

**Università degli Studi di Milano**  
Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Corso di Dottorato di Ricerca in Ematologia Sperimentale  
Ciclo XXVI



**IDENTIFICAZIONE DI NUOVE VIE DI SEGNALE  
E MARCATORI PREDITTIVI DELLA MALATTIA  
DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE DOPO  
TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE  
STAMINALI EMATOPOIETICHE**

**Tutor: Prof. Paolo Corradini**  
**Coordinatore: Prof. Paolo Corradini**

**Candidato:**  
**Silvia Alessandra Gimondi**  
**Matricola R08987**

Anno Accademico 2012/2013

# Indice

|                                                                                                                  |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Abbreviazioni</b>                                                                                             | <b>5</b> |
| <b>1 Introduzione</b>                                                                                            | <b>6</b> |
| 1.1 Trapianto di cellule staminali ematopoietiche . . . . .                                                      | 6        |
| 1.2 Fonti di cellule staminali . . . . .                                                                         | 7        |
| 1.3 Il sistema HLA e la compatibilità<br>ricevente-donatore . . . . .                                            | 8        |
| 1.4 Tipologie di trapianto . . . . .                                                                             | 10       |
| 1.5 Valutazioni post trapianto . . . . .                                                                         | 11       |
| 1.6 Complicanze del trapianto di cellule staminali<br>ematopoietiche: <i>Graft Versus Host Disease</i> . . . . . | 13       |
| 1.7 Cellule effettrici della GVHD acuta . . . . .                                                                | 16       |
| 1.7.1 Linfociti <i>Thelper</i> : Th1, Th2, Th17 . . . . .                                                        | 17       |
| 1.7.2 Linfociti T regolatori (T <sub>reg</sub> ) . . . . .                                                       | 19       |
| 1.7.3 Linfociti T: fase di reclutamento . . . . .                                                                | 19       |
| 1.7.4 Linfociti T: fase effettrice . . . . .                                                                     | 20       |
| 1.7.5 Linfociti B . . . . .                                                                                      | 21       |
| 1.7.6 Cellule presentanti l'antigene . . . . .                                                                   | 23       |
| 1.8 Trattamento della GVHD acuta . . . . .                                                                       | 23       |
| 1.8.1 Prevenzione della GVHD . . . . .                                                                           | 24       |
| 1.8.2 Terapia . . . . .                                                                                          | 25       |
| 1.8.3 Nuovi farmaci . . . . .                                                                                    | 26       |
| 1.8.3.1 La via di segnalazione JAK-STAT . . . . .                                                                | 27       |
| 1.8.3.2 CP-690-550 . . . . .                                                                                     | 29       |
| 1.8.3.3 INC-424 . . . . .                                                                                        | 29       |
| 1.9 Biomarcatori . . . . .                                                                                       | 30       |
| 1.9.1 I microRNA . . . . .                                                                                       | 31       |
| 1.9.1.1 Biogenesi dei miRNA . . . . .                                                                            | 34       |
| 1.9.1.2 miRNA ed ematopoiesi . . . . .                                                                           | 39       |
| 1.9.1.3 miRNA e trapianti di organi solidi . . . . .                                                             | 41       |
| 1.9.1.4 miRNA circolanti . . . . .                                                                               | 42       |

|          |                                                                                         |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2</b> | <b>Scopo del lavoro</b>                                                                 | <b>44</b> |
| <b>3</b> | <b>Materiali e Metodi</b>                                                               | <b>46</b> |
| 3.1      | Modello murino per lo studio della <i>Graft Versus Host Disease</i> . . . . .           | 46        |
| 3.1.1    | Mantenimento del modello murino e stabulazione . . . . .                                | 46        |
| 3.1.2    | Modello murino di GVHD . . . . .                                                        | 46        |
| 3.1.2.1  | Prelievo di midollo osseo . . . . .                                                     | 47        |
| 3.1.2.2  | Prelievo di cellule spleniche . . . . .                                                 | 47        |
| 3.1.2.3  | Irraggiamento . . . . .                                                                 | 48        |
| 3.1.2.4  | Trapianto . . . . .                                                                     | 48        |
| 3.1.2.5  | Monitoraggio degli animali e trattamento farmacologico . . . . .                        | 48        |
| 3.1.2.6  | Coltura primaria di cellule dendritiche . . . . .                                       | 49        |
| 3.1.2.7  | Reazione linfocitaria mista . . . . .                                                   | 50        |
| 3.1.3    | Modelli murini di GVT . . . . .                                                         | 50        |
| 3.2      | Test di attività anti tumorale . . . . .                                                | 51        |
| 3.3      | Separazione immunomagnetica . . . . .                                                   | 52        |
| 3.4      | Analisi immunofenotipica mediante citometria a flusso . . . . .                         | 54        |
| 3.4.1    | Compensazione dello strumento . . . . .                                                 | 55        |
| 3.4.2    | Preparazione del campione . . . . .                                                     | 56        |
| 3.4.3    | Analisi Citofluorimetrica . . . . .                                                     | 56        |
| 3.5      | Analisi istologica . . . . .                                                            | 57        |
| 3.6      | Dosaggio citochine plasmatiche . . . . .                                                | 61        |
| 3.7      | Pazienti . . . . .                                                                      | 62        |
| 3.8      | Separazione del plasma da sangue periferico . . . . .                                   | 63        |
| 3.9      | Estrazione di RNA da plasma . . . . .                                                   | 65        |
| 3.10     | Retrotrascrizione . . . . .                                                             | 66        |
| 3.11     | Preamplificazione . . . . .                                                             | 68        |
| 3.12     | Real Time PCR . . . . .                                                                 | 68        |
| 3.13     | Software di analisi . . . . .                                                           | 72        |
| 3.14     | Analisi statistica dei dati . . . . .                                                   | 72        |
| <b>4</b> | <b>Risultati</b>                                                                        | <b>74</b> |
| 4.1      | Inibizione della via di segnalazione JAK/STAT in un modello murino di<br>GVHD . . . . . | 74        |
| 4.1.1    | CP-690,550 e INC-424 a confronto . . . . .                                              | 74        |
| 4.1.1.1  | Valutazione del chimerismo . . . . .                                                    | 76        |
| 4.1.1.2  | Sopravvivenza e andamento ponderale . . . . .                                           | 76        |
| 4.1.1.3  | Segni esteriori di aGVHD . . . . .                                                      | 77        |
| 4.1.1.4  | Analisi Istologica . . . . .                                                            | 78        |
| 4.1.1.5  | Test di reazione linfocitaria mista (MLR) . . . . .                                     | 81        |
| 4.1.1.6  | Analisi immunofenotipica dei linfociti T splenici . . . . .                             | 82        |

|          |                                                                              |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.2    | Ottimizzazione del trattamento con INC-424 . . . . .                         | 88         |
| 4.1.2.1  | Valutazione del chimerismo . . . . .                                         | 88         |
| 4.1.2.2  | Sopravvivenza e andamento ponderale . . . . .                                | 90         |
| 4.1.2.3  | Segni esteriori di aGVHD . . . . .                                           | 92         |
| 4.1.2.4  | Analisi Istologica . . . . .                                                 | 93         |
| 4.1.2.5  | Test di reazione linfocitaria mista (MLR) . . . . .                          | 94         |
| 4.1.2.6  | Analisi immunofenotipica dei linfociti T splenici . . . . .                  | 94         |
| 4.1.2.7  | Dosaggio delle citochine plasmatiche . . . . .                               | 98         |
| 4.1.3    | Modello murino di Graft Versus Tumor . . . . .                               | 99         |
| 4.1.3.1  | Andamento ponderale e sopravvivenza . . . . .                                | 100        |
| 4.1.3.2  | Valutazione dell'effetto antitumorale <i>in vivo</i> . . . . .               | 102        |
| 4.1.4    | Valutazione dell'effetto antitumorale <i>in vitro</i> . . . . .              | 104        |
| 4.2      | Ricerca di biomarcatori di GVHD . . . . .                                    | 107        |
| 4.2.1    | Estrazione di RNA da plasma . . . . .                                        | 107        |
| 4.2.1.1  | Ottimizzazione dell'estrazione . . . . .                                     | 107        |
| 4.2.1.2  | Quantificazione dell' RNA estratto . . . . .                                 | 109        |
| 4.2.2    | Ottimizzazione del protocollo di retrotrascrizione . . . . .                 | 110        |
| 4.2.3    | Analisi del profilo di espressione di microRNA circolanti . . . . .          | 110        |
| 4.2.3.1  | Confronto pazienti allotrapiantati - donatori sani . . . . .                 | 111        |
| 4.2.3.2  | Identificazione di un pannello di miRNA differenzialmente espressi . . . . . | 115        |
| 4.2.3.3  | Costruzione di un predittore: <i>Support Vector Machine</i> . . . . .        | 119        |
| 4.2.3.4  | microRNA differenzialmente espressi in pazienti con aGVHD                    | 119        |
| 4.2.3.5  | Analisi delle vie di segnalazione . . . . .                                  | 120        |
| <b>5</b> | <b>Discussione</b>                                                           | <b>124</b> |
|          | <b>Bibliografia</b>                                                          | <b>131</b> |

# Abbreviazioni

**H SCT**, Hematopoietic Stem Cell Transplantation  
**allo-H SCT**, allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation  
**GVT**, Graft Versus Tumor  
**GVHD**, Graft Versus Host Disease  
**aGVHD**, acute Graft Versus Host Disease  
**cGVHD**, chronic Graft Versus Host Disease  
**HSC**, Hematopoietic Stem Cells  
**G-CSF**, Granulocyte Colony Stimulating Factor  
**CXCR4**, CXC chemokine Receptor 4  
**CXCR12**, CXC chemokine Receptor 12  
**MHC**, Major Histocompatibility Complex  
**HLA**, Human Leucocyte Antigen  
**APC**, Antigen Presenting Cells  
**MUD**, Matched Unrelated Donor  
**FISH**, Fluorescence In Situ Hybridization  
**PCR**, Polimerase Chain Reaction  
**STR**, Short Tandem Repeats  
**NK cells**, Natural Killer cells  
**DLI**, Donor Lymphocyte Infusion  
**TCR**, T Cell Receptor  
**LPS**, LipoPolySaccharide  
**IFN $\gamma$** , Interferon  $\gamma$   
**TNF $\alpha$** , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**NO**, Nitric Oxygen  
**miHAs**, minor Histocompatibility Antigens

**NKT cells**, Natural Killer T cells  
**BCR**, B Cell Receptor  
**TGF  $\beta$** , Tumor Growth Factor  $\beta$   
**MIF**, Macrophage Inhibitory Factor  
**TRM**, Transplant Related Mortality  
**STAT**, Signal Transducers and Activators of Transcription  
**FDA**, Food and Drug Administration  
**UTR**, UnTranslated Region  
**RISC**, RNA-Induced Silencing Complex  
**RLC**, RISC Loading Complex  
**TRBP**, TAR RNA Binding Protein  
**PACT**, Protein ACtivating PKR  
**DLBCL**, Diffuse Large B Cell Lymphoma  
**RQ**, Relative Quantification  
**SOCS**, Suppressor Of Cytokine Signaling  
**GC**, Germinal Center  
**CIS**, Cytokine-inducible Src homology 2(SH2) domain-containing protein  
**JAK**, Janus Kinase  
**STAT**, Signal Transducers and Activators of Transcription  
**BM-TCD**, Bone Marrow T-cell Depleted  
**SC-BCD**, Spleen Cells B-cell Depleted  
**TBI**, Total Body Irradiation  
**MLR**, Mixed Lymphocyte Reaction  
**RIC**, Reduced Intensity Conditioning  
**C<sub>t</sub>**, Cycle of Threshold  
**DC**, Dendritic Cells  
**OS**, Overall Survival

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Trapianto di cellule staminali ematopoietiche

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) rappresenta un'importante opzione terapeutica per la cura di numerose patologie ematologiche sia di origine ereditaria, quali immunodeficienze innate e anemia, che di origine neoplastica. Il razionale alla base del trapianto di cellule staminali sta nella sostituzione di un sistema ematopoietico “malato” con uno derivante da un individuo sano. Il primo trapianto di cellule staminali ematopoietiche risale al 1959 quando Thomas fu in grado di indurre la remissione clinica in una paziente affetta da leucemia in stadio avanzato dopo trapianto di midollo osseo prelevato dalla sorella gemella [90]. Nel contesto oncologico, la maggior parte dei trattamenti chemioterapici e/o radioterapici ad alte dosi (definiti mieloablativi) comporta un'elevata tossicità sulla fisiologica attività del midollo osseo. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche offre la possibilità di sopperire al deficit immunitario derivante dalla terapia farmacologica. Questo tipo di terapia permette infatti di eliminare in modo molto efficace le cellule tumorali, causando tuttavia una perdita permanente della funzionalità del midollo osseo del paziente che necessita pertanto di essere sostituito mediante cellule staminali ematopoietiche da un donatore sano. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche si può quindi considerare come una vera e propria terapia cellulare in grado di sostituire un sistema ematopoietico malato o danneggiato, ma allo stesso tempo svolge un'azione immunoterapica in quanto è lo stesso sistema immunitario ad essere sostituito. In particolare, nel contesto del trapianto allogenico, le

differenze immunologiche tra donatore e ricevente sono in grado di innescare una risposta alloreattiva benefica che è alla base dell'effetto antitumorale, meglio conosciuto come effetto *Graft Versus Tumor* (GVT). Tuttavia, gli stessi linfociti T autori della risposta GVT possono riconoscere come estranei anche i tessuti sani dell'ospite e dar luogo alla principale complicanza del trapianto allogenico, nota come malattia del trapianto contro l'ospite o *Graft Versus Host Disease*, GVHD.

## 1.2 Fonti di cellule staminali

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche prevede un primo processo di isolamento, differente a seconda della fonte di staminali scelta. Ad oggi le cellule staminali ematopoietiche  $CD34^+$  (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) possono essere prelevate da tre diverse sedi:

- Midollo osseo
- Sangue Periferico
- Sangue da cordone ombelicale

Ciascuna di queste fonti sembra fornire risultati clinici paragonabili, tuttavia la scelta preferenziale di una di queste sedi può variare a seconda dell'età del donatore e del ricevente, nonché dell'applicazione e dalla disponibilità del donatore stesso. Generalmente il prelievo di midollo osseo è preferito nel caso di pazienti pediatrici, per gli adulti può essere scelto sia midollo che sangue periferico, mentre per quanto riguarda il sangue da cordone ombelicale dipende dal numero di cellule ottenute dal singolo cordone. Le cellule staminali isolate da midollo osseo o da sangue periferico hanno caratteristiche simili in termini di efficacia di attecchimento a lungo termine e vitalità cellulare. Tuttavia l'isolamento da sangue periferico risulta essere una metodica più semplice dal punto di vista tecnico e rispetto al prelievo da midollo osseo permette di ottenere una miglior resa in termini di numero totale di cellule. Il prelievo da sangue periferico prevede la mobilitazione attraverso l'utilizzo di chemoterapici in associazione con fattori di crescita quali il G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) e altri farmaci quali il Plerixafor, un antagonista di CXCR4 (un recettore che favorisce la migrazione delle staminali ematopoietiche nel midollo osseo grazie al legame con CXCL12 espresso dalle staminali). Il

sangue da cordone ombelicale infine ha una minore quantità di cellule staminali rispetto alle altre fonti ma le cellule ottenute hanno un fenotipo più indifferenziato. Questo riduce l'incidenza di sviluppo di GVHD ma rallenta il periodo di attecchimento post trapianto, esponendo così il paziente ad un aumentato rischio di infezioni opportunistiche. Tuttavia, come già accennato in precedenza, il trapianto di cellule staminali cordonali è limitato dal numero ridotto di cellule ottenibili da un singolo cordone.

In seguito all'isolamento dalla sede più opportuna, le cellule vengono infuse per via endovenosa in un paziente precedentemente sottoposto a regime di condizionamento. Per regime di condizionamento si intende il trattamento utilizzato per preparare il paziente al trapianto e che consiste in una combinazione di diversi farmaci, chemioterapici e radioterapia. Lo scopo del regime di condizionamento è duplice:

- Distruggere tutte, o il maggior numero possibile, di cellule neoplastiche presenti nel paziente.
- Creare lo spazio fisico per la migrazione delle cellule ematopoietiche dalla periferia al midollo osseo.

### 1.3 Il sistema HLA e la compatibilità ricevente-donatore

La compatibilità tra donatore e ricevente per il *locus* MHC è di cruciale importanza per il buon esito del trapianto e per evitare eventi avversi quali ad esempio il rigetto. Il *locus* MHC (*Major Histocompatibility Complex*, sistema maggiore di istocompatibilità) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 dove mappano i geni HLA (*Human Leukocyte Antigen*). I geni HLA codificano per delle glicoproteine transmembrana in grado di presentare peptidi antigenici ai linfociti T e permetterne quindi l'attivazione. I geni che codificano per gli antigeni leucocitari umani possono essere raggruppati in due classi principali: MHC di classe I in grado di presentare peptidi antigenici ai linfociti T CD8 (citotossici), MHC di classe II in grado di presentare peptidi antigenici ai linfociti T CD4 (helper). A differenza dell'MHC di classe II, l'MHC di classe I è sintetizzato ed espresso sulla superficie di tutte le cellule dell'organismo e ha il compito di presentare peptidi antigenici di origine intracellulare (ad es. virali) ai linfociti T citotossici. Questo meccanismo

di riconoscimento fisiologico che è alla base dell'immunità nei confronti di agenti virali è di particolare importanza nel rigetto del trapianto. Al contrario, l'MHC di classe II non è presente su tutte le cellule dell'organismo ma solo su cellule particolari che prendono il nome di cellule presentanti l'antigene professionali (APC, *Antigen Presenting Cell*). Tra queste riconosciamo le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B attivati. Le proteine MHC di classe II sono in grado di presentare peptidi antigenici esogeni ai linfociti T helper che sono in grado quindi di attivarsi e coordinare la risposta immune.

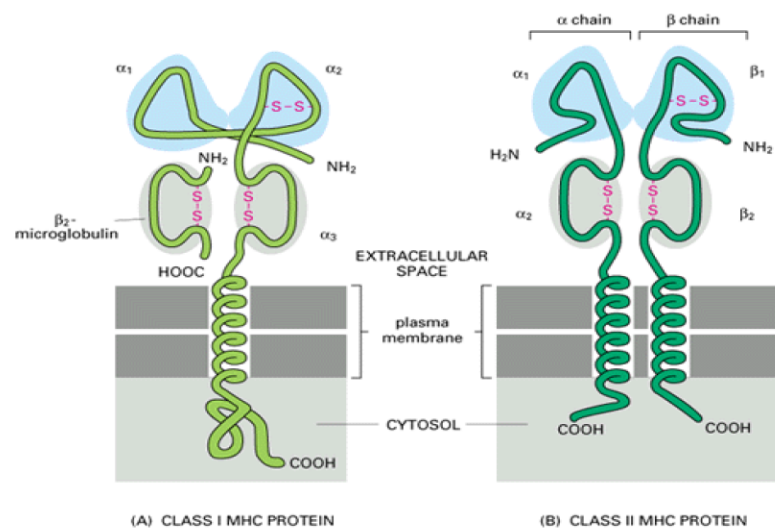


Figura 1.1: Rappresentazione grafica delle glicoproteine transmembrana codificate dai geni HLA. A sinistra la molecola MHC di classe I, sulla destra la proteina MHC di classe II. In entrambi le classi la porzione C terminale intra-citoplasmatica è coinvolta nella trasduzione del segnale mentre la porzione N terminale della proteina costituisce il sito di legame all'epitopo.

Le proteine MHC di classe I sono codificate da tre geni differenti HLA-A HLA-B e HLA-C, mentre quelle di classe II sono codificate dai geni HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. I geni per le molecole MHC sono raggruppati in regioni cromosomiche ristrette: fenomeni di ricombinazione omologa sono molto rari (<1%), per questo motivo i diversi alleli vengono ereditati insieme come “aplotipi”. Un aspetto molto importante delle proteine MHC, sia di classe I che di classe II, è che sono espresse in modo codominante sulla superficie della cellula per permettere uno spettro maggiore di riconoscimento dell'antigene. Inoltre i geni che codificano per le proteine MHC sono altamente polimorfici e questo permette alle

diverse forme alleliche della proteina di riconoscere diversi peptidi. Proprio per questa loro caratteristica è molto difficile trovare due individui identici per il *locus* HLA. Tuttavia i geni del complesso maggiore di istocompatibilità sono legati tra loro da fenomeni di *linkage disequilibrium* quindi i diversi aplotipi hanno una segregazione preferenziale che ha dato origine alla formazione di aplotipi ancestrali tramandati alle generazioni successive con esigue alterazioni. Questo è molto importante a fini trapiantologici in quanto aumenta le probabilità di trovare un altro individuo compatibile.

## 1.4 Tipologie di trapianto

In base al grado di omologia genetica tra donatore e ricevente si possono distinguere diverse tipologie di trapianto. In particolare quando il donatore è il paziente stesso si parla di trapianto autologo. Questo particolare tipo di trapianto può essere utilizzato solo in alcune patologie di origine tumorale, ad esempio il mieloma multiplo, e prevede il prelievo di cellule staminali ematopoietiche dal paziente in remissione clinica. Il trapianto autologo può essere utilizzato anche nel caso in cui il paziente debba essere sottoposto a dosi massicce di chemioterapia nel tentativo di eradicare la malattia: in questo caso la terapia causa un profondo stato di immunodepressione conseguente ad una compromissione del midollo osseo. Si rende quindi necessario il trapianto autologo per rimpiazzare il sistema immunitario deficitario. Nel caso del trapianto autologo non si assiste a fenomeni avversi come il rigetto o l'attivazione della risposta immunitaria contro l'ospite, tuttavia non si ottiene nemmeno un effetto immunoterapico tale da contrastare la malattia stessa.

Altra tipologia di trapianto è il trapianto allogenico, in cui le cellule trapiantate nel paziente derivano da un donatore sano. Rispetto al trapianto autologo si è rivelato più efficace nel diminuire il rischio di ricaduta neoplastica. Esistono diverse tipologie di trapianto allogenico che prevedono schemi terapeutici e regimi di condizionamento differenti e hanno conseguenze variabili a seconda del paziente, dell'età e del regime di condizionamento adottato. Il trapianto allogenico da donatore familiare HLA identico prevede l'isolamento delle cellule CD34<sup>+</sup> da un donatore consanguineo. In questo ambito si è osservato un buon attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche e una ridotta incidenza di complicanze post trapianto grazie allo sviluppo di nuovi regimi di condizionamento a ridotta intensità e la deplezione dei linfociti T maturi. Tuttavia la probabilità di trovare nella propria famiglia un donatore HLA-identico è circa del 30% per cui si rendono ne-

cessari approcci terapeutici alternativi. Nel caso in cui non sia possibile effettuare un trapianto da donatore consanguineo si può ricorrere al trapianto allogenico da donatore HLA-identico non familiare (MUD, *Matched Unrelated Donor*). Lo svantaggio di questo approccio terapeutico è un aumentato rischio di sviluppare complicanze post trapianto a causa della disparità tra gli antigeni minori di compatibilità. La ricerca di un donatore HLA-identico inoltre può richiedere tempi molto lunghi.

Un ulteriore approccio terapeutico che viene utilizzato nel caso in cui non sia disponibile un donatore MUD né vi sia un donatore HLA-identico all'interno della famiglia è quello del trapianto con incompatibilità tra donatore e ricevente che arriva ad essere del 50% nel caso del trapianto aploidentico. In questo caso una compatibilità donatore-ricevente del 50% comporta inevitabilmente un aumentato rischio di complicanze quali il rigetto e la malattia del trapianto verso l'ospite (GVHD).

## 1.5 Valutazioni post trapianto

In seguito al trapianto di cellule staminali ematopoietiche è necessario effettuare delle valutazioni per monitorare l'esito della procedura e in particolare per analizzare la ripresa della funzionalità ematica. Viene monitorata la cellularità del sistema ematopoietico, viene valutata l'origine delle cellule mature e si effettua un'analisi della ricostituzione linfocitaria.

La prima valutazione che viene effettuata in seguito a trapianto è l'analisi della produttività midollare attraverso la misura dell'emocromo. Con questa metodica si ottiene un'informazione quantitativa in merito alla funzionalità del sistema ematopoietico ma non si ottengono informazioni riguardo l'origine delle cellule prodotte. Infatti le cellule potrebbero originarsi sia dalle cellule staminali trapiantate che dalle cellule sopravvissute al regime di condizionamento. Attraverso l'esame emocromocitometrico è possibile stimare il numero totale di leucociti, eritrociti, piastrine, nonché effettuare una valutazione dell'ematocrito, dell'emoglobina e delle diverse sottopopolazioni leucocitarie. Con questa metodica tuttavia non è possibile avere informazioni in merito alle diverse popolazioni linfoidi.

Altro parametro indispensabile per valutare la buona riuscita del trapianto è l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche trapiantate. Per effettuare una valutazione dell'attecchimento del trapianto si esegue un'analisi di laboratorio che prende il nome di

analisi del chimerismo (vedi figura 1.2). Questa metodica permette di stabilire la percentuale di cellule del sistema ematopoietico originatesi dalle cellule staminali del donatore rispetto alle cellule del ricevente. Il dato ottenuto può essere interpretato come indice dell'avvenuto attecchimento del trapianto. Si definisce chimerismo completo la condizione in

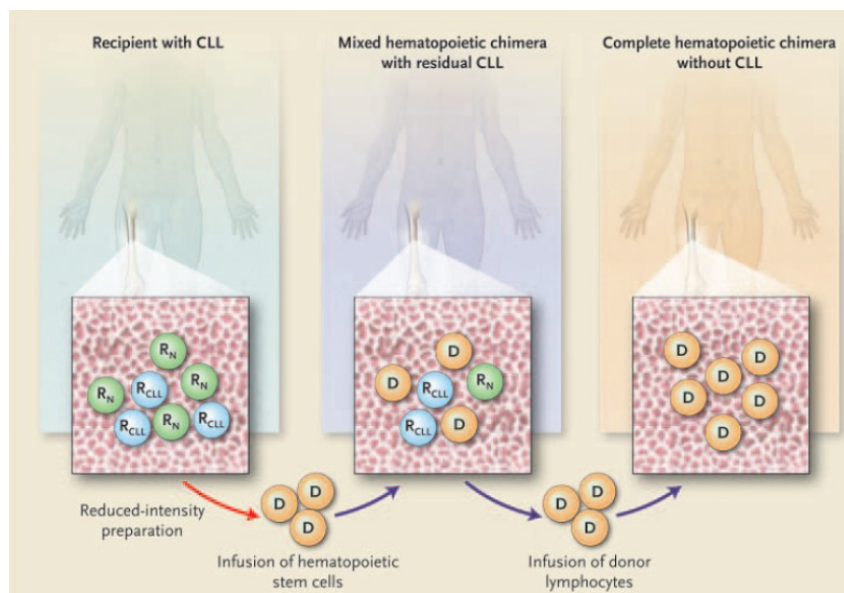


Figura 1.2: Formazione di una chimera completa in seguito a trapianto di cellule staminali ematopoietiche dopo regime a ridotta intensità. Per un periodo di tempo variabile il paziente presenterà cellule proprie e cellule del donatore.

cui la percentuale di cellule originatesi dalle staminali trapiantate da donatore supera il 95%.

Esistono metodiche di analisi differenti, basate sullo studio fenotipico degli eritrociti, sull'identificazione mediante Ibridazione fluorescente “*in situ*” (FISH) dei cromosomi del sesso X e Y come marcatori di popolazioni cellulari derivanti da individui di sesso diverso, e infine sulla presenza di alleli polimorfici altamente variabili tra donatore e ricevente. Quest'ultima analisi viene preferita e si utilizza una tecnica basata sull'amplificazione mediante PCR (più specifica e sensibile delle altre tecniche finora menzionate) di 9 alleli polimorfici appartenenti alla classe degli *short tandem repeats* (STR). Gli STR sono frammenti genici di circa 150bp costituiti da una serie di ripetizioni di 2-6 nucleotidi, sono elementi sparsi nel genoma (DNA microsatellite) e sono generalmente fiancheggiati da sequenze uniche che ne permettono l'amplificazione con oligonucleotidi specifici. Il

numero di ripetizioni è variabile da allele ad allele ed è dovuto allo slittamento della DNA polimerasi durante il processo di duplicazione del DNA. L'analisi del chimerismo viene solitamente effettuata ai giorni +30, +60, +90, +120 e +180 post trapianto per valutare la percentuale di cellule del donatore nel midollo o nel sangue periferico del paziente ricevente.

## 1.6 Complicanze del trapianto di cellule staminali ematopoietiche: *Graft Versus Host Disease*

Nel contesto allogenico, i linfociti T del donatore infusi al momento del trapianto sono in grado di riconoscere antigeni allogenici dell'ospite ed innescare una vera e propria reazione immunitaria. Questo fenomeno risulta positivo e funzionale al trapianto stesso nel momento in cui i linfociti T riconoscono e bersagliano le cellule tumorali residue nel paziente, espletando in questo modo l'effetto GVT associato al trapianto. Tuttavia, i linfociti T alloreattivi sono in grado di riconoscere come estranei anche i tessuti sani del ricevente. Nel caso ciò accadesse, si assiste ad una reazione del trapianto contro l'ospite, fenomeno noto come *Graft Versus Host Disease*, o GVHD. La GVHD è una delle maggiori complicanze associate al trapianto di cellule staminali ematopoietiche e rappresenta la principale causa di mortalità. Sebbene i principali fattori di rischio siano noti (principalmente il grado di disparità per il locus HLA e la disparità di sesso tra donatore e ricevente, il tipo di regime di condizionamento e la fonte di cellule staminali), la GVHD si presenta in circa il 40% di pazienti che ricevono un trapianto HLA-identico. Negli ultimi anni purtroppo sono stati fatti pochi passi avanti nel trattamento della GVHD e l'*outcome* di pazienti refrattari alla terapia steroidea è piuttosto basso, con un tasso di mortalità pari al 70%.

La GVHD viene clinicamente classificata in due forme distinte, una acuta (aGVHD) e una cronica (cGVHD), in base al periodo di insorgenza. La GVHD acuta si manifesta entro 100 giorni dal trapianto, mentre può definirsi cronica a partire dal giorno +100 post trapianto. Nonostante la distinzione in GVHD acuta o cronica sia storicamente basata sul periodo di insorgenza, in realtà questa classificazione non è ottimale nel distinguere i diversi meccanismi alla base di due patologie ben distinte. La GVHD acuta infatti può insorgere anche dopo 100 giorni dal trapianto in particolare nel caso di pazienti che siano stati sottoposti a regimi di condizionamento non mieloablativo o che abbiano ricevuto

un'infusione di linfociti del donatore (DLI). Analogamente anche una GVHD con caratteristiche proprie di GVHD cronica può svilupparsi entro i primi 100 giorni dal trapianto o in concomitanza con una situazione di GVHD acuta. Nel nostro studio tuttavia abbiamo mantenuto la classificazione clinica di GVHD, definendo acuta una GVHD che si fosse manifestata entro 100 giorni dal trapianto [72].

La tipologia di condizionamento pre-trapianto gioca un ruolo chiave nello sviluppo della aGVHD. Il regime farmacologico di tipo citotossico a cui è sottoposto il paziente infatti induce un ingente danno tissutale che si traduce in un inevitabile rilascio di citochine proinfiammatorie. L'aumentata concentrazione in circolo di molecole proinfiammatorie promuove l'attivazione e la maturazione delle APC e conseguentemente la rapida attivazione delle cellule T del donatore infuse al momento del trapianto.

Nello specifico, la aGVHD è caratterizzata da una risposta cellulare Th1 associata a linfopenia delle cellule B, e la sua patofisiologia si sviluppa attraverso quattro stadi: il primo stadio è caratterizzato dall'attivazione della risposta immune, nel secondo stadio avviene il riconoscimento antigenico, nel terzo stadio avviene l'espansione delle popolazioni alloreattive, ed infine vi è la migrazione delle cellule effettrici negli organi bersaglio ed il danno d'organo. L'attivazione delle cellule T del donatore avviene in seguito all'interazione con le APC, in particolare grazie al legame specifico del recettore delle cellule T (*T cell receptor*, TCR) con il ligando presentato sulla superficie delle APC (vedi figura 1.3). Le cellule T alloreattive che hanno riconosciuto l'antigene presentato dalle APC vanno quindi incontro ad espansione e differenziamento (Th1 o Th2 a seconda delle citochine presenti) e migrano infine ai tessuti bersaglio della GVHD (intestino, fegato, cute e polmoni) dove svolgono la loro azione effettrice e provvedono al reclutamento di altri leucociti per la distruzione dei tessuti sani. L'espansione e il differenziamento dei linfociti T giocano un ruolo chiave nella patogenesi della GVHD, in particolare l'azione citotossica svolta dai linfociti T CD8 a livello dei tessuti periferici (vedi figura 1.4). I tessuti ospiti danneggiati rispondono secerndo citochine proinfiammatorie come  $TNF\alpha$  e IL1 che contribuiscono ad aumentare l'espressione di molecole di adesione, molecole costimolatorie, antigeni MHC, e favoriscono lo sviluppo di gradienti citochinici indispensabili per richiamare i linfociti T residui dell'ospite e i linfociti T del donatore infusi durante il trapianto. Il continuo aumento di segnali proinfiammatori ("*danger signals*") contribuisce quindi all'attivazione delle cellule a livello dei tessuti ospiti, in particolare delle APC presenti a livello periferico.

Di particolare importanza è il danno causato a livello gastrointestinale da parte del regime

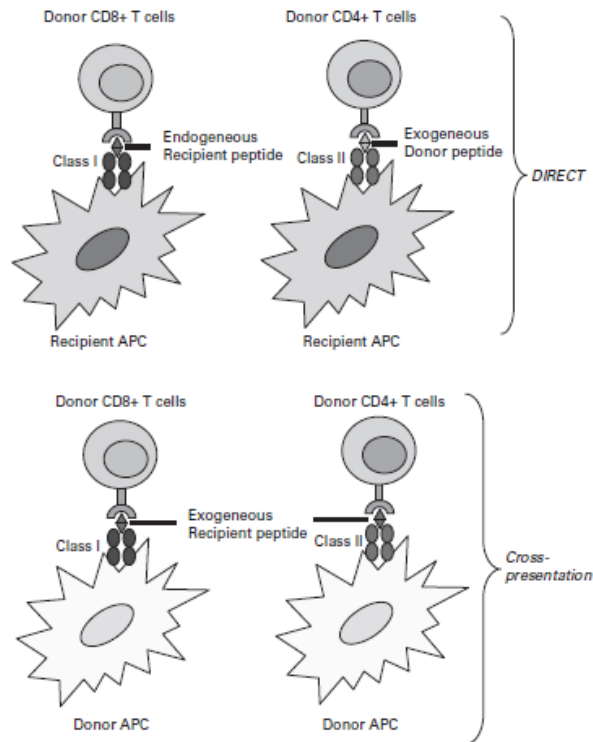


Figura 1.3: *Pathways* di presentazione dell'antigene nel contesto GVHD. Nel primo riquadro è mostrato il caso della presentazione diretta da parte delle APC del ricevente alle cellule T del donatore. Nel secondo caso invece sono le APC del donatore stesso a presentare l'antigene alle cellule T [72].

