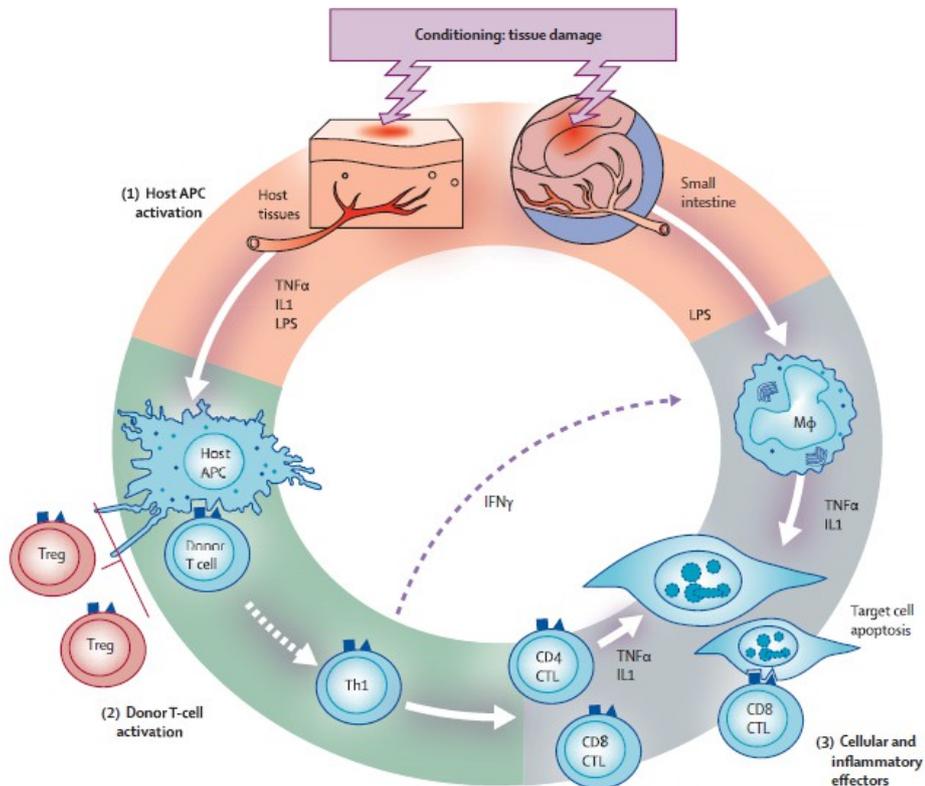


Figura 1.1: Fisiopatologia della GvHD acuta. Da Lancet, 2009, 373: 1550-61. Legenda: LPS: lipopolisaccaride; CTL: linfociti T citotossici.

1.4.2 Incidenza e fattori di rischio

La GVHD acuta ha un'incidenza del 30-80% a seconda del tipo di donatore. Noti fattori di rischio sono:

- Donatori non familiari
- Donatore di sesso femminile
- Numero di gravidanze prima della donazione
- Età del ricevente: maggiore incidenza di aGVHD nei pazienti adulti
- Fonte di CSE: maggiore incidenza di aGVHD per il trapianto di CSE da sangue periferico, minore incidenza per il trapianto da sangue cordonale, rispetto al trapianto da midollo osseo
- Regime di condizionamento ad intensità ridotta

1.4.3 Clinica della GvHD acuta [4]

La GVHD acuta insorge generalmente tra la prima settimana ed il secondo mese post-trapianto. All'esordio gli organi bersaglio risultano essere cute (81%), tratto gastrointestinale (54%) ed fegato (50%) [18]. Nella Tabella 1.5 vengono riportati i segni/sintomi caratteristici della aGvHD.

Segni/Sintomi della GvHD acuta

Cute

- Rash maculo-papulare: è la manifestazione più tipica della aGvHD; interessa tipicamente palmo delle mani e pianta dei piedi, fino al coinvolgimento diffuso di tutto il manto cutaneo e con lesioni pruriginose da lievi a gravi (vescicole, desquamazioni, ulcerazioni dolorose fino a lesioni emorragiche). Istologicamente: apoptosi a livello delle papille dermo-epidermiche, discheratosi, linfociti satelliti adiacenti a cheratinociti discheratosici, infiltrazione linfocitaria perivascolare nel derma

Tratto gastrointestinale alto

- Nausea, anoressia, vomito, reperti istologici tipici di aGvHD

Tratto gastrointestinale basso

- Diarrea acquosa di tipo secretorio ($\geq 500-2000$ mL/die): l'entità del volume fecale viene utilizzato come indicatore di gravità della aGvHD
- Grave dolore addominale

- Diarrea emorragica, ileo paralitico (da escludere altre cause): è conseguente ad ulcerazione della mucosa e si associa a prognosi peggiore [19]. La mucosa può tuttavia essere coinvolta in maniera discontinua e questo comportare l'assenza di lesioni all'esame istologico [20]. Alla TAC: dilatazione luminale con assottigliamento della parete intestinale, specie a livello del piccolo intestino ("segno del nastro"); la presenza di livelli idroaerei è suggestivo di perforazione. All'esame istologico dopo biopsia: ulcerazioni disomogenee, corpi apoptotici alla base delle cripte, ascessi criptici, perdita e appiattimento dell'epitelio di superficie [21].

Fegato

- Iperbilirubinemia colestatica: la diagnosi è difficile perché nel post trapianto diverse possono essere le cause di epatopatia. Istologicamente: endotelite, infiltrazione linfocitaria degli spazi portali, pericolangite e distruzione dei dotti biliari

Altre manifestazioni

- Febbre, riduzione del performance status, perdita di peso, pancitopenia, coinvolgimento di altre mucose

Tabella 1.5: Sintomi della GvHD acuta.

1.4.4 Classificazione della GvHD acuta

La valutazione dell'entità della GVHD acuta si basa su un sistema di stadiazione che tiene conto del numero di organi/tessuti interessati e del grado di coinvolgimento. Il più diffuso è il *Grading* secondo *Glusckberg*, con o senza valutazione del *performance status* del paziente, che è stata successivamente rivista nel dall'IBMTR (vedi Tabella 1.6, 1.7, 1.8).

Stadio	CUTE: rash maculo-papulare	FEGATO: bilirubina	INTESTINO: diarrea
+	<25% della sc	34-50 µmol/L	> 500 mL
++	25-50% della sc	51-102 µmol/L	> 1000 mL
+++	Eritrodermia generalizzata	103-255 µmol/L	> 1500 mL
++++	Eritrodermia generalizzata con bolle e desquamazione	>255 µmol/L	Dolore addominale grave con o senza ileo

Tabella 1.6: "Grading system: stadio per ciascun organo interessato". Modificata da: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.

Grado di aGvHD	Grado di interessamento d'organo
I	Cute: da + a ++
II	Cute: da + a +++ Intestino e/o fegato: + Lieve riduzione del PS
III	Cute: da ++ a +++ Intestino e/o fegato: da ++ a +++ Marcata riduzione del PS
IV	Cute: da ++ a ++++ Intestino e/o fegato: da ++ a ++++ Grave riduzione del PS

Tabella 1.7: “Sistema di grading complessivo secondo Glucksberg”. Modificata da: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.

INDEX	Cute		Fegato		Intestino	
	Stadio (max)	Estensione del rash	Stadio (max)	Bilirubina (µmol/L)	Stadio (max)	Diarrea (mL/die)
A	1	<25%	0	<34	0	<500
B	2	25-50% o	1-2	34-102	1-2	550-1500
C	3	>50% o	3	103-255 o	3	>1500
D	4	Bolle op-pure	4	>255 o	4	dolore. Ileo

Tabella 1.8: “IBMTR Severity Index per aGvHD”. Modificata da *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.

Nella pratica clinica, si distinguono in base alla gravità:

- grado 0 e I, clinicamente irrilevanti;
- grado II-IV, clinicamente significativi.

1.5 GVHD CRONICA

1.5.1 Incidenza e fattori di rischio

Circa il 20-25% dei pazienti pediatrici sottoposti a trapianto allogenico HLA-identico sviluppa una GVHD cronica [22]. Tale percentuale è significativamente più bassa rispetto a quella dell'adulto, in cui è riportata un'incidenza del 30-50%. La GVHD cronica è la causa maggiore di mortalità tardiva e di mortalità trapianto correlata.

La GVHD cronica può svilupparsi:

- come evoluzione di una forma acuta (GVHD cronica progressiva)
- a distanza dalla completa risoluzione della GVHD acuta (GVHD cronica quiescente)
- in assenza di una precedente forma acuta (GVHD cronica “*de novo*”).

I principali fattori di rischio per GVHD cronica sono [2]:

- Età avanzata del ricevente
- Storia di GVHD acuta
- Uso di CSE periferiche (PBSC)
- Uso di donatori femmine per riceventi maschi
- Uso di donatori non familiari o HLA-mismatched
- Infusione di linfociti del donatore (DLI)

Molti fattori di rischio sono comuni sia alla forma acuta che alla forma cronica di GVHD. Ne consegue che le strategie di prevenzione della GVHD acuta potrebbero contribuire a prevenire la GVHD cronica.

1.5.2 Clinica della GVHD cronica

Le manifestazioni cliniche della GVHD cronica presentano strette analogie con alcune patologie autoimmuni (es, collagenopatie, psoriasi, sclerodermia, sindrome di Sjogren, cirrosi biliare primitiva, bronchiolite obliterante, citopenia autoimmune, malattie infiammatorie croniche intestinali).

I sintomi si manifestano generalmente entro tre anni dal trapianto allogenico e sono spesso preceduti da una storia di GVHD acuta. Le manifestazioni cliniche possono limitarsi ad un singolo organo o tessuto o possono dare un coinvolgimento sistemico. La GVHD cronica può portare a conseguenze debilitanti, quali contratture articolari, perdita della vista, patologia polmonare grave [12].

1.5.3 Diagnosi

Attualmente la diagnosi di GVHD cronica è essenzialmente clinica e può essere supportata dal reperto istologico dopo biopsia di un tessuto interessato.

La Tabella 1.9 riporta i caratteristici segni e sintomi della GVHD cronica.

A tal proposito, nel 2005 il *National Institute of Health (NIH)* ha proposto una revisione dei criteri di classificazione sulla base dei segni e dei sintomi tipici della forma cronica (*NIH Working Group Report on Diagnosis and Staging*) [13]. Vengono riconosciuti:

- **Segni e sintomi diagnostici:** permettono la diagnosi di forma cronica in assenza di ulteriori segni o evidenza di coinvolgimento di altri organi
- **Segni e sintomi distintivi:** non si riscontrano normalmente nella GVHD acuta, ma che da soli non sono sufficienti per stabilire una diagnosi inequivocabile di GVHD cronica, necessitando quindi di altri test o del coinvolgimento aggiuntivo di altri organi
- **Altre manifestazioni:** manifestazioni di forma cronica rare, controverse o non specifiche di questa patologia, e che quindi non possono essere utilizzate per fare diagnosi di certezza
- **Segni e sintomi comuni:** manifestazioni riscontrabili sia nella GVHD acuta che nella GVHD cronica

Per la diagnosi di GVHD cronica sono necessari tre requisiti:

1. La distinzione dalla GVHD acuta

2. La presenza di almeno 1 segno clinico diagnostico di GVHD cronica o la presenza di almeno 1 manifestazione distintiva confermata da una biopsia adeguata o da un altro test rilevante

3. L'esclusione di ogni altra possibile diagnosi.

Organi	Diagnostici	Distintivi	Altri	Comuni
Cute	Poichiloderma Lesioni lichenoidi Sclerosi Lesioni morphea-like	Depigmentazione	Sudorazione compromessa Ictiosi Cheratosi pilare Iperpigmentazione Ipopigmentazione	Eritema Rash maculo-papulare Prurito
Unghie	Lesioni lichen-sclerosi <i>like</i>	Distrofia lesioni strutturali Onicolisi Pterigo ungueale Perdita dell'unghia		
Capelli		Alopecia di nuova insorgenza Lesioni papulo-squamose	Assottigliamento dei capelli, sparso, grossolano (da escludere cause endocrinologiche) Prematuro ingrigiamento	
Bocca	Lesioni lichenoidi Placche ipercheratosiche Difficoltà di apertura della bocca a causa della sclerosi	Xerostomia Mucocele Atrofia mucosale Pseudomembrane Ulcere		
Occhi		Secchezza o dolore oculare di nuova insorgenza Congiuntivite cicatriziale Cheratocongiuntivite secca Aree confluenti di cheratopatia puntata	Fotofobia Iperpigmentaz periorbitale Blefarite	
Genitali	Lesioni lichenoidi cicatrici o ste-	Erosioni Fissurazioni Ulcere		

	nosi vaginali			
Intestino	Lesioni esofagee (stenosi)		Insufficienza pancreatica esocrina	Anoressia Nausea Vomito Diarrea Perdita di peso Deficit di crescita
Fegato				Valori di bilirubina totale o ALP >2 volte i vn Transaminasi >2 volte i vn
Polmone	BO (diagnosi istologica)	BO (diagnosi funzionale e radiologica)		BOOP
Muscoli, tendini, articolazioni	Fascite Contratture secondarie alla sclerosi	Miosite o polimiosite	Edema Crampi muscolari Artralgia o artrite	
Sistema immunitario/ematologico			Trombocitopenia Eosinofilia Linfopenia Ipo/ ipergammaglobulinemia Autoanticorpi (AEA, PTI)	
Altre			Versamenti pericardico, pleurico Ascite Neuropatia periferica Sindrome nefrosica Miastenia grave Anomalie ECG o cardiomiopatia	

Tabella 1.9: Segni e sintomi di GvHD cronica. Modificata da *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005, 11: 945/955. Legenda: ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi; BOOP: bronchiolite obliterante/polmonite in fase di organizzazione; AEA: anemia emolitica autoimmune; PTI: porpora trombocitopenica idiopatica.

1.5.4 Scoring della GvHD cronica

Il *NIH Working Group* ha proposto un nuovo sistema di *scoring globale* [12], che tiene in considerazione:

- numero di organi o siti coinvolti (“1”, “2”, “3 o più”, “coinvolgimento polmonare”)

- gravità con cui ogni organo è colpito. Questa è definita da un sistema di scoring specifico per ciascun organo considerato: cute, bocca, occhi, tratto gastrointestinale, fegato, polmoni, articolazioni, fasce muscolari, tratto genitale femminile. Ogni organo riceve un punteggio secondo una scala composta da quattro gradi:

score 0 = nessun sintomo

score 1= sintomi lievi

score 2= sintomi moderati

score 3= sintomi gravi

E' possibile calcolare anche il *performance status scoring*, che va da 0 a 3, tuttavia questo parametro non viene preso in considerazione nel calcolo dello *score globale*.

Sulla base del *Global scoring system*, la GvHD cronica viene suddivisa in (Tabella 1.10):

- **Lieve:** coinvolgimento di uno o due organi, esclusi i polmoni, con *score* massimo 1
- **Moderata:** coinvolgimento di almeno un organo con *score* di 2, oppure 3 o più organi con *score* 1, oppure coinvolgimento polmonare con *score* 1.
- **Grave:** indica la presenza di uno *score* 3 in un organo, oppure di uno *score* 2 a livello polmonare.

N° di organi coinvolti	Lieve GvHD cronica	Moderata GvHD cronica	Grave GvHD cronica
1 organo	Score 1	Score 2	Score 3
2 organo	Score 1	Score 2	Score 3
3 o più organi		Score 1	Score 3
Interessamento polmonare		Score 1	Score 2

Tabella 1.10: *Score* globale della GvHD cronica, in relazione al numero e alla gravità degli organi coinvolti. Modificata da: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.

Sebbene questo *scoring* possa essere utilizzato anche alla diagnosi, la sua valutazione ripetuta periodicamente durante il decorso della GvHD cronica può modificare la prognosi e descrive meglio la gravità corrente della malattia.

1.6 PREVENZIONE E TRATTAMENTO DELLA GVHD

Negli ultimi anni, diverse sono state le strategie di prevenzione e trattamento della GvHD. Ciascun farmaco è stato pensato alla luce delle conoscenze dei diversi meccanismi patogenetici della GvHD.

Per quanto riguarda il trattamento della forma acuta, migliori sono i risultati relativi alla riduzione fino a completa risoluzione del quadro clinico.

Questo è probabilmente dovuto alla minore conoscenza dei fenomeni biologici che stanno alla base della forma cronica, che appare essere il risultato di eventi diversi da quelli scatenanti la forma acuta. Da qui la necessità di proseguire lo studio relativo ai fenomeni patogenetici della GvHD cronica, al fine di individuare potenziali target terapeutici.

La Tabella 1.11 riassume le attuali strategie farmacologiche impiegate comunemente nella profilassi/trattamento di prima linea della GvHD.

	Meccanismo di azione	Dose
Ciclosporina (CsA)	Inibitore della Calcineurina: blocco dell'attivazione delle cellule T	3 mg/kg IV
Tacrolimus	Inibitore della Calcineurina: blocco dell'attivazione delle cellule T	0,02 mg/kg IV
Metotrexate (MTX)	Antimetabolita, analogo dell'acido folico	15 mg/m ² D+1, 10 mg/m ² D+3, +6 and

		+11
Metilprednisolone (MP)	Linfolisi recettore-mediata + meccanismi addizionali	0,5-1 mg/kg
Micofenolato mofetil (MMF)	Inibizione della sintesi del DNA, apoptosi dei linfociti	1,5 to 3 g/d
Sirolimus (Rapamicina)	Antibiotico macrolide: blocco dell'attivazione delle cellule T e B	12 mg D-3 then 4 mg/d
Globulina anti-timocita (ATG)	Anticorpi ottenuti da coniglio o cavallo diretti contro cellule T umane	2,5 mg/kg/d x 4
Alemtuzumab (Campath-1H)	Anticorpo monoclonale umanizzato contro CD52	

Tabella 1.11: Farmaci utilizzati per la profilassi/terapia di prima linea della GvHD e loro meccanismo d'azione. Modificata da: *Haemat Stem Cell Transplantat*, 2008.

Il gold standard nel trattamento della GVHD acuta è la terapia steroidea. Gli steroidi hanno una potente attività antilinfocitaria e antinfiammatoria. Generalmente viene utilizzato il Metilprednisolone alla dose di 2mg/kg/die, in associazione o meno ad un inibitore della calcineurina (Ciclosporina o Tacrolimus). La risposta al cortisone valutata dopo 7 giorni di terapia ha importante valore prognostico. Tuttavia, la risposta alla terapia decresce all'aumentare della gravità della malattia e le dinamiche di questa risposta possono differire tra organi *target* e tra i diversi pazienti. Si considera come fallimento della terapia:

- una progressione della malattia dopo 3 giorni di terapia, oppure
- nessun cambiamento dopo 7 giorni, oppure
- una risposta incompleta dopo 14 giorni

Il trattamento di prima linea standard consiste in una combinazione di Ciclosporina A (CsA) e Metilprednisolone [23]. La dose iniziale di steroidi varia da 1 a 1.5 mg/kg/die per almeno due settimane, quindi è lentamente scalata, in base alla risposta. La durata della terapia è determinata dalla risposta, ma in genere viene prolungata fino a circa 12 mesi, anche nei pazienti che vanno incontro a risoluzione completa.

I pazienti nei quali la terapia iniziale fallisce ricevono un trattamento di seconda linea. La Tabella 1.12 indica le principali strategie terapeutiche di seconda linea. Nonostante siano molti gli approcci disponibili, pochi sono gli studi clinici controllati e randomizzati finora compiuti, e non vi è ancora modo di identificare quali pazienti effettivamente possono trarre beneficio dal trattamento.

Metilprednisolone (2-5 mg/kg)

Farmaci immunosoppressivi:

- Tacrolimus, MMF, Sirolimus (se non usato in profilassi)

Steroidi orali non assorbibili (in caso di GVHD intestinale)

Globulina Anti-Timociti (ATG)

Anticorpi monoclonali:

- Anti-IL-2 receptor (CD25): Inolinomab, basiliximab, daclizumab, denileukin difitox
- Anti-TNF α : Infliximab, etanercept
- Anti-CD52 (ampia specificità per cellule T): Alemtuzumab (Campath 1H)
- Anti-CD147 (anti cellule T e B attivate): ABX/CBL
- Anti-CD3 (ampia specificità per cellule T): Visilizumab, OKT3

Pentostatina:

- Inibitore dell'adenosina-deaminasi

Fotoferesi extracorporea¹:

¹ La **fotoferesi extracorporea** consiste nella filtrazione dei leucociti del paziente mediante aferesi. Queste cellule vengono dunque incubate con un agente intercalante del DNA, l'8-metossipsoralene, esposte a luce ultravioletta e quindi reinfuse nel paziente. Questa procedura induce apoptosi cellulare ed ha un potente effetto antiinfiammatorio in vari contesti, compresa la prevenzione del rigetto nel trapianto di organi solidi. Inoltre, in modelli murini è stato dimostrato che la fotoferesi extracorporea causa remissione della aGVHD aumentando il numero di cellule T regolatorie [2] Haematopoietic Stem Cell Transplantation, 2008..

- Soppressione delle cellule T reattive e del rilascio di citochine, induzione di cellule T regolatorie

Cellule Staminali Mesenchimali:

Effetto immunomodulatorio e di riparazione tissutale

Tabella 1.12: Trattamento di seconda linea nella GVHD refrattaria agli steroidi. Modificata da: *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.

SCOPO DELLA TESI

La GvHD rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità post allo-TCSE e classicamente veniva definita acuta (GvHD acuta) e cronica (GvHD cronica) in base al tempo di insorgenza. Nella *Consensus Conference* dell'NIH del 2005 (cfr: "GvHD, Classificazione") sono stati stabiliti dei criteri di classificazione sulla base dei sintomi clinici. La GvHD in età pediatrica ha un'incidenza rispettivamente dell'80% nella sua forma acuta e del 20-25% per la forma cronica [22].

Nonostante la patogenesi della GvHD acuta sia stata ben caratterizzata, sono ancora poche le informazioni circa i meccanismi fisiopatologici che portano allo sviluppo della GvHD cronica, da cui deriva la difficoltà di diagnosi e di gestione della terapia. Diversi studi hanno indagato possibili marcatori biologici di GvHD acuta e cronica in grado di contribuire alla comprensione della patogenesi, prevedere il rischio di sviluppo di questa malattia ed essere studiati come possibili *target* terapeutici. Tuttavia sono stati condotti pochi studi sulla popolazione pediatrica e nessuno di questi è stato replicato in modo indipendente, motivo per cui non sono ancora stati identificati *biomarker* validi. Si definisce *biomarker* una caratteristica misurabile oggettivamente e valutabile come indicatore di un normale pro-

cesso biologico, di un processo patogenetico o di una risposta farmacologica ad un intervento terapeutico [24].

Lo scopo di questa tesi è quello di identificare possibili *biomarker* di GvHD cronica, attraverso uno studio retrospettivo di espressione genica di citochine e successiva valutazione in fosfoproteomica in campioni di pazienti pediatrici sottoposti ad allo-TCSE. È stato indagato, a vari *timepoint*, lo stato di attivazione dei principali *pathway* di trasduzione del segnale coinvolti nella proliferazione e attivazione delle cellule B e T e nell'infiammazione. Sono state analizzate le vie di AKT/mTOR, JAK/STAT, MEK/ERK, p38, JNK, TYK2, LCK e BAFF. Per questa analisi è stata utilizzata l'innovativa tecnica dei *Reverse Phase Protein Arrays* (cfr: "Materiali e metodi"). Inoltre, attraverso *Sybr Green* RQ-PCR è stata analizzata l'espressione genica delle principali citochine coinvolte nei processi infiammatori e autoimmunitari, tra cui IL-2, IL-10, IL-17, IL-22, TNF β .

L'identificazione di nuovi *biomarker* di GvHD cronica potrebbe facilitare la diagnosi, seguire nel tempo l'andamento clinico e la risposta alla terapia, migliorare l'approccio terapeutico.

MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

È stato analizzato, mediante uno studio retrospettivo, il sangue periferico di 29 pazienti pediatrici sottoposti ad allo-TCSE presso l'Unità Trapianti di CSE della Clinica Oncoematologica Pediatrica di Padova, nel periodo dal 1995 al gennaio 2012, stratificati sulla base della classificazione classica (criterio temporale: entro 100gg post-TCSE= aGVHD; oltre 100gg post-TCSE = cGVHD, crf: 1.3.3: "Classificazione della GvHD").

Di questi pazienti:

- 11 hanno sviluppato solo aGVHD, non seguita da cGVHD
- 14 hanno sviluppato cGVHD, preceduta dalla forma acuta
- 4 non hanno sviluppato GVHD

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in Appendice I.

Su 14 dei 29 pazienti è stato analizzato il sangue periferico del relativo donatore.

3.1.1 Criteri di inclusione

La popolazione è composta da pazienti pediatrici (età al trapianto inferiore a 18 aa), sottoposti ad allo-TCSE.

È stata scelta una popolazione mista, comprendente sia maschi che femmine (16 maschi, 13 femmine), con età media di 9 anni (range 6 mesi-18 anni), 23 affetti da patologie oncologiche e 6 non oncologiche. Di questi pazienti, 19 hanno effettuato

allo-TCSE MUD, 10 allo-TCSE MSD (23 CSE midollari, 4 CSE periferiche, 2 CSE cordonali).

Tutti i pazienti considerati nello studio sono stati sottoposti a condizionamento mieloablativo, a profilassi per GvHD con ciclosporina A, methotrexate e ATG. Inoltre tutti i pazienti con GvHD (acuta e cronica) hanno ricevuto terapia immunosoppressiva con steroidi, foto-afèresi extracorporea ed inibitori della calcineurina. I pazienti senza GvHD sono stati trattati solo con ciclosporina A.

La raccolta dei campioni è stata effettuata a diversi *timepoint*. In particolare:

- per i pazienti con GvHD acuta e GvHD cronica in fase attiva, entro 30 gg dalla comparsa di segni e sintomi di malattia;
- per i pazienti con GvHD cronica in remissione completa dopo i 30 gg dalla scomparsa di segni e sintomi di malattia.

3.1.2 Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dallo studio pazienti che prima del trapianto avevano mostrato positività per HBV-DNA e HCV-RNA e pazienti che dopo il trapianto avevano presentato chimerismo misto.

3.2 ISOLAMENTO DELLE CELLULE MONONUCLEATE (PBMC)

Le cellule mononucleate sono state isolate da campioni di sangue periferico con metodica Ficoll-Hypaque.

La separazione delle cellule mononucleate avviene mediante centrifugazione in gradiente di densità. Si ottengono tre fasi di differente densità: la fase rossa sul fondo della provetta, contenente eritrociti e polimorfonucleati, un anello bianco centrale in cui si trovano le cellule mononucleate (linfociti e monociti) e la fase sovrastante che contiene plasma e piastrine.

Metodo:

- Trasferire il prelievo di sangue periferico in una provetta sterile, diluirlo 1:1 con Hank's Salt Solution 1X (Biochrom KG, Berlino, Germania) e risospenderlo. L'Hank's è una soluzione tampone. Tutto il processo va condotto sotto una cappa a flusso laminare che permette di lavorare in sterilità.

- Preparare una provetta da 15ml, contenente lo stesso volume di Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Svezia) a 37°C e far scendere lentamente, goccia a goccia, il sangue diluito. Le due fasi devono restare ben separate.

- Centrifugare senza freno finale, a temperatura ambiente, per 20 min a 2200rpm.

Si ottengono in questo modo le tre fasi descritte sopra.

- Prelevare l'anello di cellule mononucleate e passarlo in una provetta da 15ml.

- Diluire con 10ml di Hank's e risospendere.

- Centrifugare a 1200rpm per 7 min con freno a temperatura ambiente.

- Eliminare il soprannatante.

Si ottiene quindi un pellet bianco costituito da leucociti. Se questo pellet si presenta rosso significa che è presente ancora una certa quantità di eritrociti e, al fine di eliminarli, va effettuata una reazione di emolisi.

- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet nella soluzione di emolisi (da 3 a 10ml). La soluzione di emolisi (NH₄Cl 16.25g, KHCO₃ 2g, EDTA tetrasodico 0.074g, acqua distillata fino a 2 litri) serve per emolizzare gli eritrociti rimasti.

- Lasciare il tutto a temperatura ambiente per circa 10 min.

- Portare a volume con Hank's.

- Centrifugare per 7 min a 1150rpm a temperatura ambiente.

- Eliminare il surnatante e risospendere in Hank's.

- Procedere con la conta delle cellule servendosi di una cameretta di Burker (Precicolor HBG, Giessen-Luetzellinden, Germania). Prelevare 20µl di cellule risospese e diluirle 1:3 con Trypan Blu (Sigma, St.Louis, MO), che permette di distinguere le cellule vive dalle morte; spipettare bene e porre 20µl nella cameretta di Burker. Contare le cellule vive al microscopio ottico (Olympus1X50, Tokyo, Giappone) e moltiplicare il numero di cellule contate per il fattore di diluizione e successivamente per 10000 (si ottiene così il numero di cellule per ml). Moltiplicare la concentrazione ottenuta per il numero di ml totali per ottenere il numero di cellule complessivo.

- Suddividere gli ml totali in due eppendorf, una contiene i PBMC destinati all'estrazione di proteine, l'altra quelli destinati all'estrazione di RNA. Se il numero di cellule ottenute lo permette, verrà conservata una terza aliquota per il congelamento in DMSO descritto in seguito.

- Centrifugare a 4000rpm per 4 min.

- Eliminare il soprannatante facendo attenzione a seccare bene il pellet.
 - Congelare i pellet a -80 °C.
- Ora abbiamo a disposizione i pellet secchi di cellule da cui si può partire per l'estrazione delle proteine e dell'RNA.
- Nel caso in cui il numero di PBMC lo permetta, congelare le cellule rimaste per eventuali esperimenti futuri.
- Sospendere il pellet (almeno 5 milioni di cellule mononucleate) in 900µl di FBS (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) e trasferirlo in una criovial.
 - Aggiungere 100µl di DMSO (Sigma) goccia a goccia e agitare delicatamente la provetta per favorirne la sospensione.
 - Mettere la provetta nel contenitore con isopropanolo e porre quest'ultimo a -80°C per almeno una notte intera. Il giorno dopo la criovial può essere trasferita in azoto liquido.

3.3 PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA DI CITOCINE

Sono stati confrontati mediante RQ-PCR 8 pazienti che hanno sviluppato aGVHD, 13 pazienti che hanno sviluppato aGVHD poi evoluta in cGVHD e 4 pazienti di controllo, che non hanno sviluppato né cGVHD, né aGVHD. Per questa analisi sono stati utilizzati:

- 7 campioni di GVHD cronica in fase attiva di malattia (evidenza di segni e sintomi clinici attribuibili alla patologia)
- 8 campioni di GVHD cronica dopo spegnimento completo della malattia (completa remissione clinica della patologia)
- 8 campioni di GVHD acuta in fase attiva di malattia (evidenza di segni e sintomi clinici attribuibili alla patologia), di cui:
 - 4 campioni di aGVHD di pazienti che successivamente hanno sviluppato GVHD cronica
 - 4 campioni di aGVHD di pazienti che hanno presentato solo la forma acuta
- 4 campioni di controllo, appartenenti a pazienti che non hanno sviluppato né cGVHD, né aGVHD
- 10 campioni di donatori di CSE, di cui:

- 3 campioni di donatori di pazienti che hanno sviluppato cGVHD
- 7 campioni di donatori di pazienti che hanno sviluppato solo aGVHD

Come calibratore per l'analisi con PCR quantitativa è stato utilizzato un pool di cellule ottenuto dall'isolamento di PBMC da 7 donatori volontari sottoposti a prelievo ematico. Sono stati selezionati volontari in buona salute, di diverse fasce d'età e di entrambi i sessi.

3.3.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto mediante il kit Qiagen RNeasy Mini Kit (Invitrogen).

Metodo:

- Scongellare il pellet secco in ghiaccio, dopo di che tutto il procedimento va eseguito a temperatura ambiente sotto cappa chimica.
- Risospendere il pellet nel buffer di lisi (Buffer RLT, vanno aggiunti 10µl di β-Mercaptoetanololo -Sigma- a ogni ml di buffer): aggiungere 350µL di buffer RLT se il numero di cellule risulta $<5 \times 10^6$; 600µL se il numero di cellule è compreso tra 5×10^6 e 1×10^7 . Spipettare o vortexare.
- Trasferire il lisato in una colonnina Qiashredder posta all'interno di un tubetto da 2ml. Centrifugare a 14000rpm per 2 min. Eliminare la colonnina e conservare l'eluato.
- Aggiungere un pari volume (350µL o 600µL) di etanolo 70% in acqua DEPC. Spipettare accuratamente.
- Trasferire 700µL di campione, compreso l'eventuale precipitato formatosi, in una colonnina RNeasy Spin column, posta all'interno di un tubetto da 2ml. Centrifugare a 10000rpm per 1 min. Eliminare l'eluato e conservare la colonnina.
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubetto da 2ml. Aggiungere 700µL di Buffer RW1 e centrifugare a 10000rpm per 1 min. Eliminare l'eluato e conservare la colonnina.
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubetto da 2ml. Aggiungere 500µL di Buffer RPE e centrifugare a 10000rpm per 1 min. Eliminare l'eluato e conservare la colonnina.
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubetto da 2ml. Aggiungere 500µL di Buffer RPE e centrifugare a 10000rpm per 1 min. Eliminare l'eluato e conservare la colonnina.

- Trasferire la colonnina in un nuovo tubetto da 2ml. Centrifugare a 10000rpm per 2 min. Eliminare l'eluato e conservare la colonnina.
- Trasferire la colonnina in una eppendorf da 1,5ml. Aggiungere 35µL di acqua DEPC direttamente sopra la membrana della colonnina. Centrifugare a 10000rpm per 1 min. Eliminare la colonnina e tenere l'eluato contenente l'RNA che deve essere conservato a -80°C.

3.3.2 Quantifica dell'RNA estratto

L'RNA estratto è stato quantificato utilizzando il Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Metodo:

-Il campione di RNA viene quantificato aliquotando 2µl di campione direttamente sul supporto dello strumento. Il risultato viene poi registrato su un file excel.

Controllo qualità interno: Monitorare la qualità dell'RNA: la ratio A260/280 deve essere compresa tra 1.8 e 2.2, e la curva non deve presentare picchi prima del valore a 230.

3.3.3 Trattamento con DNAsi

Per evitare contaminazioni da DNA genomico nelle reazioni di amplificazione, ogni campione è stato trattato con DNAsi, utilizzando la TURBO DNase (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Metodo:

- Calcolare il volume di RNA necessario per avere al massimo 10µg in un volume finale di 50µl.
- Trasferirlo in provette da 250µl e portare a 45µl con acqua DEPC (Invitrogen).
- Aggiungere 5µl di Buffer (10X TURBO DNase Buffer, Applied Biosystem, Ambion).
- Aggiungere 1µl di TURBO DNase.
- Incubare per 30 min a 37°C nel termociclatore. Spinnare.
- Per inattivare l'enzima è poi necessario incubare nel termociclatore a 75°C. Per proteggere l'RNA dall'eventuale degradazione causata dal calore, si deve aggiungere:

- 1.8µL di EDTA 0.5M DEPC

- 7.2µL di Acqua DEPC
- Incubare nel termociclatore per 10 min a 75°C.
- Spinnare.
- Conservare i campioni a -80°C.

3.3.4 Sintesi di cDNA: reazione di retrotrascrizione

È stata eseguita una reazione di retrotrascrizione (RT) utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript II Reverse Transcriptase (SSRTII) (Invitrogen), partendo da 1µg di RNA.

Metodo:

- Calcolare il volume di RNA necessario per avere 1µg di RNA.
- Trasferirlo in provette da 250µl e portare a 11µl con acqua DEPC (Invitrogen). Tutto il procedimento va condotto in ghiaccio. Preparare il controllo negativo aliquotando nella provetta 11µl di acqua DEPC.
- Aggiungere 2µl di Random Primers (Invitrogen). Spipettare e spinnare in centrifuga
- Scaldare per 10 minuti a 75°C. Spinnare.
- Aggiungere in ciascuna provetta 7µl di mix così preparata (preparare un'unica mix per tutti i campioni, incluso il controllo negativo, e uno in più):
 - 2µL di Buffer 5X (Invitrogen)
 - 1µL di MgCl₂ 50µM (Invitrogen)
 - 1µL di H₂O DEPC (Invitrogen)
 - 1µL di PCR Nucleotide Mix (Roche, Basel, Svizzera)
 - 1µL di RNase Inhibitor (Roche)
 - 1µL di SSRTII
- Spinnare.
- Incubare nel termociclatore impostando il programma: 10min 25°C, 30min 42°C, 5min 99°C, 4°C infinito.
- Terminata la reazione si spinnano le provette e si portano a 100µl con acqua DEPC.
- Conservare a -20°C.

Controllo qualità interno: Per controllare la buona riuscita della reazione di retro-trascrizione si amplifica il gene *housekeeping* ABL come di seguito descritto.

3.3.5 Reazione di PCR per ABL

Metodo:

- Preparare la mix (preparare un'unica mix per tutti i campioni, incluso il controllo negativo, e uno in più), tutto il procedimento va condotto in ghiaccio:

- 2.5µl di PCR reaction Buffer 10X (Roche)
- 0.5µl di PCR Nucleotide Mix
- 0.5µl di MgCl₂ 50mM
- 17.75µl di acqua per preparazioni iniettabili
- 0.25µl di Primer Forward 20µM (Primer ABL Fwd 5'-CCTTCTCGCTGGACCCAGTGA-3', Invitrogen)
- 0.25µl di Primer Reverse 20µM (Primer ABL Rev 5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3', Invitrogen)
- 0.1µl di TAQ Dna Polimerase (Roche)

Nella provetta del controllo negativo viene aliquotata solo la mix.

- Aliquotare nelle provette da 250µl 20µl di mix e aggiungere 5µl (50ng) di cDNA risultante dalla reazione di retro trascrizione.

- Spipettare e spinnare.

- Incubare nel termociclatore, impostando il programma così costituito: 3min 94°C; per 35 cicli: 30sec 94°C, 30sec 60°C, 30sec 72°C , e 7min 72°C e 4°C in-finito.

- Terminata la reazione spinnare le provette e conservarle a -20°C.

Controllo qualità interno: Per controllare la buona riuscita della reazione di am-plicazione si procede con il controllo in gel d'agarosio di seguito descritto.

3.3.6 Gel di agarosio

Metodo:

- Pesare 4gr di agarosio (Seachem GTG Agarose, Lonza, Rockland, ME).

- Aggiungere 200ml TAE 1X (ottenuto diluendo il TAE 50X: 242gr Tris -Carlo Erba, Milano, Italia-, 57.1ml Acido Acetico Glaciale -Carlo Erba-, 100ml EDTA 0.5M pH8 -Carlo Erba-, e portando a 1l con acqua deionizzata).

- Sciogliere nel forno a microonde per circa 4min, mescolando ogni tanto.
- Far raffreddare sotto cappa chimica.
- Aggiungere 5µl di GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000X (VWR International, Radnor, PA). Mescolare.
- Svuotare nella cameretta con pettinino (precedentemente chiusa ai lati con scotch di carta). Lasciare solidificare sotto cappa.
- Nel frattempo preparare i campioni diluendo 5µl di Loading Buffer (Invitrogen) con 10µl di prodotto di PCR.
- Togliere lo scotch dalla cameretta, inserirla nella vasca riempita con TAE1X, togliere il pettinino e caricare 15µl di ciascun campione nei pozzetti. Nel primo pozzetto si carica il marcatore di peso molecolare 50bp DNA Ladder (Invitrogen).
- Far correre il gel nella vaschetta chiusa per circa 20min a 75 millivolt.
- Estrarre il gel dalla vasca e visualizzare l'immagine nello strumento ImageQuant 300 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Fare la fotografia.

Controllo qualità interno: Per controllare la buona riuscita del gel valutare la corretta corsa del marcatore di peso molecolare. Per la buona riuscita della PCR devono essere presenti le bande al corretto peso dell'amplificato nei campioni, mentre devono essere puliti il controllo negativo della PCR e l'eventuale controllo negativo della reazione di retro trascrizione.

3.3.7 SYBR Green Real-Time Quantitative PCR (RQ-PCR)

È stata analizzata l'espressione dei geni di interesse mediante Real-Time Quantitative PCR (RQ-PCR), utilizzando Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). Si è fatto uso della strumentazione 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Nello specifico, abbiamo quantificato l'espressione di: BAFF, IL-2, IL-12p35, IL-12p40, IL-17, IL-22, IL-23p19, ROR γ , TNF- β , TRAF-6, geni notoriamente coinvolti nella patogenesi della GVHD acuta, nei processi infiammatori ed autoimmuni. Come riferimento, è stato utilizzato il gene *housekeeping* GUS. I primers sono stati disegnati in modo tale che risultino complementari alle regioni di giunzione "esone-esone" permettendo così di eliminare l'eventuale segnale aspecifico derivante da contaminazioni di DNA genomico. Il software utilizzato è stato PrimerBLAST. Le sequenze dei primer sono di seguito riportate:

BAFF:

- Fwd: 5'-GGGACTGAAAATCTTTGAACCA-3'
- Rev: 5'-GCAAGCAGTCTTGAGTGAAGT-3'

IL-2:

- Fwd: 5'-AAGTTTTACATGCCCAAGAAGG-3'
- Rev: 5'-AAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAGCTA-3'

IL-10:

- Fwd: 5'-CTGCCTAACATGCTTCGAGA-3'
- Rev: 5'-CTCAGACAAGGCTTGGCAAC-3'

IL-12p35:

- Fwd: 5'-GCCTTCACCACTCCCAA-3'
- Rev: 5'-CCTCCACTGTGCTGGTTTTATC-3'

IL-12p40:

- Fwd: 5'-CCCTGACATTCTGCGTTCA-3'
- Rev: 5'-AGGTCTTGTCCGTGAAGACTCTA-3'

IL-17:

- Fwd: 5'-CAA CCG ATC CAC CTC ACC TT-3'
- Rev: 5'-GGC ACT TTG CCT CCC AGA T-3'

IL-22:

- Fwd: 5'-TCAGCAACAGGCTAAGCACA-3'
- Rev: 5'-TTTGCTCTGGTCAAATGCAG-3'

IL-23p19:

- Fwd: 5'-ATTTTCACAGGGGAGCCTTC-3'
- Rev: 5'-TTTTGAAGCGGAGAAGGAGA-3'

ROR γ :

- Fwd: 5'-GTCCCGAGATGCTGTCAAGT-3'
- Rev: 5'-TGAGGGTATCTGCTCCTTGG-3'

TNF- β :

- Fwd: 5'-AACCTGCTGCTCACCTCATT-3'
- Rev: 5'-GACCACCTGGGAGTAGACGA-3'

TRAF-6:

- Fwd: 5'-TCAATAAGGGATGCAGGTCA-3'

- Rev: 5'-TCCATCTTGTGCAAACAACC-3'

GUS:

- Fwd: 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'
- Rev: 5'-CGGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'

Come calibratore è stato utilizzato il cDNA ottenuto dal pool di PBMC di 7 volontari sani sottoposti a prelievo ematico.