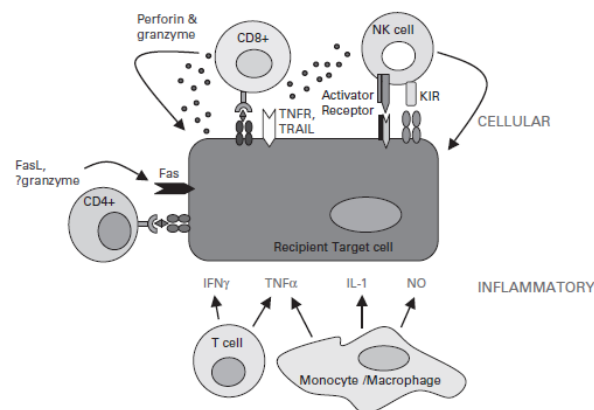


Figura 1.4: Effettori della risposta GVHD. L'apoptosi delle cellule bersaglio è indotta sia da componenti cellulari quali le cellule T, sia da stimoli proinfiammatori come  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL}1$  e  $\text{NO}$  [72].

di condizionamento. La terapia citotossica a cui è sottoposto il paziente infatti favorisce la traslocazione in membrana di lipopolisaccaridi (LPS) che contribuiscono in modo diretto all'attivazione delle APC dell'ospite, questo a supporto della tesi per cui regimi di condizionamento più "aggressivi" (mieloablativi) sono associati ad un aumentato rischio di sviluppare GVHD.

L'incidenza di GVHD acuta è direttamente correlata al grado di disparità tra donatore e ricevente per il locus HLA. Tuttavia anche nel caso di trapianto di cellule staminali ematopoietiche tra individui HLA identici si può andare incontro all'insorgenza di GVHD acuta a causa di differenze genetiche estranee al locus HLA, in particolare differenze in geni che codificano per antigeni minori di istocompatibilità (miHAs).

## 1.7 Cellule effettrici della GVHD acuta

Diverse popolazioni cellulari sono coinvolte nella patogenesi della GVHD. Un ruolo di particolare importanza è rivestito dai linfociti T i quali risultano essere i principali effettori della risposta citotossica volta a distruggere i tessuti sani dell'ospite quali pelle, intestino, fegato e polmoni. Oltre alle popolazioni canoniche CD4 e CD8, indispensabili per mantenere e promuovere lo stato di GVHD, sono però presenti anche altre popolazioni con attività opposta, che esplicano una azione inibente nei confronti della GVHD.

Un ruolo particolare spetta alle cellule T regolatorie (CD4 CD25 FoxP3 positive) che esercitano una potente azione immunosoppressiva sia *in vitro* che *in vivo*. Studi sull'infusione di cellule T regolatorie del donatore post trapianto hanno dimostrato che queste sono efficaci nel bloccare lo sviluppo di GVHD. In particolare cellule T regolatorie ( $T_{reg}$ ) che esprimono CD62L (L-selectina, una molecola di adesione) e che sono localizzate a livello degli organi linfoidi secondari, hanno dimostrato un'azione preventiva nei confronti della GVHD. L'azione spiccatamente immunomodulante e inibitoria delle  $T_{reg}$  ha dato il via a protocolli di espansione *ex vivo* al fine di aumentare il numero disponibile di cellule per l'infusione *in vivo* post trapianto, tuttavia la manipolazione delle cellule  $T_{reg}$  non è semplice dal punto di vista metodologico. Le cellule  $T_{reg}$  infatti possono essere selezionate sulla base dell'espressione delle molecole di superficie CD4 e CD25 ma questi due determinanti antigenici da soli non sono sufficienti per ottenere una popolazione pura. La selezione basata su anticorpi anti FoxP3 è da escludersi, in quanto si tratta di un

marcatore intracellulare e comporterebbe la morte delle cellule stesse, limitandone così l'utilizzo. Recentemente nuovi protocolli basati sulla selezione con anticorpi anti CD4, CD25 e CD127 (il recettore per IL7) ha permesso la selezione di una popolazione altamente pura.

Un'altra popolazione con effetti inibitori (poco rappresentata, solo 0,2% del sangue periferico) è costituita dalle cellule T *Natural Killer* (NKT) che agiscono favorendo la generazione di cellule T<sub>reg</sub> e la produzione e il rilascio di citochine antiinfiammatorie.

Le cellule Th17 infine giocano un ruolo importante nello sviluppo e nel controllo della GVHD nonostante il loro ruolo nel contesto della GVHD non sia ancora ben chiaro.

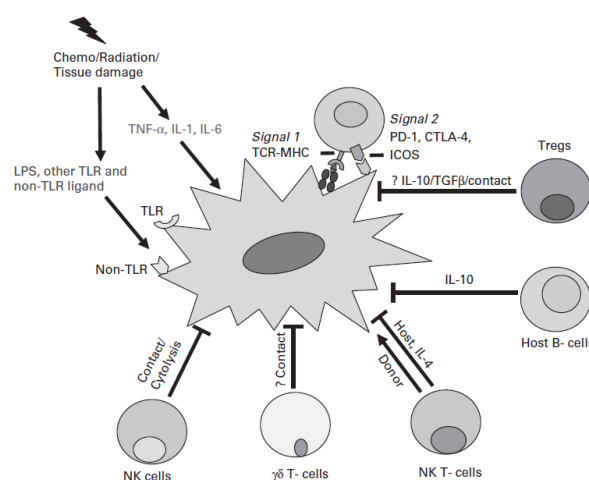


Figura 1.5: Meccanismi di interazione APC-cellule T. Come si può notare dalla figura l'interazione tra questi due tipi di cellule è aumentata o negativamente regolata da diverse citochine/chemochine e diverse popolazioni cellulari [72].

### 1.7.1 Linfociti *Helper*: Th1, Th2, Th17

I linfociti T CD4<sup>+</sup> svolgono un ruolo di particolare importanza nell'induzione della GvHD, e possono essere divisi in tre differenti *subset* a seconda della loro funzione: Th1, Th2 e Th17. I linfociti Th1, che si differenziano in presenza di IL-12, sono implicati nella regolazione dell'immunità cellulare mediante la produzione di IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , mentre i linfociti Th2, che si differenziano in presenza di IL-4 prodotta da linfociti T attivati e T regolatori, mediano l'immunità umorale e le risposte allergiche. Attraverso la produzione di IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 mediano inoltre la risposta a parassiti extracellulari.

Queste due popolazioni, deputate a funzioni differenti, sono in equilibrio l'una con l'altra, modulandosi negativamente a vicenda. Nonostante alcuni studi abbiano rilevato elevati livelli di citochine di tipo Th1 nel siero di pazienti con aGVHD [73], studi murini in cui una delle due popolazioni fosse depleta hanno messo in evidenza come sia i Th1 che i Th2 siano in grado di indurre aGVHD [70]. Il tempo e la dose delle citochine prodotte durante la GVHD costituiscono infatti fattori critici per la sua patogenesi, e la natura pleiotropica e spesso contrastante delle citochine in gioco durante le diverse fasi della malattia portano all'instaurarsi di vari effetti che alterano l'equilibrio tra le popolazioni effettrici e regolatorie.

Il ruolo di un'altra sottopopolazione di linfociti T  $CD4^+$ , i Th17, caratterizzati dalla produzione di IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, ha recentemente acquisito maggior importanza nel dibattito sulla fisiopatologia della GVHD. Studi iniziali hanno mostrato che linfociti T del donatore carenti di IL-17A aumentavano il differenziamento in Th1 ed esacerbavano la aGVHD [101], mentre studi successivi effettuati sul medesimo modello mostrarono come IL-17 contribuisca alla GVHD mediata da linfociti T  $CD4^+$  senza influire sulla sopravvivenza globale [49]. Inoltre, il trapianto di linfociti Th17 differenziati *in vitro* portava ad una forma di aGVHD letale [12] con danni severi a cute e polmoni, mentre la GVHD non veniva influenzata in seguito a delezione del fattore di trascrizione Th17-specifico ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor- $\gamma$ t*) [46], dimostrando che i Th17 sono sufficienti ma non necessari per l'induzione della GVHD. Fra i potenziali bersagli per la neutralizzazione dei linfociti Th17 vi è la citochina IL-21, implicata nella promozione dell'attivazione, differenziamento, maturazione ed espansione di questa sottopopolazione oltre che di NK, cellule B e APC. L'IL-21 aumenta i Th17 non solo aumentando direttamente la risposta Th17-mediata, ma anche inibendo le cellule Treg [28]. L'inibizione del *signaling* di IL-21 *in vivo* riduce l'aGVHD a livello intestinale in seguito a diminuzione dei Th1 ed aumento dei T<sub>reg</sub> nella mucosa intestinale [38]. Un altro approccio per la modulazione della risposta Th17 è l'inibizione di citochine implicate nella loro attivazione e differenziamento, quali IL-6, che con il TGF $\beta$  promuove il differenziamento dei linfociti T<sub>naive</sub> in Th17, mentre in loro assenza vengono invece indotti T<sub>reg</sub>, e IL-23, membro della famiglia IL-12, indispensabile per la sopravvivenza e proliferazione dei Th17.

### 1.7.2 Linfociti T regolatori ( $T_{reg}$ )

Fra le diverse sottopopolazioni di linfociti T, i linfociti T regolatori ( $T_{reg}$ ) svolgono una funzione di rilievo all'interno della fisiopatologia della GVHD. Le  $T_{reg}$  furono inizialmente identificate come una popolazione  $CD4^+$  esprimente alti livelli della catena alfa del recettore per IL-2 (CD25) in grado di sopprimere l'attivazione di altre popolazioni linfocitarie. Successivamente venne identificato il marcatore intracellulare FoxP3 *Forkhead Box Transcription Factor*, necessario e sufficiente ad indurre la capacità soppressoria delle  $T_{reg}$ . È possibile identificare due sottopopolazioni distinte di cellule T regolatorie. Le Natural  $T_{reg}$  ( $nT_{reg}$ ), che rappresentano il 5-10% dei linfociti T  $CD4$  totali e che maturano nel timo riconoscendo antigeni *self* durante la selezione negativa ed inibendo successivamente i linfociti T autoreattivi in periferia. E le *induced*  $T_{reg}$  ( $iT_{reg}$ ), generate durante l'attivazione delle cellule T in presenza di  $TGF\beta$  e IL-2, ed implicate nell'attivazione periferica dei linfociti T durante le infezioni e nella fase regolatoria in seguito ad una risposta immunitaria. La funzione dei linfociti T regolatori nella patogenesi della GVHD non è ancora del tutto chiara. Diversi lavori hanno dimostrato una diminuzione nella frequenza di  $T_{reg}$  nel sangue periferico di pazienti con alti *score* di aGVHD rispetto a quelli con bassi *score* e rispetto a pazienti che non hanno sviluppato GVHD dopo trapianto allogenico [57]. Tuttavia, non tutti gli studi presenti in letteratura sono concordi su questo tipo di correlazione. Sono infatti presenti lavori che dimostrano come frequenze maggiori di  $T_{reg}$  nel sangue periferico del donatore correlino negativamente con l'incidenza di aGVHD nel ricevente [20].

### 1.7.3 Linfociti T: fase di reclutamento

Il meccanismo di reclutamento delle cellule T nella sede del danno è di notevole importanza per comprendere al meglio il coinvolgimento di pelle, fegato e intestino nell'ambito della GVHD. Infatti nonostante siano ben noti i meccanismi di migrazione delle cellule T agli organi linfoidi secondari durante la GVHD, poco si conosce in merito alla migrazione dei leucociti a livello degli organi parenchimosi. Questo processo sembra coinvolgere cambiamenti omeostatici, in particolare nella permeabilità vascolare, nonché interazioni con integrine, recettori chemochinici e ligandi selectina-specifici [86].

Nelle fasi iniziali della GVHD le cellule T del donatore migrano velocemente alla milza

e nei tessuti linfoidei periferici, in particolare le cellule T *naive* derivanti dal donatore si localizzano a livello dei tessuti linfoidei dove le cellule alloreattive ricevono segnali di attivazione da parte delle APC e solo successivamente sono in grado di migrare ai tessuti bersaglio. Nonostante quasi tutti i tessuti dell'organismo esprimano antigeni che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario, nel caso della GVHD gli organi bersaglio sono ristretti e in particolare sono coinvolti solo tratto gastrointestinale, cute, fegato, polmoni. Questa specificità di azione delle cellule del sistema immunitario è facilmente comprensibile se si pensa che la capacità delle cellule T alloreattive di migrare in sedi specifiche è finemente regolata da combinazioni uniche di segnali che permettono il legame ligando-recettore (TCR). Nel tentativo di trovare approcci farmacologici alternativi a quelli già esistenti si è pensato di utilizzare i meccanismi di traffico delle cellule T come bersaglio farmacologico. In particolare è stato sviluppato un farmaco, FTY720, in grado di "intrappolare" le cellule T a livello degli organi linfoidei secondari e impedirne quindi la migrazione agli organi bersaglio.

#### 1.7.4 Linfociti T: fase effettrice

In seguito alla migrazione dei linfociti T ai tessuti bersaglio della GVHD, il danno tissutale può essere indotto sia attraverso un'attività citotossica diretta, sia attraverso il reclutamento di altri leucociti. Si è sempre ritenuto che la GVHD acuta fosse una patologia di tipo Th1/T citotossica sulla base di una patogenesi mediata da cellule T CD8, caratterizzata da un aumento di citochine Th1 (es. IL12, IL2 ...) e in particolare  $IFN\gamma$  che può essere facilmente rilevato nel siero di pazienti affetti da GVHD acuta. Ulteriori studi volti a comprendere meglio il coinvolgimento delle diverse sottopopolazioni linfocitarie nel corso della patogenesi della GVHD non hanno completamente chiarito il coinvolgimento delle cellule Th1/Th2. Tuttavia si ritiene che entrambe le popolazioni derivanti da cellule T del donatore siano in grado di indurre GVHD acuta. Un fattore molto importante per lo sviluppo e il mantenimento della GVHD è determinato dalla concentrazione di citochine e dal periodo di rilascio in circolazione. IL-10 ad esempio ha un ruolo centrale nella modulazione della GVHD, promuove risposte Th2 e allo stesso tempo risposte regolatorie di tipo 1 che possono essere importanti nel mantenimento della tolleranza. Produzioni elevate di IL-10 sono associate ad una ridotta incidenza e severità di GVHD, tuttavia studi nel modello murino hanno rivelato che alte dosi di IL-10 possono accelerare lo sviluppo

di GVHD, in accordo con il fatto che alte dosi di IL-10 nel siero di pazienti trapiantati sono associati ad esiti infausti del trapianto. L'esempio di IL-10 ci fa comprendere come le citochine abbiano un ruolo altamente pleiotropico e giochino un ruolo chiave nella modulazione di questa patologia così come un equilibrio tra citochine proinfiammatorie e antiinfiammatorie sia indispensabile per il mantenimento della GVHD.

### 1.7.5 Linfociti B

I linfociti T CD4 e CD8 sono da sempre considerati i principali effettori della patogenesi della GVHD, a dimostrazione di ciò i trapianti T depleti si sono dimostrati efficaci nel prevenire lo sviluppo della GVHD, al prezzo comunque di una maggior incidenza di rigetto e rischio di recidiva. Fino ad oggi la GVHD è sempre stata interpretata come una malattia T mediata e anche in campo farmacologico la maggior parte delle strategie terapeutiche si sono concentrate su questa popolazione cellulare. In realtà recenti studi sul modello animale suggeriscono un ruolo importante anche da parte delle cellule B [84].

Evidenze sperimentali supportano la tesi che le cellule B, oltre a produrre diverse classi immunoglobuliniche, possano contribuire alla risposta immune attraverso meccanismi anticorpo-indipendenti come ad esempio la presentazione dell'antigene attraverso il BCR (*B cell receptor*), la produzione di citochine e chemochine e agendo anche da cellule "immunoregatorie". La funzione di cellula presentante l'antigene è del tutto fisiologica nelle risposte immuni tradizionali, le cellule B infatti dopo attivazione attraverso il recettore BCR e recettori costimolatori (CD40) diventano delle cellule presentanti l'antigene con un ruolo molto importante. L'unico aspetto che differenzia le cellule B dalle altre APC è la loro capacità di catturare e presentare antigeni specifici attraverso il BCR. In seguito al legame con il BCR l'antigene viene internalizzato, processato ed esposto in membrana con complessi MHC di classe II o cross-presentato con molecole MHC di classe I (la cross-presentazione è un processo per cui anche antigeni esogeni, normalmente presentati da MHC II, possono essere esposti in membrana con MHC I). Le cellule B attivate sono quindi in grado di attivare la risposta T, sia CD4 che CD8, e giocano un ruolo importante nella regolazione della risposta T. Inoltre sono coinvolte nella secrezione di una grande quantità di citochine proinfiammatorie come ad esempio IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-12 e MIF (*Macrophage Inhibitory Factor*). Le cellule B tuttavia, oltre ad esplicare una forte attività immunostimolante, posseggono anche importanti funzioni immunomo-

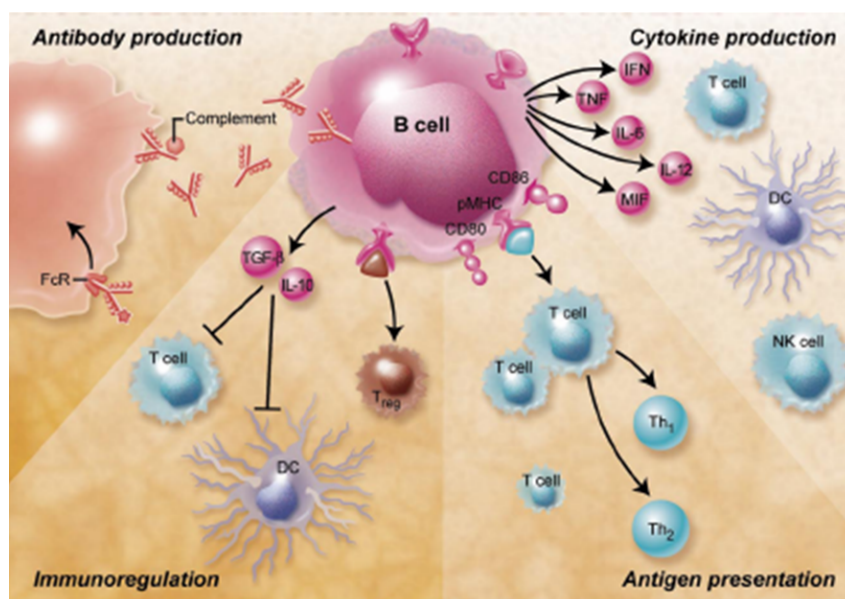


Figura 1.6: Ruolo delle cellule B nella patogenesi della GVHD [84].

dulanti. Giocano infatti un ruolo importante nel mantenimento della tolleranza periferica attraverso un'ampia gamma di meccanismi tra cui la delezione, l'induzione di anergia e la soppressione mediata da citochine. Ad esempio cellule B regolatorie sono in grado di indurre tolleranza non solo agendo come APC tollerogeniche ma anche producendo citochine immunomodulanti quali IL-10 e TGF $\beta$ .

Presi insieme questi aspetti rivelano come le cellule B posseggano una eterogeneità funzionale molto ampia e, dato il loro coinvolgimento nella patogenesi della GVHD ma anche in malattie autoimmuni, ci si è concentrati nel trovare soluzioni terapeutiche che avessero come bersaglio le cellule B. In particolare sono stati condotti studi con Rituximab, un anticorpo monoclonale anti CD20, al fine di eliminare la popolazione B linfocitaria. Il trattamento con Rituximab si è rivelato molto efficace anche in malattie che storicamente si pensava fossero T mediate, quali le malattie autoimmuni. Il trattamento con Rituximab non solo è efficace nell'eliminare le cellule B ma ha anche un'attività di down-regolazione di molecole costimolatorie quali CD40 e CD80, agendo quindi anche a livello di attivazione delle cellule T. Le cellule B si sono dimostrate una popolazione cellulare di grande importanza nella patogenesi della GVHD e quindi ottimi bersagli terapeutici per la prevenzione e il trattamento di questa malattia. Sebbene gli studi sulla deplezione delle cellule B nella GVHD abbiano mostrato buoni risultati, i meccanismi alla base di questi

effetti sono ancora poco chiari. Ad ogni modo, il trattamento con Rituximab si è rivelato piuttosto promettente, soprattutto nell'affiancare le terapie convenzionali già esistenti.

### 1.7.6 Cellule presentanti l'antigene

Le *Antigen Presenting Cells* (APC) rappresentano un gruppo di cellule in grado di esprimere sulla propria superficie l'MHC di classe II e mediare il riconoscimento dei peptidi antigenici presentati da parte dei linfociti T CD4. Tra le APC, le cellule con migliori capacità di presentare l'antigene sono le cellule dendritiche (DC), che possono dividersi in DC di origine mieloide (mDC), in grado di promuovere il differenziamento dei linfociti Th1 e la risposta citotossica dei linfociti CD8 tramite produzione di IL-12, e DC di origine plasmocitoide (pDC), in grado di stimolare i linfociti CD4 e CD8 mediante produzione di IFN $\gamma$ .

L'attivazione delle DC del ricevente avviene ancor prima del trapianto ad opera del regime di condizionamento che induce l'esposizione dei peptidi antigenici del ricevente sugli MHC di classe II, riconosciuti dai linfociti T del donatore subito dopo il trapianto. Le DC di origine del donatore assumeranno invece questa funzione solo successivamente. Dati sperimentali dimostrano come le APC di origine non ematopoietica del ricevente, ad esempio le cellule di Langerhans a livello cutaneo, siano in grado di indurre la GVHD [63], suggerendo quindi che non solo le APC di origine ematopoietica del donatore e del ricevente, ma anche le APC residenti del ricevente siano coinvolte nella patogenesi della malattia. Il segnale attivatorio nei confronti dei linfociti T avviene attraverso due modalità: la prima è l'interazione tra il complesso MHC-allopeptide sull'APC e il TCR sul linfocita T. La seconda, critica per l'attivazione, proliferazione, differenziamento e sopravvivenza dei linfociti T e per l'induzione della GVHD, è il co-stimolo. Il blocco *in vivo* delle molecole del co-stimolo (CD28, CD40, ICOS, CD30, 4-1BB e OX40) porta ad una riduzione della GVHD [45], mentre il blocco dei segnali inibitori del co-stimolo quali PD-1 (*Programmed Death 1*) e CTLA-4 portano all'aumento della GVHD in modelli murini [7].

## 1.8 Trattamento della GVHD acuta

La forma acuta della *Graft Versus Host Disease* è la principale causa di mortalità associata al trapianto. La mortalità è dovuta non solo alla aGVHD stessa, ma anche alle

complicazioni associate al suo trattamento, essendo queste responsabili di un profondo stato di immunodeficienza che causa l'insorgere di infezioni opportunistiche. L'obiettivo principale rimane tutt'ora quello di prevenire l'insorgenza di questa complicanza. Tuttavia, ad oggi, non è ancora possibile distinguere l'effetto dannoso *Graft Versus Host* da quello benefico *Graft Versus Tumor*: questo spiega perché sia difficile definire una strategia ottimale di trattamento e prevenzione della GVHD. Una volta che la complicanza si manifesta clinicamente, il più importante predittore della sopravvivenza a lungo termine è la risposta primaria alla terapia, dato che trattamenti di seconda linea hanno sempre dato scarsi risultati.

### 1.8.1 Prevenzione della GVHD

- **Immunosoppressione post trapianto:** Generalmente la terapia immunosoppressiva post trapianto prevede una combinazione di un inibitore della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) con metotrexate (un analogo dell'acido folico) per brevi periodi. Sebbene siano stati proposti regimi alternativi, questo regime farmacologico standard, descritto già vent'anni fa, ha dimostrato di riuscire a mantenere un buon equilibrio tra GVHD e GVT in trapianti tra fratelli compatibili dopo condizionamento mieloablativo. Per gruppi di pazienti ad alto rischio o gruppi di pazienti che ricevono trapianti non convenzionali (come trapianti da donatori non compatibili, pazienti anziani, regimi di condizionamento a ridotta intensità etc...), la migliore profilassi non è ancora stata definita e possono essere utilizzate altre terapie immunosoppressive. In particolare, sirolimus (un macrolide, blocca l'attivazione di linfociti B e T) in combinazione con tacrolimus e basse dosi di metotrexate o tacrolimus da solo hanno dimostrato un buon attecchimento del trapianto e una ridotta mortalità associata al trapianto (*Transplant Related Mortality*, TRM). L'efficacia del micofenolato mofetile (MMF) associato con ciclosporina è stato studiato prevalentemente nel contesto di regimi di condizionamento a ridotta intensità. In questo caso il MMF potrebbe sostituire il metotrexate nella combinazione standard con ciclosporina data la sua maggiore tollerabilità e un minor rischio di sviluppare mucositi. Il metilprednisone (che causa linfolisi mediata da legame a recettore) rappresenta la prima linea di trattamento per la GVHD ma il suo ruolo nella prevenzione della stessa è tutt'ora controverso. Diverse combinazioni di prednisone con

metotrexate, ciclosporina o entrambi hanno dimostrato scarso beneficio.

- **Deplezione dei linfociti T *in vitro* o *in vivo*:** nel caso di pazienti che ricevono un trapianto da donatore non compatibile è generalmente richiesto un grado di immunosoppressione maggiore. Una strategia alternativa a quella sopracitata consiste nella deplezione dei linfociti T *ex vivo* o *in vivo*, mediante farmaci quali ATG (*Anti-Thymocyte Globulin*) o alemtuzumab (un anticorpo monoclonale diretto contro il CD52). In generale queste strategie riducono l'incidenza di GVHD ma aumentano il rischio di infezioni opportunistiche, dovuto ad un ritardo nella ricostituzione del sistema immunitario, e di ricaduta (dovuta ad una diminuzione dell'effetto GVT). Sono stati condotti diversi studi per paragonare l'efficacia della T deplezione, tuttavia nessuno è stato in grado di dimostrarne l'efficacia nel migliorare la sopravvivenza a lungo termine.

### 1.8.2 Terapia

Il predittore più importante della sopravvivenza a lungo termine è la risposta al trattamento di prima linea per la GVHD. Il metilprednisone a 2mg/kg/die rappresenta la terapia di prima linea per la aGVHD. Questo trattamento farmacologico, associato con un inibitore della calcineurina, viene mantenuta dai 7 ai 14 giorni per poi essere scalato lentamente se vi è una completa risposta alla terapia. Tra il 25 e il 40% dei pazienti con aGVHD di grado II-IV ottengono una risposta completa alla terapia steroidea di prima linea. Tuttavia, la probabilità di risposta diminuisce con l'aumentare della severità della GVHD, inoltre il tipo di risposta alla terapia può variare anche in funzione dell'organo colpito e da paziente a paziente. Un fallimento della terapia viene definito se il paziente va incontro a progressione dopo 3 giorni, oppure non vi sono cambiamenti dopo 7 giorni, o ancora si ottiene una risposta incompleta dopo 2 settimane di trattamento.

Un fallimento nel trattamento di prima linea comporta inevitabilmente un trattamento secondario. Sono state testate diverse strategie farmacologiche ma ad oggi non sono disponibili criteri che identifichino i pazienti che risponderanno o meno ad un trattamento di seconda linea. In generale, i trattamenti di seconda linea danno risultati poco incoraggianti: il tasso di risposta varia dal 35 al 70% con una sopravvivenza a 6-12 mesi che tocca il 30%, dato l'insorgere di complicanze infettive o riattivazione della GVHD. Purtroppo il trattamento della GVHD refrattaria alla terapia steroidea non ha fatto molti

progressi nell'ultima decade e sono tuttora in studio strategie farmacologiche alternative per la gestione di questa complicanza.

### 1.8.3 Nuovi farmaci

Nel ultimi anni sono stati fatti pochi passi avanti nella terapia della GVHD, in particolare nel caso di quella refrattaria al trattamento con steroidi, dove si raggiunge anche il 70% di mortalità [96]. I farmaci in uso in pratica clinica includono molecole in grado di interferire con l'attività dei linfociti T, in particolare inibitori della calcineurina (ciclosporina A e FK506), antimetaboliti (MMF), e farmaci linfotossici quali steroidi, globuline anti-timociti, anticorpi specifici e ciclofosfamide. Nonostante la loro utilità per la prevenzione e la terapia della GVHD, tuttavia nessuno di essi è del tutto efficace. Si rendono quindi necessari nuovi farmaci in grado di bersagliare vie di segnale alternative coinvolte nella patogenesi della GVHD.

Una nuova interessante classe di farmaci è rappresentata dagli inibitori delle protein chinasi: la protein chinasi C (PKC) infatti è cruciale per l'attivazione e la sopravvivenza delle cellule T ed è stato dimostrato come PKC $\theta$  sia necessaria per l'alloreattività e l'induzione della GVHD ma non per la GVT o la risposta ad infezioni virali [92]. L'inibitore disponibile, AEB071, diminuisce la produzione di IL-2 e IFN $\gamma$  da parte dei linfociti T ed aumenta la sopravvivenza globale in seguito ad allotrapianto nel modello animale. Analogamente, sono emersi anche farmaci inibitori delle tirosin chinasi. Tra questi ad esempio l'Imatinib, usato nel trattamento della leucemia mieloide cronica, dimostra un significativo effetto anti-GVHD, soprattutto nel caso della forma cronica.

Un approccio farmacologico alternativo si basa sull'inibizione dei segnali di trasduzione indotti da citochine, il cui ruolo infiammatorio risulta cruciale per la patogenesi della aGVHD. In particolare, le Janus chinasi (JAK) sono proteine con attività tirosin chinasi che inducono una cascata di segnale intracellulare in seguito al legame di citochine con recettori specifici. A livello citoplasmatico la forma latente delle proteine STAT si attiva in seguito a fosforilazione da parte delle proteine JAK. In modelli preclinici, piccoli inibitori di JAK3 quali WHI-P131 si sono dimostrati efficaci nel ridurre la letalità legata alla GVHD senza comunque inibire l'effetto GVT. Inoltre, l'inibizione di JAK2 ha mostrato *in vitro* effetti tollerogenici su cellule T stimulate da DC allogeneiche, pur conservando la normale risposta antigenica. Fra i farmaci JAK-inibitori, quello di maggior successo è

sicuramente il CP690-550, la cui somministrazione comporta una riduzione dei linfociti T CD8. La scoperta di mutazioni *gain of function* di JAK2 in malattie linfoproliferative ha portato allo sviluppo di diversi inibitori di questa specifica tirosin chinasi quali il Lastaurtinib, XL019 e Ruxolitinib. Quest'ultimo in realtà è un inibitore selettivo sia di JAK1 che di JAK2 ed è approvato dalla FDA per il trattamento della policitemia vera e della mielofibrosi.

Altre strategie immunosoppressive si basano ad esempio sull'inibizione del proteasoma mediante Bortezomib: in questo modo viene inibita la via di segnalazione di NF-KB (*Nuclear Factor Kappa B*) causando una deplezione specifica dei soli linfociti alloreattivi, permettendo la sopravvivenza dei linfociti T regolatori ed attenuando il differenziamento mediato da IL-6.

Un strategia alternativa potrebbe essere anche la modulazione del traffico dei linfociti T: l'inibizione dell'*homing* dei linfociti T nei tessuti infiammati potrebbe essere infatti effettuata andando ad agire su uno dei quattro stadi della migrazione ovvero il rotolamento, l'interazione chemochina-recettore, l'adesione all'endotelio e la migrazione in risposta alla sfingosina 1 fosfato (S1P, *Sphingosine 1 phosphate*).

### 1.8.3.1 La via di segnalazione JAK-STAT

Le Janus Kinasi (JAK) sono una famiglia di tirosin chinasi non recettoriali che in risposta a stimolazione da parte di citochine trasducono un segnale attraverso la via Jak-STAT. Le JAK hanno una dimensione variabile tra i 120 e i 140 KDa e presentano sette domini di omologia JAK conservati (JH, *JAK Homology*): le due regioni JH carbossil terminali rappresentano i domini chinasi e pseudochinasi (JH1 e JH2), i quattro domini JH amino terminali (metà di JH4, JH5, JH6 e JH7) costituiscono il dominio FERM che media l'associazione dei recettori, mentre il restante dominio SH2 (costituito da JH3 e metà di JH4) presenta funzione non nota. In modo simile alle altre tirosin chinasi l'attivazione è iniziata dalla fosforilazione di tirosine specifiche nel loop di inattivazione, dopodiché l'associazione delle JAK avviene su domini box1/box2 vicini alla membrana ricchi in prolina. La famiglia delle JAK chinasi presenta quattro membri: JAK1, JAK2, JAK3 e la tirosin chinasi TYK2. Quest'ultima è solitamente associata ai recettori citochinici per IFN-I, IL-6 e IL-10, svolgendo un ruolo nella risposta immunitaria di tipo Th2 e contribuendo all'effetto letale delle endotossine attraverso un *pathway* STAT-1 indipendente. JAK1 è

associata a recettori di IFN di tipo I ( $\text{IFN}\alpha/\beta$ ), di tipo II ( $\text{IFN}\gamma$ ), ai recettori di IL-2 e IL-6. JAK2 invece è implicata nella risposta alle famiglie di recettori a singola catena (Epo-R, GH-R, PL-3) ed IL-3, oltre che alla famiglia del recettore dell' $\text{IFN}\gamma$ . Studi più approfonditi hanno dimostrato che il legame del ligando al recettore porta alla dimerizzazione delle due subunità e alla trans-fosforilazione di JAK2. JAK3 infine, è una tirosin chinasi specifica dei leucociti JAK3 che si associa esclusivamente con la catena  $\gamma$  del recettore di IL-2: questa catena costituisce un componente importante dei recettori di diverse citochine linfotropiche, incluse IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, e mutazioni in questa catena o in JAK3 portano a severe immunodeficienze combinate.

Le protreine trasduttrici dei segnali e attivatrici della trascrizione (STAT, *Signal Transducers and Activator of Transcription*) sono proteine che presentano fra di loro alti livelli di omologia in alcune regioni, tra le quali il dominio SRC2 (SH2) essenziale per la dimerizzazione delle proteine STAT, il dominio di legame al DNA ed un dominio di trans-attivazione posto all'estremità carbossil terminale. Nell'uomo sono state identificate 7 STAT: STAT1, 2, 3, 4, STAT5A/B e STAT6. La via di segnalazione JAK/STAT rappresenta una via di trasduzione del segnale condivisa da numerose citochine, che in seguito al legame con una o più subunità del proprio recettore ne inducono la dimerizzazione portando all'avvicinamento delle JAK ad esso costitutivamente associate ed alla loro attivazione per trans-fosforilazione. In seguito alla loro attivazione le JAK fosforilano i residui di tirosina presenti sulla coda citoplasmatica dei recettori citochinici creando dei siti di reclutamento per le STAT: queste proteine citoplasmatiche vengono poi fosforilate dalle JAK chinasi ed in seguito a dimerizzazione traslocano a livello nucleare, dove agiscono come fattori di trascrizione promuovendo l'espressione di geni specifici. La via di segnalazione JAK/STAT è principalmente coinvolta nella trasmissione di segnali di sopravvivenza o apoptosi, proliferazione o differenziamento cellulare. Questa via di segnalazione svolge inoltre un ruolo preponderante nel controllo delle risposte immunitarie e nel differenziamento delle diverse popolazioni leucocitarie nelle rispettive sottopopolazioni in funzione del contesto in cui si trovano. Alterazioni di questa via sono riscontrabili in molti disordini immuni, infiammatori e disordini ematopoietici di natura neoplastica.