Come controllo interno in ogni piastra è stata amplificata in parallelo una curva standard ottenuta mediante diluizioni seriali di cDNA di PMBC attivati con PHA (fitoemoagglutinina) ed IL-2. Per le piastre del gene IL12p40 è stata utilizzata una curva standard ottenuta da diluizioni seriali di cDNA della linea cellulare 293T.

Per escludere la contaminazione dovuta a prodotti di PCR da genomico, per ciascuna piastra è stata aggiunta l'analisi della curva di melting dopo il completamento dei cicli di amplificazione.

Il livello di espressione dei geni è stato determinato utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4 PROFILO FOSFOPROTEOMICO

Mediante *Reverse Phase Protein Array* Sono stati studiati 11 pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta, 12 pazienti che hanno sviluppato GvHD acuta poi evoluta in GvHD cronica e 3 pazienti di controllo, che non hanno sviluppato né GvHD acuta né GvHD cronica.

Per questa analisi sono stati utilizzati:

- 8 campioni di GVHD cronica in fase attiva di malattia (evidenza di segni e sintomi clinici attribuibili alla patologia)
- 7 campioni di GVHD cronica dopo spegnimento completo della malattia (completa remissione clinica della patologia)
- 14 campioni di GVHD acuta in fase attiva di malattia (evidenza di segni e sintomi clinici attribuibili alla patologia), di cui:
 - 5 campioni di GvHD acuta di pazienti che successivamente hanno sviluppato GvHD cronica

- 9 campioni di GvHD acuta di pazienti che hanno presentato solo la forma acuta
- 3 campioni di controllo, appartenenti a pazienti che non hanno sviluppato né GvHD cronica, né GvHD acuta
- 14 campioni di donatori di CSE, di cui:
 - 4 campioni di donatori di pazienti che hanno sviluppato GvHD cronica
 - 8 campioni di donatori di pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta
 - 2 campioni di donatori di pazienti che non hanno sviluppato né GvHD acuta, né GvHD cronica

La tecnica dei *Reverse Phase Protein Array* (RPPA) [25] rappresenta una metodologia innovativa, ad alta sensibilità e specificità, che permette di ottenere informazioni sulle modificazioni post-traduzionali, tra cui la fosforilazione delle proteine, in modo da poter studiare lo stato di attivazione del *network* proteico e, quindi, lo stato funzionale delle cellule in analisi. Tra i vantaggi di questa tecnica si possono elencare l'elevata efficienza, sensibilità e specificità, il fatto di poter analizzare un ampio numero di pazienti/proteine in tempi brevi, sono necessari volumi minimi di lisato proteico, ed un'elevata riduzione della variabilità sperimentale poichè tutti i campioni sono sottoposti a condizioni identiche, alle stesse quantità e allo stesso tempo di incubazione di reagenti e di anticorpi.

Gli RPPA sono già stati applicati allo studio del proteoma in differenti patologie. Alcuni lavori in letteratura hanno, in particolare, messo in risalto l'efficacia di questa metodica nelle indagini in campo oncologico: ne sono esempio gli studi realizzati nel cancro all'ovaio [26, 27], nel cancro alla mammella [28, 29], nel linfoma follicolare [30, 31], nei rhabdomiosarcomi pediatrici [32] e nelle leucemie acute pediatriche [33].

3.4.1 Estrazione proteica per analisi con *Reverse Phase Protein Array*

Con questa metodologia di estrazione proteica si ottiene un lisato totale cellulare in cui è contenuto l'intero proteoma della cellula. Nel *buffer* di lisi sono contenuti inibitori di proteasi e fosfatasi, importanti per impedire la degradazione e la defosforilazione delle proteine, in modo da poter analizzare lo stato funzionale della cellula al momento della lisi.

Buffer di Lisi (per ml):

- 915µl di TPER *Reagent* (Pierce, Rockford, IL).
- 60µl di NaCl 5M.
- 10µl di Ortovanadato di Sodio 100mM (1mM concentrazione finale), inibitore delle fosfatasi (per preparare l'Ortovanadato di sodio 100mM si devono aggiungere 0.01839g di Ortovanadato di Sodio a 1ml di dH₂O e bollire la soluzione per 10 min a 100°C).
- 10µl PEFABLOC (AEBSF) 200mM (Roche), inibitore di serina proteasi e serina-treonina fosfatasi.
- 1µl Aprotinina 5mg/ml (Sigma), inibitore competitivo delle proteasi seriniche.
- 5µl Pepstatina A (Sigma), inibitore delle proteasi acide.
- 1µl Leupeptina 5 mg/ml (Sigma), inibitore di proteasi seriniche e cisteiniche.

Metodo:

- Scongellare il pellet cellulare in ghiaccio.
- Centrifugare a 1150rpm per 2 min in centrifuga refrigerata a 4°C e rimuovere eventuale surnatante.
- Risospendere il pellet nell'appropriato volume di buffer di lisi (circa 35µl per 1×10^7 cellule).
- Trasferire il tutto in microprovette da 1.5ml.
- Vortexare 30 sec.
- Incubare in ghiaccio 20 min.
- Vortexare 15 sec.
- Centrifugare a 10.000rpm per 5 min in centrifuga refrigerata a 4°C.
- Trasferire il surnatante contenente le proteine in nuove microprovette da 1.5ml.
- Conservare le proteine estratte a -80°C.

3.4.2 Quantificazione della concentrazione proteica

Per la quantificazione dei lisati proteici in piastra da 96 pozzetti è stato utilizzato il kit *BCA-Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL). La concentrazione è stata letta con lo strumento *Victor³ 1420 Multilabel Counter* (PerkinElmer, Waltham, MA).

Metodo:

- Scongellare i lisati proteici in ghiaccio, vortexare e spinnare.
- Preparare per la retta di taratura 5 campioni con diverse concentrazioni note di BSA secondo lo schema di Tabella 3.1 (si usa dH₂O a temperatura ambiente).

Vial	Volume di diluente (μL)	Volume di BSA (μL)	Concentrazione finale di BSA (μg/ml)
A	140	20 dello stock	250
B	80	80 della diluizione A	125
C	90	60 della diluizione B	50
D	80	80 della diluizione C	25
E	80	20 della diluizione D	5
F	80	0	0= Blank

Tabella 3.1: Quantità di dH₂O e BSA, necessarie per preparare i campioni a concentrazione nota per la retta di taratura.

- Preparare i campioni diluendoli 1:50 in H₂O.
- Preparare al riparo da fonti di luce il volume necessario di *Working Reagent* (WR) mixando 50 parti di soluzione A con 1 parte di soluzione B. Per ogni campione da quantificare vengono prelevati 25μl a cui si aggiungono 200μl di WR.
- Mettere i campioni a 37°C per 30 min.
- Leggere i campioni allo spettrofotometro.
- Riportare i valori ottenuti per la retta di taratura e costruire la retta con l'equazione.
- Riportare i valori di assorbanza dei lisati e, con i valori dell'equazione, calcolare la concentrazione proteica dei campioni.

3.4.3 Diluizione e bollitura

Metodo:

Preparare la soluzione in cui diluire i lisati aggiungendo a 950μl di 2X Tris-*Glycine* SDS *Sample Buffer* (Novex/Invitrogen) 50μl di β-Mercaptoetanolo (Sigma). Vortexare.

- Diluire i lisati 1:1 con la soluzione appena preparata.
- portare ad una concentrazione di 1μg/μl in *buffer* (1ml TPER, 950μl 2X Tris-*Glycine* SDS *Sample Buffer*, 50μl β-Mercaptoetanolo)
- Bollire le diluizioni in un termoblocco per 8 min a 96°C.

- Conservare a -20°C.

3.4.5 Printing dei Reverse Phase Protein Array con 2470 Aushon Arrayer

I lisati cellulari vengono immobilizzati in diluizioni seriali in duplicato su vetrini ricoperti da uno strato di nitrocellulosa (FASTSlides, Whatman Schleicher & Schuell, Florham Park, NJ). Questo procedimento viene effettuato da uno strumento innovativo, l'*Aushon 2470 Arrayer* (Aushon Biosystems, Billerica, MA), che utilizza la tecnologia dei "solid pins" particolarmente adatta a immobilizzare sulla nitrocellulosa i lisati cellulari con complesse caratteristiche chimico-fisiche, come quelli da noi analizzati.

Metodo:

- Nelle piastre (384-Well Low Profile Microplates, Genetix, New Milton, UK) sono stati caricati i lisati diluiti dei campioni inclusi nello studio e quelli dei pool cellulari di controllo (come controllo positivo per l'attivazione linfocitaria sono stati utilizzati PBMC trattati per 72 ore con PHA alla concentrazione di 4µg/ml; come controllo positivo per la fosforilazione sono state usate Hela trattate con il Pervanadato, un inibitore non specifico delle tirosina-fosfatasi cellulari).
- Caricare i lisati nella piastra in diluizioni seriali secondo lo schema presentato nell'Appendice II (per esempio: pozzetto A1 non diluito, A6 1:2, A11 1:4, A16 1:8), diluendo il campione con una soluzione composta da 1ml TPER, 950µl 2X Tris-Glycine SDS Sample Buffer, 50µl β-Mercaptoetanolo.
- Preparare i volumi nei pozzetti della piastra a seconda di quanti vetrini si vogliono preparare, per esempio 20µl per pozzetto = circa 100 vetrini.
- Accendere lo strumento *Aushon 2470 Arrayer* e caricare la piastra negli appositi spazi.
- Porre i vetrini nelle apposite piastre e caricarle negli appositi spazi.
- Controllare che vi sia un'appropriata quantità di ddH₂O sia nella tanica dell'acqua che nell'umidificatore e che la tanica dei rifiuti sia vuota.
- Impostare il software dello strumento e avviare la corsa.
- Al termine della corsa estrarre i vetrini che vanno conservati fino all'utilizzo a -20°C con l'agente dessicante (*Drierite, with indicator, 6 mesh*, Sigma).

- Estrarre le piastre, chiuderle con un foglio d'alluminio adesivo (*Corning*, NY) e conservarle a -20°C.

3.4.6 Colorazione dei *Reverse Phase Array* con *Fast Green FCF*

Il *Fast Green FCF* (Sigma) è un colorante fluorescente in grado di legarsi direttamente alle proteine con elevata sensibilità; esso viene solitamente usato per la colorazione dei tessuti connettivi in campioni istologici. Questo fluorocromo assorbe a un massimo di 625nm ed emette a 700nm. La colorazione con *Fast Green FCF* permette di misurare la quantità di proteina totale immobilizzata in ogni singolo spot sul vetrino. In questo modo si riesce a normalizzare il segnale che deriva dalla marcatura con i singoli anticorpi primari con la quantità di proteina totale presente sul vetrino. Questo serve per poter comparare correttamente il profilo di attivazione proteica dei pazienti analizzati sul vetrino, indipendentemente dalla concentrazione del loro lisato proteico.

Metodo:

- Lavare i vetrini con PBS 1X (PBS 10X: Sciogliere 80g di NaCl, 2g di KCl, 2g di KH_2PO_4 , 14.4g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oppure 11.5g di Na_2HPO_4 in acqua e portare a 1 litro. Controllare che il pH sia di poco inferiore a 7) per 1 minuto sull'agitatore orbitale.
- Versare 10ml di soluzione di *Fast Green FCF* (preparata nel seguente modo: 0.01% *Fast Green*, 10% Acido Acetico, 30% Etanolo assoluto, ddH₂O a volume) e lasciare sull'agitatore orbitale per 2 ore. Da questo passaggio, i contenitori devono essere avvolti nella stagnola per proteggere dalla luce la fluorescenza del colorante.
- Lavare con la soluzione 10% Acido Acetico, 30% Etanolo, ddH₂O a volume, per 2 ore in agitazione.
- Lasciar asciugare al buio in posizione verticale.
- Leggere il vetrino nello scanner (*ScanArray 4000*, *Packard Biochip Technologies*, Billerica, MA).

3.4.7 Marcatura dei *Reverse Phase Protein Array* con anticorpi specifici

Questa metodica viene utilizzata per la rivelazione, tramite marcatura con anticorpi specifici, di proteine presenti nei lisati cellulari, utilizzando lo strumento *Dako Autostainer Plus* (*Dako Cytomation*, Carpinteria, CA).

Per la marcatura si utilizza il CSA (*Catalyzed Signal Amplification*) kit (*Dako Cytomation*). Brevemente, la proteina viene riconosciuta e legata da parte dell'anticorpo primario, il quale viene successivamente legato dall'anticorpo secondario biotinilato. In seguito, il complesso streptavidina – biotina – perossidasi (SABC) si lega in all'anticorpo secondario biotinilato. Il reagente successivo (*Amplification Reagent*) usa la perossidasi biotinilata del SABC per catalizzare la precipitazione di un fenolo biotinilato, amplificando il numero di molecole di biotina disponibili per il legame del reagente successivo, la streptavidina-perossidasi. La colorazione si completa con l'utilizzo della diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. La perossidasi reagisce con la diaminobenzidina e porta alla formazione di un precipitato colorato. Questa procedura comporta un'elevata amplificazione del segnale, consentendo la rilevazione di minime quantità di proteina.

Metodo:

Preparazione dell'*I-Block*, agente a base di caseina utilizzato per saturare i siti aspecifici di legame degli anticorpi su membrane di nitrocellulosa.

Per 1 litro di *I-Block*:

- Pesare 2g di *I-Block* (*Applied BioSystems*) e versarlo in un *becker* con circa 700ml di PBS 1X.
- Sciogliere la polvere con ancoretta magnetica su piastra riscaldata per circa 15 min (verificare che la polvere sia ben sciolta ed evitare la bollitura).
- Raffreddare la soluzione (eventualmente immergere il *becker* in una vaschetta con del ghiaccio).
- Aggiungere 1ml di *Tween 20* (Sigma).
- Far sciogliere il *Tween 20* su piastra con ancoretta magnetica per 2 min.
- Portare a volume in cilindro da 1 litro con PBS 1X.
- Saturare i siti aspecifici nei vetrini mediante incubazione con *I-Block* per 3 ore sull'agitatore orbitale a bassa velocità.
- Programmare lo strumento *Dako Autostainer Plus*.
- Creare la *Reagent Layout Map* (Appendice IV) in cui vengono precisate le

quantità da preparare di ciascun reagente per il processo di marcatura.

- Preparare i tubi forniti con il CSA Kit (*Dako Cytomation*) nel rack portaprovette del *Dako Autostainer*.

- Le soluzioni vanno preparate nelle quantità e nell'ordine descritti nella *Reagent Layout Map*:

o TBST (*Dako Cytomation*), buffer di lavaggio.

Diluire la soluzione madre di TBST 10X 1:10 con ddH₂O, per ottenere una soluzione finale 1X.

o *Peroxidase Block* (inclusa nel CSA kit), per bloccare la perossidasi endogena.

o *Avidin* (inclusa nel *Biotin Blocking System*, *Dako Cytomation*) per bloccare l'attività della biotina endogena.

o *Biotin* (inclusa nel *Biotin Blocking System*) per bloccare l'attività residua delle molecole di avidina aggiunte in precedenza.

o *Protein Block* (inclusa nel CSA kit) per saturare la membrana.

o *Streptavidin-Biotin Complex* (SABC) (inclusa nel CSA kit).

Preparare la soluzione aggiungendo a ogni ml di SABC *Diluent* richiesto una goccia di *Reagent A* e una goccia di *Reagent B* (inclusi nel CSA Kit).

o *Amplification Reagent* (incluso nel CSA kit).

o *Streptavidin Peroxidase* (inclusa nel CSA kit).

o Anticorpi Primari. Prepararli nei tubi corrispondenti diluendoli in modo appropriato per ciascun anticorpo nell'*Antibody Diluent With Background Reducing Components* (*Dako Cytomation*). Per valutare la concentrazione ottimale da usare per ciascun anticorpo, sono state effettuate delle prove di concentrazione su vetrini in cui sono stati immobilizzati lisati di linee cellulari di laboratorio. Per ogni anticorpo sono stati marcati vetrini a concentrazioni di 1:1000, 1:500, 1:100 ed è poi stata scelta la concentrazione migliore, a cui il segnale risulta pulito e definito in tutte le diluizioni seriali, con background minimo.

Sono stati utilizzati gli anticorpi primari indicati in Appendice II.

o Anticorpi Secondari:

- *Anti-mouse* (incluso nel CSA kit): diluire nell'*Antibody Diluent With Background Reducing Components* 1:10.

- *Anti-rabbit* (*Vector*, Burlingame, CA): diluire nell'*Antibody Diluent With Background Reducing Components* 1:7000.

o DAB (incluso nel DAB *Liquid Plus*, Dako *Cytomation*). Preparare la soluzione aggiungendo a ogni ml di DAB *Buffer* richiesto una goccia di DAB.

- Inserire i vetrini nell'apposito *rack* all'interno dello strumento, posizionare i *rack* con i reagenti per la marcatura e avviare lo strumento.

- Al termine della corsa tirare fuori i *rack* con i vetrini marcati e lasciarli asciugare in verticale su un foglio di carta.

- Acquisire allo *scanner* (Epson *Perfection V350*, Epson, *Long Beach*, CA) le immagini dei vetrini come file TIFF, 600dpi e scala di grigi 16bit.

3.4.8 Analisi dei *Reverse Phase Protein Array* con il software *Microvigene*TM

Le immagini dei vetrini colorati con gli anticorpi primari e con il *Fast Green FCF*, in formato TIFF e a 600 dpi, sono state analizzate grazie al programma *Microvigene*TM (*VigeneTech*, Carlisle, MA). Questo software è stato sviluppato in modo specifico per l'analisi degli RPPA. È in grado di calcolare l'intensità dei pixel di ciascuno spot, sottraendo il *background* e rimuovendo eventuali artefatti. Per ogni campione viene quindi calcolata l'intensità media del segnale per ciascun punto e questa viene moltiplicata per il corrispondente fattore di diluizione. All'intensità di ciascuno spot viene sottratta l'intensità dello spot corrispondente nel vetrino marcato solo con l'anticorpo secondario. In tal modo, viene sottratta l'intensità data dall'eventuale legame aspecifico dell'anticorpo secondario. Successivamente viene calcolata la media dei valori ottenuti e questa viene normalizzata dividendo per il valore medio, calcolato come sopra descritto, della proteina totale (vetrino marcato con *Fast Green FCF*). L'intensità del segnale viene, così, normalizzata con la quantità di proteina totale immobilizzata sul vetrino. Il programma quindi utilizza uno specifico algoritmo per analizzare la curva di diluizione, generando un singolo valore per ogni proteina analizzata per ciascun paziente.

3.5 ANALISI STATISTICHE

I singoli sottogruppi di pazienti sono stati confrontati fra loro allo scopo di trovare geni o proteine differenzialmente espressi o attivati. I pazienti sono stati suddivisi nelle categorie di GVHD acuta e cronica in base a due criteri:

- la classificazione classica (criterio temporale: -100gg = aGVHD, +100gg = cGVHD)
- la classificazione della *Consensus Conference* del *National Institute of Health* (NIH) del 2005, ad oggi vigente.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software “R” (www.r-project.org), pacchetto “multitest”. Per confrontare i gruppi è stato utilizzato il test di Wilcoxon. I *p-value* sono stati ottenuti mediante un approccio di permutazione (*rawp*). Un *p-value* viene considerato significativo se inferiore a 0.05 (**) o debolmente significativo se compreso tra 0.05 e 0.1 (*).

La correlazione tra l’espressione dell’IL-22 e la presenza delle cellule NK o l’espressione dell’IL-17 è stata valutata attraverso il metodo di *Spearman*.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate dal Dott. Marco Giordan, consulente statistico del nostro laboratorio.

RISULTATI

4.1 L'AUMENTO DI ESPRESSIONE DI IL-22 È ASSOCIATO ALLA PRESENZA DI GVHD CRONICA IN FASE ATTIVA DI MALATTIA

Per verificare che la popolazione considerata fosse omogenea, è stato fatto un primo confronto tra il gruppo di pazienti con GvHD acuta di sesso maschile (aGvHD M, n=6) ed il gruppo di pazienti con GvHD cronica di sesso femminile (aGVHD F, n=2) e tra il gruppo di pazienti con GvHD cronica di sesso maschile (aGvHD M, n=4) ed il gruppo di pazienti con GvHD cronica di sesso femminile (cGvHD F, n=3). Il livello di espressione dei geni esaminati non ha mostrato alcuna differenza significativa tra i due gruppi.

Inoltre, i pazienti che hanno sviluppato aGvHD e cGvHD sono stati suddivisi per età superiore a 10 anni (aGvHD +10, n=5; cGvHD +10, n=2) ed età inferiore a 10 anni (aGvHD -10 n= 3; cGvHD -10, n=5) Anche in questo caso non sono risultate differenze significative nei livelli di espressione genica delle citochine considerate.

Questi risultati ci hanno premesso di considerare i nostri campioni come un'unica popolazione omogenea per le analisi successive.

Allo scopo di identificare marcatori biologici di GvHD cronica, sono stati confrontati i prelievi di pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=7) e quelli di pazienti con GvHD cronica in remissione completa (Cs, n=8). Da tale confronto è emersa una differenza nell'espressione genica dell'IL-22. Tale cito-

china è risultata infatti maggiormente espressa nel gruppo Ca, rispetto a Cs (Wilcoxon, $p=0.02$) (Figura 4.1).

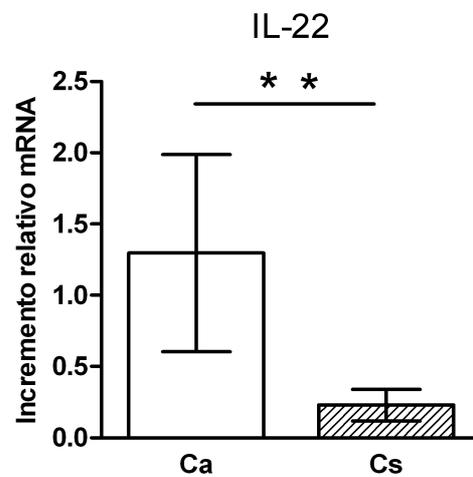


Figura 4.1: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con cGVHD in fase attiva di malattia (Ca) e nei pazienti con cGVHD in remissione completa (Cs). Wilcoxon, $p=0.02$.

I pazienti con GvHD cronica in fase attiva (Ca, $n=7$) sono stati quindi confrontati con i pazienti che non hanno sviluppato né GvHD cronica, né GvHD acuta, definiti come controlli negativi di malattia (Ctrl-, $n=4$). Da tale confronto è emerso che l'espressione genica dell'IL-22 nei Ca è maggiore rispetto ai Ctrl-, anche se la differenza non ha raggiunto la significatività statistica (Wilcoxon, $p=0.16$) (Figura 4.2).

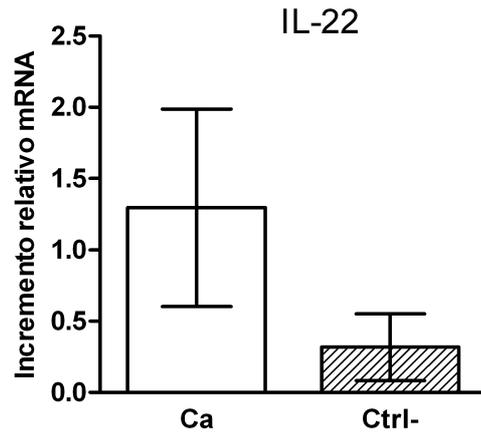


Figura 4.2: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca) e nei controlli negativi di malattia (Ctrl-). Wilcoxon, $p=0.16$.

Abbiamo quindi confrontato i prelievi dei pazienti con GvHD cronica in completa remissione (Cs, $n=8$), con i controlli negativi (Ctrl-, $n=4$) allo scopo di assicurarci che i possibili marcatori biologici identificati nelle analisi precedenti fossero effettivamente specifici della fase attiva di malattia. Dal confronto non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, rinforzando quindi la nostra ipotesi che l'IL-22 sia un marcatore specifico di GvHD cronica in fase attiva di malattia (Figura 4.3).

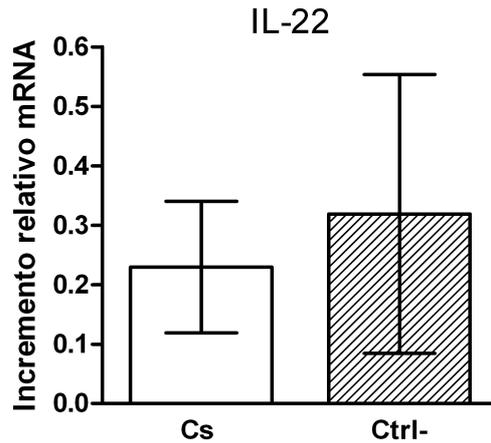


Figura 4.3: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con cGVHD in completa remissione (Cs) e nei controlli negativi di malattia (Ctrl-).

Per confermare ulteriormente la nostra ipotesi, sono stati confrontati i pazienti con GvHD acuta in fase attiva di malattia (Aa, n= 8) e i pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=7). Dal confronto è emerso che l'espressione genica dell'IL-22 nei Ca è maggiore rispetto agli Aa, anche se la differenza non ha raggiunto la significatività statistica (Wilcoxon, $p=0.07$) (Figura 4.4).

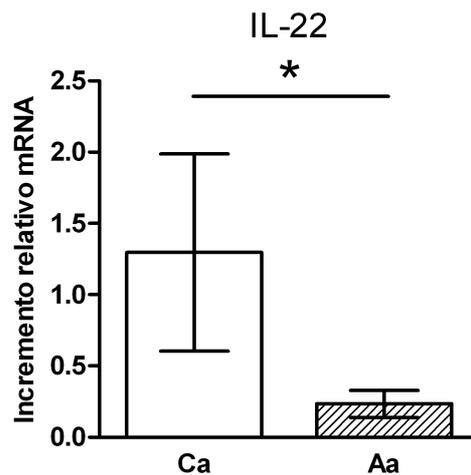


Figura 4.4: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca) e nei pazienti con GvHD acuta in fase attiva di malattia (Aa). Wilcoxon, $p=0.07$.

Allo scopo di identificare eventuali marcatori precoci di insorgenza di GvHD cronica sono stati confrontati pazienti con GvHD acuta che hanno poi manifestato anche la cronica (Aa + C, n=4) versus pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=7). L'espressione genica dell'IL-22 è risultata anche in questo caso maggiore nei Ca, rispetto agli Aa + C (Wilcoxon, p=0.07) (Figura 4.5), confermando la specificità dell'espressione di IL-22 solo nelle GvHD croniche in fase attiva.