### 1.8.3.2 CP-690-550

Il CP-690,550, o Tofacitinib, è un inibitore selettivo della chinasi JAK3 ma mostra una modesta attività inibitoria anche nei confronti di JAK1 (IC<sub>50</sub> 1 nM e 112nM rispettivamente) [16]. Risultati ottenuti da uno studio di fase III condotto su pazienti con artrite reumatoide hanno dimostrato una spiccata attività antinfiammatoria del farmaco e una significativa riduzione del numero di neutrofili, principali effettori del danno cellulare [65]. Il CP-690,550 ha dimostrato una discreta efficacia anche in altri disordini immunomeditati quali la psoriasi, il morbo di Crohn e in studi di prevenzione del rigetto di trapianto d'organo ed è attualmente in uso in alcuni *trial* clinici di fase II [9, 15]. Recentemente, uno studio condotto su un modello murino di GVHD acuta ha dimostrato l'efficacia immunomodulante di questa molecola: topi trattati con l'inibitore di JAK3 hanno mostrato un'aumentata sopravvivenza rispetto ai controlli. In particolare l'aumento della sopravvivenza sembra essere associato ad una riduzione delle cellule T Natural Killer e all'inibizione della produzione di citochine effettrici [74]. Ad oggi purtroppo il meccanismo d'azione del farmaco non è del tutto noto, come discusso in precedenza è un inibitore selettivo della chinasi JAK3 ma mostra una capacità inibente, seppure ridotta, anche nei confronti di JAK1. *In vivo* il farmaco è in grado di inibire la polarizzazione IL-4 dipendente dei T linfociti CD4 *naïve* a Th2 ed interferisce anche con il differenziamento delle cellule Th17 bloccando la segnalazione cellulare associata alle citochine JAK1 e JAK3 dipendenti (IL-1, IL-6 e IL-23) e sopprimendo l'espressione di geni STAT1 dipendenti [36]. Altri studi hanno invece dimostrato come il CP-690,550 impedisca il differenziamento Th1 prevenendo l'attivazione a monte di STAT1 e riducendo significativamente il numero di cellule secernenti IFN $\gamma$  [74]. Dati questi presupposti, questo farmaco si propone quindi come un ottimo candidato per l'inibizione di risposte alloreattive, in particolare nel contesto di aGVHD.

### 1.8.3.3 INC-424

L'INC-424 (meglio conosciuto come INCB018424 o Ruxolitinib) è un potente inibitore orale di JAK1 e JAK2 sperimentale che presenta una selettività 100 volte maggiore rispetto alle altre kinasi non-JAK e che è in sperimentazione per la cura di malattie neoplastiche mieloproliferative [58, 77]. Nonostante non sia del tutto noto, il suo meccanismo d'azione comprende l'attenuazione della via di trasmissione del segnale citochinico tramite l'inibi-

zione di JAK1 e JAK2, portando ad effetti antiproliferativi e proapoptotici: INC-424 si lega infatti al sito catalitico di legame dell'ATP di queste chinasi impedendone l'idrolisi e bloccando l'attività fosforiltransferasica della kinasi. INC-424 presenta un rapido assorbimento orale ed un'esposizione sistemica proporzionale alla dose. Presenta inoltre una *clearance* ed un volume di distribuzione moderati, con un'emivita plasmatica di eliminazione di circa 3 ore. L'accumulo di farmaco dopo somministrazioni multiple è minimo. Il trattamento con INC-424 porta alla manifestazione di una tossicità a livello ematologico che comporta trombocitopenia e anemia, riducibili attraverso il controllo del dosaggio, l'interruzione del trattamento o trasfusioni di sangue. L'INC-424 si è dimostrato efficace nella cura della mielofibrosi, una delle neoplasie mieloproliferative croniche più gravi [95]. Questo farmaco, registrato da parte della FDA per il trattamento di questa malattia [24], porta ad una significativa riduzione della splenomegalia e ad un miglioramento dei sintomi cronici. Nonostante questo farmaco si sia dimostrato efficace nella cura di diverse malattie mieloproliferative, la sua azione terapeutica non è sufficiente a garantire una remissione completa, e per questo motivo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche rimane la scelta terapeutica di elezione. E' stata inoltre riscontrata una minore attività inibente nei confronti di altre Janus kinasi, quali TYK2 e JAK3 [83], rendendo questo farmaco un candidato ideale per la terapia di altre malattie oncologiche, per l'artrite reumatoide e la psoriasi [30, 33, 53]. L'INC-424 è inoltre in grado di bloccare la migrazione dei linfociti T in periferia attraverso l'inibizione del segnale  $\text{IFN}\gamma\text{-IFN}\gamma\text{R}$  e la down-regolazione del recettore chemochinico CXCR3, fornendo una possibile spiegazione del suo meccanismo d'azione in un contesto GVHD [18]. Inoltre, un ulteriore meccanismo d'azione prevede l'inibizione dell'attivazione delle DC sia *in vitro* che *in vivo* [41].

## 1.9 Biomarcatori

Ad oggi la diagnosi di GVHD acuta è basata su criteri clinici che possono essere confermati mediante biopsia di uno degli organi bersaglio (cute, tratto gastrointestinale o fegato). La gravità della GVHD viene valutata con un punteggio che va da I a IV utilizzando un sistema di *score* basato sulla valutazione degli organi bersaglio coinvolti, con tassi di mortalità maggiori associati a punteggi più alti (in particolare gradi II-IV). Purtroppo ad oggi non sono disponibili test diagnostici validati per la GVHD acuta, sebbene diversi studi abbiano descritto la presenza di specifiche proteine associate allo sviluppo

della complicità [73]. Questo sottolinea quindi la necessità di trovare nuovi marcatori di malattia, in particolare biomarcatori “predittivi” dello sviluppo di aGVHD al fine di poter diagnosticare a tempistiche precoci lo sviluppo della complicità, fornendo così ai clinici una finestra temporale per intervenire con terapie mirate atte a spegnere la risposta alloreattiva.

Recenti lavori volti alla ricerca di molecole associate all’insorgenza di aGVHD dimostrano come aumentate concentrazioni di  $\text{TNF}\alpha$  durante il condizionamento pre-trapianto siano predittive nei confronti della GVHD [81], così come aumentati rapporti tra le concentrazioni di  $\text{TNF}\alpha$  pre e post HSCT sono predittivi di aGVHD nel contesto mieloablativo [50, 19, 97]. Oltre al TNF, sono state indagate anche altre proteine e citochine coinvolte nella aGVHD. In particolare, elevate concentrazioni di IL-6 durante le prime 3 settimane post trapianto sembrano predire la GVHD [59], così come alterazioni nei livelli di CD40L, CD8 e IL-2R sulla superficie dei linfociti T citotossici a 2 settimane da trapianto sembrano associate ad successivo sviluppo di GVHD [3]. Tuttavia, i risultati di questi studi non sono concordi tra loro e si limitano a proporre proteine semplicemente associate alla aGVHD ma che non sono mai state validate come biomarcatori.

Recenti studi proteomici condotti all’Università del Michigan hanno portato all’identificazione di un pannello di 4 proteine informative con significato diagnostico:  $\text{TNFR-1}$ ,  $\text{IL2-2R}\alpha$ , IL-8 e HGF [73]. Queste proteine sono state rilevate all’insorgere della complicità ma non sono predittive dello sviluppo della aGVHD, ciononostante, risultano associate con l’*outcome* clinico e con la prognosi. Gli stessi ricercatori hanno inoltre scoperto dei biomarcatori organo specifici per gli organi bersaglio della GVHD che permettono la distinzione tra le diverse forme di GVHD acuta [72, 40].

### 1.9.1 I microRNA

I microRNA (definiti anche miRNA) sono piccole molecole lunghe circa 22 nucleotidi derivanti da trascritti endogeni con una classica forma a forcina (*hairpin*). La loro azione è quella di regolare l’espressione genica legandosi al 3’ non tradotto (3’ UTR) dell’mRNA bersaglio. I miRNA maturi e le proteine Argonauta (Ago) formano insieme il complesso ribonucleoproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) che ha il compito di mediare il silenziamento genico post trascrizionale. Il complesso RISC favorisce l’appaiamento di basi complementari tra il miRNA e il suo RNA messaggero bersaglio: nel caso di un

perfetto appaiamento miRNA-mRNA si assiste ad una degradazione dell'mRNA bersaglio, mentre un appaiamento imperfetto risulta in una semplice downregolazione (vedi figura 1.7). Oltre un terzo dei geni umani è ritenuto essere bersaglio diretto di miRNA; studi recenti di proteomica e analisi in silico (previsione di *target* basata su diversi algoritmi bioinformatici) hanno tra l'altro evidenziato il fatto che un singolo miRNA può avere anche centinaia di mRNA bersaglio. Ad oggi il *database* dei microRNA (miRbase) contiene le

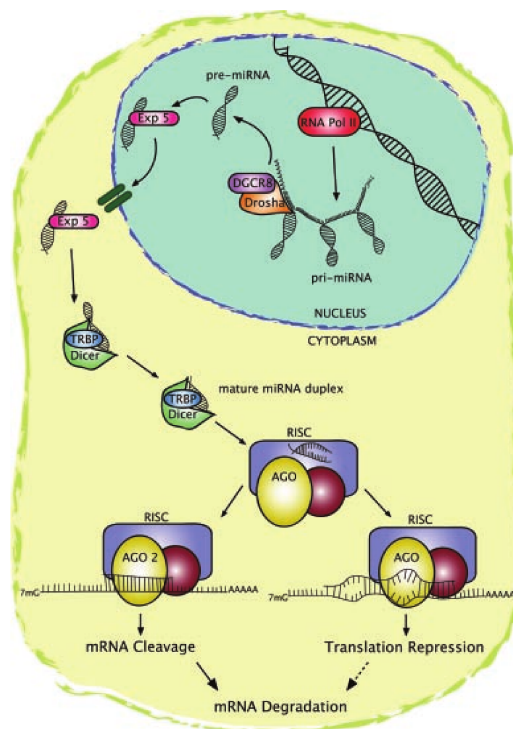


Figura 1.7: Biogenesi dei microRNA: una volta maturi vanno ad agire sul mRNA bersaglio in modo differente a seconda della qualità dell'appaiamento [71].

sequenze di circa un migliaio di microRNA umani e centinaia di altre specie come ad esempio *C. Elegans*, *Drosophila Melanogaster*, *Zebrafish* etc ...

Sorprendentemente circa il 55% dei geni di *C. Elegans* possiede il corrispettivo omologo nell'uomo, a testimonianza dell'importanza di queste molecole nel corso dell'evoluzione. La maggior parte dei miRNA espressi nei mammiferi presenta diverse isoforme (definiti paraloghi), probabilmente in seguito a processi di duplicazione genica che sono avvenuti nel corso dell'evoluzione. Per esempio nel genoma umano si ritrovano 12 *loci* per la famiglia del miRNA "let-7". I paraloghi spesso presentano la stessa sequenza in posizione

2-7 all'estremità 5' dell'mRNA: questi sei nucleotidi sono indispensabili per l'appaiamento, sono infatti definiti "*seed region*", pertanto si ritiene che l'azione dei miRNA paraloghi sia ridondante. Tuttavia dato che le sequenze al 3' del miRNA contribuiscono al legame con l'mRNA bersaglio e il profilo di espressione di questi paraloghi è spesso differente, si pensa che i membri della stessa "*seed family*" possano avere ruoli distinti in vivo. I geni che codificano per i miRNA possono essere indipendenti, ovvero presentare un promotore e siti di regolazione autonomi, oppure essere localizzati nel genoma in *cluster*, in regioni intergeniche o nelle sequenze introniche di specifici geni [71]. In particolare circa il 50% dei loci codificanti per miRNA sono localizzati in prossimità di altri microRNA: in questo modo viene a definirsi un *cluster* di miRNA che sono trascritti da una singola unità policistronica. In rari casi invece i miRNA sono autonomi e sono sotto il controllo di specifici promotori genici. Inoltre circa il 40% dei miRNA sono localizzati in regioni introniche di trascritti non codificanti, mentre il 10% di essi è presente in regioni esoniche di unità trascrizionali non codificanti. I miRNA localizzati in unità trascrizionali che codificano per proteine non sono pochi, rappresentano circa il 40% dei miRNA, e sono localizzati generalmente a livello intronico (vedi figura 1.8).

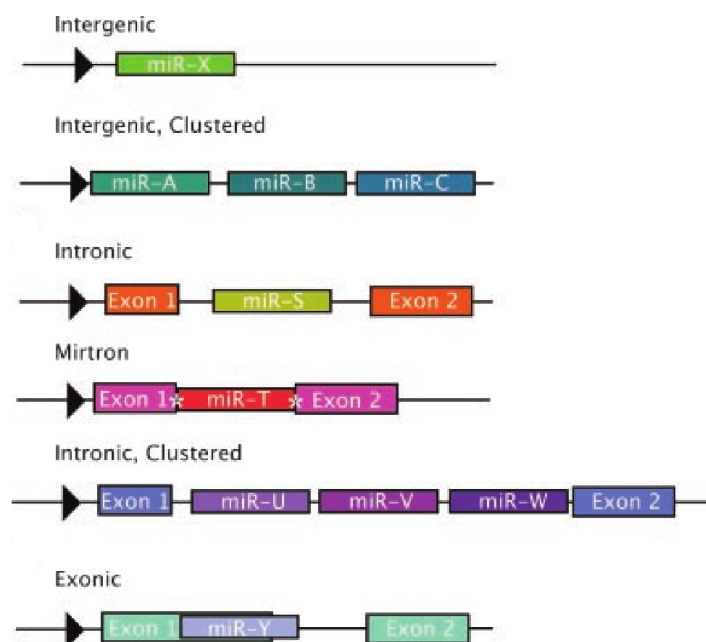


Figura 1.8: Localizzazione genomica dei microRNA [71].

La trascrizione della maggior parte dei miRNA è mediata dalla RNA polimerasi II (RNA Pol II), sebbene un gruppo minore di miRNA che sono associati a ripetizioni Alu possono essere trascritti dalla RNA polimerasi III. Ognuna delle polimerasi viene regolata in maniera differente e riconosce promotori della trascrizione ed elementi di terminazione specifici, permettendo così una regolazione molto fine della loro trascrizione in specifiche condizioni e in determinati tipi cellulari. È interessante notare che l'espressione di alcuni miRNA è sotto il controllo di fattori di trascrizione quali p53 (coinvolto nel processo di apoptosi), c-Myc (un oncogene), o dello stato di metilazione della regione a monte del sito di inizio della trascrizione.

Sebbene si conosca molto bene il processo di regolazione genica da parte dei microRNA, si conosce ancora poco in merito alla regolazione dei microRNA stessi. Queste piccole molecole sono comunque coinvolte in diversi processi cellulari tra cui l'omeostasi cellulare, lo sviluppo, l'apoptosi, nonché in processi più complessi come ad esempio lo sviluppo embrionale, la crescita, il differenziamento cellulare, lo sviluppo di tumori. I microRNA sono molecole che giocano un ruolo molto importante nella patogenesi di diverse malattie, in particolare nello sviluppo di neoplasie. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo chiave di queste molecole nell'ematopoiesi e anche in seguito a trapianto di organi solidi: per questo motivo il nostro studio si è incentrato sull'analisi di microRNA circolanti nel plasma di pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche. È stata posta particolare attenzione al coinvolgimento dei microRNA nella ricostituzione immune post trapianto e al loro ruolo nello sviluppo della GVHD.

#### 1.9.1.1 Biogenesi dei miRNA

I trascritti primari denominati pri-miRNA e generati (solitamente) dalla RNA Polimerasi II sono lunghi generalmente diverse chilobasi e contengono delle specifiche strutture a forcina di 33 paia di basi (bp), un *loop* terminale e due regioni fiancheggianti a singolo filamento a monte e a valle della struttura a forcina. La porzione a doppio filamento e le regioni a singolo filamento risultano critiche per il successivo legame a proteine necessarie per il processamento. Il primo passaggio nella maturazione del miRNA consiste nel taglio del pri-miRNA e nel rilascio di una piccola forcina che acquisisce quindi il nome di pre-miRNA. Questa reazione avviene nel nucleo ad opera della proteina Drosha, una proteina nucleare della famiglia delle RNasi III, insieme al cofattore DGCR8 che contiene

due domini leganti l'RNA a doppi filamento essenziali per il processamento del miRNA. Insieme ad essa Drosha forma un macrocomplesso meglio conosciuto come “complesso microprocessore” di circa 650 KDa (vedi figura 1.9).

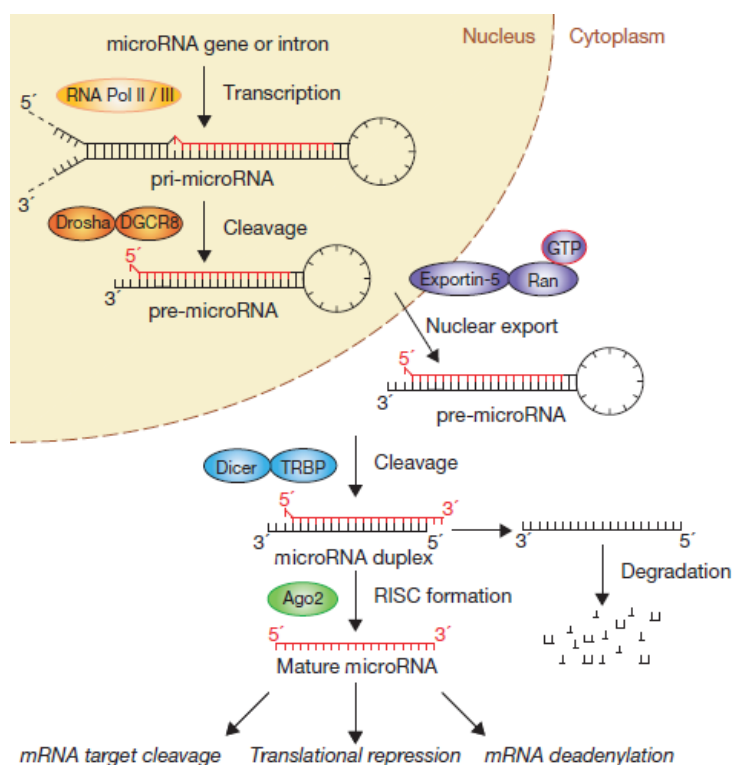


Figura 1.9: Meccanismo di produzione e processamento dei microRNA [98].

I due domini di Drosha con attività RNAsica tagliano le porzioni al 5' e al 3' del pri-miRNA, mentre il legame di DGCR8 consente di terminare con precisione il sito di taglio grazie alla sua interazione con il pri-miRNA. Il taglio effettuato dalla proteina Drosha avviene cotrascrizionalmente e precede lo *splicing* dell'RNA ospite codificante o non che contiene il miRNA. Il processamento dei pri-miRNA da parte di Drosha è regolato da meccanismi miRNA specifici. Drosha fa parte di due complessi, uno minore formato solo da Drosha e DGCR8 e che processa diversi tipi di miRNA, e un complesso maggiore contenente RNA elicasi, proteine che legano RNA a doppio filamento, diverse ribonucleoproteine e proteine del sarcoma di Ewing. Le elicasi p72 e p68 fanno parte del complesso maggiore Drosha e potrebbero agire da fattori di specificità per il processamento di un *subset* di pri-miRNA (vedi figura 1.10).

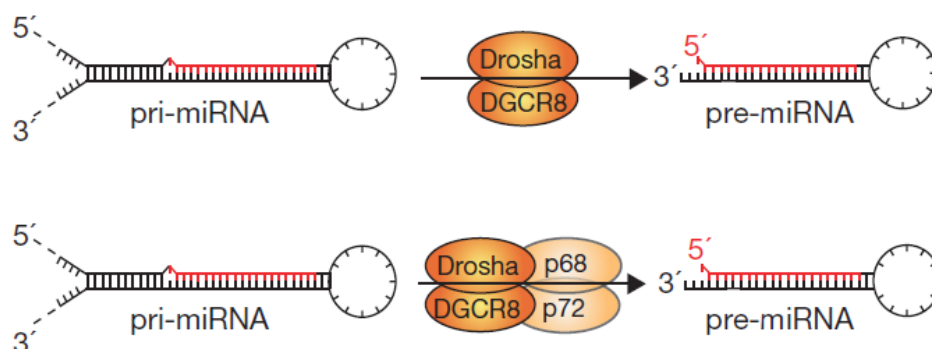


Figura 1.10: Interazione della proteina DROSHA con il pre-miRNA e processamento [98].

I fattori che processano i miRNA sono regolati sia a livello post trascrizionale che post traduzionale. La proteina DGCR8 stabilizza Drosha mediante un'interazione tra il suo dominio carbossi-terminale conservato e il dominio centrale di Drosha. Quest'ultima, viceversa, taglia due strutture a forcina nella regione 5' non tradotta e nella sequenza codificante dell'mRNA del gene *Dgcr8*. La conseguente degradazione dell'mRNA di *Dgcr8* determina un meccanismo di *feedback* negativo che riduce l'espressione di DGCR8 quando è presente una quantità sufficiente di proteine per il microprocessamento dei pri-miRNA (vedi figura 1.11). Il processamento nucleare ha come esito la produzione del pre-miRNA:

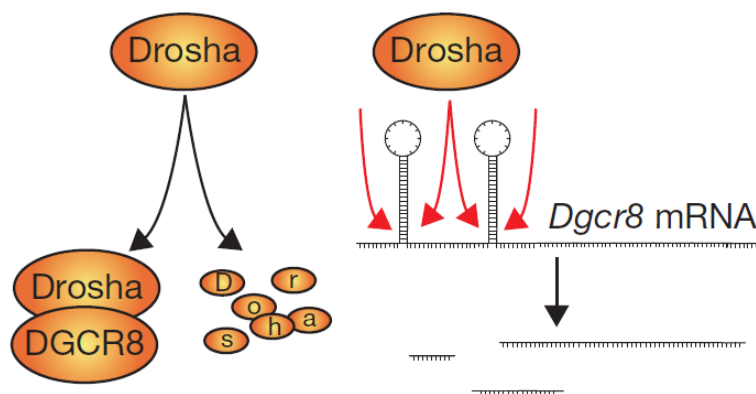


Figura 1.11: Meccanismo di regolazione di *Dgcr8* da parte della proteina DROSHA [98].

esso viene esportato nel citoplasma dalla proteina Esportina 5 (EXP5) complessata con Ran-GTP. Originariamente la proteina EXP5 è stata identificata come recettore per il trasporto nucleare di tRNA, solo in seguito si è rivelata la proteina essenziale per il tra-

sporto dei miRNA processati dal nucleo al citosol. EXP5, così come gli altri recettori per il trasporto nucleare, lega in modo cooperativo il suo cargo e il complesso Ran-GTP nel versante nucleare; solo dopo l'idrolisi del GTP a GDP è permesso il rilascio del cargo a livello del citoplasma (vedi figura 1.9). In seguito all'esporto nel citoplasma i miRNA vengono processati dal complesso RLC (*RISC loading complex*), un complesso multiproteico costituito da Dicer, una proteina legante l'RNA a doppio filamento denominata TRBP (*TAR RNA binding protein*), la proteina PACT (*protein activating PKR*), e dal componente Argonauto2. La formazione del complesso RLC inizia nell'uomo con l'assemblaggio di Dicer, TRBP e Ago2, indipendentemente dall'idrolisi dell'ATP. Il pre-miRNA si lega al RLC solo dopo la formazione di questo macrocomplesso (vedi figura 1.12). Una volta

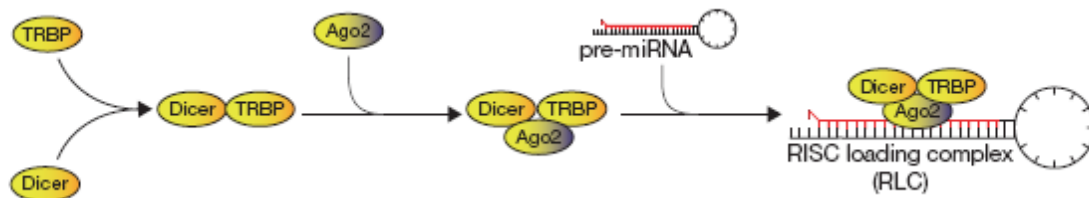


Figura 1.12: Processamento dei microRNA da parte del complesso RLC [98].

formatosi il complesso proteico contenente il pre-miRNA e Dicer, quest'ultimo taglia via il loop terminale del pre-miRNA generando un oligonucleotide di RNA a doppio filamento lungo circa 22 paia di basi. Questa molecola, il miRNA maturo, possiede estremità protrudenti di 2 nucleotidi al 3' di ciascun filamento. L'attività di Dicer è finemente regolata, TRBP infatti può legarsi al dominio elicastico di Dicer ed attivarlo in seguito ad un cambiamento conformazionale. Dopo il taglio TRBP e Dicer si dissociano dal miRNA a doppio filamento in quanto è necessario che i due filamenti di RNA vengano separati affinché si possa determinare la formazione del complesso RISC attivo in grado di effettuare il silenziamento genico. In seguito alla separazione uno dei due filamenti andrà a costituire il filamento guida, quello in grado di appaiarsi all'mRNA bersaglio, l'altro invece viene denominato filamento passeggero e verrà in seguito degradato. Studi su siRNA hanno rivelato che la stabilità termodinamica delle due estremità del *duplex* determina quale dei due filamenti venga selezionato: il filamento con la coppia di basi meno stabile all'estremità 5' entra a far parte del complesso RISC. Le proteine Argonauto (Ago) svolgono molteplici funzioni nella biogenesi dei miRNA. Esse infatti sono le proteine effet-

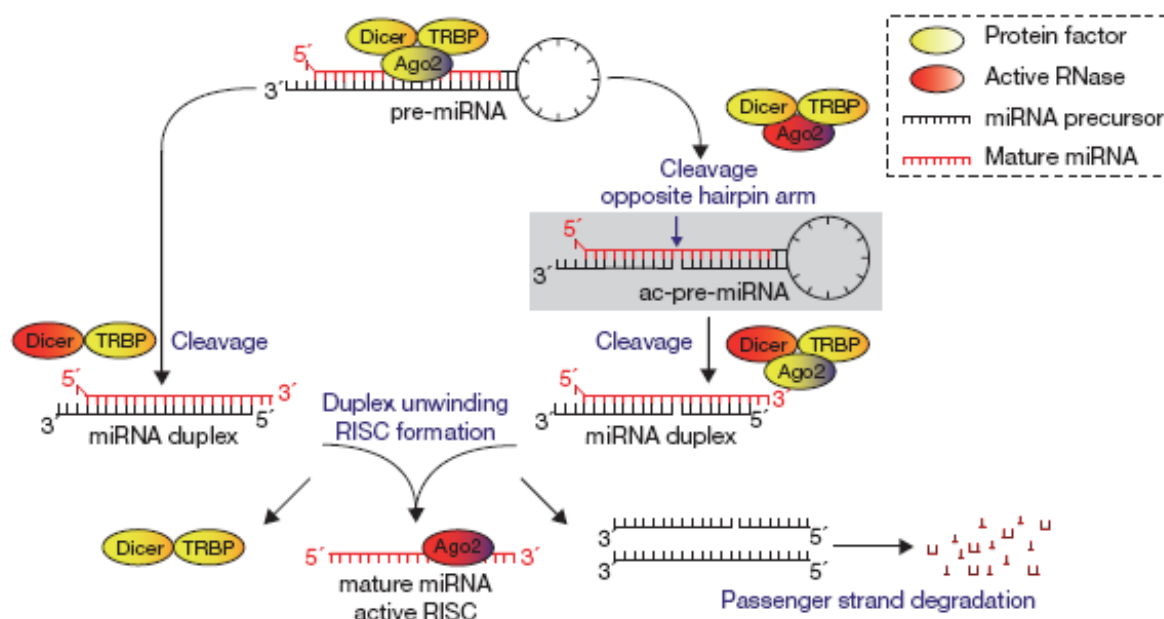


Figura 1.13: Meccanismo di formazione del miRNA maturo in grado di svolgere la sua attività catalitica [98].

trici del complesso RISC che mediano la degradazione, la destabilizzazione, o l'inibizione della traduzione dell'mRNA bersaglio. Inoltre le proteine Ago regolano con un meccanismo post-trascrizionale l'abbondanza dei miRNA nella cellula in quanto una perdita di Ago2 riduce l'espressione e l'attività dei miRNA maturi. Il meccanismo regolatorio è indipendente dall'attività nucleasica di Ago2 e probabilmente dipende dalla capacità delle proteine Ago di legarsi ai miRNA maturi e di aumentarne la stabilità. Per questo motivo Ago2 è sicuramente candidato al ruolo di proteina coordinatrice della regolazione dei miRNA, della loro biogenesi e della loro funzione. L'attività di Ago2 viene regolata tramite meccanismi di fosforilazione che coinvolgono le MAP chinasi p38. Ago2 viene fosforilata in condizioni di stress cellulare e si localizza nei "*P-bodies*", siti di accumulo di mRNA non tradotti e di enzimi implicati nel rinnovamento degli mRNA e nella repressione della traduzione. Alcuni miRNA, tra cui il miR-29b, possono essere reimportati nel nucleo: questo a suggerire un possibile ruolo di queste molecole nella regolazione della trascrizione, in particolare un ruolo importante a livello di regolazione dell'intera espressione genica.

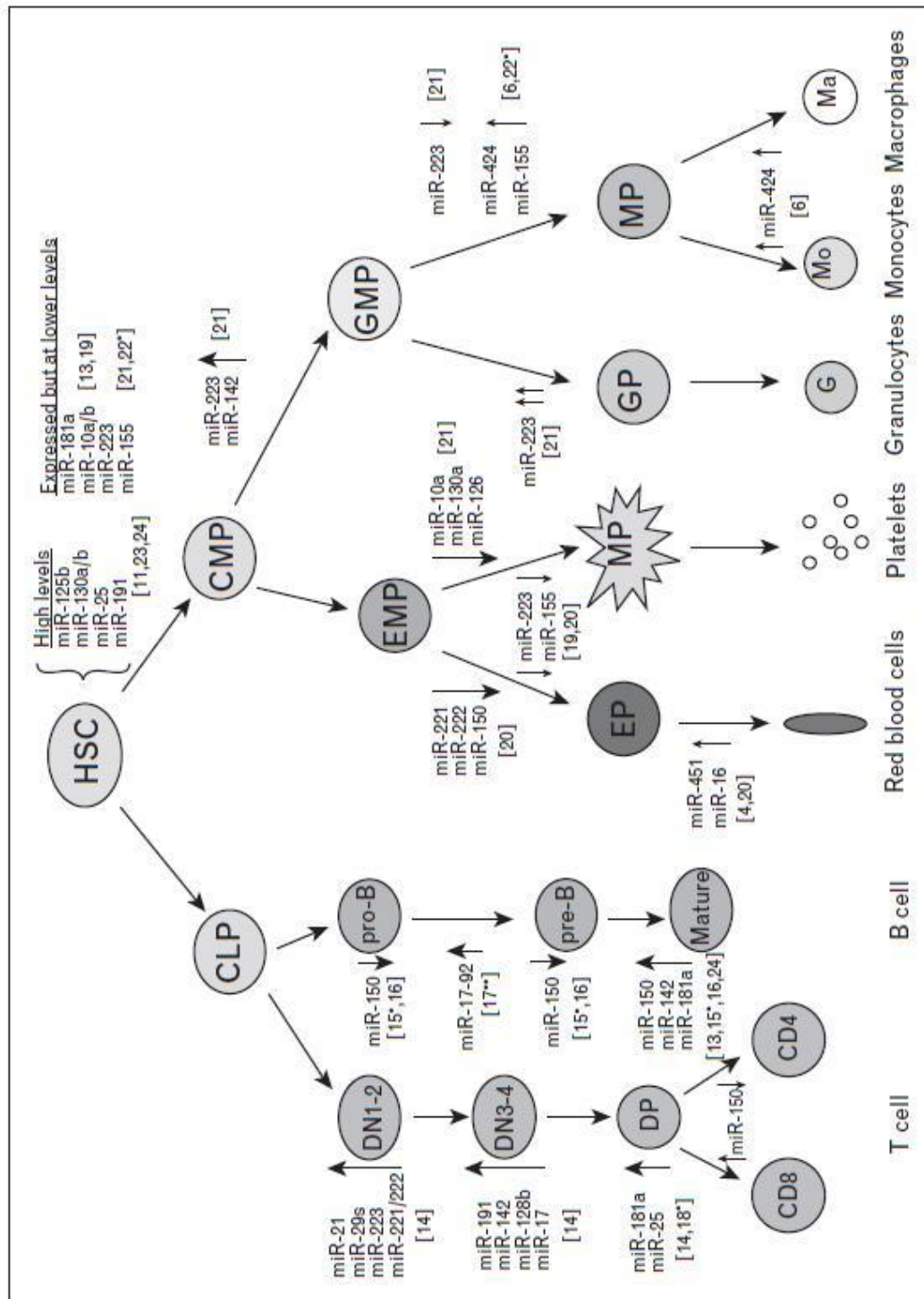
Una volta ottenuto il miRNA maturo lungo circa 22 nucleotidi e selezionato il filamen-

to guida, esso viene incorporato all'interno del complesso ribonucleoproteico RISC e il filamento guida è in grado di legarsi alla regione 3' non tradotta (3' UTR) dell'mRNA bersaglio. Come già accennato in precedenza, se l'appaiamento è perfetto si assiste ad una degradazione dell'RNA messaggero, nel caso in cui l'appaiamento non sia perfetto (ad esempio ci sono nucleotidi non perfettamente appaiati) si va incontro ad un'inibizione della traduzione dell'mRNA.

Ad oggi sono disponibili poche informazioni in merito all'emivita dei miRNA all'interno della cellula e ad eventuali processi di degradazione. I miRNA maturi si sono dimostrati delle molecole stabili in quanto persistono all'interno della cellula anche dopo il trattamento con molecole che silenziano l'espressione degli enzimi di processamento. Tuttavia potrebbero esistere dei meccanismi non ancora identificati che controllano il *turnover* dei miRNA.