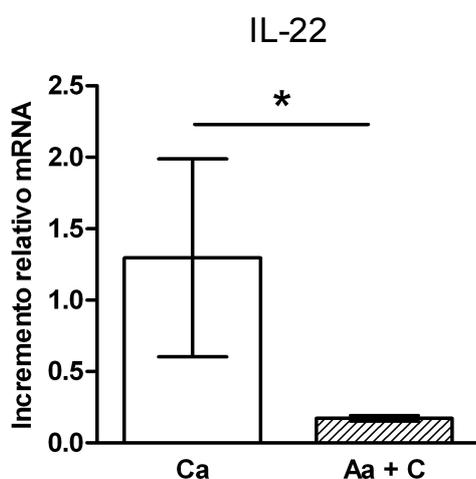


Figura 4.5: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca) e nei pazienti con aGvHD che hanno sviluppato cronica (Aa + C). Wilcoxon, p=0.07.

Allo stesso scopo, sono stati confrontati, all'interno della popolazione dei pazienti che avevano GvHD acuta, il gruppo di pazienti con GvHD acuta che poi hanno sviluppato GvHD cronica (Aa + C, n=4) e di pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta (Aa - C, n=4). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi, pertanto la popolazione dei pazienti con GvHD acuta in fase attiva può considerarsi omogenea (Figura 4.6).

L'IL-22 quindi non può essere considerata come un marcatore precoce di insorgenza di GvHD cronica.

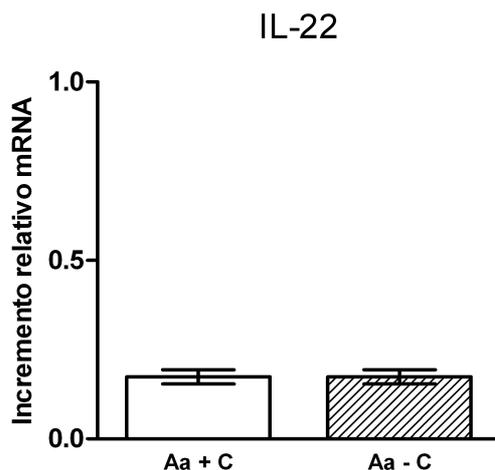


Figura 4.6: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD acuta che poi hanno sviluppato GvHD cronica (Aa + C) e nei pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta (Aa - C).

Infine, poiché le cellule effettrici responsabili del disordine immunologico sono i linfociti del donatore, è stato fatto un confronto tra il gruppo dei donatori di pazienti che hanno manifestato solo GvHD acuta (Don A, n=7) ed il gruppo dei donatori di pazienti che hanno manifestato GvHD cronica (Don C, n=3). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi, pertanto l'aumento dell'espressione di IL-22 nelle Ca è indipendente dal donatore.

Da tali confronti si può concludere che l'espressione genica dell'IL-22 è maggiore nelle GVHD croniche in fase attiva, pertanto può essere considerata un possibile marcatore biologico di fase attiva di malattia.

4.2 L'AUMENTO DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'IL-22 SI CORRELA A QUELLO DELL'IL-17

Alla luce dei risultati ottenuti ci siamo chiesti quale fosse la popolazione cellulare responsabile della maggiore espressione di IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia. E' noto infatti che l'IL-22 può essere prodotta da quattro tipi cellulari: linfociti T helper 17 (Th17), cellule Natural Killer (NK), linfociti T helper 1 (Th1) e linfociti T helper 22 (Th22) [34, 35]. Poichè non è stato possibile risalire all'immunofenotipo completo dei pazienti studiati, non si è potuto attribuire in modo diretto la produzione dell'IL-22 a una delle popolazioni sopra descritte.

Per ovviare a questo problema, abbiamo provato a correlare i livelli di IL-22 con la percentuale di cellule NK (dati precedentemente raccolti) e con l'espressione genica della IL-17.

Per verificare se le cellule produttrici di IL-22 fossero le NK, per ciascun paziente con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=7) o in fase di remissione completa (Cs, n=8), è stata messa in relazione l'espressione genica dell'IL-22 con la percentuale di cellule circolanti esprimenti CD16 e CD56 (marcatori immunofenotipici specifici delle NK) presente allo stesso *timepoint*. Tale dato di valutazione immunofenotipica era stato ottenuto al momento della raccolta dei campioni [36]. Da tale confronto è emerso che i valori dell'espressione dell'IL-22 non sono correlati alla percentuale di NK (Spearman, $\rho=0.08$). Da questo possiamo concludere che verosimilmente non sono le cellule NK le responsabili dell'aumentata espressione di IL-22.

Allo scopo di verificare se le cellule responsabili della produzione di IL-22 fossero invece le Th17, sono stati messi in relazione tra loro i valori di espressione genica della IL-22 e della IL-17 (citochina effettrice delle Th17) nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=5). Dal confronto è emerso che l'espressione di queste due citochine è correlata positivamente (*Spearman*, $\rho=0.7$) (Figura 4.7). Quest'ultimo dato indica che potrebbero essere effettivamente le Th17 le cellule responsabili dell'aumentata produzione di IL-22 nei pazienti con

GvHD cronica in fase attiva di malattia, ma non si può comunque escludere un eventuale contributo delle cellule Th22 e Th1.

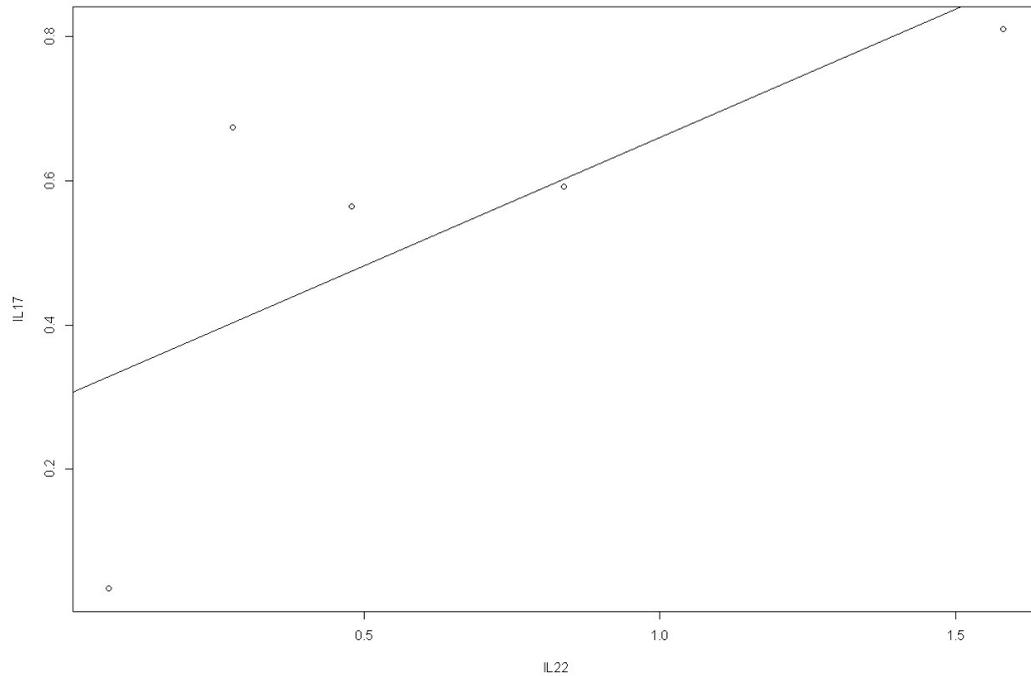


Figura 4.7: Correlazione tra i livelli di espressione dell'IL-22 e dell'IL-17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca). *Spearman* $\rho=0.7$.

Da notare che dal confronto tra pazienti con GVHD cronica in fase attiva di malattia (Ca, n=5) e pazienti con GVHD cronica in remissione completa (Cs, n=7) l'IL-17 era risultata maggiormente espressa nei Ca rispetto ai Cs, anche se tale differenza non raggiungeva la significatività statistica (Wilcoxon, $p=0.15$) (Figura 4.8).

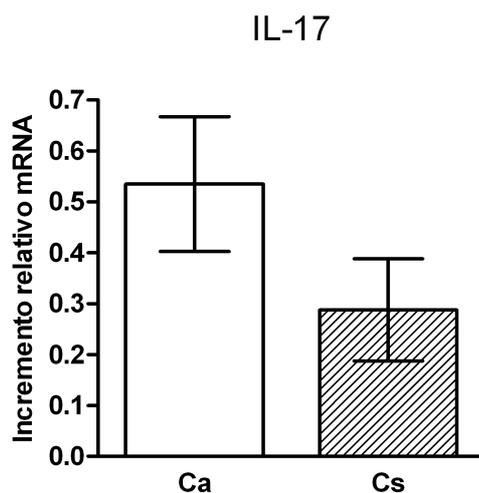


Figura 4.8: Espressione relativa dell'IL-17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca) e nei pazienti con GvHD cronica in remissione completa (Cs). Wilcoxon, $p=0.15$.

4.3 ANALISI DEL PROFILO FOSFOPROTEOMICO

Per valutare l'espressione o attivazione delle proteine descritte in Appendice III sono stati eseguiti gli stessi confronti descritti in precedenza per lo studio dell'espressione genica.

Da queste analisi non è risultata nessuna proteina espressa o attivata in modo differente nei diversi gruppi di pazienti, né per quanto riguarda le proteine coinvolte nei *pathway* di iperproliferazione (Akt/mTOR), né per le proteine attivate a valle dei recettori delle interleuchine (vie JAK/STAT).

4.4 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA DI CITOCINE DOPO CLASSIFICAZIONE DEI PAZIENTI SECONDO I CRITERI NIH

Alla luce della nuova classificazione ormai in vigore dal 2005, i pazienti sono stati riclassificati secondo i criteri NIH: sono stati confrontati 10 pazienti che hanno

sviluppato GvHD acuta, 11 pazienti che hanno sviluppato GvHD acuta poi evoluta in GvHD cronica e 4 pazienti di controllo, che non hanno sviluppato né forma acuta né cronica.

Sono stati pertanto riconfrontati secondo i nuovi criteri pazienti con GvHD cronica in fase attiva (Ca NIH, n=7), con pazienti con GvHD cronica in remissione completa (Cs NIH, n=6). Dal confronto è emerso che l'espressione di IL-22 è maggiore nel gruppo dei Ca NIH rispetto ai Cs NIH (Wilcoxon, p=0.1) (Figura 4.9). Si conferma dunque che l'IL-22 è maggiormente espressa nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia.

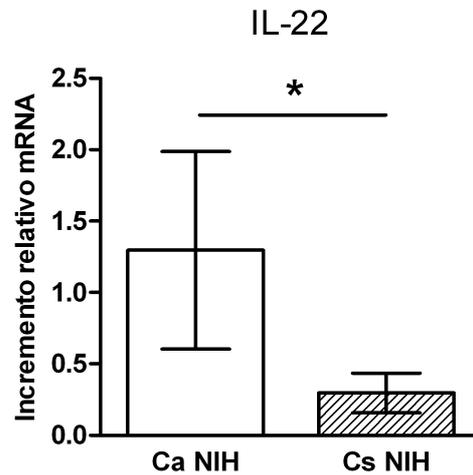


Figura 4.9: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia secondo NIH (Ca NIH) e nei pazienti con GvHD cronica in remissione completa secondo NIH (Cs NIH). Wilcoxon, p=0.1.

Abbiamo quindi confrontato i pazienti con GvHD cronica in completa remissione secondo NIH (Cs NIH, n=6), con i controlli negativi (Ctrl-, n=4). Dal confronto non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (Figura 4.10), rinforzando quindi la nostra ipotesi che l'IL-22 sia un marcatore specifico di cGvHD in fase attiva di malattia.

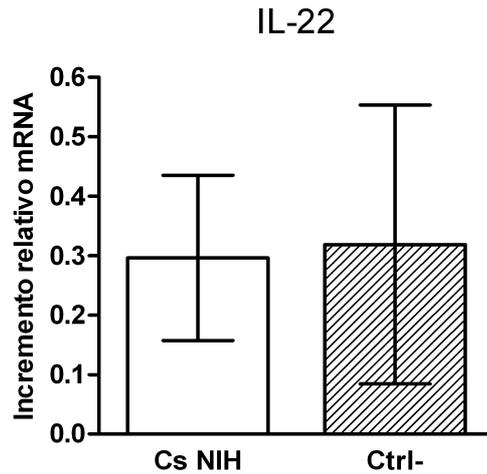


Figura 4.10: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in completa remissione secondo NIH (Cs NIH) e nei controlli negativi di malattia (Ctrl-).

Secondo i nuovi criteri sono stati inoltre confrontati pazienti con GvHD acuta che successivamente hanno manifestato GvHD cronica (Aa + C NIH, n=3) con i pazienti che avevano GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca NIH, n=7). L'espressione genica dell'IL-22 è risultata maggiore nei Ca, rispetto agli Aa + C (Wilcoxon, p=0.1) (Figura 4.11).

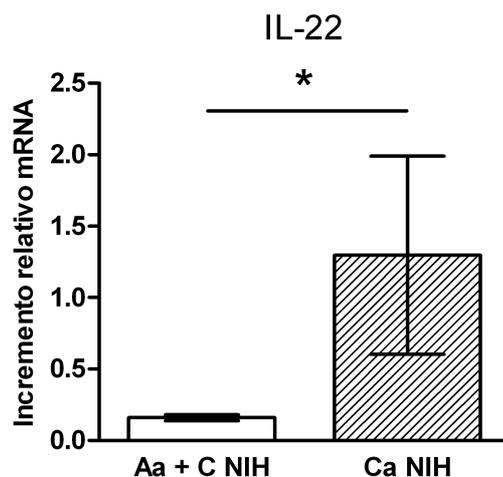


Figura 4.11: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia secondo NIH (Ca NIH) e nei pazienti con GvHD acuta che

poi hanno sviluppato GvHD cronica secondo NIH (Aa + C NIH). Wilcoxon, $p=0.1$.

Il gruppo di pazienti con GvHD acuta che poi hanno sviluppato GvHD cronica secondo NIH (Aa + C NIH, $n=3$) è stato confrontato poi con i pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta secondo NIH (Aa - C NIH, $n=5$). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi (Figura 4.12). Questi ultimi due confronti, come era risultato secondo la vecchia classificazione, evidenziano che l'IL-22 non può essere considerato un marcatore precoce di insorgenza di GvHD cronica.

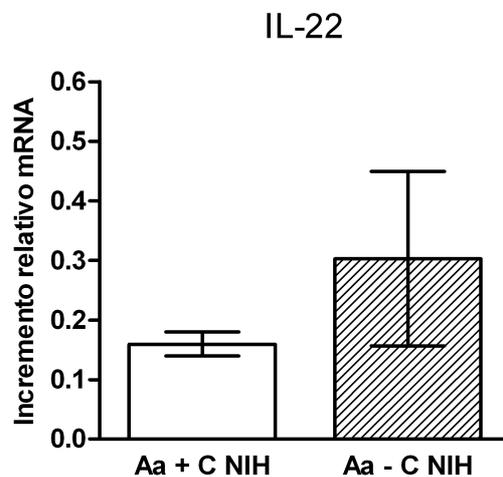


Figura 4.12: Espressione relativa dell'IL-22 nei pazienti con GvHD acuta che poi hanno sviluppato GvHD cronica secondo NIH (Aa + C NIH) e nei pazienti che hanno sviluppato solo GvHD acuta secondo NIH (Aa - C NIH).

L'IL-22 quindi può essere considerata un potenziale marcatore di GvHD cronica in fase attiva di malattia anche nei pazienti che hanno ricevuto diagnosi di GvHD secondo i criteri proposti dalla recente classificazione NIH.

Infine è stato fatto un confronto tra il gruppo dei donatori di pazienti che hanno manifestato solo GvHD acuta diagnosticata secondo NIH (Don A NIH, $n=7$) ed il

gruppo dei donatori di pazienti che hanno manifestato GvHD cronica (Don C NIH, n=3). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi, pertanto anche in questo caso l'aumento dell'espressione di IL-22 nelle Ca è indipendente dalle caratteristiche intrinseche da noi studiate dei donatori.

È stata analizzata anche l'espressione dell'IL-17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia secondo NIH (Ca NIH, n=5), con pazienti con GvHD cronica in remissione completa secondo NIH (Cs NIH, n=5). Dal confronto è emerso che anche l'IL-17 risulta maggiormente espressa nel gruppo dei Ca NIH rispetto ai Cs NIH, anche se tale differenza non ha raggiunto la significatività statistica (Wilcoxon, p=0.13) (Figura 4.13).

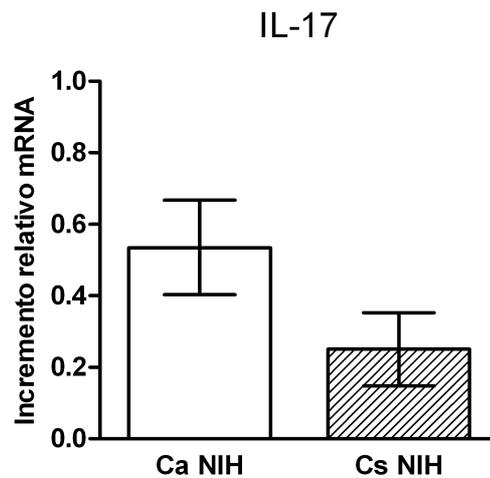


Figura 4.13: Espressione relativa dell'IL-17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia secondo NIH (Ca NIH) e nei pazienti con GvHD cronica in remissione completa secondo NIH (Cs NIH). Wilcoxon, p=0.13.

La correlazione tra IL-22 e IL-17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia non è stata ripetuta con i nuovi criteri di classificazione in quanto la coorte non è variata rispetto al test effettuato con i vecchi criteri.

Da queste analisi si può affermare che se si classificano i pazienti per mezzo dei nuovi criteri NIH, che identificano lo stato della malattia sulla base di segni e sintomi clinici, l'IL-22 si conferma essere un potenziale marcatore di GvHD cronica in fase attiva di malattia.

4.5 ANALISI DEL PROFILO FOSFOPROTEOMICO DOPO CLASSIFICAZIONE DEI PAZIENTI SECONDO I CRITERI NIH

Dopo la riclassificazione dei pazienti secondo i criteri NIH, è stato analizzato il profilo fosfoproteomico confrontando 13 pazienti che hanno sviluppato GvHD acuta, 10 pazienti che hanno sviluppato GvHD acuta evoluta in cronica e 3 pazienti di controllo, che non hanno sviluppato né GvHD acuta né cronica.

Per valutare l'espressione o attivazione delle proteine descritte in Appendice III sono stati eseguiti gli stessi confronti descritti in precedenza per lo studio dell'espressione genica.

Da queste analisi non è risultata nessuna proteina espressa o attivata in modo differente nei diversi gruppi di pazienti, né per quanto riguarda le proteine coinvolte nei *pathway* di iperproliferazione (Akt/mTOR), né per le proteine attivate a valle dei recettori delle interleuchine (vie JAK/STAT).

Tuttavia, le proteine coinvolte nella produzione di IL-22 nella popolazione Th17 hanno mostrato una tendenza ad essere più attivate nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia secondo NIH (Ca NIH, n=8) rispetto ai pazienti con GvHD cronica in remissione completa secondo NIH (Cs NIH, n=5) (Figura 4.14).

Nelle Th17, infatti, il legame dell'IL-23 al suo recettore comporta l'attivazione di JAK2 e TYK2. Questo porta all'attivazione di STAT3 che recluta ROR γ , il fattore di trascrizione per i geni dell'IL-22 e dell'IL-17.

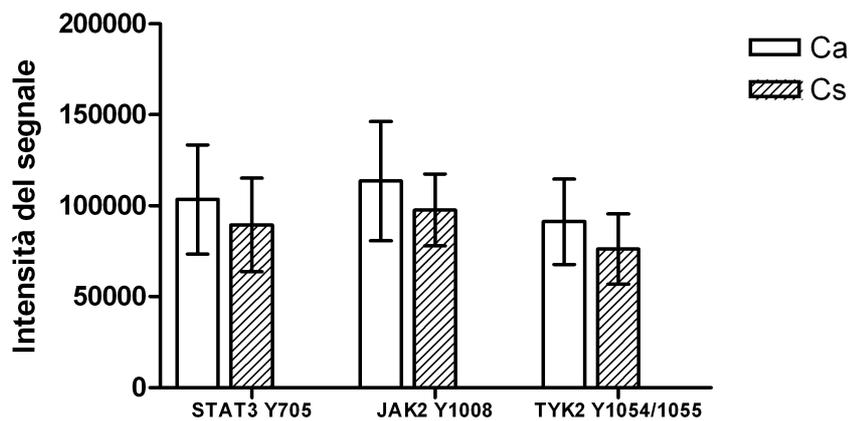


Figura 4.14: Attivazione della via che nelle Th17 è responsabile della produzione di IL-22 e IL-17 misurata tramite *Reverse Phase Protein Arrays*.

DISCUSSIONE

La GvHD rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità post allo-TCSE. Questa patologia è il risultato di una reazione mediata dai linfociti T del donatore contro i tessuti dell'ospite. Può interessare diversi distretti (cute, intestino, fegato, polmoni), con un'incidenza in età pediatrica dell'80% per la forma acuta, e del 20-25% per la forma cronica [22]. La prevenzione e il trattamento della GvHD sono obiettivi prioritari nella gestione dei pazienti. I pazienti affetti da forma cronica hanno manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle presentate da pazienti con malattie autoimmuni (sclerodermia, sindrome di Sjogren, psoriasi, malattie infiammatorie croniche intestinali). Se da un lato i meccanismi patogenetici della GvHD acuta sono ben descritti, per la forma cronica la patogenesi non è ancora stata chiarita. E' noto dalla letteratura che alla base dell'insorgenza della GvHD cronica intervengono sia linfociti T alloreattivi che cellule B allo- e auto-reattive [37]. Sono state individuate potenziali molecole coinvolte in tale processo, quali BAFF [38], IL-2R α , CD13, autoanticorpi anti-dsDNA e anti-antigeni nucleari (ANA) [39, 40]; tuttavia non è ancora stato proposto alcun modello in grado né di elucidare la patogenesi di GvHD cronica né di individuare potenziali *marker* di malattia o *target* terapeutici.

In questa tesi ci siamo proposti di analizzare il profilo di espressione genica di citochine e quello fosfoproteomico di pazienti con GvHD cronica allo scopo di individuare potenziali marcatori biologici (*biomarker*). La scelta delle citochine e delle vie di trasduzione del segnale da analizzare si è basata sulle conoscenze attuali relative alle patologie autoimmunitarie.

Dalle nostre analisi emerge una maggiore espressione dell'IL-22 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia (Ca) rispetto sia ai pazienti con GvHD cronica in remissione completa (Cs), sia ai pazienti con GvHD acuta, che ai pazienti che non hanno mai sviluppato GvHD (Ctrl-). In particolare, l'IL-22 è

espressa mediamente tre volte di più nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva rispetto a tutti gli altri. Questi risultati ci suggeriscono che questa citochina potrebbe rappresentare un nuovo marcatore biologico dello stato attivo di GvHD cronica.

Dai confronti tra i pazienti Ca con i pazienti con GvHD acuta in fase attiva (Aa) e dei pazienti con GvHD acuta che hanno sviluppato la forma cronica (Aa+C) contro quelli con GvHD acuta in assenza di forma cronica (Aa-C) non emerge invece alcuna differenza nell'espressione genica, inclusa l'IL-22. Quindi, tra i geni da noi studiati non è possibile identificare nessun *marker* precoce.

Poiché attualmente la distinzione dei pazienti in forma acuta e cronica viene effettuata mediante la nuova classificazione NIH, abbiamo deciso di ripetere le analisi rivedendo la diagnosi di GvHD acuta e GvHD cronica dei pazienti in studio secondo le nuove linee guida. Due pazienti precedentemente definiti come GvHD cronica sono stati considerati del gruppo degli acuti. Dalla nuova analisi abbiamo confermato che l'IL-22 è maggiormente espressa nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia. Questo risultato ha ulteriormente incoraggiato la nostra ipotesi che l'IL-22 può rappresentare un potenziale marcatore di GvHD cronica.

Il principale ruolo biologico dell'IL-22 comprende l'incremento dell'immunità innata, la protezione dal danno, l'incremento della rigenerazione tissutale. Nelle malattie autoimmuni può esercitare effetti biologici diversi in relazione al tessuto oggetto del danno e al *milieu* citochinico locale [41]. L'IL-22 è una citochina appartenente alla famiglia dell'IL-10, codificata dal gene IL-TIF (*IL-10-related-T-cell-derived inducible factor*), localizzato sul cromosoma 12q15 [42]. Tale citochina esercita il proprio effetto biologico legandosi ad un complesso recettoriale sulla membrana cellulare che fa parte della famiglia dei recettori delle citochine di classe 2 e consiste in due subunità che eterodimerizzano: l'IL-22R1 e l'IL-10R2 [43]. L'IL-22R1 è espresso a livello di cute, pancreas, rene, fegato, intestino ed appara-

to respiratorio, ma non su cellule B, T, monociti e cellule dendritiche [35]. Attraverso il legame al suo recettore, l'IL-22 attiva diverse vie del segnale (es. JAK/STAT, JNK/SAPK, MEK-ERK-RSK, p38), che portano all'attivazione di specifici fattori di trascrizione (es. STAT1, STAT3, STAT5), dipendenti dalla popolazione cellulare target [44]. Mentre il ruolo dell'IL-22 è stato indagato in molte patologie su base autoimmunitaria (malattie infiammatorie croniche intestinali, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, psoriasi) [44], non è mai stato effettuato alcuno studio in adulti e bambini affetti da GvHD cronica. Questa tesi rappresenta dunque un punto di partenza per approfondire il ruolo di tale citochina nella patogenesi di questa patologia.

Per confermare il ruolo dell'IL-22 come marcatore biologico dello stato attivo di GvHD cronica sarà però necessario valutare i livelli plasmatici di questa citochina. Se in questo modo le nostre osservazioni saranno validate, allora sarà possibile proporre il dosaggio dell'IL-22 sia come parametro per la conferma della diagnosi sia per monitorare l'andamento clinico del paziente. In particolare, il dosaggio dell'IL-22 potrebbe essere impiegato per differenziare le forme di GvHD cronica ancora in fase attiva dalle forme in cui persiste il danno d'organo, ormai divenuto irreversibile nonostante la completa remissione della GvHD cronica. Questo sarebbe d'aiuto nella modulazione della terapia immunosoppressiva fino alla sospensione di questa.

Oltre a queste importanti applicazioni diagnostiche, il riscontro di una maggiore espressione di IL-22 nei PBMC di pazienti con GvHD cronica può dare delle indicazioni utili per chiarire i processi patogenetici che sono alla base della comparsa di tale patologia e delle sue manifestazioni.

I nostri risultati, se confermati in una coorte di pazienti più ampia, potrebbero individuare l'IL-22 come nuovo *target* terapeutico specifico. A tal proposito, recentemente sono stati effettuati su modelli murini alcuni studi che dimostrano l'utilità dell'inibizione dell'IL-22 nella terapia di patologie croniche ed autoimmuni, quali

ad esempio la miocardite autoimmune, la psoriasi, la sclerodermia [44]. Un grosso vantaggio di questo nuovo approccio terapeutico consisterebbe anche nel fatto che l'inibizione specifica dell'IL-22 potrebbe agire in modo esclusivo a livello dei tessuti danneggiati, non compromettendo ulteriormente la competenza immunologica del paziente.