### 1.9.1.2 miRNA ed ematopoiesi

La prima evidenza di un coinvolgimento dei miRNA nel processo ematopoietico è stata supportata dal lavoro di Chen et al. [17] i quali effettuando degli studi sul modello murino hanno identificato 3 miRNA preferenzialmente espressi a livello del midollo osseo. In particolare i 3 miRNA con espressione preferenziale a livello di tessuto ematopoietico sono il miR-223, miR-142 e miR-181. Ulteriori studi hanno dimostrato un'elevata espressione del miR-181 a livello del timo, a livello di cellule non differenziate e in linfociti B. Il coinvolgimento dei miRNA nell'ematopoiesi può essere facilmente riassunto nella figura 1.14. È possibile notare come i microRNA giochino un ruolo fondamentale nel processo di differenziamento da cellula staminale ematopoietica a cellula matura della linea mieloide o linfoide. In realtà più che agire da molecole regolatorie dello *switch* da una popolazione cellulare all'altra, i miRNA coinvolti nell'ematopoiesi agiscono come molecole regolatorie del differenziamento cellulare e favoriscono l'adattamento della cellula in risposta a diversi stimoli. Il loro effetto è prevalentemente dovuto alla downregolazione coordinata di svariate proteine bersaglio coinvolte in *pathways* critici per lo sviluppo e il differenziamento delle linee ematopoietiche. A supporto di questa loro azione, una forte deregolazione di miRNA è stata riscontrata in leucemie e linfomi [94, 34]. Visto il loro diretto coinvolgimento nel processo ematopoietico è interessante andare ad analizzare il profilo di espressione dei miRNA durante il processo di ricostituzione immune per poter identificare



↑, upregulation; ↓, downregulation; CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; DN, double negative T cell precursors; DP, double positive (CD4+CD8+ T-cells); EMP, erythrocyte-megakaryocyte precursor; EP, erythrocyte precursor; GMP, granulocyte-monocyte precursor; GP, granulocyte precursor; HSC, hematopoietic stem cells; MP, megakaryocyte precursor.

Figura 1.14: In figura i microRNA coinvolti nel processo di differenziamento delle diverse linee ematopoietiche [34].

*patterns* di espressione di microRNA durante le fasi della ricostituzione immune ottimale.

### 1.9.1.3 miRNA e trapianti di organi solidi

I miRNA giocano un ruolo chiave nello sviluppo e nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche, ma non solo: sono coinvolte in molteplici regolazioni di tipo post-trascrizionale, in particolare come risulta da recenti studi [39] sono coinvolti anche in processi di regolazione del sistema immune e nella modulazione di risposte immunitarie adattative e innate.

Nell'ambito del trapianto di organi solidi sono stati fatti grandi progressi nell'arco degli ultimi cinquant'anni, tuttavia il trapianto d'organo rimane sempre una strategia terapeutica che comporta alcuni rischi sia legati alla procedura in sè sia legati alle complicanze post trapianto. Il paziente sottoposto a trapianto d'organo necessita inoltre di un trattamento farmacologico immunosoppressivo (quindi non specifico e tossico) per tutto il resto della sua vita. Uno degli effetti avversi più frequenti e indesiderato del trapianto d'organo è il rigetto: il rigetto dell'organo trapiantato deriva dall'attivazione dei linfociti del ricevente in seguito al riconoscimento di antigeni non *self* del donatore. I linfociti T del ricevente si attivano e producono cellule T effettrici che insieme a tutte le altre cellule alloreattive vanno ad infiltrare l'organo trapiantato causando quindi il rigetto dell'organo stesso. Studi di espressione genica in pazienti sottoposti a trapianto di organo solido hanno rivelato alterazioni importanti nel profilo di espressione di alcuni geni in condizioni di rigetto acuto [2]. Il gruppo di Suthanthiran ha quindi pensato di analizzare il profilo di espressione di microRNA in pazienti sottoposti a trapianto di rene per verificare la presenza di alterazioni nel profilo di espressione dei miRNA e per verificare inoltre se il profilo di espressione di miRNA *intragraft* potesse avere un significato diagnostico per il rigetto acuto. Nello studio di Suthanthiran sono stati rilevati 17 miRNA differenzialmente espressi in biopsie di rigetto acuto rispetto a campioni normali, di cui 10 *downregolati* nel caso di rigetto e 7 *upregolati*. In particolare sono stati identificati tre miRNA predittivi di rigetto acuto (miR-142-5p, miR-155 and miR-223), inoltre i loro livelli di espressione sono strettamente correlati con i livelli di CD3 mRNA all'interno del trapianto a testimonianza del processo di infiltrazione linfocitario durante il rigetto d'organo. Da notare tra questi la presenza del miR-155, un miRNA implicato anche nello sviluppo e nel differenziamento ematopoietico e che è considerato uno dei miRNA più pleiotropici visto il suo ampio spettro di regolazio-

ne [29]. I miRNA giocano un ruolo chiave nella regolazione post-trascrizionale a qualsiasi livello e in qualsiasi *pathway* biologico, a partire dal differenziamento ematopoietico fino al rigetto d'organo, come abbiamo visto finora. In particolare il loro coinvolgimento in processi di regolazione dell'immunità e della tolleranza può lasciare spazio all'ipotesi di un loro coinvolgimento anche nell'ambito del trapianto di midollo osseo e nello sviluppo di effetti avversi del trapianto quali il rigetto o, ancor più interessante, lo sviluppo di GVHD.

#### 1.9.1.4 miRNA circolanti

Il coinvolgimento dei microRNA in diversi processi cellulari è stato confermato da diversi studi, focalizzando tuttavia l'attenzione sull'azione di queste molecole all'interno della cellula stessa. Recenti lavori hanno però evidenziato un ruolo chiave dei microRNA presenti nei fluidi biologici sottolineandone in particolare il loro valore diagnostico e prognostico. Il primo studio che si è proposto di misurare il livello di espressione di microRNA nel siero è quello di Lawrie et al. [54]. In questo studio si dimostra come i livelli sierici di miR-21 siano associati ad una sopravvivenza libera da ricaduta in pazienti affetti da linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL). A seguire sono stati pubblicati numerosi altri studi volti a sottolineare l'importanza della caratterizzazione dei microRNA circolanti per la diagnosi e la stratificazione di pazienti affetti da diverse malattie oncologiche (vedi tabella 1.1.) In seguito alla scoperta di microRNA nel siero/plasma ci si è chiesti come ciò fosse possibile data la presenza di potenti ribonucleasi nel circolo sanguigno che non avrebbero dovuto permettere la sopravvivenza di queste molecole. Recenti studi hanno però dimostrato la presenza di microRNA e la loro protezione nei confronti dell'attività RNAsica del plasma [26, 91]. Chen et al. [17] hanno dimostrato che sia siero che plasma contengono microRNA fortemente stabili anche in seguito a trattamenti molto stringenti quali ebollizione, variazioni di pH, congelamento prolungato, 10 cicli di congelamento/scongelo... tutte condizioni che normalmente causerebbero una degradazione dell'RNA. Evidenze da El-Hefnawy et al. [26] hanno mostrato che l'RNA presente nel plasma è protetto dalla degradazione grazie all'inclusione in complessi lipidici o lipoproteici. Diversi studi hanno inoltre dimostrato la capacità delle cellule di scambiare piccole molecole come microRNA attraverso la membrana cellulare grazie all'inclusione in microvescicole (fino a 1  $\mu\text{m}$ ) o in piccole vescicole di origine endocitica definite "exosomi" (50/90 nm). Nonostante le re-

| microRNA<br>upregolato                | Malattia                              | Bibliografia         |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| miR-21, 155, 210                      | Linfoma B<br>a grandi cellule diffuso | Lawrie et al. [54]   |
| miR-141                               | Tumore alla prostata                  | Mitchell et al. [67] |
| miR-205, 206, 335, 485-3p             | Tumore al<br>polmone/colonrettale     | Chen et al. [17]     |
| miR-21, 141,<br>200a/b, 203, 205, 214 | Tumore ovarico                        | Taylor et al. [89]   |
| miR-21, 92, 93, 126, 29a              | Tumore ovarico                        | Resnick et al. [82]  |
| miR-184                               | Carcinoma a<br>cellule squamose       | Wong et al. [99]     |
| miR-21                                | Glioblastoma                          | Skog et al. [85]     |
| miR-17-3p, 92                         | Tumore colonrettale                   | Ng et al. [69]       |

Tabella 1.1: MicroRNA con ruolo di biomarcatori in diverse tipologie di tumore.

centi scoperte si conosce ancora molto poco dei meccanismi con cui i microRNA vengono rilasciati in circolo, in particolare nel plasma, e dei meccanismi con cui vanno ad agire sui loro bersagli.

## Capitolo 2

### Scopo del lavoro

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche rappresenta una valida opzione terapeutica per molti pazienti affetti da malattie oncoematologiche. Tuttavia, l'assenza di una risposta antitumorale, definita *Graft Versus Tumor* (GVT), e l'eventuale insorgere della malattia del trapianto contro l'ospite, *Graft Versus Host Disease* (GVHD), rappresentano i due principali problemi associati al trapianto allogenico, ostacolandone la buona riuscita e limitandone l'applicabilità. L'introduzione di regimi di condizionamento a ridotta intensità ha contribuito solo in parte a ridurre l'incidenza di GVHD, tanto che questa complicanza, in particolare nella sua forma acuta (aGVHD) rimane ad oggi la principale causa di mortalità associata al trapianto. Ad oggi, sebbene la maggior parte dei fattori di rischio sia nota, non è possibile predire l'*outcome* del trapianto né tanto meno l'insorgenza di aGVHD. L'unica soluzione disponibile è rappresentata dalla terapia profilattica con immunosoppressori che ostacolano in parte il recupero emopoietico post trapianto esponendo il paziente ad un aumentato rischio di infezioni opportunistiche. Negli ultimi anni l'attenzione è stata concentrata sullo sviluppo di terapie alternative, seppur con scarsi risultati. La ricerca di strategie farmacologiche innovative è in continua evoluzione, così come si rende sempre più necessario lo sviluppo di marcatori in grado di predire lo sviluppo di GVHD prima della manifestazione clinica della malattia. In questo modo si potrebbe ridurre la mortalità ad essa associata e fornire così ai clinici una finestra temporale per modulare, se non interrompere, la risposta alloreattiva e adattare la terapia immunosoppressiva in maniera paziente-specifico.

La caratterizzazione delle vie di segnale coinvolte sia nella risposta GVT che in quella

GVHD risulta di particolare importanza per la possibilità di modulare la risposta immunitaria dopo trapianto. In particolare, la via di segnale JAK/STAT, e la sua controparte regolatoria mediata dalle proteine della famiglia SOCS, rappresentano i principali mediatori intracellulari della segnalazione mediante citochine. Queste ultime infatti giocano un ruolo chiave nella maturazione, proliferazione e attivazione dei linfociti T del donatore, considerati i principali effettori delle risposte GVT e GVHD. Ad oggi, il *signaling* di JAK/STAT nel contesto allogenico non è ancora del tutto chiaro. Il nostro studio si propone quindi di approfondire la conoscenza del ruolo di JAK/STAT dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche avvalendosi dell'uso di un modello murino di GVHD e GVT. In particolare, data la disponibilità in commercio di inibitori più o meno selettivi di JAK, sono state valutate differenti strategie per la modulazione della GVHD, cercando di mantenere l'effetto antitumorale associato al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.

In aggiunta, data l'assenza di test diagnostici in grado di predire l'insorgenza di GVHD, il nostro studio si è concentrato sulla ricerca di biomarcatori circolanti di GVHD acuta in pazienti sottoposti a trapianto allogenico. Data la loro presenza in forma stabile in diversi fluidi biologici e la loro natura regolatoria, i microRNA si propongono come biomarcatori non invasivi post allo-HSCT. Riteniamo inoltre che queste molecole possano giocare un ruolo chiave nella regolazione della GVHD e nell'esito del trapianto allogenico. È stato pertanto valutato il potenziale utilizzo dei microRNA circolanti come biomarcatori di aGVHD mediante l'analisi del profilo di espressione di miRNA circolanti alla ricerca di molecole differenzialmente espresse in grado di predire la complicità.

# Capitolo 3

## Materiali e Metodi

### 3.1 Modello murino per lo studio della *Graft Versus Host Disease*

#### 3.1.1 Mantenimento del modello murino e stabulazione

Per il trapianto sono stati utilizzati topi femmina all'età di 8 settimane. Gli animali sono stati mantenuti in gabbie sterili a temperatura costante in numero massimo di 5 animali per gabbia. Le gabbie sono state cambiate due volte a settimana e sono state provviste di cibo e acqua sterile con aggiunta di antibiotico (Gentamicina 80mg in 500ml di acqua sterile) ogni settimana. Il sacrificio è stato effettuato per dislocazione cervicale dopo anestesia con isofluorano, ed il prelievo di organi per le analisi istologiche e di milze, tibie e femori per il trapianto è stato effettuato con strumenti chirurgici sterilizzati. Gli animali sono stati pesati tre volte alla settimana ed il peso è stato utilizzato come indicatore delle condizioni fisiche degli animali unitamente alla constatazione di parametri clinici relativi a mobilità, qualità del pelo ed insorgenza di tumori localizzati nei modelli che prevedevano l'utilizzo di linee tumorali. Animali che avessero perso più del 25% del peso iniziale o che presentassero condizioni fisiche gravi sono stati eutanizzati per dislocazione cervicale.

#### 3.1.2 Modello murino di GVHD

È stato utilizzato un modello murino di GVHD acuta che prevede il trapianto di cellule midollari CD3<sup>+</sup> deplete (BM-TCD, *Bone Marrow T-cell depleted*) e cellule della milza

B220<sup>+</sup> deplete (SC-BCD, *Spleen Cells B-cell depleted*) provenienti da un donatore incompatibile per un antigene maggiore di istocompatibilità. È stato pertanto scelto il ceppo C57Bl/6 come donatore, contraddistinto dall'espressione dell'antigene maggiore di istocompatibilità H2Kb, ed il ceppo BALB/c come ricevente, esprimente l'antigene H2Kd. La deplezione dei linfociti T da midollo e dei linfociti B dalla milza è stata effettuata per ottenere un miglior controllo sull'azione delle due componenti cellulari e poterne evidenziare i rispettivi ruoli nei controlli scelti. I topi riceventi sono stati irradiati in modo letale alla dose di 950Gy prima del trapianto per eliminare completamente il sistema immunitario ed evitare condizioni di chimerismo tra il sistema immunitario dell'ospite e del donatore. La gravità della GVHD è strettamente correlata al tipo di regime di condizionamento utilizzato e al numero di linfociti T infusi, ed è pertanto possibile controllarne l'intensità agendo su questi due parametri.

### 3.1.2.1 Prelievo di midollo osseo

I donatori C57Bl/6 (B6) sono stati sacrificati per dislocazione cervicale all'età di 8 settimane. Sono state prelevati gli arti posteriori tagliando a livello dell'articolazione coxo-femorale, dai quali sono stati isolati tibie e femori dopo aver chirurgicamente rimosso muscoli e tendini. Il midollo osseo è stato prelevato attraverso la tecnica del *flushing* (dall'inglese "*to flush*", sciacquare) che consiste nell'iniettare DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffer Solution*) + Hepes 1mM (Lonza) nella cavità interna di tibie e femori dopo rimozione delle epifisi. Il midollo è stato risospeso in 10 ml di DPBS + Hepes e filtrato con filtri da 70  $\mu$ m per eliminare i detriti di dimensioni maggiori e con filtri da 30  $\mu$ m per creare una sospensione monocellulare utile per i passaggi successivi di separazione. Le cellule sono state contate con il colorante Turk (Crystal Violet (Sigma), 6% acido acetico), centrifugate a 300g per 10' e risospese in PBS-FACS (DPBS + 1% FBS) alla concentrazione di  $10 \times 10^7$  cellule/ml.

### 3.1.2.2 Prelievo di cellule spleniche

Sono state prelevate le milze dei donatori C57Bl/6 e sono state conservate in terreno RPMI + 10% FBS (RPMI 1640 con L-Glutamina (Lonza), Penicillina e Streptomina 100U/ml (Sigma), FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Sigma)). Le cellule spleniche sono state ottenute in seguito a disaggregazione per schiacciamento delle milze. Queste sono state poi

filtrate su filtri da 70  $\mu\text{m}$  per eliminare i detriti di dimensioni maggiori e con filtri da 30  $\mu\text{m}$  per creare una sospensione monocellulare utile per i successivi passaggi di separazione. Le cellule sono state contate con il colorante Turk, centrifugate a 300g per 10' e risospese in PBS-FACS (DPBS + 1% FBS) alla concentrazione di  $10 \times 10^7$  cellule/ml.

### 3.1.2.3 Irraggiamento

Il giorno del trapianto i topi riceventi sono stati sottoposti ad irradiazione totale (TBI, *Total Body Irradiation*) al fine di eliminare completamente il loro sistema ematopoietico. I topi riceventi dell'esperimento GVHD sono stati sottoposti ad irradiazione mieloablativa alla dose totale di 950Gy, suddivisa in due dosi da 500Gy e 450Gy a distanza di 3 ore l'una dall'altra. I topi riceventi dell'esperimento GVT sono stati sottoposti ad irradiazione non-mieloablativa alla dose totale di 650Gy al fine di ridurre la mortalità posttrapianto, suddivisa in due dosi da 350Gy e 300Gy a distanza di 3 ore l'una dall'altra. Per limitare il rischio di infezioni legate allo stato di immunodeficienza transiente post-trapianto, ogni gabbia è stata fornita di acqua con aggiunta di antibiotico (Gentamicina 80mg in 500ml di acqua).

### 3.1.2.4 Trapianto

Tutti gli animali sono stati ricostituiti con  $10 \times 10^6$  cellule BM-TCD provenienti da donatori non trattati o da donatori trattati, e a seconda della coorte sperimentale sono anche state somministrate  $2,5 \times 10^6$  cellule SC-BCD. I topi donatori e i topi riceventi appartengono a due ceppi differenti non compatibili per quanto riguarda l'MHC di classe I. Il trapianto delle cellule BM-TCD alla concentrazione di  $10^8$  cellule/ml e delle cellule SC-BCD alla concentrazione di  $2,5 \times 10^6$  cellule/ml è stato effettuato tramite singola iniezione retro-orbitale in un volume finale di 200  $\mu\text{l}$  di PBS. La somministrazione di cellule BM-TCD serve a fornire i precursori da cui si svilupperà il nuovo sistema ematopoietico, mentre la somministrazione di cellule SC-BCD serve ad indurre lo sviluppo della aGVHD.

### 3.1.2.5 Monitoraggio degli animali e trattamento farmacologico

Gli animali trapiantati sono stati monitorati tre volte a settimana per verificare le condizioni di salute. Sono stati pesati regolarmente e sacrificati quando il calo ponderale risultava maggiore del 25% rispetto al peso al giorno 0. Per quanto riguarda i topi a cui

sono state inoculate cellule tumorali, la percentuale di cellule tumorali circolanti è stata monitorata una volta a settimana tramite prelievo sanguigno dalla vena caudale dopo somministrazione intraperitoneale di 200  $\mu$ l di anestetico (10% Ketamina, 2,5% Xilazina in soluzione fisiologica). I farmaci sono stati somministrati per *oral gavage* (vedi figura 3.1) in due somministrazioni da metà dose in un volume di 200  $\mu$ l per somministrazione dal giorno 0 al giorno +13 post-trapianto. Il farmaco CP-690,550 è stato somministrato alla



Figura 3.1: Somministrazione dei farmaci per *oral gavage*

dose fissa di 0,3 mg/die risospeso in 400  $\mu$ l di veicolo costituito da una soluzione acquosa allo 0,5% di metilcellulosa e 5% N,N-dimetilacetamide. L'INC-424 è stato somministrato a diverse dosi a seconda della coorte sperimentale, dopo risospensione in DMSO (dimetilsolfossido)(Sigma) alla concentrazione di 100mg/ml e diluizione in un veicolo composto da 0,5% metilcellulosa (Sigma) e N,N-dimetilacetamide (Sigma-Aldrich) in acqua.

### 3.1.2.6 Coltura primaria di cellule dendritiche

Per ottenere delle colture cellulari primarie di cellule dendritiche sono stati sacrificati topi sani e sono stati prelevati gli arti posteriori. Le cellule midollari derivanti dal *flushing* di femori e tibie sono state risospese in RPMI Pen/Strep 10% FBS con aggiunta di IL-4 1000U/ml e GM-CSF 1000U/ml per indurne il differenziamento e la maturazione in cellule dendritiche (DC) e piastrate in *flask*. Il terreno è stato cambiato ogni due giorni, sostituendone la metà con terreno fresco addizionato con IL-4 e GM-CSF 500U/ml. Al giorno +5 è stato aggiunto LPS alla concentrazione finale di 1  $\mu$ g/ml per permettere il cor-

retto differenziamento in cellule dendritiche. Al giorno +6 le cellule dendritiche sono state raccolte ed utilizzate per il test di reazione linfocitaria mista (MLR, *Mixed Lymphocyte Reaction*).

### 3.1.2.7 Reazione linfocitaria mista

La reazione di trasformazione blastica dei linfociti coltivati *in vitro* in presenza di linfociti allogenici consiste nella risposta dei linfociti alloreattivi, indotta dal riconoscimento dei diversi MHC espressi sulla membrana nei confronti dei linfociti allogenici in co-coltura. Al giorno +14 post trapianto sono state prelevate le milze dei topi trapiantati, dopo sacrificio degli stessi. Gli splenociti ottenuti sono stati messi in coltura piastrando in ogni pozzetto cellule dendritiche e linfociti ad un rapporto linfociti: DC 10:1 ( $2 \times 10^6$  cellule spleniche e  $2 \times 10^5$  cellule dendritiche) in terreno RPMI Pen/Strep 10% FBS. L'alloreattività dei linfociti T dei topi trapiantati è stata valutata misurando al citofluorimetro la produzione di IFN $\gamma$  intracellulare da parte dei linfociti T (di origine del donatore) stimolati in modo allogenico dalle DC del ricevente. I linfociti T prelevati dai topi trapiantati sono stati posti in coltura sia con le DC del donatore (singeniche), sia con le DC del ricevente (allogeniche). La cocoltura è stata mantenuta in incubatore a 37 °C 5% CO $_2$  *overnight* e la valutazione della produzione di IFN $\gamma$  intracellulare è stata effettuata a 24 ore dall'inizio della coltura dopo permeabilizzazione delle membrane con *Inside Stain Kit* (Miltenyi) e marcatura con anticorpi anti-IFN $\gamma$ .

### 3.1.3 Modelli murini di GVT

In questo studio sono stati utilizzati due modelli murini di GVT per mimare le condizioni di trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in pazienti con leucemia mieloide acuta e linfoma a cellule B in remissione. È stato scelto il ceppo C57Bl/6 come donatore ed il ceppo BALB/c come ricevente, per riprodurre le medesime condizioni del modello aGVHD precedentemente utilizzato. I topi riceventi sono stati irradiati in modo sub-letale alla dose di 650Gy prima del trapianto per eliminare il sistema immunitario senza aumentare eccessivamente il tasso di mortalità post trapianto (TRM, *Transplant Related Mortality*). I topi riceventi sono stati trapiantati con cellule midollari CD3 $^+$  deplete e cellule spleniche B220 $^+$  deplete proveniente dal donatore. Per mimare le condizioni di tumore in remissione i topi riceventi sono stati inoltre trapiantati con  $5 \times 10^6$  cellule A20

o  $5 \times 10^5$  cellule RMB-1 al momento del trapianto: le cellule tumorali trapiantate non vengono in questo modo eliminate dal regime di condizionamento e al momento dell'iniezione delle cellule effettrici della GVT non sono ancora in crescita, in quanto sottoposte a shock per il passaggio dalla coltura in vitro al modello in vivo. La dose di radiazione per il regime di condizionamento e la dose di cellule tumorali trapiantate è stata determinata sperimentalmente in precedenti esperimenti preparatori in funzione della sopravvivenza media.

Per mimare in modo più efficace la condizione fisiologica nella quale si interviene con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, sono state scelte linee cellulari tumorali derivate dallo stesso ceppo dei topi riceventi (BALB/c). Poiché l'INC-424 agisce in modo efficace contro le cellule della linea mieloide, è stata presa in considerazione la linea cellulare di leucemia mieloide RMB-1 per mimare una leucemia mieloide acuta. Le cellule della linea RMB-1 si caratterizzano come  $H2Kd^+$  (in quanto derivate da BALB/c),  $CD11b_{low}$  e  $Anti-Gr1^+$ , occupando la zona dei granulociti nel citogramma con parametri fisici, e sono facilmente rilevabili con un prelievo di sangue periferico. Volendo analizzare l'influenza dell'INC-424 sulla GVT anche in tumori di origine non mieloide, è stata presa in considerazione la linea cellulare di linfoma a cellule B A20. Le cellule della linea A20 si caratterizzano come  $H2Kd^+$  (in quanto derivate da BALB/c),  $CD3$  e  $B220(45R)^+$ , occupando in parte la zona dei linfociti ed una zona con SSC e FSC più elevati.

## 3.2 Test di attività anti tumorale

Al fine di valutare l'attività antitumorale dei linfociti T *in vitro* (effetto *Graft versus Tumor*), è stata analizzata la mortalità delle cellule tumorali dopo co-cultura con splenociti prelevati come precedentemente descritto da topi C57Bl/6 sani. Gli splenociti sono stati stimolati con il T-cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi) per due giorni e successivamente piastrati in triplicato in piastre da 24 pozzetti in rapporto linfociti: cellule tumorali 10:1 piastrandoli in pozzetti differenti gli splenociti stimolati assieme a cellule A20 o assieme a cellule RMB-1 in un volume totale di 2ml RPMI Pen/Strep 10% FBS.

Sono state utilizzate le seguenti coorti sperimentali:

- Controllo negativo linfociti: cellule A20 o cellule RMB-1 in assenza di splenociti;

- Controllo negativo tumore trattato: cellule A20 o cellule RMB-1 trattate con INC-424 10uM in assenza di splenociti;
- Controllo singenico: cellule A20 o cellule RMB-1, splenociti BALB/c stimolati;
- Controllo singenico stimolazione: cellule A20 o RMB-1, splenociti BALB/c non stimolati;
- Controllo di attivazione: cellule A20 o cellule RMB-1, splenociti C57Bl/6 non stimolati;
- Controllo attività antitumorale: cellule A20 o cellule RMB-1, splenociti C57Bl/6 stimolati;
- Test non stimolato: cellule A20 o cellule RMB-1, splenociti C57Bl/6 non stimolati, INC-424 10uM;
- Test: cellule A20 o cellule RMB-1, splenociti stimolati, INC-424 10uM;

### 3.3 Separazione immunomagnetica

La separazione immunomagnetica si basa sull'utilizzo di biglie di materiale superparamagnetico delle dimensioni di circa 50nm chiamate Microbeads. Queste biglie sono coniugate con anticorpi diretti verso antigeni di superficie espressi dalle popolazioni cellulari di interesse: la purificazione dei complessi biglie-cellule è effettuata attraverso il passaggio forzato del campione in colonne sottoposte ad un campo magnetico ad alto gradiente. Le cellule non coniugate con l'anticorpo sono dunque libere di passare attraverso le colonne, e possono essere raccolte separate dalle cellule coniugate con le biglie magnetiche legate alla matrice delle colonne e che vengono eluite in un secondo momento. È possibile dividere i sistemi di ibridazione fra biglia e cellula in:

- Sistemi diretti: biglia e anticorpo specifico sono già coniugati tra loro, l'ibridazione con la sospensione cellulare avviene in un unico passaggio;
- Sistemi indiretti: biglia e anticorpo specifico non sono coniugati tra loro. L'anticorpo può essere non coniugato, biotinilato o coniugato con un fluorocromo. L'ibridazione

avviene attraverso un primo passaggio di legame tra anticorpo e cellule desiderate, ed un secondo passaggio di legame tra anticorpo e biglie coniugate con anticorpi anti-immunoglobuline, anticorpi anti-biotina, streptavidina o anticorpi anti-fluorocromo;

Per tutti le separazioni è stato utilizzato il separatore autoMACSTM Pro Separator (Miltenyi Biotec). Sono stati utilizzati due differenti kit di separazione con relativi protocolli:

- CD90.2 Microbeads mouse (Miltenyi): Utilizzato per la deplezione pre-trapianto dei linfociti T dal midollo osseo dei topi donatori, in modo da ottenere una frazione cellulare negativa T-depleta (BM-TCD) non coniugata con biglie da utilizzare per il trapianto. Le biglie coniugate con l'anticorpo CD90 legano selettivamente l'antigene murino Thy1.2 espresso dai timociti, dai linfociti T periferici, da alcuni linfociti T intraepiteliali e in misura minore da alcuni progenitori staminali emopoietici a livello del midollo osseo.
- CD45R (B220) Microbeads mouse (Miltenyi): Utilizzato per la deplezione pre-trapianto dei linfociti B dalle cellule spleniche dei topi donatori, in modo da ottenere una frazione cellulare negativa arricchita da linfociti T (SC-BCD). Il CD45R è un antigene espresso dai linfociti B durante la loro maturazione a partire dai primi stadi del differenziamento e sviluppo, che viene downregolato solo in seguito a trasformazione in plasmacellule.

I kit di separazione che sfruttano la marcatura diretta delle popolazioni cellulari di interesse prevedono un'incubazione del campione con 10  $\mu$ l di microbeads ogni  $10^7$  cellule in un volume di 90  $\mu$ l di soluzione di corsa (AutoMACSTM Rinsing solution (Miltenyi), 0,5% BSA (Miltenyi)) ogni  $10^7$  cellule. L'incubazione deve essere effettuata a 4-8 gradi centigradi al buio per 15 minuti. Le cellule vengono successivamente centrifugate a 300g per 10min, risospese in un volume appropriato di soluzione di corsa per rimuovere l'eccesso di microbeads non ibridate, ri-centrifugate a 300g per 10min. Le cellule vengono infine risospese in 2ml di soluzione di corsa e separate col separatore immunomagnetico.

### 3.4 Analisi immunofenotipica mediante citometria a flusso

L'analisi immunofenotipica si effettua mediante citometria a flusso e permette sia di ottenere il numero totale di linfociti che di valutare i rapporti tra le varie sottopopolazioni cellulari. La citometria a flusso è una tecnologia che permette di analizzare le caratteristiche fisiche di cellule in sospensione e la presenza di determinanti antigenici intracellulari o di membrana grazie all'utilizzo di una sorgente laser e anticorpi fluorescinati diretti contro le molecole di interesse. Le cellule vengono diluite all'interno di una camera di flusso e allineate una dopo l'altra grazie ad un sistema fluidico basato sulla differenza di pressione esistente tra il campione e il fluido di trasporto. Le cellule così disposte passano quindi davanti alla sorgente laser focalizzata in modo da colpire le cellule al centro del canale di conta formato dal fluido di trasporto. Una volta colpite dal laser le cellule emettono diversi segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, è possibile quindi rilevarne la forma e la granulosità (vedi figura 3.2).

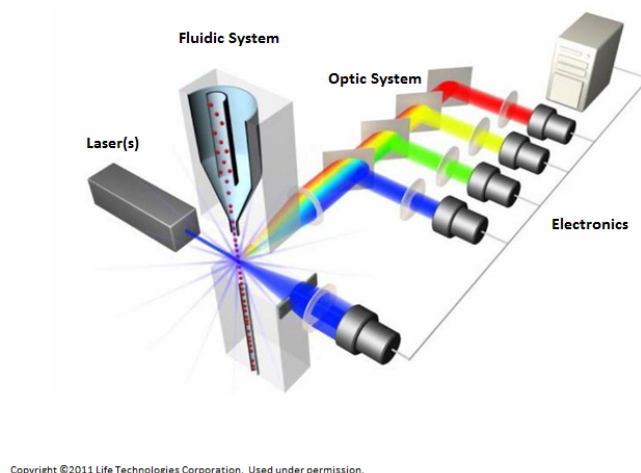


Figura 3.2: Rappresentazione schematica della citometria a flusso.

In particolare la luce che attraversa la cellula (*forward scatter*) viene raccolta da un rilevatore posto a  $180^\circ$  dalla fonte di radiazione ed è correlata alle dimensioni e forma della cellula, invece la luce riflessa a  $90^\circ$  (*side scatter*) è dovuta ai parametri morfologici della cellula come la granulosità del citoplasma. Grazie all'utilizzo di anticorpi coniugati con

fluorocromi è possibile inoltre identificare sottopopolazioni cellulari di interesse a seconda dell'espressione di antigeni di membrana o intracellulari. È possibile utilizzare diversi anticorpi coniugati con diversi fluorocromi in modo da identificare diverse sottopopolazioni caratterizzate dall'espressione di antigeni differenti. In questo caso le diverse lunghezze d'onda delle radiazioni utilizzate vengono separate l'una dall'altra grazie ad un sistema di filtri ottici che selezionano solo la lunghezza d'onda caratteristica del fluorocromo in esame e inviano il segnale ai rispetti sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) i quali trasformano i segnali ottici in impulsi elettrici.

Ogni citofluorimetro è composto quindi da tre parti: un sistema fluidico, un sistema ottico e un sistema elettronico. Il sistema fluidico è necessario per il trasporto delle cellule in modo che possano essere opportunamente colpite dal raggio laser, il sistema ottico è costituito dai laser stessi (diverse lunghezze d'onda, nel nostro caso 3) e dai filtri ottici, infine il sistema elettronico converte i segnali luminosi in segnali digitali. Il citofluorimetro presente nel nostro laboratorio è il MACSQuant<sup>TM</sup> Analyzer (Miltenyi Biotec), è dotato di tre laser (405nm, 488nm, 635nm) ed è in grado di registrare sette canali di fluorescenza.

### 3.4.1 Compensazione dello strumento

Nonostante il complesso sistema ottico presente all'interno del citofluorimetro e l'accurata scelta dei fluorocromi più adatti, è possibile che una certa intensità di radiazione emessa da un fluorocromo si sovrapponga alla lunghezza d'onda di un altro fluorocromo a causa dell'ampiezza degli spettri di emissione (vedi figura 3.3).

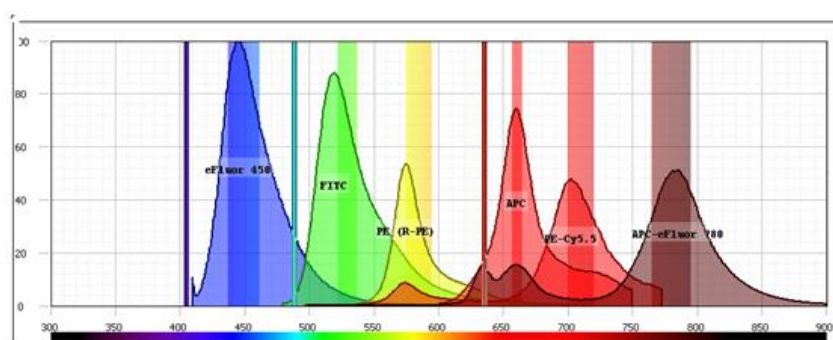


Figura 3.3: Sovrapposizione degli spettri di emissione dei diversi fluorofori.

Durante la lettura dei campioni bisogna quindi tener in conto che l'emissione dei diversi fluorocromi si sovrappone in alcuni punti e ciò può alterare la positività o la negatività di una determinata popolazione cellulare per uno specifico antigene. Si rende quindi necessario sottrarre da un determinato canale una quota fissa di segnale relativa all'emissione di un altro fluorocromo: questo procedimento prende il nome di compensazione. Nel nostro caso la compensazione è stata effettuata manualmente andando a modificare i parametri della matrice di compensazione in modo da sottrarre la giusta quantità di fluorescenza da ciascun canale per minimizzare la sovrapposizione di emissione. La nuova matrice di compensazione ottenuta è stata applicata alla lettura di ciascun campione e, in caso di necessità, può essere modificata in fase di analisi.

### 3.4.2 Preparazione del campione

A seconda dell'applicazione, le cellule del sangue periferico, del midollo o della milza sono state contate e sono stati allestiti i seguenti tubi per la lettura citofluorimetrica utilizzando  $1 \times 10^6$  cellule sia per la marcatura extra che intra-cellulare:

- Tubo Maturazione/Attivazione: anticorpi anti CD3 VioBlue, CD62L FITC, H2Kb PE, CD8 PerCP, CD44 PE-Vio770, CD25 APC, CD4 APC-Vio770
- Tubo *Helper*: anticorpi anti CD4 VioBlue, H2Kb FITC, IFN $\gamma$ PE, CD8 PerCP, IL-4 PeCy7, IL-17 APC
- Tubo T<sub>reg</sub>: anticorpi anti CD3 VioBlue, H2Kd FITC, CD25 PE, CD127 PeCy7, FoxP3 APC, CD4 APC-Vio770
- Tubo A20: anticorpi anti B220 (CD45R) VioBlue, H2Kd FITC, CD3 APC
- Tubo RMB-1: anticorpi anti CD11b VioBlue, H2Kd FITC, Gr1-PerCP Vio770

### 3.4.3 Analisi Citofluorimetrica

I dati ottenuti mediante lettura al MACSQuant<sup>TM</sup> Analyzer vengono elaborati ed analizzati attraverso l'utilizzo del programma MACSQuantify<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec). Questo

programma permette di riprodurre il dato citofluorimetrico acquisito attraverso la creazione di istogrammi o rappresentazioni bidimensionali. L'istogramma riporta in ascissa l'intensità di fluorescenza e in ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene. Le rappresentazioni bidimensionali invece, definite anche *dot plot*, permettono di visualizzare la distribuzione delle varie popolazioni e di correlare due o più parametri tra loro. Tramite l'analisi bidimensionale con *Forward* e *Side Scatter* è possibile visualizzare e selezionare popolazioni cellulari che presentano differenti parametri fisici, eliminare eventuali cellule morte o detriti cellulari in modo da ottenere un dato più pulito e preciso. In base agli antigeni intracellulari o di superficie espressi dalle cellule è inoltre possibile individuare le diverse sottopopolazioni di interesse e valutarne la numerosità e i rapporti tra esse.

### 3.5 Analisi istologica

Al giorno +14 post-trapianto sono stati prelevati i principali organi bersaglio della GVHD, in particolare cute, fegato e tratto gastrointestinale. Su questi è stata condotta un'analisi istologica per confermare la presenza di aGVHD e fornire una migliore interpretazione dei dati ottenuti dagli esperimenti di citofluorimetria e dagli esperimenti *ex vivo*. Gli organi sono stati fissati in formaldeide 10% ed è stata effettuata una colorazione con ematossilina-eosina. Campioni di intestino tenue, colon, fegato e cute sono stati processati con Tissue Processor Leica ASP300S ed inclusi in blocchi di paraffina (Embedding Center Leica EG1160), da ognuno dei quali sono state tagliate 4 sezioni con microtomo rotativo Leica RM2245 semiautomatico. Le sezioni sono state colorate con ematossilina eosina (Diapath) e valutati con microscopio ottico Leica DM2500 da un tecnico veterinario anatomopatologo. La valutazione della GVHD è stata effettuata assegnando punteggi istopatologici che variano da 0 (quadro sano) a 4 (quadro grave) ad ogni organo preso in considerazione (vedi Tabella 3.1). La somma dei punteggi per ogni sede presa in considerazione può essere utilizzata per definire il grado globale della GVHD. Estendendo la valutazione a 4 sedi anatomiche differenti (fegato, intestino tenue, colon, cute) il punteggio cumulativo totale va da 0 a 16.

---

---

**GVHD cutanea**

1. Acantosi ed ipercheratosi multifocale tenue con minimo numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio; minima infiltrazione linfocitaria, qualche segno di vacuolizzazione dell'epitelio basale.
  2. Acantosi ed ipercheratosi multifocale tenue con piccolo numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio, qualche segno di vacuolizzazione dell'epitelio basale, presenza da minima a piccola di linfociti intra epiteliali, presenza da minima a piccola di cellule epiteliali discheratosiche.
  3. Da tenue a moderata ipercheratosi ed acantosi multifocale con aumentato numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio. Maggiore vacuolizzazione dell'epitelio basale, presenza di linfociti intraepiteliali e di cellule epiteliali discheratosiche.
  4. Da tenue a moderata ipercheratosi ed acantosi multifocale con aumentato numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio. Maggiore vacuolizzazione dell'epitelio basale, presenza di linfociti intraepiteliali, di cellule epiteliali discheratosiche, microascessi, erosioni cutanee e/o ulcerazione.
-

---

**GVHD epatica**

1. Infiltrato cellulare linfoide periduttale minimo (5-10 cellule).
  2. Infiltrato cellulare linfoide periduttale piccolo (10-20 cellule).
  3. Infiltrato cellulare linfoide periduttale moderato (20-40 cellule), con cellule linfoidi intraepiteliali, necrosi epatica a singola cellula.
  4. Infiltrato cellulare linfoide periduttale da moderato a severo ( $> 40$  cellule) con cellule linfoidi intraepiteliali, necrosi epatica a singola cellula, coinvolgimento delle zone portalì con infiltrato linfoide.
-

---

**GVHD gastrica**

1. Porzione squamosa – piccolo numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio.
  2. Porzione squamosa - piccolo numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio e piccolo numero di linfociti intraepiteliali. Porzione ghiandolare – linfociti intraepiteliali con degenerazione delle cellule parietali.
  3. Porzione squamosa – da piccolo a moderato numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio e da piccolo a moderato numero di linfociti intraepiteliali. Porzione ghiandolare – linfociti intraepiteliali con marcata degenerazione delle cellule parietali.
  4. Porzione squamosa - da piccolo a moderato numero di linfociti adiacenti allo strato basale dell'epitelio e da piccolo a moderato numero di linfociti intraepiteliali. Porzione ghiandolare – linfociti intraepiteliali con marcata degenerazione delle cellule parietali, erosione/ulcerazione della mucosa.
-

---

**GVHD intestinale**

1. Da minimo a ridotto numero di linfociti infiltranti l'epitelio delle cripte, rara degenerazione delle cellule epiteliali.
2. Ridotto numero di linfociti infiltranti l'epitelio delle cripte, aumentato numero di mitosi, da minima a piccolo numero di cellule epiteliali in degenerazione in alcune cripte.
3. Ampio numero di linfociti infiltranti nell'epitelio delle cripte, aumentato numero di mitosi, piccolo numero di cellule epiteliali in degenerazione nella maggior parte delle cripte, possibile ulcerazione della mucosa.
4. Ampio numero di linfociti infiltranti nell'epitelio delle cripte, aumentato numero di mitosi, un'evidente degenerazione delle cellule epiteliali nella maggior parte delle cripte, possibile ulcerazione della mucosa.

---

Tabella 3.1: *Score* istopatologici della *Graft Versus Host Disease*

### 3.6 Dosaggio citochine plasmatiche

Sono stati prelevati campioni di plasma dopo centrifugazione a 2500g per 10 min di campioni di sangue periferico. Il dosaggio delle citochine plasmatiche è stato effettuato con tecnica ELISA sandwich con kit *Quantikine ELISA* (RandD Systems) IL-12 *Immunoassay*, IL-6 *Immunoassay*. Il kit da noi utilizzato è composto da una piastra da 96 pozzetti contenenti anticorpi diretti contro le citochine di interesse legati al fondo del pozzetto. In seguito ad ibridazione del campione con gli anticorpi presenti sulla piastra per 2h a temperatura ambiente e lavaggio delle molecole non legate, le citochine legate agli anticorpi presenti sul fondo sono state incubate per 2 ore con una soluzione contenente anticorpi legati a perossidasi. La successiva incubazione con una soluzione contenente i substrati

cromofori della perossidasi per 30 minuti e l'aggiunta di una soluzione di blocco della reazione permette di dosare in modo accurato le citochine legate attraverso l'uso di uno spettrofotometro registrando l'assorbanza a 450nm e sottraendo l'assorbanza a 540nm (correzione necessaria per ovviare ad imperfezioni della piastra). Dopo aver creato una curva di taratura, utile per mettere in relazione concentrazioni definite della proteina di interesse con un determinato segnale, la lettura della piastra ELISA allo spettrofotometro permette di determinare la concentrazione delle citochine interpolando l'assorbanza del campione con la curva di taratura (vedi figura 3.4).

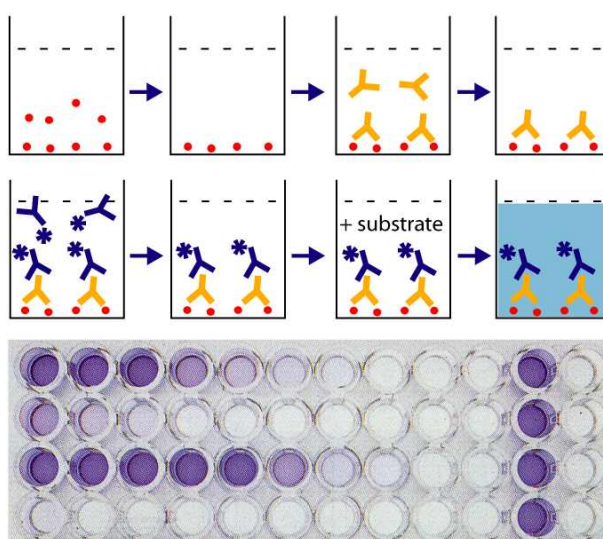


Figura 3.4: Illustrazione schematica del principio di funzionamento di un saggio ELISA.

## 3.7 Pazienti

Nel nostro studio sono stati analizzati 24 pazienti sottoposti a trapianto allogenico di midollo osseo da donatore non consanguineo affetti da diverse malattie di tipo ematologico e sottoposti a diversi regimi di condizionamento pre-trapianto con una età compresa tra i 18 e i 65 anni (mediana di 40 anni). Tutti i pazienti che hanno ricevuto un trapianto da donatore familiare compatibile (n=5, 20.83%) sono stati sottoposti ad un regime di condizionamento a ridotta intensità (RIC) contenente tiotepa (10mg/kg), ciclofosfamida

(60mg/kg) e fludarabina (60mg/m<sup>2</sup>). Questi pazienti hanno inoltre ricevuto una terapia profilattica per la GVHD a base di ciclosporina A (livelli plasmatici 200-300ng/ml) e metotrexate (10mg/m<sup>2</sup> al giorno +1, e 8mg/m<sup>2</sup> ai giorni +3 e +6).

Pazienti trapiantati da un donatore non familiare compatibile (n=7, 10/10) o parzialmente compatibile (n=4 (9/10); n=8 (8/10) sono invece stati sottoposti a regime di condizionamento contenente tiotepa (10mg/kg) e ciclofosfamide (100mg/kg) (n=10) con o senza l'aggiunta di fludarabina (120mg/m<sup>2</sup>) (n=9) [22]. La T deplezione del trapianto è stata effettuata prevalentemente attraverso l'utilizzo di globulina anti-timocita (18 pazienti, timoglobulina 3.5mg/kg/die ai giorni 4 and 3) o alemtuzumab (1 paziente). La profilassi anti-GVHD post trapianto ha previsto l'utilizzo di ciclosporina A e metotrexate (10mg/m<sup>2</sup> al giorno +1, e 8mg/m<sup>2</sup> ai giorni +3 e +6; n=21) o ciclosporina A e mico-fenolato (15mg/kg 3 volte al giorno partendo dal giorno 0; n=3). I pazienti in studio sono affetti da diverse malattie oncoematologiche, in particolare 9 linfomi non Hodgkin, 10 linfomi di Hodgkin, 3 mieloma multiplo, ed infine 2 con sindrome mielodisplastica. I pazienti in studio sono stati monitorati per verificare l'insorgenza di GVHD, in particolare 14 di essi hanno sviluppato GVHD acuta con grado variabile tra I e III. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in tabella 3.2.

### 3.8 Separazione del plasma da sangue periferico

I campioni di sangue periferico prelevati dai pazienti sono stati sottoposti a centrifugazione a 4 °C per permettere la separazione del plasma dalla componente cellulare. I campioni di sangue periferico sono stati processati in provette BD Vacutainer®.



Figura 3.5: Provette BD Vacutainer per la separazione del plasma

Tabella 3.2: Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio.

| Caratteristiche                     | GVHD (n=14)                      | nonGVHD (n=10)                |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Età mediana                         | 50 (range 22-65)                 | 34 (range 18-56)              |
| Dose Mediana CD34 <sup>+</sup> /Kg  | 7,8x10 <sup>6</sup> (5,9-11,4)   | 6,5x10 <sup>6</sup> (3,3-9)   |
| Dose Mediana CD3 <sup>+</sup> /Kg   | 2,96x10 <sup>6</sup> (1,47-5,46) | 3x10 <sup>6</sup> (1,58-4,48) |
| Patologia                           |                                  |                               |
| Linfoma Non Hodgkin                 | 6 (44%)                          | 3 (30%)                       |
| Linfoma di Hodgkin                  | 4 (28%)                          | 6 (60%)                       |
| Mieloma Multiplo                    | 2 (14%)                          | 1 (10%)                       |
| MDS                                 | 2 (14%)                          |                               |
| Tipologia di Donatore               |                                  |                               |
| Matched Unrelated (MUD)             | 9 (64%)                          | 10 (100%)                     |
| Familiare HLA identico              | 5 (36%)                          |                               |
| Regime di condizionamento           |                                  |                               |
| Thiotepa-Ciclofosfamide-Fludarabina | 9 (64%)                          | 5 (50%)                       |
| Thiotepa-Ciclofosfamide             | 5 (36%)                          | 5 (50%)                       |
| Profilassi GVHD                     |                                  |                               |
| Ciclosporina A - Metotrexate        | 12 (85%)                         | 10 (100%)                     |
| Ciclosporina A - Micofenolato       | 2 (15%)                          |                               |
| Insorgenza GVHD (giorno)            | mediana 48 (range 32-90)         |                               |
| Grado GVHD                          |                                  |                               |
| Grado I                             | 2 (14%)                          |                               |
| Grado II                            | 9 (64%)                          |                               |
| Grado III                           | 3 (22%)                          |                               |
| Organi bersaglio                    |                                  |                               |
| Cute                                | 8 (58%)                          |                               |
| Tratto gastrointestinale            | 2 (14%)                          |                               |
| Multi Organo                        | 4 (28%)                          |                               |

Le provette contenenti il prelievo vengono centrifugate una prima volta a 380g per 10 minuti. Il plasma viene raccolto e centrifugato una seconda volta a 380g per 10 min per eliminare le eventuali cellule rimaste in sospensione. Il plasma raccolto viene aliquotato e conservato ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al momento di processarlo, il plasma viene scongelato a temperatura ambiente.

### 3.9 Estrazione di RNA da plasma

Il kit miRvana associa la separazione con una soluzione di fenolo-cloroformio e l'utilizzo di filtri in silice leganti l'RNA. L'estrazione viene effettuata a partire da aliquote di plasma di 500  $\mu\text{l}$ . Al campione vengono inizialmente aggiunti 300  $\mu\text{l}$  di soluzione lisante, contenenti detergenti e  $\beta$ -mercaptoetanol. In seguito si aggiunge una soluzione omogeneizzante pari a 1/10 del volume del lisato. Il campione viene incubato 10 min in ghiaccio. Al termine dell'incubazione viene aggiunto un volume di soluzione di fenolo-cloroformio e si agita vigorosamente per omogeneizzare il campione. Si procede quindi alla separazione in fasi per centrifugazione a 5 minuti a 10000g a temperatura ambiente. Al termine della centrifugazione si preleva la fase acquosa e la si trasferisce in una nuova provetta. Il protocollo prevede a questo punto di scegliere se effettuare un'estrazione dell'RNA totale o ottenere un estratto contenente solo RNA di lunghezza inferiore a 200 nucleotidi.

L'estrazione dell'RNA totale prevede l'aggiunta di 1,25 volumi di etanolo al 100% alla fase acquosa recuperata. La soluzione viene miscelata, caricata sull'apposita membrana legante l'RNA e centrifugato a 10000g per 30 secondi. Si elimina l'eluato e si procede al lavaggio del filtro. Al termine del lavaggio si lascia evaporare l'etanolo dal filtro e si eluisce il campione in 80  $\mu\text{l}$  di acqua.

La procedura per ottenere un eluato arricchito di piccoli RNA prevede l'aggiunta alla fase acquosa recuperata di un volume di etanolo pari a 1/3 del volume della fase acquosa stessa. Dopo aver miscelato la soluzione, si carica sulla colonna e si centrifuga a 10000g per 30 secondi a temperatura ambiente. Si ottiene così un eluato purificato dalle molecole di RNA totale che rimangono legate al filtro. All'eluato si aggiungono 2/3 del volume di etanolo al 100% e si procede con la filtrazione su una nuova colonna. Terminata la filtrazione è necessario procedere con il lavaggio del filtro. Terminato il lavaggio è possibile eluire le corte molecole di RNA in 80  $\mu\text{l}$ .

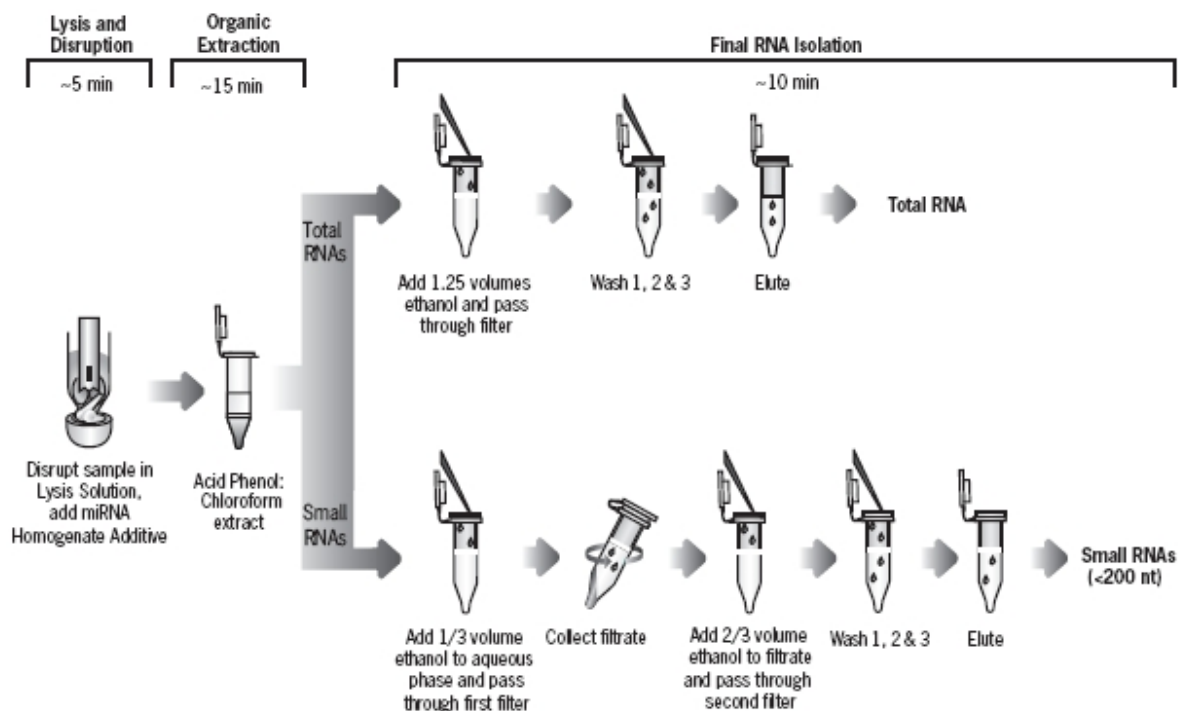


Figura 3.6: Schema per l'estrazione di RNA totale o microRNA con il kit miRvana.

### 3.10 Retrotrascrizione

La reazione di retrotrascrizione consente di ottenere cDNA a partire da RNA utilizzando l'attività catalitica di DNA-polimerasi RNA-dipendenti, le retrotrascrittasi. La retrotrascrizione dei microRNA prevede l'utilizzo di oligonucleotidi particolari in quanto la lunghezza del template, costituito dai microRNA, è molto ridotta (20-23 paia di basi) e non consente l'utilizzo degli oligonucleotidi generalmente utilizzati per la retrotrascrizione, di lunghezza pari a 15-20 paia di basi. Gli oligonucleotidi utilizzati per la retrotrascrizione dei microRNA formano ripiegamenti interni, definiti "*loop*", con un'estremità sporgente al 5'. L'oligonucleotide si appaia ad un'estremità del microRNA e quest'ultimo funge da template per la retrotrascrizione del primo filamento. Il filamento di DNA complementare al microRNA funge da template per la trascrizione del secondo filamento di cDNA complementare al primo. Questo procedimento determina la presenza degli oligonucleotidi utilizzati per la retrotrascrizione all'interno delle molecole di cDNA ottenute. La presenza di queste sequenze è fondamentale per le reazioni successive di PCR quantita-



Figura 3.7: Oligonucleotidi per la retrotrascrizione di microRNA.

tiva poiché gli oligonucleotidi utilizzati sono in parte complementari alle sequenze degli oligonucleotidi utilizzati durante la retrotrascrizione. La retrotrascrizione è stata effettuata sia con oligonucleotidi specifici per un determinato microRNA sia con una miscela di oligonucleotidi in una reazione multipla di amplificazione con “*Megaplex<sup>TM</sup> RT Pool Primers*”.

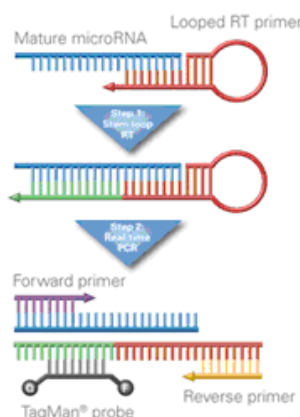


Figura 3.8: Retrotrascrizione di microRNA con primers specifici.

#### *Retrotrascrizione con oligonucleotidi specifici*

La reazione consente di retrotrascrivere un unico microRNA utilizzando oligonucleotidi specifici. Il volume di reazione è di 15 µl in cui sono contenuti Reverse Transcription Buffer 1X, dNTPs 20mMoli, MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 50 U, RNase Inhibitor 2U, soluzione contenente oligonucleotidi specifici (Applied Biosystems) 1X, 5 µl di RNA totale. La reazione prevede 33 minuti a 16 °C per l'appaiamento degli oligonucleotidi al template, 30 minuti a 42 °C per la retrotrascrizione e 5 minuti a 85 °C per l'inattivazione dell'enzima.

*Retrotrascrizione con “Megaplex<sup>TM</sup> RT Pool Primer”*

Il sistema di amplificazione Megaplex (Applied Biosystems) consente di amplificare simultaneamente 380 miRNA diversi con una miscela di oligonucleotidi specifici all'interno di una reazione di retrotrascrizione multipla. In un volume totale di 7.5 µl sono contenuti Reverse Transcription Buffer 1X, dNTPs 20mMoli, MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 50 U, RNase Inhibitor 2 U, Megaplex<sup>TM</sup> RT primers 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 µl di RNA totale. I campioni vengono retrotrascritti tramite 40 cicli termici di tre fasi (16 °C per 2 minuti, 42 °C per 1 minuto e 50 °C per 1 secondo) seguiti da una denaturazione dell'enzima a 85 °C per 5 minuti.

### 3.11 Preamplificazione

La reazione di preamplificazione ha lo scopo di aumentare la quantità di template presente nel campione retrotrascritto, risulta perciò particolarmente utile nel caso in cui la quantità di microRNA contenuta sia particolarmente ridotta. La reazione consiste in una PCR di 12-14 cicli: il numero ridotto di cicli è necessario per non alterare il rapporto quantitativo tra i diversi microRNA presenti nel campione. Gli oligonucleotidi utilizzati per la preamplificazione sono MegaPlex microRNA specifici. Nel volume finale di 25 µl sono contenuti TaqMan® PreAmp Master Mix 1X, Megaplex<sup>TM</sup> PreAmp Primers 1X e 2.5 µl di cDNA (necessariamente retrotrascritto con oligonucleotidi Megaplex<sup>TM</sup>). I cicli termici prevedono 10 minuti a 95 °C, 2 minuti a 55 °C, 2 minuti a 77 °C, 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 4 minuti per 12-14 cicli, ed infine 99.9 °C per 10 minuti.

### 3.12 Real Time PCR

A differenza della PCR tradizionale, la Real Time PCR permette la quantificazione dell'amplificato man mano che esso si accumula durante la reazione attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da particolari sonde. La fluorescenza emessa viene misurata ed espressa attraverso curve di amplificazione che permettono la quantificazione del template iniziale con alta precisione. Il segnale di fluorescenza, proporzionale alla quantità di template accumulata, è generato da sonde fluorescenti sequenza specifiche, come le sonde TaqMan®, o da molecole fluorescenti che si intercalano alla doppia elica di DNA,

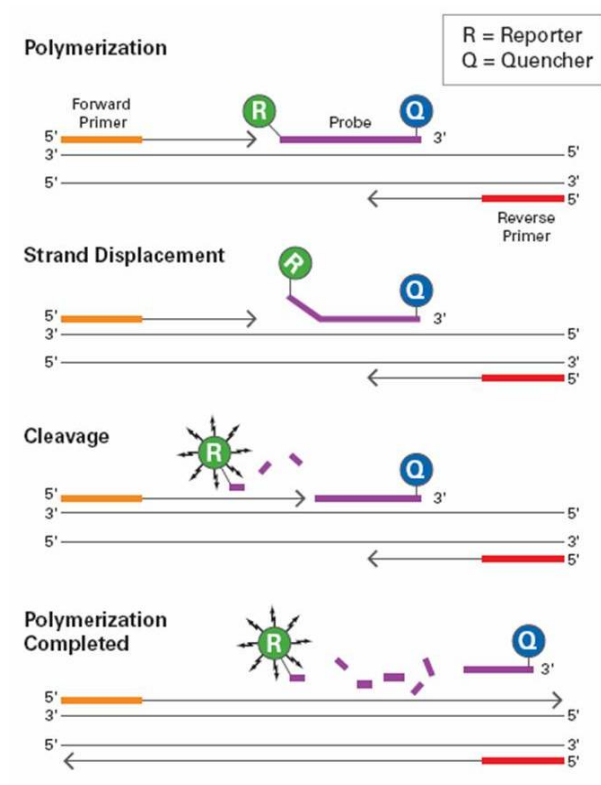


Figura 3.9: Meccanismo di funzionamento di una sonda TaqMan in Real Time PCR.

SybrGreen®. In questo studio sono state utilizzate sonde TaqMan® MGB, oligonucleotidi in grado di appaiarsi al template in posizione compresa tra l'oligonucleotide senso e antisenso. Le sonde presentano una molecola non fluorescente, definita “*quencher*”, legata all'estremità 3', e una molecola “*reporter*” legata all'estremità 5'. Quando la sonda è integra non avviene emissione di fluorescenza in quanto, se eccitata dall'apposito laser dello strumento, l'energia emessa dal *reporter* al 5' viene totalmente assorbita dal *quencher* al 3'. In seguito, durante la polimerizzazione la sonda appaiata al template viene degradata dalla DNA polimerasi stessa: la degradazione della sonda allontana il *quencher* dal *reporter*. In questo modo quando il *reporter* viene eccitato dalla radiazione laser, la fluorescenza emessa non viene più assorbita dal *quencher* (che si trova ora ad una distanza troppo elevata) e viene misurata dallo strumento. La quantità di fluorescenza emessa dal campione è proporzionale alla quantità di *reporter* che emette fluorescenza e di conseguenza è un indice della quantità di prodotto accumulato. Le sonde utilizzate in questo caso presentano al 3' del *quencher* un MGB: *Minor Groove Binder*. Questa molecola ha la

funzione di stabilizzare il legame della sonda al template, aumentandone la temperatura di *melting*. L'accumulo di prodotto viene espresso da una curva di amplificazione che descrive l'andamento dell'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione. All'interno della curva si possono individuare tre fasi ben distinte: una fase esponenziale, in cui la quantità di prodotto raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione, una fase lineare, in cui l'accumulo di prodotto inizia a rallentare poiché i reagenti vanno consumandosi, ed infine la fase di plateau in cui ormai tutto il prodotto è stato amplificato e la quantità di fluorescenza emessa non aumenta più. I dati vengono analizzati considerando la fase esponenziale della reazione, infatti ad ogni ciclo di PCR il prodotto raddoppia e la quantità di target può essere espresso come  $2^n$ , dove  $n$  indica il numero di cicli di amplificazione effettuati.

Vengono così determinati i tre parametri indispensabili per l'analisi della reazione:

- Linea di base (comunemente definita *Baseline*)
- Soglia (comunemente definita *Threshold* )
- Ciclo soglia (*Cycle of threshold*,  $C_t$ )

La *baseline* sta ad indicare il livello di fluorescenza emessa non specifica, ovvero determinata dalla presenza di rumore di fondo e non dalla reazione di amplificazione stessa; la *baseline* può essere impostata automaticamente dal *software* di analisi per ogni pozzetto, oppure può essere impostata manualmente dall'operatore, a seconda delle esigenze.

La *threshold* indica invece il livello minimo di fluorescenza specifica, ed è un parametro molto importante in quanto permette di determinare il ciclo soglia; la *threshold* viene posizionata automaticamente dal *software* o anche in questo caso può essere determinata manualmente dall'utente. La *threshold* viene posizionata in corrispondenza dell'inizio della fase esponenziale, quando l'intensità di fluorescenza indica l'accumulo di prodotto specifico.

Definendo la *threshold* si definisce quindi anche il  $C_t$  per ogni campione, ovvero il ciclo di PCR in cui la fluorescenza accumulata raggiunge la soglia di fluorescenza specifica, non quella accumulata come rumore di fondo ma quella derivata dall'accumulo specifico di prodotto.

La quantificazione del template contenuto nel campione può essere assoluta oppure relativa. La quantificazione assoluta richiede la presenza di un calibratore, ovvero di un

campione contenente un numero noto di copie di un determinato gene, che venga utilizzato per la costruzione di una retta di calibrazione.

Nel nostro studio viene utilizzata invece una quantificazione relativa che è basata sull'utilizzo del metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  che prevede il confronto dei  $C_t$  del campione e quello del gene di riferimento ( $\Delta C_t$ ) rispetto ad un calibratore.

#### *TaqMan® MicroRNA Assay*

Il saggio di Real Time PCR per un singolo microRNA prevede l'utilizzo di una coppia di oligonucleotidi e di una sonda TaqMan specifica per il microRNA da analizzare. In una piastra da 96 pozzetti ogni campione viene analizzato in triplicato. La miscela di reazione contiene Universal TaqMan Master Mix 1X e la miscela di oligonucleotidi e sonda. Dopo la denaturazione iniziale a 95 °C per 10 minuti, vengono effettuati 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi.

#### *TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems)*

Il sistema TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems) è costituito da piastre da 384 pozzetti al cui interno sono contenuti gli oligonucleotidi e la sonda TaqMan specifica per un singolo microRNA.

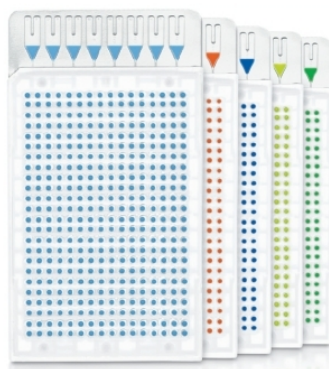


Figura 3.10: Cards TaqMan per la reazione di Real Time PCR: con questa tecnologia è possibile analizzare l'espressione di 381 microRNA in una sola reazione.

In un'unica reazione è pertanto possibile analizzare l'espressione di 381 miRNA differenti e di 3 RNA nucleolari (RNU48, RNU6, RNU44) utilizzati come controllo endogeno della reazione. La miscela contenente TaqMan® Universal Master Mix ed il prodotto di pre-amplificazione viene caricato sulla "card" da 384 pozzetti. La "card" contiene 8 porte

ognuna della quali viene caricata con 100  $\mu$ l di miscela contenente il campione. In totale vengono perciò caricati 800  $\mu$ l. In seguito si procede alla centrifugazione delle cards per 2 minuti a 1200g per far depositare il campione in ciascun pozzetto. Terminata la centrifugazione la card viene sigillata e preparata per essere caricata sullo ABIPrism HT7900 per la reazione di PCR quantitativa. Dopo la denaturazione iniziale a 95 °C per 10 minuti, vengono effettuati 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 60 secondi.

### 3.13 Software di analisi

L'analisi dei dati relativi alle reazioni di amplificazione quantitativa sono stati analizzati con il *software* AbiPrism SDS2.1 fornito da Applied Biosystems. Successivamente i dati sono stati processati con Microsoft Excel al fine di calcolare la quantificazione relativa dei microRNA circolanti rispetto ad un gruppo di donatori sani. I risultati ottenuti sono stati rappresentati mediante l'utilizzo di grafici creati con il programma Graph Pad Prism e con programma statistico R. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'utilizzo del linguaggio statistico *open source* R con l'ausilio di pacchetti *ad hoc* a seconda del tipo di applicazione. Per quanto riguarda le analisi di *pathway* è stato utilizzato il *software* IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Ingenuity Systems). Solo risultati con p-value <0.05 sono stati tenuti in considerazione.

### 3.14 Analisi statistica dei dati

Per quanto riguarda la parte di ricerca di biomarcatori circolanti è stato messo a punto un *workflow* statistico/bioinformatico *ad hoc* per l'analisi di dati di Real Time PCR su microRNA circolanti. Solo molecole detectate in Real Time PCR, quindi amplificabili, sono state tenute in considerazione per le successive analisi biostatistiche. Per rimuovere i miRNA non amplificati il dataset è stato filtrato mantenendo solo miRNA con un valore di  $C_t$  uguale o inferiore a 32 in tutti i campioni analizzati, riducendo così il numero di miRNA da analizzare da 380 a 113. La normalizzazione dei dati da Real Time è stata condotta mediante l'utilizzo di rapporti reciproci (definiti *ratio*) ottenuti calcolando il  $\Delta C_t$  tra ciascun paio di microRNA in maniera iterativa per ciascun campione. Il dataset finale analizzato include 1610 *ratio* per 23 campioni (un campione è stato escluso dalle

analisi a causa della scarsa qualità del dato). Le analisi di espressione differenziale di miRNA sono state effettuate utilizzando t-test (*unpaired*, a due code) con un approccio di *Leave-One-Out Cross Validation*. Il *clustering* gerarchico è stato effettuato mediante l'utilizzo di distanze Euclidee e di *average linkage*. Per quanto riguarda l'analisi predittiva mediante l'utilizzo di microRNA, è stata utilizzata una SVM (*Support Vector Machine*), come implementata nel pacchetto R “e1071”, per classificare campioni di pazienti con o senza GVHD.

# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1 Inibizione della via di segnalazione JAK/STAT in un modello murino di GVHD

#### 4.1.1 CP-690,550 e INC-424 a confronto

Al fine di valutare se il blocco della via di segnalazione JAK/STAT fosse efficace nel prevenire l'insorgenza della GVHD acuta, è stato allestito un modello murino di aGVHD geneticamente incompatibile per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I, nel topo H-2). È stato quindi valutato l'effetto protettivo di due differenti farmaci JAK inibitori: un inibitore selettivo di JAK3, CP-690,550, e un inibitore selettivo di JAK1 e JAK2, INC-424. I farmaci sono stati somministrati per 14 giorni mediante *oral gavage*. La prima somministrazione è iniziata il giorno del trapianto ed è terminata il tredicesimo giorno dopo il trapianto. Il dosaggio di entrambi i farmaci nel modello murino è stato ricavato da dati pubblicati in letteratura [74, 95]. L'INC-424 è stato somministrato due volte al giorno alla concentrazione finale di 0,9 mg/die (90 mg/Kg/die) e il CP-690,550 una volta al giorno alla concentrazione di 0,3 mg/die (15 mg/Kg/die). A tempistiche prestabilite a seconda dell'esperimento, gli animali sono stati sacrificati per la valutazione istologica degli organi bersaglio di GVHD, l'analisi immunofenotipica degli splenociti e per la valutazione dell'alloreattività cellulare con il saggio MLR. Nel dettaglio, sono stati utilizzati topi *inbred* trapiantati alla stessa età e mantenuti in stabulario nelle stesse condizioni (umidità, temperatura, alimentazione) per tutta la durata della speri-

mentazione. Tutti gli animali sono sopravvissuti per l'intera durata della sperimentazione ad eccezione di un topo della coorte INC-424 che è stato sacrificato per eccessiva perdita ponderale al decimo giorno dopo il trapianto e un topo del gruppo GVHD-veicolo che è deceduto al 28 giorno post-trapianto. Il disegno sperimentale è riassunto in tabella 4.1.

Tabella 4.1: Schema sperimentale di trapianto.

| <b>Coorte</b>    | <b>Donatore</b> | <b>Ricevente</b>    | <b>Giorno 0</b>                                                              |
|------------------|-----------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| CTRL Singenico   | C57/BL6         | C57/BL6<br>(6 topi) | XRT 950 cGy<br>TCD-BM $10 \times 10^6$<br>SC $2.5 \times 10^6$               |
| CTRL Allogeneico | C57/BL6         | BALB/c<br>(6 topi)  | XRT 950 cGy<br>TCD-BM $10 \times 10^6$                                       |
| GVHD-veicolo     | C57/BL6         | BALB/c<br>(6 topi)  | XRT 950 cGy<br>TCD-BM $10 \times 10^6$<br>SC $2.5 \times 10^6$<br>Veicolo    |
| INC-424          | C57/BL6         | BALB/c<br>(8 topi)  | XRT 950 cGy<br>TCD-BM $10 \times 10^6$<br>SC $2.5 \times 10^6$<br>INC-424    |
| CP-690,550       | C57/BL6         | BALB/c<br>(6 topi)  | XRT 950 cGy<br>TCD-BM $10 \times 10^6$<br>SC $2.5 \times 10^6$<br>CP-690,550 |

Dati presenti in letteratura mostrano che, in un modello murino di aGVHD analogo al nostro, tra il giorno +4 e il giorno +7 post trapianto gli animali cominciano a presentare i caratteristici segni clinici della GVHD, con un picco di manifestazione della complicità a circa 2 settimane dal trapianto [21]. Studi condotti nel nostro laboratorio infatti dimostrano come il giorno +14 post trapianto sia quello di massima manifestazione clinica della complicità, pertanto i topi sono stati sacrificati al quattordicesimo giorno dopo l'inoculo cellulare. Tra i segni esteriori di aGVHD vi sono l'arruffamento del pelo, la perdita dell'integrità cutanea, la riduzione dell'attività, la perdita ponderale e la postura rannichiata. In queste condizioni sperimentali, topi riceventi diventano in genere moribondi 20-30 giorni dopo il trapianto.

#### 4.1.1.1 Valutazione del chimerismo

Al fine di valutare la buona riuscita del trapianto e il grado di attecchimento dello stesso, è stata effettuata un'analisi del chimerismo post trapianto mediante tecnica citofluorimetrica. I topi donatori e riceventi sono infatti incompatibili per l'antigene H-2, pertanto al giorno +14 post trapianto le cellule spleniche ottenute dagli animali sacrificati sono state marcate con anticorpi anti-H-2Kd-FITC (ricevente) e anti-H-2Kb-PE (donatore) ed è stata effettuata una lettura citofluorimetrica. Come è possibile evincere dalla tabella 4.2, al giorno +14 si osserva un buon attecchimento del trapianto in tutti i gruppi sperimentali, con una percentuale di cellule del donatore superiore al 85%.

Tabella 4.2: Valutazione del chimerismo

| Coorte sperimentale  | % Cellule spleniche H-2Kb <sup>+</sup> $\pm$ SD |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| Controllo Singenico  | 87.8% $\pm$ 3.9                                 |
| Controllo Allogenico | 84.9% $\pm$ 6.5                                 |
| GVHD-Veicolo         | 90.8% $\pm$ 7.2                                 |
| CP-690,550           | 94.9% $\pm$ 3.6                                 |
| INC-424              | 85.8% $\pm$ 1.8                                 |

#### 4.1.1.2 Sopravvivenza e andamento ponderale

L'andamento ponderale rappresenta uno dei principali parametri con cui valutare lo stato di salute dell'animale. Ciascun topo è stato pesato a partire dal giorno -1 fino al giorno +14 o +30 dopo il trapianto. Tutti gli animali sono stati pesati singolarmente ogni 2-3 giorni e sono stati sacrificati in caso di perdita di peso superiore al 25%. Come è possibile notare dai seguenti grafici, gli animali subiscono un brusco calo ponderale tra il giorno -1 e il giorno +6 post trapianto, dovuto all'irradiazione a cui vengono sottoposti prima del trapianto. Il minimo ponderale è raggiunto tra la quarta e sesta giornata in cui, anche secondo dati di letteratura [79, 74], l'effetto dello stress associato all'irradiazione scompare. Tra il giorno +6 e +30 è possibile apprezzare un aumento del peso più o meno rapido a seconda della coorte considerata. Gli animali che riprendono più rapidamente peso, tornando ai valori fisiologici tra la dodicesima e quattordicesima giornata, sono i controlli singenico e allogenico che non sviluppano GVHD. Al contrario, nella coorte GVHD-veicolo è possibile apprezzare un brusco calo ponderale che raggiunge addirittura il 23% al sesto

giorno dopo trapianto. Un leggero aumento ponderale è osservabile nei giorni successivi ma complessivamente l'andamento percentuale medio rimane sempre inferiore alle altre coorti sperimentali. Gli animali trattati con i farmaci mostrano invece un andamento ponderale intermedio tra le coorti GVHD-veicolo e i controlli, ad indicare un grado di GVHD inferiore probabilmente associato al trattamento farmacologico (vedi figure 4.1 e 4.2).

Per quanto riguarda la sopravvivenza, solo un animale della coorte INC-424 è stato sacrificato al giorno +10 post trapianto per eccessiva perdita ponderale.

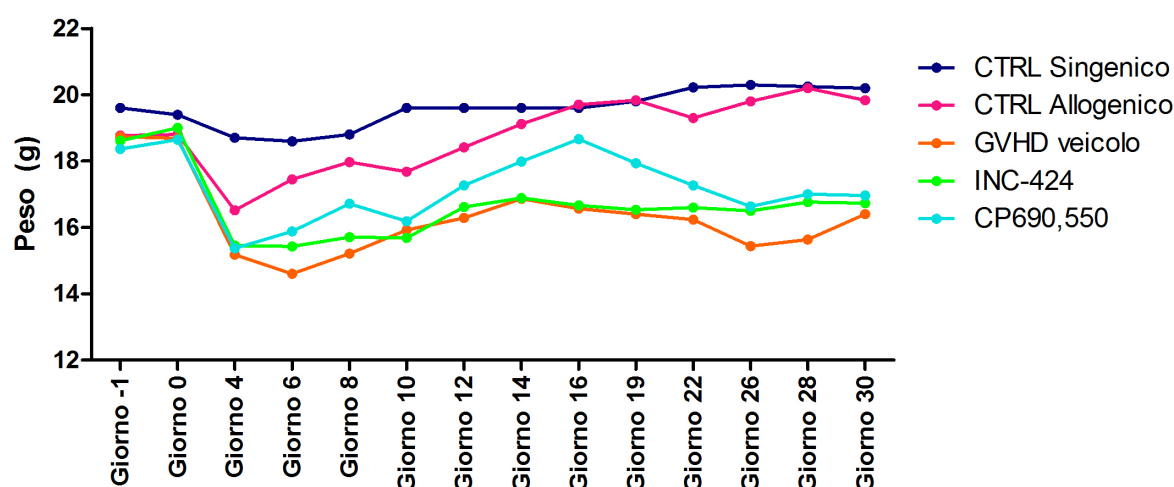


Figura 4.1: Rappresentazione grafica dell'andamento ponderale. Sulle ascisse i giorni post trapianto, in ordinate il peso in grammi.

#### 4.1.1.3 Segni esteriori di aGVHD

Oltre alla variazione ponderale, sono stati monitorati i segni clinici di GVHD acuta. Pelo arruffato, postura rannicchiata, perdita dell'integrità cutanea, assenza di attività e inappetenza rappresentano le principali caratteristiche che sono state monitorate durante l'esperimento. In particolare, sono state riscontrate evidenti variazioni a livello cutaneo e del pelo. Nella coorte GVHD-veicolo è stato possibile osservare una crescente e progressiva perdita dell'integrità cutanea e di pelo, soprattutto nella regione occipitale e a livello addominale. Inoltre, il pelo si è presentato particolarmente arruffato durante tutta la durata dell'esperimento. I topi di questa coorte hanno mostrato inappetenza e una netta

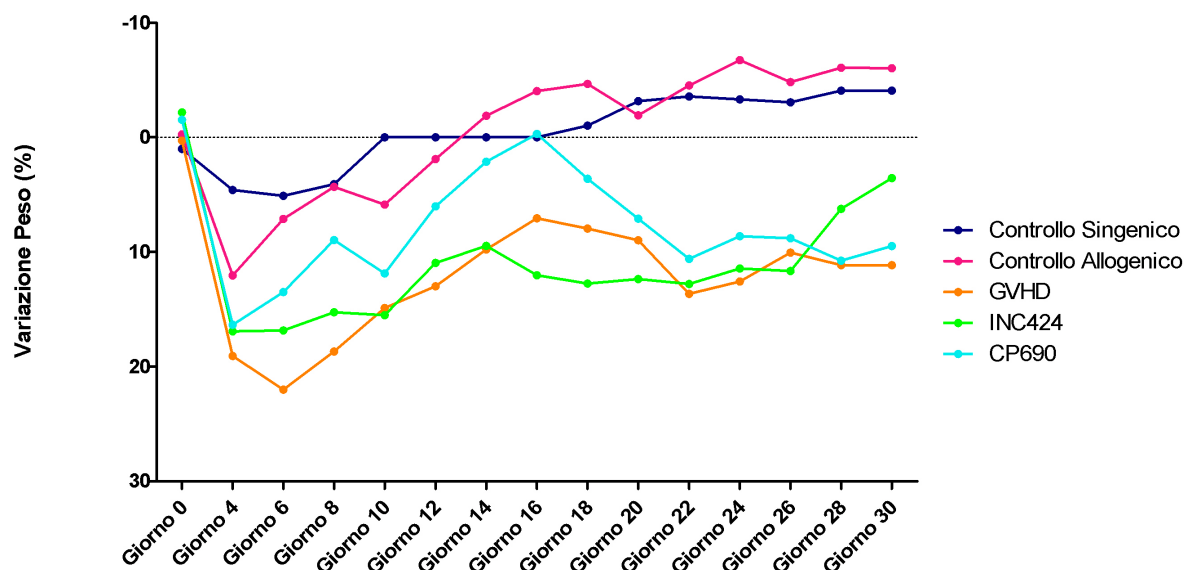


Figura 4.2: Rappresentazione grafica dell'andamento ponderale. Sulle ascisse i giorni post trapianto, in ordinate la variazione ponderale in percentuale rispetto al giorno 0.

diminuzione dell'attività rispetto agli altri gruppi sperimentali. I controlli singenici e allogenici non hanno invece mostrato alcuno dei segni clinici sopra descritti. Nelle coorti sperimentali trattate farmacologicamente e nei primi venti giorni dopo il trapianto si è evidenziato un lieve arruffamento della pelliccia, inappetenza e inattività che però si sono progressivamente ridotte fino alla conclusione dell'esperimento (in figura 4.3 sono riportate delle immagini esemplificative al giorno +14 post trapianto).

#### 4.1.1.4 Analisi Istologica

L'esame istopatologico è stato eseguito in cieco al quattordicesimo giorno dopo il trapianto. Per ciascuno dei topi sacrificati sono stati isolati campioni del tratto gastrointestinale (stomaco, intestino tenue e colon), del tratto dorsale della pelle e del fegato e sono stati fissati in formalina 10%. La natura, la gravità e la distribuzione delle lesioni infiammatorie osservate in organi e tessuti sono state valutate in base a criteri di classificazione istologica precedentemente pubblicati [31]. Per l'analisi quantitativa della GVHD ad ogni sede viene assegnato un valore che varia da 0 (quadro sano) a 4 (quadro grave), i valori possono poi essere sommati per definire il grado globale di GVHD (vedi Materiali e Metodi tabella 3.1).



Figura 4.3: Segni esteriori di aGVHD al giorno +14 post trapianto in topi delle coorti Controllo Singenico, Controllo Allogénico, GVHD-veicolo, CP690,550 e INC-424 (da sinistra a destra).

Dai risultati dell'esame istopatologico (vedi tabella 4.3) si può apprezzare che, come atteso, i topi della coorte di Controllo Singenico ed Allogénico non presentano segni di GVHD a livello di nessuna delle sedi analizzate ad eccezione di un lieve infiltrato cellulare linfoide periduttale nel fegato, evidenziabile solo in due animali. È molto interessante osservare che nemmeno la coorte trattata con il farmaco INC-424 manifesta segni istologici di GVHD. Solo un topo presenta un lieve infiltrato cellulare linfoide epatico ed un altro lieve acantosi ed ipercheratosi dello strato basale dell'epitelio. I gruppi sperimentali GVHD-veicolo e CP-690,550 hanno punteggi istopatologici medi totali comparabili (rispettivamente 12,5 e 11) ad indicare che in entrambe le popolazioni murine al giorno +14 dopo il trapianto sono presenti evidenze istologiche di GVHD. In queste due coorti sperimentali sono state riscontrate evidenze di infiltrati linfoidi epatici (periduttali e portal), necrosi epatica a singola cellula e marcata degenerazione delle cellule parietali gastriche associata sempre ad infiltrazioni linfocitarie intraepiteliali. In aggiunta a questo quadro istopatologico, gli animali della coorte GVHD-veicolo hanno chiari segni di risposta infiammatoria a livello cutaneo caratterizzata da un aumento del numero di linfociti, maggiore vascolarizzazione ed erosioni cutanee e/o ulcerazioni a livello dello strato basale epiteliale.

Tabella 4.3: *Score* istologico di GVHD al giorno +14 per ogni sede anatomica valutata secondo i criteri precedentemente definiti (vedi Materiali e Metodi tabella 3.1).

| <b>Coorte sperimentale</b> | <b>Cute</b> | <b>Fegato</b> | <b>Intestino tenue</b> | <b>Colon</b> | <b>Stomaco</b> |
|----------------------------|-------------|---------------|------------------------|--------------|----------------|
| Controllo Singenico        | 0           | 0.3           | 0                      | 0            | 0.3            |
| Controllo Allogénico       | 0           | 0.3           | 0                      | 0            | 0              |
| GVHD-Veicolo               | 3.3         | 3             | 1.3                    | 1.6          | 3              |
| CP-690,550                 | 1           | 3.3           | 2                      | 1.3          | 3              |
| INC-424                    | 0.25        | 0.25          | 0                      | 0            | 0              |

Conoscendo gli effetti farmacologici dei due inibitori testati ed in particolare, tenendo a mente che l'INC-424 viene utilizzato nel trattamento della mielofibrosi per ridurre la splenomegalia, è stata monitorata la dimensione e la cellularità delle milze degli animali alle diverse tempistiche (+14 e +30). Al giorno +14 post trapianto in particolare, è stato possibile riscontrare dimensioni significativamente inferiori delle milze dei topi trattati con l'INC-424 rispetto a quelle di tutti gli altri gruppi sperimentali. Come è possibile vedere anche in tabella 4.4, l'analisi macroscopica è stata confermata dalla conta degli splenociti. La stessa analisi è stata effettuata anche al giorno +30 post trapianto, dopo

la sospensione del trattamento farmacologico. A questa tempistica è stato interessante osservare come le milze degli animali trattati con INC-424 tornassero a dimensioni “fisiologiche” paragonabili a quelle dei controlli e non vi fossero differenze significative tra le diverse coorti sperimentali.

Le differenze riscontrate tra le diverse coorti sperimentali devono necessariamente essere tenute in considerazione durante l’analisi dell’immunofenotipo delle cellule spleniche. Sarebbe infatti analiticamente scorretto paragonare percentuali di sottopolazioni quando il numero di cellule di partenza è significativamente differente. Le analisi saranno pertanto condotte tenendo in considerazione il numero assoluto di linfociti.

Tabella 4.4: Conta degli splenociti al giorno +14 post trapianto nelle diverse coorti sperimentali (sono riportate le medie  $\pm$ SD).

| Coorte sperimentale  | % Numero di cellule ( $\times 10^6$ ) $\pm$ SD |
|----------------------|------------------------------------------------|
| Controllo Singenico  | 270 $\pm$ 3                                    |
| Controllo Allogenico | 150 $\pm$ 5                                    |
| GVHD-veicolo         | 110 $\pm$ 3                                    |
| CP-690,550           | 145 $\pm$ 8                                    |
| INC-424              | 50 $\pm$ 4                                     |

#### 4.1.1.5 Test di reazione linfocitaria mista (MLR)

Al fine di valutare la risposta allogenica dei linfociti T CD4 e CD8 *in vitro*, è stata allestita una reazione linfocitaria mista (MLR) (vedi Materiali e Metodi) per valutare la produzione di IFN $\gamma$  intracellulare mediante saggio citofluorimetrico utilizzando il kit Inside Stain (Miltenyi). La valutazione della percentuale media di IFN $\gamma$  intracellulare nelle popolazioni CD4 e CD8 è stata analizzata con il programma MACSQuantify<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec). L’analisi è stata effettuata selezionando la popolazione linfocitaria ed escludendo altre popolazioni presenti in coltura e detriti cellulari. Successivamente, sono state selezionate le cellule CD4 e CD8 positive valutando in ogni singola popolazione la percentuale di IFN $\gamma$  intracellulare sfruttando un MoAb anti-IFN $\gamma$ . Come atteso, nel saggio MLR in presenza di DC singeniche la percentuale di linfociti CD4 e CD8 IFN $\gamma^+$  è molto bassa in quanto essendo cellule appartenenti allo stesso ceppo murino non inducono all’oreattività nei linfociti T (vedi figura 4.4). Per quanto riguarda invece la co-coltura allogenica con cellule dendritiche da topi BALB/c, la percentuale di IFN $\gamma$  intracellulare è significativamente

più elevata nel contesto GVHD ( $2,75\% \pm 0,37$ ) rispetto ai controlli singenici ( $0,6\% \pm 0,21$ ) e allogenici ( $0,35\% \pm 0,03$ ) con un p-value (Unpaired t-test) rispettivamente uguale a  $0,0073^{**}$  e  $0,003^{**}$ . Inoltre è possibile riscontrare delle differenze statisticamente significative anche tra campioni appartenenti alla coorte GVHD-Veicolo e a quelle trattate con INC-424 e CP-690,550. La percentuale di linfociti T CD4  $\text{IFN}\gamma^+$  è infatti minore nei campioni appartenenti alle coorti trattate farmacologicamente: INC-424  $0,56\% \pm 0,16$  e CP-690,550  $1,34\% \pm 0,01$ . Le differenze sono statisticamente significative sia nel confronto tra la coorte GVHD-veicolo e INC-424 (p-value  $0,0056^{**}$ ) che tra quelle GVHD e CP-690,550 (p-value  $0,0193^*$ ). Le stesse differenze si riscontrano nella popolazione CD8<sup>+</sup> per l'INC-424 anche se sono al limite della significatività (p-value  $0,0513$  NS) ma non per il CP-690,550 in cui è addirittura stata rilevata una percentuale di linfociti T CD8  $\text{IFN}\gamma^+$  maggiore rispetto a quella dei campioni GVHD-veicolo (rispettivamente  $2,16\% \pm 0,43$  e  $1,91\% \pm 0,14$ ) (vedi figura 4.5).

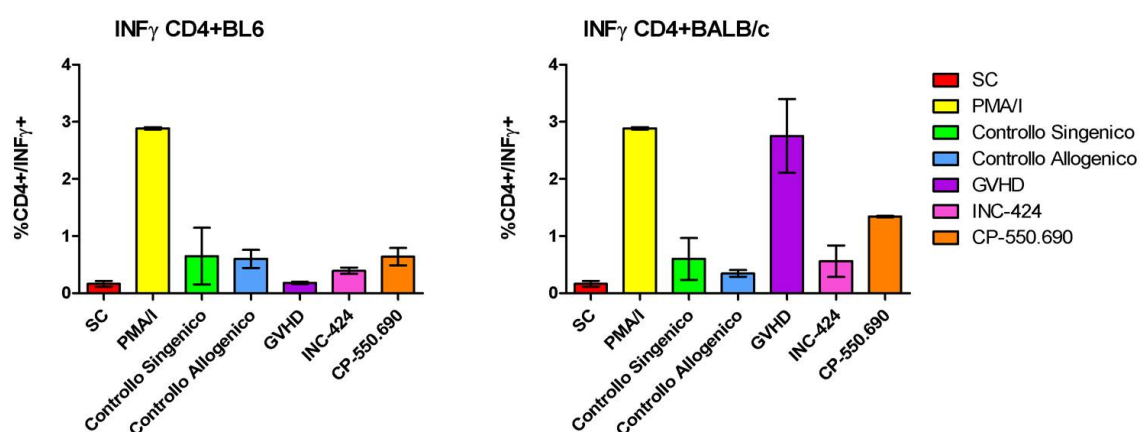


Figura 4.4: Risultati della reazione linfocitaria mista (MLR) al giorno +14 post trapianto. In grafico sono rappresentate le percentuali di cellule T CD4<sup>+</sup> positive per  $\text{IFN}\gamma$  intracellulare. A sinistra i risultati derivanti dalla stimolazione con DC singeniche, a destra allo- geniche. Il controllo positivo è rappresentato dal cellule stimulate con PMA/Ionomicina (PMA/I), il controllo negativo da cellule spleniche da sole (SC, *spleen cells*).

#### 4.1.1.6 Analisi immunofenotipica dei linfociti T splenici

Al fine di valutare l'azione dei due farmaci a livello dei linfociti T, al giorno +14 post trapianto sono state prelevate le milze dagli animali sacrificati, sono stati isolati gli sple-

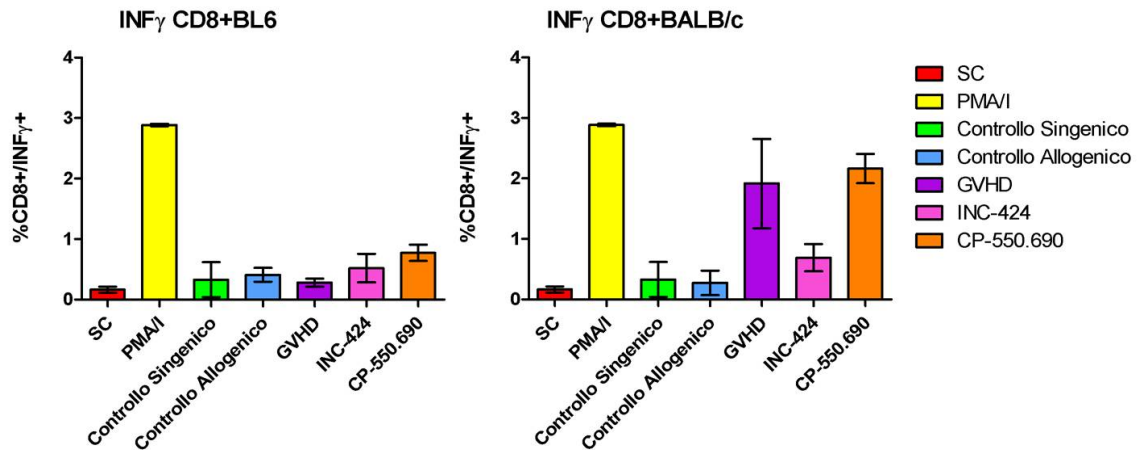


Figura 4.5: Risultati della reazione linfocitaria mista (MLR) al giorno +14 post trapianto. In grafico sono rappresentate le percentuali di cellule T CD8<sup>+</sup> positive per IFN $\gamma$  intracellulare. A sinistra i risultati derivanti dalla stimolazione con DC singeniche, a destra allo-geniche. Il controllo positivo è rappresentato dal cellule stimulate con PMA/Ionomicina (PMA/I), il controllo negativo da cellule spleniche da sole (SC, *spleen cells*).

nociti, ed è stata effettuata un'analisi immunofenotipica mediante citometria a flusso. In particolare è stato valutato il rapporto CD4/CD8, il profilo di attivazione e maturazione dei linfociti T ed il grado di polarizzazione nei diversi *subset* cellulari quali linfociti Th17 e linfociti T regolatori.

La percentuale di linfociti T *helper* e citotossici è piuttosto eterogenea tra le diverse coorti sperimentali, come atteso però il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nel gruppo GVHD-veicolo è sempre minore rispetto al gruppo di controllo (vedi tabella 4.5). Dati presenti in letteratura confermano come la popolazione CD8 raggiunga più velocemente valori fisiologici rispetto a quella CD4 sia nell'uomo che nel modello murino dopo HSCT [61]. Nei gruppi di controllo, Singenico e Allogenico, è stato possibile osservare una maggior percentuale di cellule T CD4 rispetto a cellule T CD8 citotossiche. I valori si avvicinano a quelli fisiologici murini ad indicare che le popolazioni T recuperano in tempi brevi dopo il trapianto, sia nel caso allogenico che singenico [32]. Tendenza opposta si è riscontrata nel gruppo GVHD-veicolo in cui le percentuali di cellule CD8 sono maggiori rispetto a quelle di CD4 ad indicare invece un recupero delle cellule emopoietiche posticipato (soprattutto per le CD4) dopo il trapianto [76]. Gli animali trattati con INC-424 hanno proporzioni di cellule

T paragonabili a quelle dei controlli mentre quelli trattati con il CP-690,550 presentano percentuali simili alla coorte GVHD-veicolo. I valori sono riportati in tabella 4.5.

Per quanto riguarda lo stato di attivazione dei linfociti T, diversi studi dimostrano una

Tabella 4.5: In tabella sono riportati i valori dei rapporti CD4/CD8 nelle diverse coorti sperimentali.

| Coorte sperimentale  | Rapporto CD4/CD8 |
|----------------------|------------------|
| Controllo Singenico  | 2                |
| Controllo Allogénico | 1.86             |
| GVHD-veicolo         | 0.89             |
| CP-690,550           | 1.26             |
| INC-424              | 2.77             |

upregolazione di alcuni marcatori di attivazione in pazienti con aGVHD rispetto ai controlli sani [75]. Inoltre l'upregolazione dei marcatori di attivazione CD25 e CD69 sui linfociti T è stato associato ad un'aumentata incidenza di GVHD [87, 47], tuttavia i risultati presenti in letteratura sono piuttosto controversi. Nel nostro studio è stato possibile rilevare un numero assoluto di splenociti  $CD3^+/CD25^+/CD69^+$  significativamente inferiore nella coorte INC-424 rispetto alla coorte GVHD-veicolo (Unpaired t-test, p Value= 0,0019\*\*). La stessa tendenza è stata riscontrata paragonando i valori ottenuti nei controlli allogénici e nei GVHD-veicolo, seppur senza significatività statistica. Per quanto riguarda il gruppo di animali trattati con CP-690,550 il numero assoluto di cellule  $CD3^+/CD25^+/CD69^+$  rilevato è elevato ( $0,59 \times 10^6 \pm 0,12$ ) e paragonabile a quello della coorte GVHD-veicolo ( $0,65 \times 10^6 \pm 0,10$ ). I dati sono rappresentati nel grafico 4.6.

L'analisi immunofenotipica dello stadio maturativo dei linfociti T non ha invece evidenziato particolari differenze tra i gruppi sperimentali, se non per quanto riguarda il numero assoluto di linfociti T *effector memory* e il numero di linfociti T *naive*. In particolare, il numero assoluto di linfociti T  $CD4^+CD8^+CD44^+/CD62L^-$  ( $T_{em}$ ) è significativamente minore nei gruppi di controllo e INC-424 se confrontati con il gruppo GVHD-veicolo (p-value <0.02). La coorte trattata con CP-690,550 non ha invece mostrato differenze statisticamente significative rispetto al gruppo di animali che ha sviluppato GVHD (vedi figura 4.7). Per quanto riguarda le cellule  $CD4^+CD44^-/CD62L^+$  ( $T_{naive}$ ) i valori assoluti risultano più elevati nelle coorti trattate farmacologicamente rispetto a quella GVHD-veicolo (vedi figura 4.8).

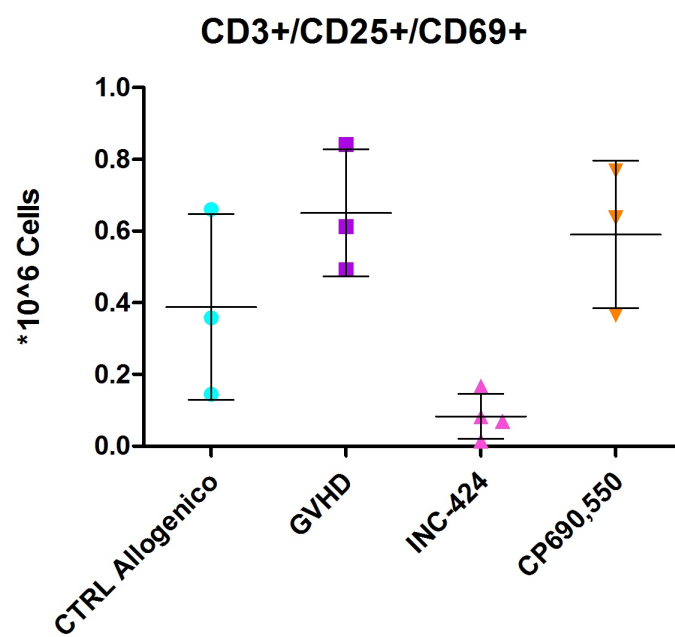


Figura 4.6: Espressione dei marcatori di attivazione CD25 e CD69 in funzione del numero assoluto di splenociti CD3<sup>+</sup>.

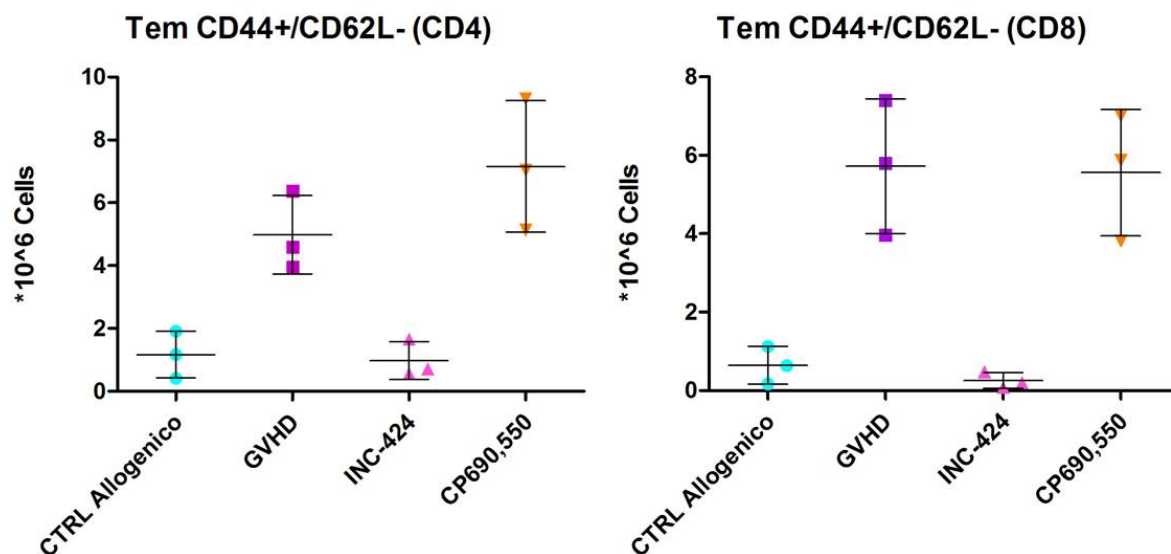


Figura 4.7: Rappresentazione grafica del numero assoluto di linfociti T CD4 (a sinistra) e CD8 (a destra) *effector memory*.

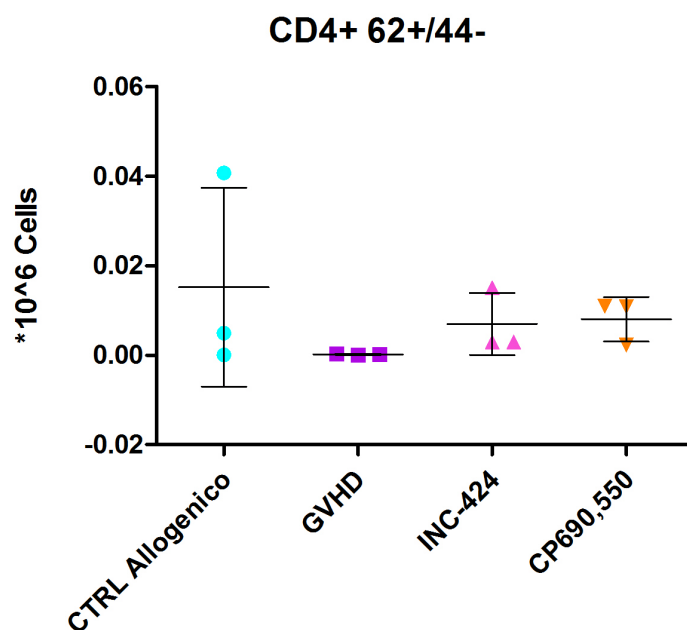


Figura 4.8: Rappresentazione grafica del numero assoluto di linfociti T CD4 *naive*.