L'IL-22 può essere prodotta solamente da linfociti T attivati e cellule NK attivate. In particolare, la produzione avviene ad opera di quattro popolazioni cellulari: T helper 17 (Th17), cellule Natural Killer (NK), linfociti T helper 1 (Th1) e linfociti T helper 22 (Th22) [34]. Ci siamo dunque chiesti quale fosse tra queste quella responsabile della produzione di IL-22 nella GvHD cronica. Purtroppo, trattandosi di uno studio retrospettivo, non avevamo a disposizione i dati completi relativi alle sottopopolazioni T linfocitarie dei pazienti studiati, e non ci è stato possibile dunque correlare la produzione dell'IL-22 all'aumento di una specifica popolazione cellulare tra quelle sopra descritte. Solamente per le cellule NK (CD16+CD56+) [36] è stato possibile effettuare questo tipo di confronto. Abbiamo dunque correlato la presenza delle cellule NK al livello di espressione dell'IL-22, ma non abbiamo ottenuto risultati significativi. Verosimilmente si può escludere il ruolo delle NK come principali produttrici di IL-22 nella GvHD cronica; tuttavia, al fine di poterne escludere un ruolo funzionale importante, occorrerà implementare i dati mediante studi funzionali relativi all'attività NK. Poiché è noto che le principali produttrici di IL-17 sono le cellule Th17 [45] per indagare se la produzione di IL-22 poteva essere principalmente ricondotta a questa sottopopolazione, abbiamo correlato i livelli di espressione genica dell'IL-22 con quelli dell'IL-17. Ne è risultata una correlazione positiva ($\rho=0.7$), suggerendo che la popolazione delle Th17 potrebbe essere tra le responsabili della produzione di IL-22 nella GvHD cronica. Allo stato attuale non è possibile escludere che anche i Th22 ed i Th1 possano contribuire all'innalzamento dei livelli di questa citochina.

Le Th17 sono una popolazione cellulare appartenente ai linfociti T helper CD3+CD4+. Inizialmente questa popolazione linfocitaria era stata descritta come responsabile del reclutamento e dell'attivazione dei neutrofili, ed era stata ritenuta giocare un ruolo chiave nell'infiammazione cronica e nell'autoimmunità. Più recentemente, è stato individuato un ruolo delle Th17 e delle loro citochine effettrici nel mantenimento dell'immunità delle mucose [46]. La produzione di IL-22 e IL-17 da parte delle Th17 è dovuta al legame della IL23p19 al suo recettore, IL-23R. Il contemporaneo legame della IL-12p40 al recettore IL-12Rb1 determina la formazione di un unico complesso recettoriale eterodimerico, che determina la fosforilazione e conseguente attivazione di JAK2 e TYK2. Questo porta alla fosforilazione di STAT3, che si attiva e trasloca nel nucleo dove recluta RORC che promuove la trascrizione di IL-22 e IL-17 [46, 47]. Per verificare dunque che vi sia un ruolo delle Th17 nella produzione di IL-22 nella GvHD cronica, attraverso analisi di fosfoproteomica abbiamo indagato lo stato di attivazione di JAK2, STAT3 e TYK2. Stratificando i pazienti secondo i classici criteri di classificazione della GvHD cronica, tali proteine non sono risultate più attivate nel gruppo di pazienti con GvHD cronica in fase attiva di malattia rispetto ai pazienti in remissione completa. Viceversa, dopo la revisione della diagnosi di forma acuta e forma cronica secondo i criteri NIH, queste proteine risultano essere tendenzialmente più attivate nei pazienti Ca, rispetto ai pazienti Cs. Questi dati suggeriscono che le Th17 potrebbero avere un ruolo nella produzione di IL-22 nella GvHD cronica in fase attiva, anche se non si può escludere un contributo anche da parte delle altre popolazioni cellulari (Th1 e Th22) [41]. Da notare che l'espressione della IL-17 tende ad essere aumentata nella cGvHD in fase attiva, non raggiungendo però la stessa significatività della IL-22. Questo potrebbe avvalorare l'ipotesi che la presenza di IL-22 potrebbe derivare dalle Th17, ma anche dalle Th1 e/o Th22.

In conclusione, in questo studio si è riscontrato che :

1. L'IL-22 è significativamente più elevata nella GvHD cronica in fase attiva. Tale citochina potrebbe quindi rappresentare un potenziale *biomarker* di GvHD cronica in fase attiva.
2. Negli stessi pazienti l'espressione di IL-22 correla con un aumento dell'espressione dell'IL-17.
3. I dati della fosfoproteomica suggeriscono una tendenza nella maggiore attivazione del *pathway* di produzione di IL-22 e IL-17 da parte dei Th17 nei pazienti con GvHD cronica in fase attiva secondo NIH. Tali dati suggeriscono un probabile ruolo dei Th17 nella produzione di questa citochina, sebbene non sia possibile escludere il contributo delle Th1 e delle Th22.

Tra le prospettive future, per avvalorare questi risultati, sarà necessario aumentare la casistica al fine di validare i dati ottenuti, dosare i livelli plasmatici di IL-22 e valutare la presenza delle sottopopolazioni Th1, Th17 e Th22 ai vari *timepoint* corrispondenti post allo-TCSE. Inoltre, sarà interessante studiare l'attivazione dei *pathway* a valle del recettore dell'IL-22 nelle biopsie dei tessuti interessati dalla GvHD cronica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Madon E, Gabutti V, Miniero R. *Ematologia e Oncoematologia Pediatrica*: McGraw-Hill, 1998.
- [2] *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2008.
- [3] Castoldi G, Liso V. *Malattie del Sangue e degli Organi Ematopoietici*: McGraw-Hill, 2007.
- [4] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-61.
- [5] Cornetta K, Laughlin M, Carter S, Wall D, Weinthal J, Delaney C, et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:149-60.
- [6] Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80.
- [7] Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996;334:281-5.

- [8] Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:965-74.
- [9] Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526-32.
- [10] Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002;100:415-9.
- [11] Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:756-62.
- [12] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-56.

- [13] Pavletic SZ, Lee SJ, Socie G, Vogelsang G. Chronic graft-versus-host disease: implications of the National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:645-51.
- [14] Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* 2005;11:1244-9.
- [15] Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285:412-5.
- [16] Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754-9.
- [17] Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003;4:154-60.
- [18] Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464-72.

- [19] Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;324:667-74.
- [20] Poncic RJ, Hackman RC, McDonald GB. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999;49:612-21.
- [21] Snover DC, Weisdorf SA, Vercellotti GM, Rank B, Hutton S, McGlave P. A histopathologic study of gastric and small intestinal graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Pathol* 1985;16:387-92.
- [22] Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002;100:1192-200.
- [23] Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R, Deeg HJ, Dahlberg S, Sanders JE, et al. Alternating-day cyclosporine and prednisone for treatment of high-risk chronic graft-v-host disease. *Blood* 1988;72:555-61.
- [24] Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
- [25] Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D, et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003;3:317-25.

- [26] Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, Lu Y, Fishman D, Espina V, et al. Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:346-55.
- [27] Wulfkuhle JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF, 3rd, Liotta L. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:59-68.
- [28] Akkiprik M, Nicorici D, Cogdell D, Jia YJ, Hategan A, Tabus I, et al. Dissection of signaling pathways in fourteen breast cancer cell lines using reverse-phase protein lysate microarray. *Technol Cancer Res Treat* 2006;5:543-51.
- [29] Cowherd SM, Espina VA, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA. Proteomic analysis of human breast cancer tissue with laser-capture microdissection and reverse-phase protein microarrays. *Clin Breast Cancer* 2004;5:385-92.
- [30] Zha H, Raffeld M, Charboneau L, Pittaluga S, Kwak LW, Petricoin E, 3rd, et al. Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest* 2004;84:235-44.
- [31] Gulmann C, Espina V, Petricoin E, 3rd, Longo DL, Santi M, Knutsen T, et al. Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5847-55.

- [32] Petricoin EF, 3rd, Espina V, Araujo RP, Midura B, Yeung C, Wan X, et al. Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res* 2007;67:3431-40.
- [33] Accordi B, Espina V, Giordan M, VanMeter A, Milani G, Galla L, et al. Functional protein network activation mapping reveals new potential molecular drug targets for poor prognosis pediatric BCP-ALL. *PLoS One* 2010;5:e13552.
- [34] Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R166.
- [35] Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 2010;32:17-31.
- [36] Scquizzato E, Zambello R, Teramo A, Baesso I, Varotto S, Albergoni MP, et al. KIR/HLA-I mismatching and risk of relapse in paediatric patients undergoing non-haploidentical allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2011;15:198-204.
- [37] Levine JE, Paczesny S, Sarantopoulos S. Clinical applications for biomarkers of acute and chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:S116-24.

- [38] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2007;13:6107-14.
- [39] Fujii H, Cuvelier G, She K, Aslanian S, Shimizu H, Kariminia A, et al. Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008;111:3276-85.
- [40] Rozmus J, Schultz KR. Biomarkers in chronic graft-versus-host disease. *Expert Rev Hematol* 2012;4:329-42.
- [41] Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:365-79.
- [42] Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, Michaux L, Renault JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 2000;1:488-94.
- [43] Renault JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003;3:667-76.

- [44] Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem* 2011;353:41-6.
- [45] Serody JS, Hill GR. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:S56-61.
- [46] Rendon JL, Choudhry MA. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol* 2012;92:529-38.
- [47] Ishizaki M, Akimoto T, Muromoto R, Yokoyama M, Ohshiro Y, Sekine Y, et al. Involvement of tyrosine kinase-2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axes in vivo. *J Immunol* 2011;187:181-9.

APPENDICE

Appendice I: Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio

Cod. pz	Sx	Età al TCSE	Diagnosi	Tipo TCSE	Compatibilità D/R	aGvHD	cGvHD
1	F	9	LLA preB t(9;22), in 2°RC	MUD BM	5/6; M/F	si	si
2	M	9	AAS	sorella BM	6/6; F/M	no	no
3	M	6	LLA 3°RC	sorella BM	6/6; F/M	si	si
4	F	12	LLA 2°RC	MUD BM	6/6; M/F	si	si
5	F	18	PNET paravertebrale metastatico rec.	fratello BM	6/6; M/F	si	no
6	F	11	LAM M2 1°RC	MUD BM	6/6; F/F	si	si
7	M	11	LLA 2°RC	MUD BM	5/6; M/M	si	si
8	F	7	LLA T/LAM M0 bifenotipica	sorella BM	6/6; F/F	si	si
9	M	4	AAS	MUD BM	6/6; M/M	si	no
10	F	15	LH 2°RC	sorella BM	6/6; F/F	no	no
11	M	8	LLA 2°RC	MUD BM	5/6; F/M	si	no
12	F	8	LLA 1°RC	fratello BM	6/6; M/F	si	no
13	M	14	LAM M1 2°RC	MUD BM	5/6; M/M	si	si
14	M	8	LLA 2°RC	MUD BM	6/6; M/M	si	si
15	M	16	LLA T in 2°RC	MUD Pb	5/6; M/F	si	si
16	F	17	LAM M4Eo, FLT3+	MUD BM	6/6; M/F	si	si
17	M	13	MDS	MUD BM	6/6; M/M	si	no
18	M	7	Anemia di Fanconi	fratello BM	6/6; M/M	no	no
19	M	8	LLA t(10;11) in 2°RC	MUD BM	6/6; F/M	si	no
20	F	16	LLA t(4;11)	MUD PB	6/6; F/F	si	si
21	F	15	LAM M4 FLT3-ITD	sorella BM	6/6; F/F	si	si
22	M	8	LLA-T 1°RC	fratello BM	6/6; M/M	si	no
23	M	4	AAS	MUD BM	6/6; M/M	si	no
24	M	5	LLA 2°RC	MUD BM	6/6; M/M	si	no
25	F	9	LAM 1°RC	MUD Pb	6/6; M/F	si	no
26	M	4	LAM secondaria 1°RC	MUD CB	5/6; M/M	si	si
27	F	1	LAM M7 in 1°RC	MUD CB	6/6; F/F	si	no
28	F	0,6	Sindrome Emofagocitica Familiare	fratello BM	6/6; M/F	no	no
29	M	8	AAS	MUD Pb	5/6; F/M	si	si

Appendice II: Tabella degli anticorpi utilizzati nelle analisi di Reverse Phase Protein Array

Anticorpo	N catalogo #	Ditta	Concentrazione
p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182)	9211	Cell Signaling	1:50
MEK1/2 (Ser217/221)	9121	Cell Signaling	1:500
IRS-1 (Ser612)	2386	Cell Signaling	1:50
4E-BP1 (Ser65)	9451	Cell Signaling	1:200
eIF4G (Ser1108)	2441	Cell Signaling	1:100
mTOR (Ser2448)	2971	Cell Signaling	1:100
LcK (Tyr505)	2751	Cell Signaling	1:200
S6 Ribosomal Protein (Ser- 235/236) (2F9)	4856	Cell Signaling	1:50
SAPK/JNK (Thr183/Tyr- 185)	9251	Cell Signaling	1:100
Stat3 (Tyr705) (D3A7)	9145	Cell Signaling	1:50
Stat3 (Ser727)	9134	Cell Signaling	1:100
p70 S6 Kinase (Thr389)	9205	Cell Signaling	1:50
Akt (Thr308)	9275	Cell Signaling	1:100
Jak1 (Tyr1022/1023)	3331	Cell Signaling	1:100
Stat1 (Tyr701)	9171	Cell Signaling	1:200
Stat5 (Tyr694)	9351	Cell Signaling	1:50
p90RSK (Ser380)	9341	Cell Signaling	1:50
BAFF	PA1-41266	Pierce	1:100
CCR5	ab65850	Abcam	1:300
CREB (Ser133)	9191	Cell Signaling	1:100
IL-2R α	5370	Cell Signaling	1:100
IL-23 Receptor	PA1-41014	Pierce	1:250
RAS40 (Thr246)	44-1100G	Biosource	1:1000
ROR γ	ab80690	Abcam	1:100
GSK3 α (Ser21) (46H12)	9337	Cell Signaling	1:50
PDK1 (Ser241)	3061	Cell Signaling	1:100
Jak2 (Tyr1008)	8082	Cell Signaling	1:100
IL-22R α	ab5982	Abcam	1:300
Tyk2 (Tyr1054/1055)	9321	Cell Signaling	1:100
TNF-R1 (C25C1)	3736	Cell Signaling	1:50
IL-10R α (Tyr496)	ab63406	Abcam	1:300
ERK1/2 (Tyr202/204)	9101	Cell Signaling	1:300