Ad oggi, il coinvolgimento della sottopopolazione Th17 nel contesto della GVHD non è ancora del tutto chiaro. È stata pertanto effettuata un'analisi immunofenotipica su cellule spleniche per caratterizzare al meglio anche questa sottopopolazione. Sulla base di dati presenti in letteratura, sono state definite Th17 linfociti CD4 positivi per IL-17A [101]. Paragonando il numero totale di linfociti Th17 tra le diverse coorti sperimentali non sono state rilevate differenze statisticamente significative, sebbene gli animali che sviluppano GVHD e quelli trattati con CP-690,550 mostrino un aumento del numero medio di Th17 (vedi figura 4.9).

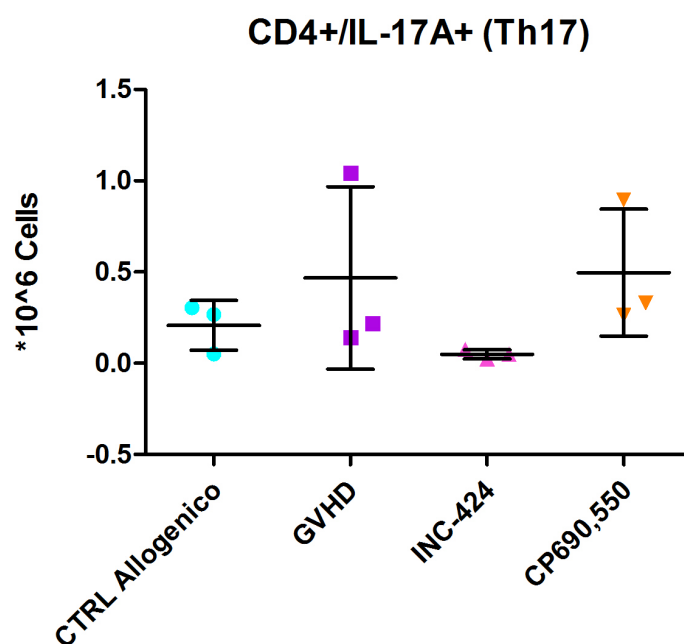


Figura 4.9: Rappresentazione grafica del numero assoluto di linfociti *Thelper*17.

Analogamente alle Th17, anche un'altra popolazione cellulare mostra un coinvolgimento nella patogenesi e regolazione della GVHD, le cellule T regolatorie. Nonostante, come per le Th17, il loro coinvolgimento non sia del tutto noto, alcuni studi [44, 68] mostrano un'attività delle  $T_{reg}$  nel controllo della GVHD. Tuttavia, la caratterizzazione immunofenotipica al giorno +14 post trapianto non ha mostrato, come per le Th17, differenze statisticamente significative.

### 4.1.2 Ottimizzazione del trattamento con INC-424

Il confronto tra il trattamento con due differenti inibitori di JAK ha mostrato come l'inibizione selettiva di JAK1 e JAK2 sia più efficace nel prevenire lo sviluppo di GVHD acuta, sia dal punto di vista dell'analisi istopatologica, sia dall'analisi dell'immunofenotipo dei linfociti T splenici. In quest'ultimo caso, nonostante non siano sempre state rilevate differenze statisticamente significative, è possibile notare come ad esempio il numero di linfociti *Tnaive* sia maggiore e il numero di  $T_{em}$  (effettrici della risposta GVHD) sia minore rispetto al trattamento con CP-690,550. Anche per quanto riguarda lo stato di salute degli animali, ad un'analisi macroscopica gli animali trattati con INC-424 mostravano un benessere maggiore rispetto a quelli trattati con CP690,550, nonché la curva dell'andamento ponderale era migliore nel caso di trattamento con INC-424.

Tuttavia, la dose di INC-424 somministrata è stata ottenuta da dati pubblicati in letteratura per il trattamento della mielofibrosi e nel contesto del trapianto allogenico mostra effetti citotossici a livello linfocitario, come documentato da differenze nella cellularità delle milze nelle diverse coorti sperimentali. È stato quindi effettuato un ulteriore esperimento per definire la dose ottimale di INC-424 con la quale trattare gli animali. Analogamente all'esperimento precedente, sono state incluse due coorti di controllo, singenico e allogenico, nonché una coorte che avrebbe sviluppato aGVHD, e tre coorti di animali trattati con dosi scalari di farmaco. Partendo dalla dose riportata in letteratura di 90mg/kg/die [95], si è ridotta la dose a 45mg/kg/die per la corte sperimentale INC-45 e a 22,5mg/kg/die per la corte sperimentale INC-22,5. Sono inoltre state aggiunte due coorti di topi in cui il farmaco è stato somministrato solamente ai donatori prima del trapianto per verificare se l'inibizione del *signaling* di JAK/STAT a livello dei linfociti T del donatore fosse efficace nel prevenire la GVHD nei topi riceventi. Lo schema sperimentale è riassunto in tabella 4.6.

#### 4.1.2.1 Valutazione del chimerismo

Come per il primo esperimento, al fine di valutare la buona riuscita del trapianto e il grado di attecchimento dello stesso, è stata effettuata un'analisi del chimerismo post trapianto. Anche in questo caso tutti gli animali hanno mostrato un ottimo attecchimento (vedi tabella 4.7), paragonabile a quello del primo esperimento, eccezion fatta per il gruppo Controllo Allogenico che ha mostrato un attecchimento piuttosto basso (46%). Un topo

Tabella 4.6: Schema sperimentale del trapianto (*donor pre-t* sono topi donatori pre-trattati col farmaco).

| Coorte Sperimentale                      | Donor         | Ricevente    | Giorno 0                                               |
|------------------------------------------|---------------|--------------|--------------------------------------------------------|
| CTRL Singenico                           | C57Bl/6       | C57Bl/6 n=15 | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD                         |
| CTRL Allogenico                          | C57Bl/6       | BALB/c n=15  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD                         |
| GVHD-veicolo                             | C57Bl/6       | BALB/c n=15  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>Veicolo INC-424      |
| INC-90                                   | C57Bl/6       | BALB/c n=15  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>INC-424 90mg/Kg/die  |
| INC-45                                   | C57Bl/6       | BALB/c n=15  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>INC-424 45mg/Kg/die  |
| INC-22.5                                 | C57Bl/6       | BALB/c n=15  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>INC-424 45mg/Kg/die  |
| Riceventi<br>donor pre-t                 | C57Bl/6 pre-t | BALB/c n=5   | TBI 950 Gy<br>BM-TCD donor pre-t<br>SC-BCD donor pre-t |
| CTRL Allogenico<br>Riceventi donor pre-t | C57Bl/6 pre-t | BALB/c n=5   | TBI 950 Gy<br>BM-TCD donor pre-t                       |

della coorte GVHD-veicolo e un controllo allogenico non hanno ricostituito adeguatamente e sono morti entro pochi giorni dal trapianto.

Tabella 4.7: Valutazione del chimerismo nelle diverse coorti sperimentali.

| Coorte sperimentale                      | % Cellule spleniche H-2Kb <sup>+</sup> $\pm$ SD |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Controllo Singenico                      | 84% $\pm$ 3                                     |
| Controllo Allogenico                     | 46% $\pm$ 4                                     |
| GVHD                                     | 95% $\pm$ 2                                     |
| INC-90                                   | 86% $\pm$ 10                                    |
| INC-45                                   | 95% $\pm$ 4                                     |
| INC-22.5                                 | 97% $\pm$ 4                                     |
| CTRL Allogenico da donatori pre-trattati | 61% $\pm$ 20                                    |
| Riceventi da donatori pre-trattati       | 95% $\pm$ 3                                     |

#### 4.1.2.2 Sopravvivenza e andamento ponderale

Come atteso, anche durante questo esperimento gli animali hanno mostrato un brusco calo ponderale tra il giorno 0 e il giorno +6 post trapianto legato al regime di condizionamento. Il minimo ponderale viene raggiunto tra il giorno +4 e il giorno +6, ma, con le dovute differenze per ciascuna coorte sperimentale, il peso torna a salire gradualmente fino al giorno +30. Nella coorte GVHD-veicolo è possibile rilevare un brusco calo ponderale che, nonostante un lieve miglioramento nei giorni successivi, resta sempre inferiore alle altre coorti sperimentali. Gli animali trattati con farmaci presentano invece un andamento ponderale intermedio tra le coorti GVHD-veicolo e i Controlli Singenici e Allogenic, ad indicare una riduzione della risposta aGVHD probabilmente associata al trattamento farmacologico. La coorte INC-90 presenta un andamento ponderale superiore rispetto alle altre coorti, anche se dal giorno +20 tornano tutte a perdere peso. È possibile inoltre osservare un progressivo peggioramento dell'andamento ponderale fino al giorno +60, probabile indice della ripresa della malattia in seguito a sospensione del trattamento farmacologico (vedi figura 4.10). I dati dell'andamento ponderale sono inoltre confermati da quelli della sopravvivenza media (OS, *overall survival*), che mostrano come le coorti di controllo e le coorti sottoposte a trattamento farmacologico abbiano una sopravvivenza maggiore rispetto alla coorte a cui è stato somministrato solo il veicolo. È possibile rilevare un'alta mortalità nella coorte INC-90 dovuta probabilmente alla tossicità del farmaco

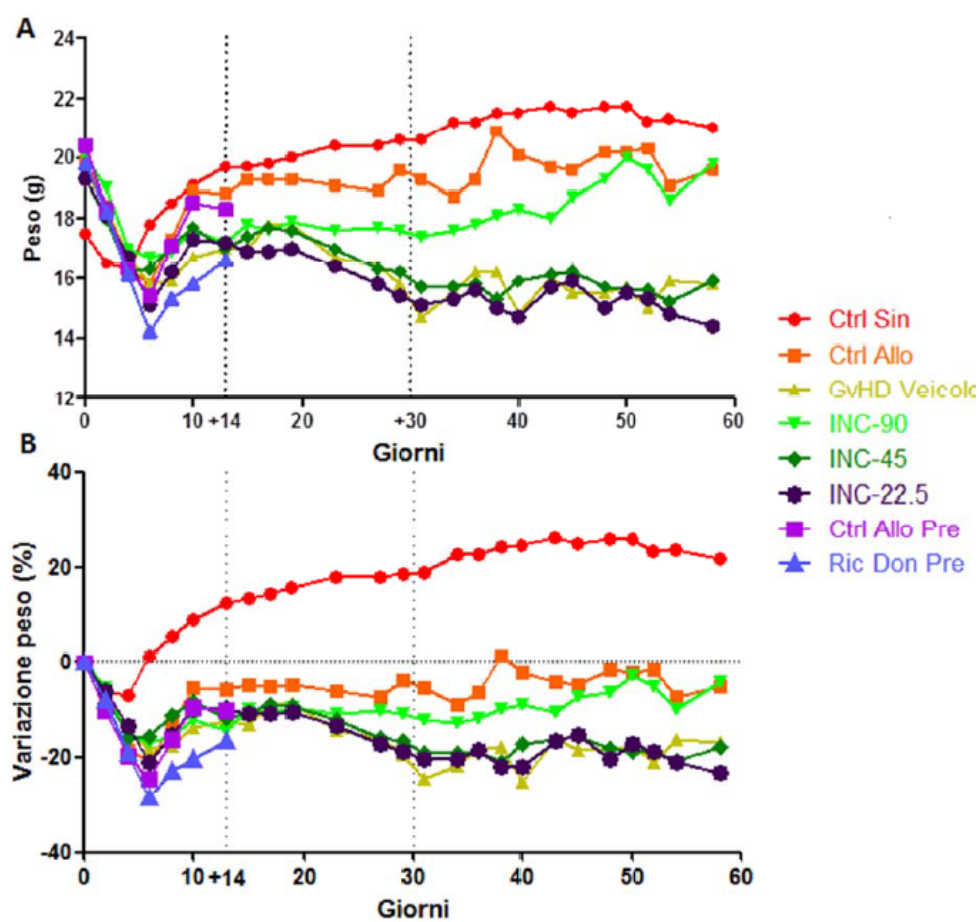


Figura 4.10: Variazione media ponderale in grammi (A) e in percentuale (B) dal giorno 0 al giorno +60, termine dell'esperimento.

(vedi figura 4.11). Le coorti INC-45 e INC-22,5 presentano invece una sopravvivenza media pari quasi ai controlli allogenici e singenici, e nel particolare la coorte INC-45 presenta la percentuale di sopravvivenza maggiore tra le coorti trattate con il farmaco. Le coorti del Controllo Allogeneico dei riceventi di donatori pretrattati e dei Riceventi da donatori pretrattati sono state monitorate fino al giorno +14, giorno in cui tutti i componenti di queste coorti sono stati sacrificati per effettuare le analisi: nessun componente di queste coorti è morto prima del giorno +14 post-trapianto.

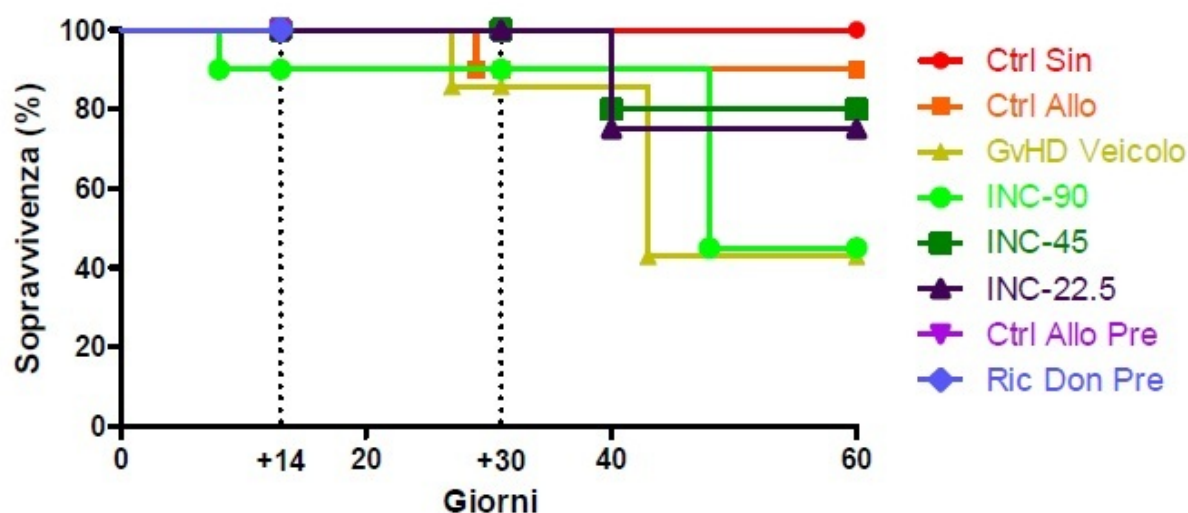


Figura 4.11: Sopravvivenza percentuale delle diverse coorti dal giorno 0 al giorno +60.

#### 4.1.2.3 Segni esteriori di aGVHD

L'analisi dei segni esteriori di aGVHD ha mostrato forti segni clinici di GVHD, quali pelo arruffato, postura rannicchiata, perdita dell'attività motoria e dell'integrità cutanea, per le coorti GVHD-veicolo e quella Riceventi da donatori pre-trattati per tutta la durata dell'esperimento. Gli animali di controllo (singenico, allogenico e da donatori pre-trattati), non hanno mostrato invece segni clinici di GVHD. Le tre coorti trattate farmacologicamente hanno mostrato invece un quadro clinico decisamente migliore rispetto alla coorte GVHD-veicolo, inoltre vi è stata una quasi totale assenza di segni clinici di GVHD fino a dopo una settimana dalla sospensione del trattamento farmacologico. Tuttavia, in seguito a sospensione del trattamento farmacologico anche queste coorti hanno cominciato a mostrare segni di aGVHD.

#### 4.1.2.4 Analisi Istologica

Analogamente ai dati ottenuti dal primo esperimento, l'esame istopatologico al giorno +14 post trapianto rivela che mentre le coorti di controllo non presentano segni di aGVHD in nessun organo, la coorte GVHD-veicolo mostra marcati segni di aGVHD. È interessante notare come le coorti trattate con il farmaco (INC-90, INC-45, INC-22,5) mostrino una netta diminuzione dei segni della aGVHD (p-value rispettivamente di  $0,7 \times 10^{-4}$ , 0,0004 e 0,002). Concordemente ai risultati della curva di sopravvivenza, 3 campioni su 4 della coorte INC-90 riportano ipertrofia centrolobulare e degenerazione vacuolare a livello epatico, suggerendo un danno tossico legato all'elevata dose di farmaco. La coorte dei Riceventi di donatori pretrattati (vedi tabella 4.8), al contrario delle altre coorti sperimentali, mostra invece un alto *score* di aGVHD: questo dato suggerisce che sia necessario un trattamento cronico con il farmaco per raggiungere l'effetto terapeutico, e che l'interruzione del trattamento con l'inibitore di JAK1 e JAK2 causi una ripresa di malattia.

Tabella 4.8: *Score* istopatologici di aGVHD al giorno +14 post trapianto divisi per sede anatomica analizzata (*donor pre-t* sono donatori pre-trattati col farmaco).

| Coorte sperimentale   | Cute | Fegato | Intestino tenue | Colon | Totale |
|-----------------------|------|--------|-----------------|-------|--------|
| Controllo Singenico   | 0.2  | 1      | 0.2             | 0.2   | 1.6    |
| Controllo Allogeneico | 0.2  | 0.6    | 0               | 0     | 0.8    |
| GVHD                  | 3.5  | 2.25   | 3.25            | 3     | 12     |
| INC90                 | 0.25 | 1.5    | 0               | 0.5   | 2.25   |
| INC45                 | 0.2  | 2      | 1               | 0.8   | 4      |
| INC22.5               | 1.2  | 2.6    | 1.4             | 1.6   | 6.8    |
| CTRL Allo donor pre-t | 0    | 1      | 0.4             | 0     | 1.4    |
| Riceventi donor pre-t | 4    | 3.2    | 2.6             | 2.6   | 12.4   |

Come atteso in seguito alla sospensione del trattamento farmacologico, l'analisi istopatologica effettuata al giorno +30 post trapianto ha mostrato una ripresa della aGVHD da parte delle coorti precedentemente trattate, senza differenze statisticamente significative con la coorte GVHD-veicolo.

#### 4.1.2.5 Test di reazione linfocitaria mista (MLR)

Come per il precedente esperimento, è stato condotto un test di reazione linfocitaria mista al giorno +14 post trapianto al fine di valutare la risposta allogenica dei linfociti T prelevati dalle diverse coorti sperimentali. Come atteso, in presenza di DC singeniche (C57Bl/6), la percentuale di linfociti  $CD4^+$   $IFN\gamma^+$  resta molto bassa, e nessuna coorte sembra avere una particolare reattività. Per quanto riguarda la co-cultura con DC allo-geniche (BALB/c), la percentuale di cellule  $IFN\gamma^+$  nel contesto GVHD-veicolo ( $5\% \pm 1$ ) è significativamente più elevata rispetto ai controlli singenici ( $3\% \pm 1$ ). È possibile inoltre riscontrare differenze statisticamente significative anche tra le coorti trattate col farmaco e la coorte GVHD-veicolo. Nel particolare, il numero di cellule  $CD4^+$  alloreattive appartenenti alle coorti INC-90 ( $2\% \pm 1$ ) e INC-45 ( $0,1\% \pm 1$ ) risulta significativamente ridotto rispetto alla coorte aGVHD, con un p-value rispettivamente pari a 0,004 e 0,0008. La percentuale di cellule  $CD4^+$   $IFN\gamma^+$  nei Controlli Allogeni ( $7\% \pm 3$ ) e nei Controlli Allogeni dei riceventi da donatori pretrattati ( $5\% \pm 3$ ) mostrano una più elevata attivazione in senso allogenico *in vitro*, dovuta probabilmente ad una diversa cinetica di ricostituzione delle popolazioni linfocitarie post trapianto in un contesto di stimolazione allogenica. La percentuale di linfociti alloreattivi nella coorte dei Riceventi da donatori pretrattati ( $5\% \pm 1$ ) non risulta significativamente differente da quella della coorte GVHD-veicolo (p-value 0,47), suggerendo ancora una volta la necessità di un trattamento cronico col farmaco per ottenere una riduzione dell'alloreattività dei linfociti trapiantati (vedi figura 4.12).

#### 4.1.2.6 Analisi immunofenotipica dei linfociti T splenici

Analogamente al primo esperimento, abbiamo effettuato un'analisi immunofenotipica dei linfociti splenici al giorno +14 post trapianto per verificare la presenza di differenze tra i diversi dosaggi somministrati in termini di maturazione, differenziamento e rapporti tra le diverse popolazioni cellulari.

Come atteso, nelle coorti del controllo singenico, del controllo allogenico e del controllo allogenico dei riceventi da donatori pretrattati è possibile osservare un aumento del rapporto  $CD4/CD8$  rispetto alla coorte GVHD-veicolo, che presenta un numero maggiore di linfociti citotossici. Le coorti INC-90, INC-45 e INC-22,5 presentano un rapporto maggiore rispetto a quello della coorte GVHD-veicolo, ma il rapporto torna a diminuire in seguito

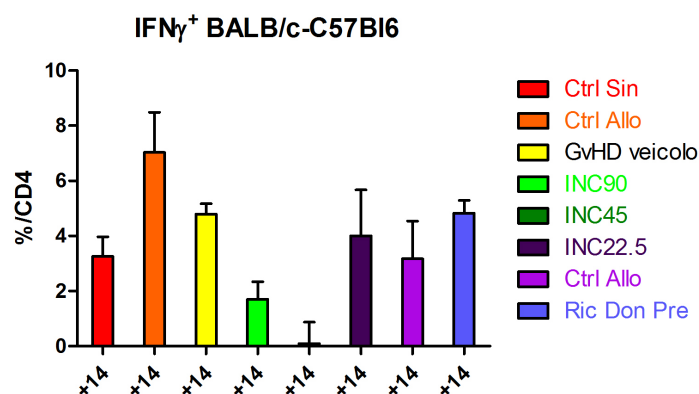


Figura 4.12: Risultati della reazione linfocitaria mista (MLR) al giorno +14 post trapianto. In grafico sono rappresentate le percentuali di cellule T CD4<sup>+</sup> positive per IFN $\gamma$  intracellulare. I dati sono normalizzati sulla MLR con DC singeniche.

a sospensione del trattamento farmacologico, come osservabile ai giorni +30 e +60 post trapianto. La coorte dei Riceventi da donatori pretrattati presenta invece un rapporto del tutto paragonabile a quello della coorte GVHD-veicolo. Con l'evoluzione della malattia è possibile notare nelle coorti colpite da aGVHD, ed in misura minore anche nelle coorti trattate col farmaco, l'inversione del rapporto CD4/CD8 a favore dei linfociti citotossici (vedi tabella 4.9).

Tabella 4.9: Rapporto CD4/CD8 nelle diverse coorti sperimentali (media).

| Coorte sperimentale                   | +14 | +30 | +60 |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|
| Controllo Singenico                   | 1.5 | 2.9 | 2.2 |
| Controllo Allogénico                  | 2.8 | 3.6 | 2   |
| GVHD                                  | 0.7 | 0.6 | 2.6 |
| INC90                                 | 1.9 | 0.8 | 1.1 |
| INC45                                 | 1   | 0.8 | 0.9 |
| INC22.5                               | 1.1 | 1   | 0.7 |
| CTRL allogénico donatori pre-trattati | 1.2 | /   | /   |
| Riceventi di donatori pre-trattati    | 0.6 | /   | /   |

L'analisi dei marcatori di attivazione, in particolare l'upregolazione del CD25 sui linfociti T CD4 e CD8, non ha mostrato differenze statisticamente significative tra le coorti trattate farmacologicamente e la coorte GVHD-veicolo. In particolare, non vi sono differenze che

vengano conservate per tutta la durata dell'esperimento ( $p$ -value  $>0.05$ ). È comunque possibile delineare un *trend* di diminuzione della percentuale di  $CD8^+/CD25^+$  nei gruppi trattati col farmaco rispetto a quello che ha sviluppato aGVHD (vedi figura 4.13).

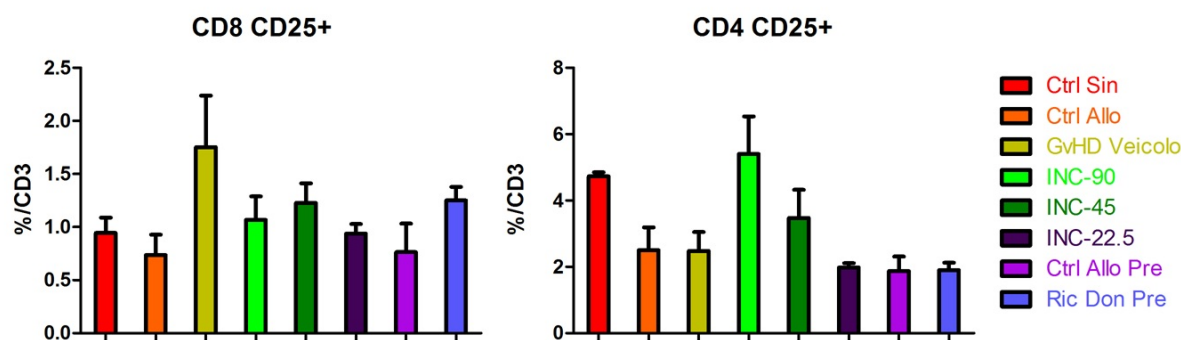


Figura 4.13: Rappresentazione grafica della percentuale di linfociti CD4 e CD8 CD25<sup>+</sup> al giorno +14 post trapianto.

L'analisi degli stadi maturativi dei linfociti T ha portato a dei risultati analoghi a quelli ottenuti nel primo esperimento. In particolare, nonostante non vi sia una differenza statisticamente significativa, è possibile individuare comunque un *trend* nelle coorti trattate col farmaco, che presentano un numero maggiore di linfociti T CD8 *naïve* rispetto alla coorte GVHD-veicolo, dove sono praticamente assenti. In tutti i gruppi è stato inoltre rilevato un numero elevato di T *effector memory*, mentre le altre sottopopolazioni non hanno mostrato differenze statisticamente significative (vedi figura 4.14).

Rispetto all'esperimento precedente, volendo confrontare diversi dosaggi di farmaco per capire quale fosse quello più adatto, è stata effettuata un'analisi più approfondita della polarizzazione dei linfociti T in linfociti Th1, Th2 e Th17, nonché in T<sub>reg</sub>. Le diverse polarizzazioni dei linfociti T *helper* sono infatti in grado di svolgere ruoli diversi ed influire in modo differente sullo sviluppo e sulla gravità della malattia. L'identificazione delle diverse sottopopolazioni è stata effettuata mediante marcatura intracellulare delle principali citochine prodotte, ovvero IFN $\gamma$  per i Th1, IL-4 per i Th2 e IL-17A per i Th17. Nonostante sia possibile evidenziare una diminuzione significativa dei linfociti Th17 ( $p$ -value 0,05) nelle coorti trattate col farmaco rispetto alla coorte GVHD-veicolo, non è possibile attribuire nessun significato statistico a questo dato, in quanto non vi è differenza significativa tra la coorte GVHD-veicolo e le coorti di controllo (vedi figura 4.15). Anche per quanto riguar-

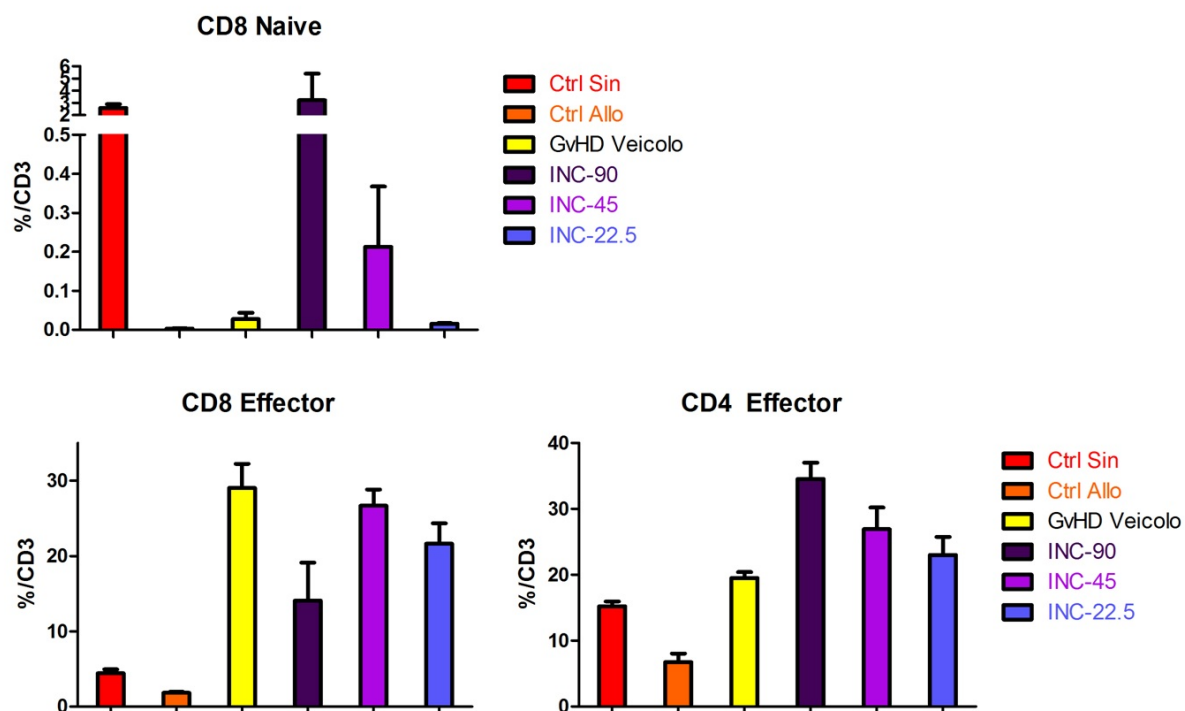


Figura 4.14: Rappresentazione delle percentuali di linfociti T *naïve* ed *effector memory* sul totale di linfociti CD3 al giorno +14 post trapianto.

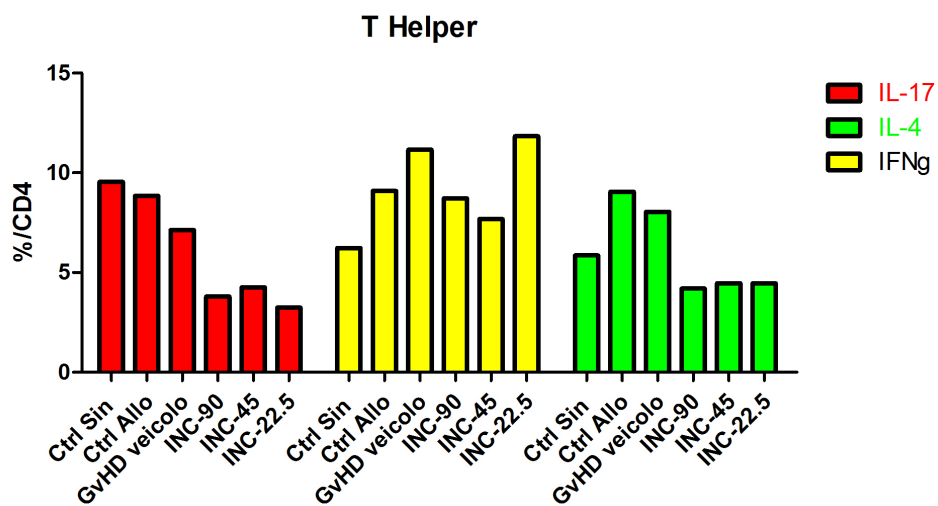


Figura 4.15: Rappresentazione della percentuale di linfociti Th1, Th2 e Th17 sul totale di linfociti CD4<sup>+</sup> nelle diverse coorti sperimentali al giorno +14 post trapianto.

da la popolazione  $T_{reg}$  non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali. Gli animali trattati col farmaco mostrano un aumento della percentuale di T regolatorie, ma questo aumento è statisticamente significativo solo al giorno +30 post trapianto (p-value  $<0.05$ ). Se andiamo invece a valutare il rapporto  $Th17/T_{reg}$ , indicato correlare con la severità della GVHD [78], questo diminuisce significativamente nelle coorti trattate col farmaco rispetto alla coorte GVHD-veicolo, dove il rapporto aumenta considerevolmente a favore delle Th17 (vedi figura 4.16)

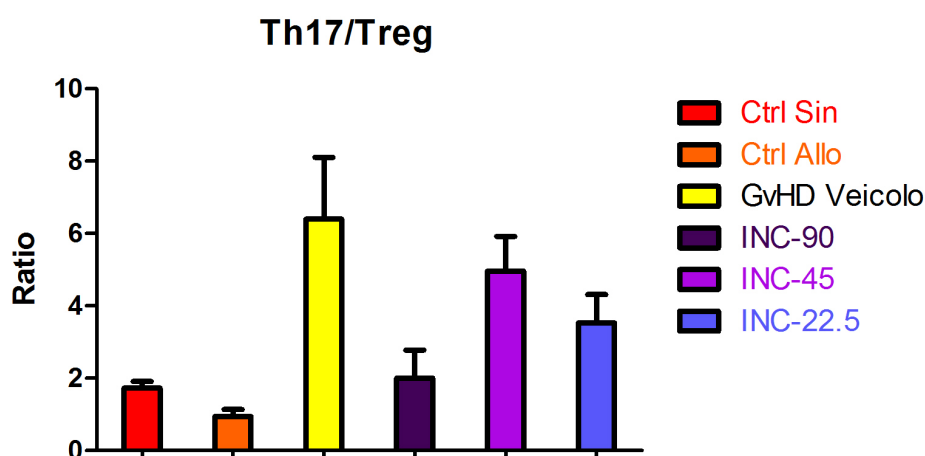


Figura 4.16: Rappresentazione del rapporto tra la percentuale di Th17 sul totale di linfociti  $CD4^+$  e la percentuale di  $T_{reg}$  sul totale di linfociti  $CD4^+$  al giorno +14 post trapianto.

#### 4.1.2.7 Dosaggio delle citochine plasmatiche

L'analisi del profilo immunofenotipico dei linfociti T a livello splenico permette di valutare in modo efficace lo stato di attivazione dei linfociti e delle altre componenti leucocitarie a livello locale, ma fornisce informazioni limitate circa la loro attività a livello sistemico. Per questo motivo è stato effettuato il dosaggio a livello plasmatico di due citochine tramite metodica ELISA. Sono state prese in considerazione le citochine IL-6, marcatore di infiammazione, e IL-12, citochina prodotta dalle cellule dendritiche, indicatore di attivazione delle DC stesse. Dal dosaggio delle citochine plasmatiche al giorno +14 post trapianto è possibile rilevare una diminuzione significativa nella produzione di IL-6 a

livello plasmatico nelle coorti trattate con il farmaco rispetto alla coorte GVHD-veicolo (p-value INC-90, INC-45 e INC-22,5 rispettivamente 0,01/0,001/0,01), ad indicare una diminuzione dello stato infiammatorio a livello sistemico. Concordemente ai risultati precedenti, la coorte dei Riceventi di Donatori Pretrattati mostra un quadro infiammatorio grave paragonabile a quello della coorte GVHD-veicolo. Non è possibile invece rilevare differenze significative nella produzione di IL-12 da parte delle DC fra le coorti trattate con il farmaco e la coorte GVHD-veicolo, indicazione di una possibile azione del farmaco sulle DC a livello tissutale (vedi figura 4.17).

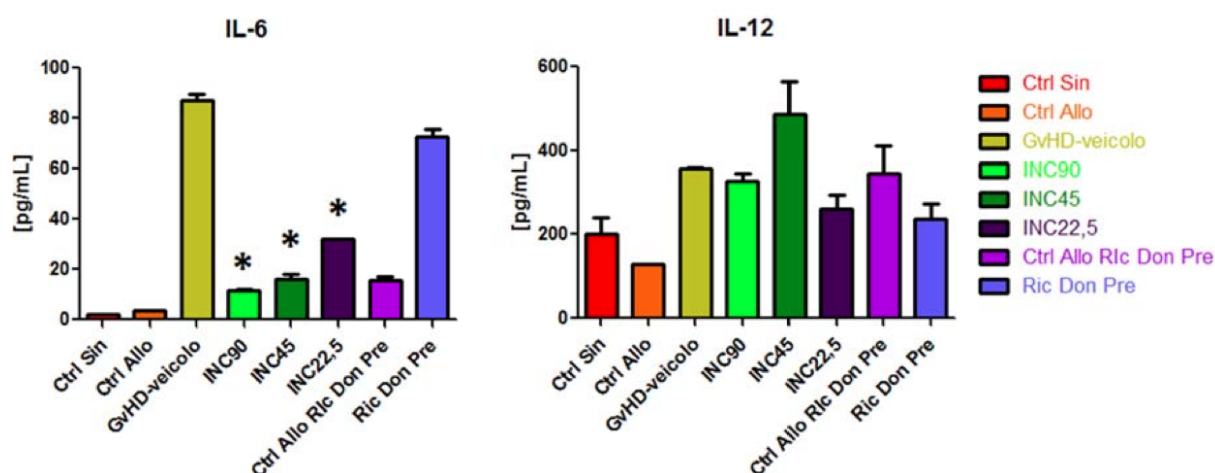


Figura 4.17: Dosaggio ELISA a livello plasmatico delle citochine IL-6 e IL-12 prodotte al giorno +14 post trapianto nelle diverse coorti sperimentali.

### 4.1.3 Modello murino di Graft Versus Tumor

I risultati fin qui ottenuti dimostrano come l'inibizione specifica di JAK1 e JAK2 mediante INC-424 sia in grado di prevenire l'insorgenza di GVHD acuta in un modello murino di GVHD. È importante però verificare che l'inibizione della via di segnale JAK/STAT non influisca negativamente sull'effetto GVT associato al trapianto di cellule staminali ematopoietiche. È stato pertanto messo a punto un modello murino di GVT che prevede la ricostituzione dei riceventi BALB/c sottoposti a regime di condizionamento non mioablativo (650Gy) con cellule del midollo osseo deplete dei linfociti T e cellule spleniche deplete dei linfociti B provenienti da donatori C57Bl/6, unitamente alla somministrazione di  $5 \times 10^6$  cellule di linfoma B cellulare A20 o  $5 \times 10^5$  cellule di leucemia mieloide RMB-1.

Il farmaco è stato somministrato una volta al giorno dal giorno del trapianto al giorno +13 post-trapianto alla dose di 45mg/kg/die alle coorti sperimentali A20-INC45 e RMB-1-INC45. La dose del farmaco è stata stabilita in base ai dati ottenuti dal precedente esperimento, prendendo in considerazione la dose terapeutica efficace con minor tossicità. Gli animali sono stati monitorati anche dopo la sospensione del trattamento fino al giorno +30 post trapianto, termine dell'esperimento. Il disegno sperimentale è riassunto in tabella 4.10.

#### 4.1.3.1 Andamento ponderale e sopravvivenza

Due parametri importanti per la valutazione dell'effetto *Graft Versus Tumor* sono l'andamento ponderale e la sopravvivenza. Tutti i topi sono stati pesati dal giorno del trapianto (Giorno 0) fino al giorno +21 ogni 2 giorni, e sono successivamente stati monitorati per la sopravvivenza globale fino al giorno +30, termine dell'esperimento. Gli animali valutati come sofferenti o con perdita di peso superiore al 25% sono stati eutanizzati. Per ogni animale è stata rappresentata la variazione ponderale media espressa in grammi e la variazione ponderale percentuale rispetto al giorno 0 (vedi figura 4.18).

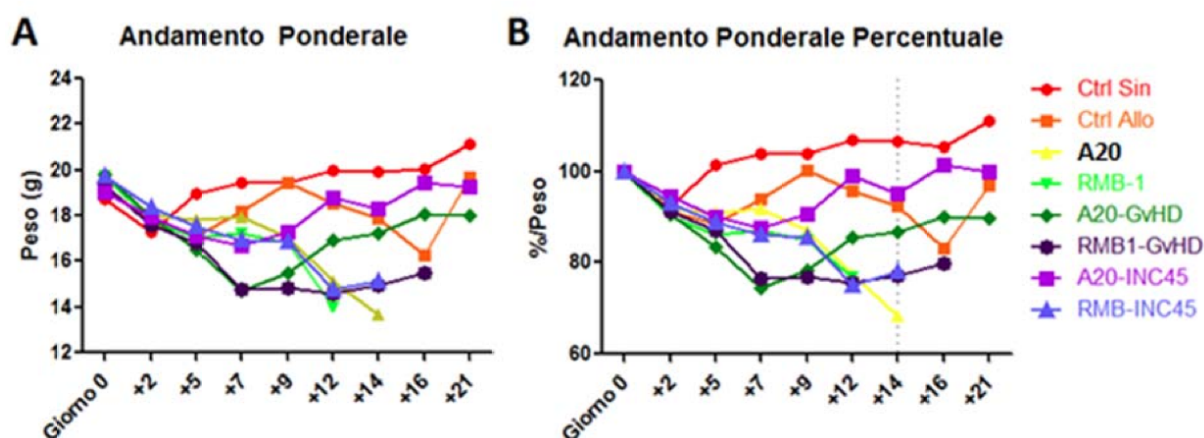


Figura 4.18: Variazione ponderale media in grammi (A) e in percentuale (B) dal giorno 0 al giorno +21.

Dal giorno 0 al giorno +5 post trapianto tutti gli animali subiscono un brusco calo ponderale legato al regime di condizionamento pre trapianto. Il minimo ponderale viene raggiunto tra il giorno +4 e il giorno +7, ma il peso torna a salire gradualmente fino

Tabella 4.10: Schema sperimentale del trapianto per la valutazione dell'effetto GVT.

| Coorte          | Donor   | Ricevente   | Giorno 0                                                                       |
|-----------------|---------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| CTRL Singenico  | C57Bl/6 | C57Bl/6 n=8 | TBI 950 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD                                                 |
| CTRL Allogenico | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 950 Gy<br>BM-TCD                                                           |
| A20             | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>A20 $5 \times 10^6$                                    |
| RMB-1           | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>RMB-1 $5 \times 10^6$                                  |
| A20-GVHD        | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>A20 $5 \times 10^6$                          |
| RMB-1-GVHD      | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>RMB-1 $5 \times 10^6$                        |
| A20-INC45       | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>A20 $5 \times 10^6$<br>INC-424 45mg/kg/die   |
| RMB-1-INC45     | C57Bl/6 | BALB/c n=8  | TBI 650 Gy<br>BM-TCD<br>SC-BCD<br>RMB-1 $5 \times 10^6$<br>INC-424 45mg/kg/die |

al giorno +16/21. Tutte le coorti non trattate con il farmaco presentano un andamento ponderale peggiore rispetto alle coorti di controllo, ovvero i controlli singenici e allogenici, che tornano ai valori fisiologici tra il giorno +12 e il giorno +14. La corte di controllo allogenico presenta un peso inferiore a causa del mancato attecchimento del trapianto in alcuni componenti della coorte. Nelle coorti trapiantate con le sole cellule tumorali è possibile osservare una brusca perdita di peso senza ripresa. Similmente anche le coorti RMB-1-GVHD e RMB-1-INC45 hanno subito un calo ponderale importante, con un andamento ponderale che resta comunque superiore rispetto alla corte RMB-1. Gli animali trattati con farmaci presentano un andamento ponderale intermedio tra le coorti trattate con sole cellule tumorali e linfociti splenici e i controlli singenici e allogenici, ad indicare l'efficacia dell'effetto GVT unitamente ad una riduzione della aGVHD dovuta al trattamento farmacologico.

I dati dell'andamento ponderale sono inoltre confermati da quelli della sopravvivenza media, che mostrano come le coorti di controllo e le coorti sottoposte a trattamento farmacologico abbiano una sopravvivenza maggiore rispetto alle coorti a cui sono state trapiantate le sole cellule tumorali (che presumibilmente muoiono per l'attecchimento del tumore) e rispetto alle coorti a cui sono stati trapiantati linfociti splenici e cellule tumorali (che presumibilmente muoiono di aGVHD) (vedi figura 4.19). Al contrario di quanto atteso, la coorte RMB-1-INC45 presenta una sopravvivenza globale inferiore rispetto alla coorte non trattata, come verrà discusso in seguito. La corte del Controllo Allogenico presenta un'alta mortalità a causa della mancata ricostituzione post trapianto di alcuni suoi componenti.

#### 4.1.3.2 Valutazione dell'effetto antitumorale *in vivo*

Gli animali sono stati monitorati ogni due giorni per verificare l'insorgenza della aGVHD e lo sviluppo del tumore nelle rispettive coorti. Nel caso delle coorti con tumore è stato possibile monitorare l'insorgenza di un tumore localizzato a livello retro-orbitale. Le coorti A20 e RMB-1 presentavano segni clinici di malattia tumorale quali arruffamento del pelo, perdita di peso, perdita dell'appetito, ridotta motilità, rigonfiamento del ventre, ma non presentavano segni clinici della aGVHD. Le coorti A20-GVHD e RMB-1-GVHD presentavano segni clinici della aGVHD intorno al giorno +14, ma nessun segno di malattia tumorale, ad eccezione della coorte RMB-1-GVHD che mostrava segni di tumore

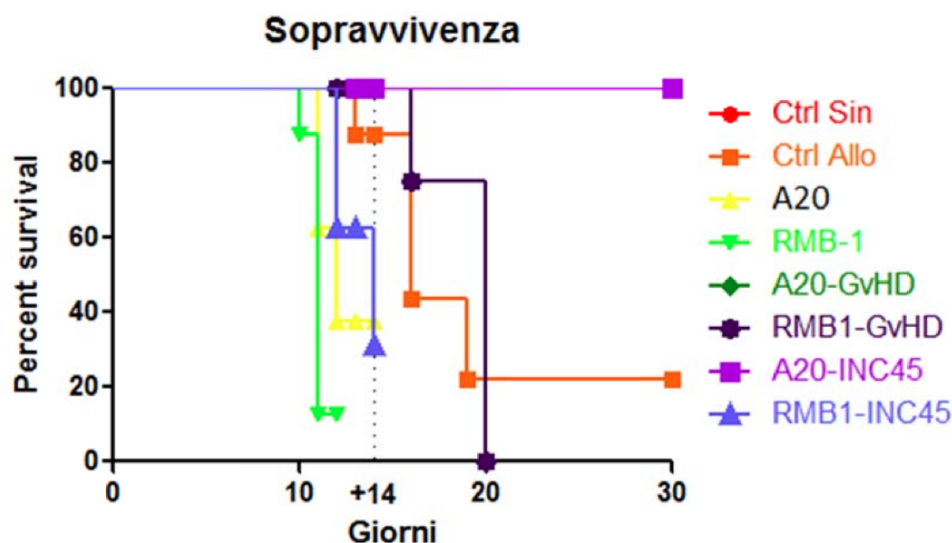


Figura 4.19: Sopravvivenza percentuale delle diverse coorti dal giorno 0 al giorno +30. Le curve del controllo singenico, della coorte A20-INC45 e A20-GVHD sono sovrapposte.

retro-orbitale legati probabilmente ad un alto dosaggio di cellule RMB-1 trapiantate. Le coorti A20-INC45 e RMB-1-INC45 non presentavano segni clinici della aGVHD intorno al giorno +14, confermando l'efficacia dell'INC-424 nel trattamento della aGVHD. Mentre la coorte A20-INC45 non presentava segni clinici di malattia tumorale, la coorte RMB-1-INC45 presentava segni clinici di leucemia, compresi segni di tumore localizzato a livello retro-orbitale. Le coorti del Controllo Singenico e del Controllo Allogeneico non presentavano segni clinici né di malattia tumorale né di GVHD. Tuttavia in alcuni componenti della coorte del Controllo Allogeneico l'attecchimento del trapianto non è andato a buon fine e gli animali sono morti dopo pochi giorni.

Per valutare una possibile modulazione dell'effetto GVT da parte di INC-424, abbiamo successivamente effettuato una valutazione della percentuale di cellule A20 o RMB-1 nel sangue periferico, nella milza e nel midollo osseo. Per la conta citofluorimetrica sono stati utilizzati anticorpi rivolti contro gli antigeni H2Kd, in quanto entrambe le linee tumorali sono derivate dal ceppo del ricevente (BALB/c), B220 (CD45R) unitamente ad un *gating* sui parametri fisici posizionato appena al di sotto della zona dei granulociti per identificare le cellule A20, CD11b<sub>low</sub> e Gr1<sup>+</sup> unitamente ad un *gating* sui parametri fisici posizionato nella zona dei granulociti per identificare le cellule RMB-1.

La conta delle cellule tumorali da sangue periferico è stata effettuata una volta a setti-

mana per monitorare l'evoluzione del tumore, ma l'utilizzo di questa sede si è rivelata poco attendibile a causa della fisiopatologia tumorale che porta ad un annidamento delle cellule tumorali negli organi linfoidi con progressiva scomparsa dal circolo sanguigno.

La conta delle cellule tumorali nel midollo osseo invece ha mostrato una diminuzione significativa nel midollo osseo delle coorti A20-GVHD e A20-INC45 rispetto alla coorte trapiantata con solo cellule A20 (p-value 0,03-0,03), ma non è possibile rilevare alcuna differenza significativa tra la coorte A20-GVHD e la coorte A20-INC45 (p-value 0,25) (vedi figura 4.20): questo dato esclude l'influenza del trattamento farmacologico sull'effetto GVT nei confronti delle cellule A20. È possibile rilevare la stessa differenza nella milza, con un p-value di 0,05. Per quanto riguarda le cellule RMB-1 è invece possibile rilevare

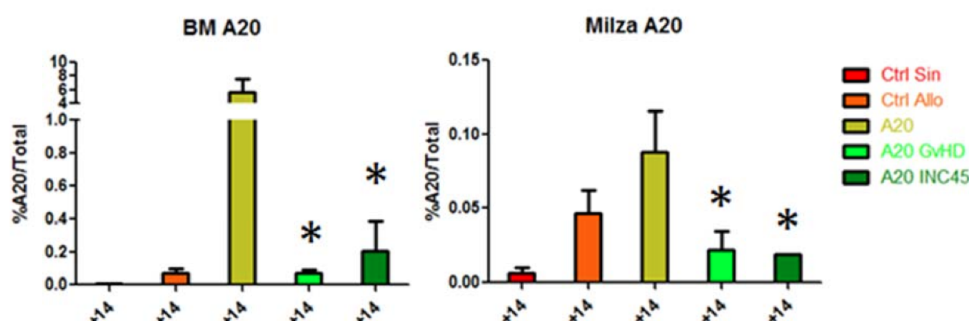


Figura 4.20: Conta delle cellule A20 sul totale di cellule del midollo osseo e della milza al giorno +14.

una diminuzione significativa delle cellule tumorali sia nel midollo osseo che nella milza delle coorti RMB-1-GVHD e RMB-1-INC45 (p-value 0,3 midollo e 0,002 milza) rispetto alla coorte RMB-1, ma nessuna differenza significativa tra la coorte RMB-1-GVHD e la coorte RMB-1-INC45 escludendo dunque l'influenza del trattamento farmacologico sull'effetto GVT nei confronti delle cellule RMB-1 (vedi figura 4.21).

#### 4.1.4 Valutazione dell'effetto antitumorale *in vitro*

Al fine di valutare l'effetto GVT, confermare i risultati ottenuti dalla conta delle cellule tumorali nella milza e nel midollo, e per meglio comprendere in che misura il trattamento con il farmaco influisca su questo effetto, è stata effettuata una co-coltura tra linfociti T C57Bl/6 stimolati e cellule A20 o RMB-1, ed è stata valutata la mortalità delle cellule tumorali attraverso la marcatura con PI/Annexina V. È stata utilizzata una prima

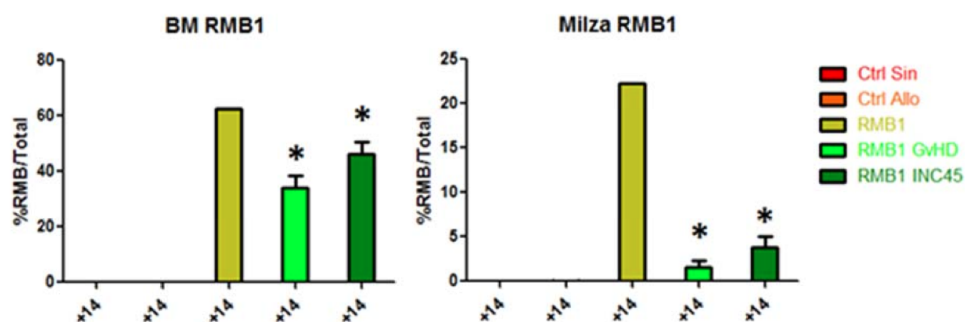


Figura 4.21: Conta delle cellule RMB-1 sul totale di cellule del midollo osseo e della milza al giorno +14.

coorte sperimentale di linfociti T stimolati e trattati con farmaco, una coorte di controllo non trattata, due coorti di controllo (trattate e non trattate) non stimolate, due coorti di controllo singeniche (linfociti BALB/c con cellule tumorali derivate da BALB/c) stimolate e non stimolate, e due coorti di controllo tumorale trattate e non trattate per ogni linea tumorale. È stato possibile rilevare un aumento significativo delle cellule sofferenti (Apoptotiche PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>, Necrosi Leggera PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>-</sup> e Necrosi Pesante PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>) nelle co-culture di linfociti C57Bl/6 stimolati e cellule tumorali trattate con il farmaco rispetto alla coltura di sole cellule tumorali (p-value 0,02 A20, 0,001 RMB-1), ed inoltre non è stata osservata alcuna differenza fra le co-culture di linfociti C57Bl/6 Stimolati e cellule tumorali trattate e non (p-value 0,4 A20, 0,24 RMB-1), sia per quanto riguarda le cellule A20 che per quanto riguarda le cellule RMB-1 (vedi figura 4.22). È inoltre possibile notare come la somministrazione del farmaco alle sole cellule tumorali porti ad un aumento della mortalità delle stesse, effetto indubbiamente positivo nel trattamento di neoplasie ematologiche. La percentuale di cellule sofferenti rilevata nelle co-culture con linfociti stimolati superava in genere quella delle co-culture con linfociti non stimolati.

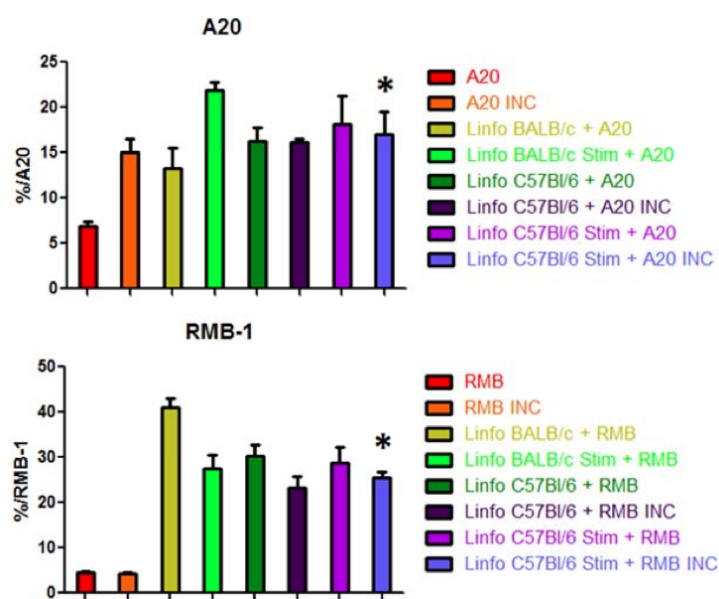


Figura 4.22: Cellule sofferenti (somma di necrosi leggera, pesante e apoptosi) A20 o RMB-1 nelle co-culture GVT.

## 4.2 Ricerca di biomarcatori di GVHD

La scoperta del primo microRNA risale ai primi anni '90 ma bisogna aspettare gli inizi del XXI secolo per comprenderne appieno le potenzialità e il loro coinvolgimento in diversi meccanismi di regolazione. I miRNA sono piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post trascrizionale legandosi all'RNA messaggero in maniera sequenza specifica [5, 27]. I miRNA giocano un ruolo chiave in processi biologici fondamentali quali differenziamento, proliferazione, apoptosi e omeostasi [4] e sono coinvolti in diverse patologie, tra cui il cancro, mostrando una deregolazione tessuto-specifica [60]. Sono molecole secrete in forma stabile nel torrente circolatorio e, data la loro specificità tissutale e la loro stabilità in diversi fluidi biologici, appaiono sempre più come i candidati ideali per l'utilizzo come biomarcatori non invasivi di diverse patologie [69]. In particolare, data la totale assenza di biomarcatori predittivi dello sviluppo di aGVHD, l'analisi del profilo di espressione di microRNA circolanti dopo trapianto allogenico potrebbe giocare un ruolo importante nella diagnosi precoce della complicanza.

### 4.2.1 Estrazione di RNA da plasma

Il nostro studio si propone di analizzare il profilo di espressione di microRNA circolanti nel plasma, si rende quindi necessaria la messa a punto di un sistema di estrazione di RNA adeguato. Il plasma è stato ottenuto centrifugando campioni di sangue periferico raccolto in provette contenenti anticoagulante K3-EDTA prelevati da donatori e pazienti (vedi 3.8). In esperimenti preliminari abbiamo testato se vi fossero differenze in termini di resa estraendo RNA totale da plasma o da siero umano. I dati ottenuti hanno mostrato una resa migliore in termini di recupero di RNA totale nel caso dell'estrazione da plasma, pertanto tutti gli esperimenti condotti sono stati effettuati su questa tipologia di campione.

#### 4.2.1.1 Ottimizzazione dell'estrazione

Abbiamo utilizzato una procedura di estrazione di RNA basata sul kit mirVana<sup>TM</sup> (Ambion) il quale associa una separazione con soluzione di fenolo-cloroformio all'utilizzo di filtri in silice leganti l'RNA. Il kit mirVana<sup>TM</sup>, come la maggior parte dei kit commerciali, è ottimizzato per l'estrazione di RNA da tessuti e cellule per cui è stato necessario adattare il protocollo per l'estrazione da plasma in modo da favorire le successive fasi di

quantificazione e analisi. Il plasma infatti è caratterizzato da un alto contenuto proteico (3-7 g/dl) che influisce negativamente sulla procedura di estrazione, rendendola più difficoltosa. Al fine di eliminare la componente proteica plasmatica è stata effettuata una digestione con proteinasi K prima dell'estrazione per facilitare il rilascio di microRNA (vedi differenze di amplificazione in figura 4.23). Diversamente dal protocollo originale

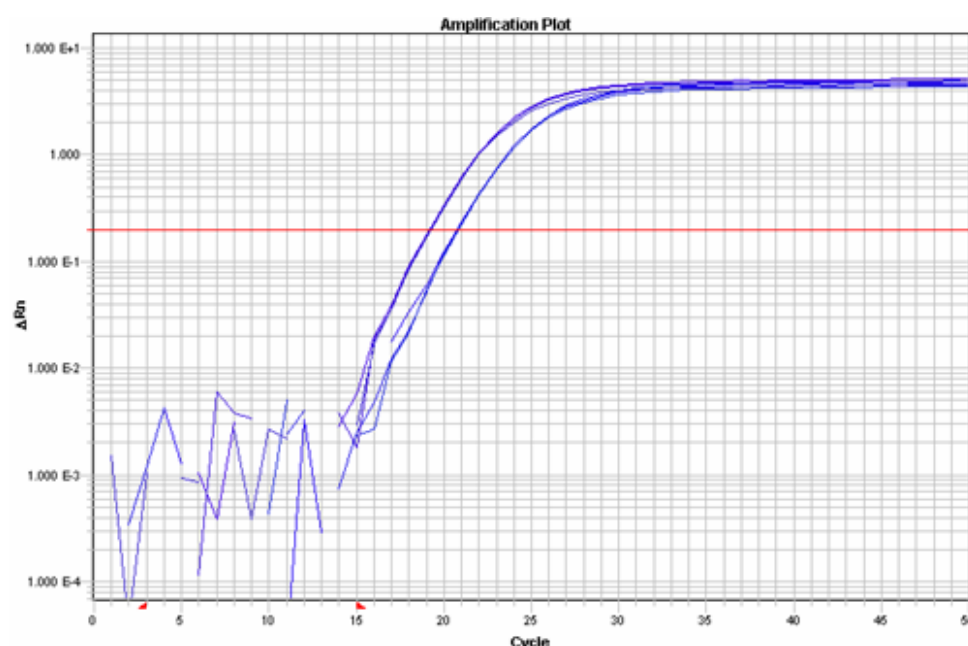


Figura 4.23: Curve di amplificazione di campioni estratti dopo incubazione con Proteinasi K (sinistra) o meno (destra). Si può facilmente notare come l'adattamento del protocollo all'estrazione di RNA da plasma utilizzando la Proteinasi K sia di notevole aiuto per la liberazione dei microRNA dalla componente proteica. Notiamo infatti una maggiore efficienza di amplificazione (un paio di cicli) nel caso di una incubazione con PK prima dell'estrazione.

vengono inoltre aggiunti SDS e acido acetico per favorire la liberazione dei microRNA da parte dei complessi proteici ai quali sono complessati e permetterne quindi una migliore quantificazione in fase di analisi. L'aggiunta di Acido Acetico prima della separazione con fenolo-cloroformio è giustificata dalla presenza di evidenze in letteratura [26] che mostrano come l'efficacia di estrazione aumenti con l'acidificazione del plasma in quanto facilita la separazione dell'RNA dalle proteine. Per verificare la presenza di differenze tra il protocollo di estrazione classico e quello modificato con aggiunta di acido acetico sono state estratte in parallelo due aliquote di plasma di un donatore sano. In figura

4.24 sono riportate le curve di amplificazione dell'RNA estratto con e senza l'aggiunta di acido acetico. La curva di amplificazione relativa al campione a cui è stato aggiunto l'acido acetico mostra un  $C_t$  inferiore di due cicli rispetto all'altro, corrispondente ad una maggiore quantità di miR-16 ed indice di una migliore efficienza di estrazione.

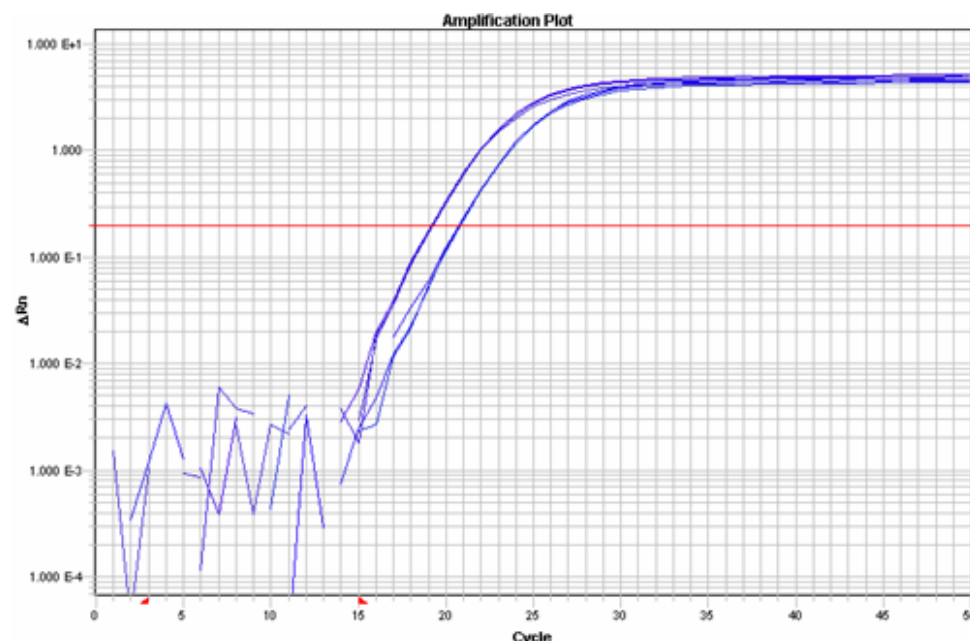


Figura 4.24: Differenze di amplificazione con e senza aggiunta di acido acetico. La curva di sinistra mostra l'amplificazione del campione estratto con l'aggiunta di acido acetico mentre la curva di destra mostra la cinetica di amplificazione in seguito al protocollo di estrazione classico.

#### 4.2.1.2 Quantificazione dell' RNA estratto

Il campione ottenuto è quindi pronto per essere retrotrascritto (vedi 3.10) e successivamente analizzato mediante PCR quantitativa per verificare il profilo di espressione dei microRNA circolanti. Al fine di avere indicazioni sull'efficienza dei protocolli di estrazione e sulla concentrazione necessaria per le successive analisi di amplificazione, si rende necessaria una quantificazione del prodotto estratto.

Evidenze presenti in letteratura [56] mostrano una correlazione del contenuto di microRNA del campione con la concentrazione di RNA totale. Abbiamo voluto testare se anche nel nostro caso vi fosse una correlazione come riportato in letteratura, pertanto i nostri

campioni sono stati quantificati allo spettrofotometro (tradizionale e nanodrop). Le concentrazioni registrate sono state estremamente basse, vicine al limite di risoluzione dello strumento e pertanto poco attendibili. I campioni inoltre hanno mostrato un'elevata assorbanza nella lunghezza d'onda di 230nm, suggerendo la presenza di contaminazione da sali e proteine. Parallelamente è stata effettuata una PCR quantitativa per un microRNA ritenuto stabile (il miR-16) per verificare l'ipotesi di correlazione tra concentrazione di RNA totale e microRNA. Purtroppo, nella nostra casistica, non siamo stati in grado di confermare i dati presenti in letteratura in quanto le concentrazioni di RNA totale registrate e l'amplificazione di un miRNA ritenuto stabile non correlavano in nessuno dei campioni analizzati. Inoltre, come già accennato prima, la concentrazione di RNA totale estratto da plasma era estremamente bassa e di dubbia attendibilità.

Riteniamo quindi che la concentrazione di RNA totale non sia un buon indicatore della quantità di miRNA circolanti e ad oggi purtroppo non sono presenti in commercio metodi per la quantificazione di miRNA da fluidi biologici. Al fine di standardizzare il protocollo e per superare questo ostacolo tecnico, abbiamo deciso di partire da una quantità iniziale costante di plasma per l'estrazione. In particolare, per tutti gli esperimenti abbiamo effettuato un'estrazione a partire da 500 µl di plasma.

#### **4.2.2 Ottimizzazione del protocollo di retrotrascrizione**

Il protocollo di retrotrascrizione indicato dalla ditta fornitrice prevede l'utilizzo di 5 µl di templat. Viste le difficoltà iniziali nell'estrazione di RNA il templat è stato aumentato fino a 10 µl in un volume finale di reazione di 15 µl al fine di retrotrascrivere la maggior quantità possibile di RNA. In questo modo si è riusciti ad amplificare i microRNA estratti da plasma utilizzando il saggio specifico per miR-16 (miR-16 TaqMan microRNA assay, Applied Biosystems), utilizzato come controllo dell'estrazione data la sua stabilità nei diversi campioni analizzati. I  $C_t$  ottenuti variano tra 23 e 33 a seconda del campione in esame (vedi figura 4.25).

#### **4.2.3 Analisi del profilo di espressione di microRNA circolanti**

L'utilizzo delle cards microfluidiche basate su tecnologia TaqMan di Applied Biosystems permette di analizzare contemporaneamente l'espressione di 384 microRNA. La maggiore potenzialità delle cards microfluidiche è quella di consentire l'analisi in contemporanea

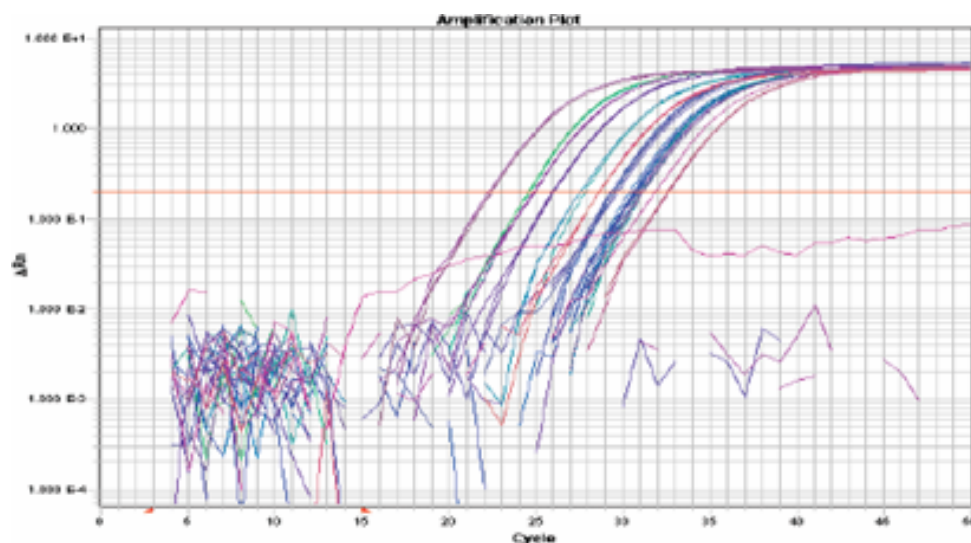


Figura 4.25: Curve di amplificazione del miR-16 in diversi campioni in seguito all'ottimizzazione delle reazioni di retrotrascrizione e amplificazione.

di un pannello esteso di microRNA in una singola reazione, inoltre la tecnologia su cui è basata è di facile utilizzo e applicabile alla maggior parte dei laboratori. Tuttavia la maggior limitazione di questa tecnologia è l'assenza di replicati tecnici, ovvero la presenza di coppie di oligonucleotidi in più di un pozzetto all'interno della card. Solamente un microRNA infatti è presente in quadruplicato. Rispetto ad una tradizionale analisi di espressione genica, l'analisi di microRNA circolanti non può essere banalmente effettuata utilizzando una quantificazione relativa standard basata sul metodo del  $\Delta C_t$ . Non esiste infatti un *consensus* su un miRNA di riferimento da utilizzare per la quantificazione, pertanto si è resa necessaria la messa a punto di un *workflow* bioinformatico per l'analisi dei dati da Real Time PCR.

#### 4.2.3.1 Confronto pazienti allotrapiantati - donatori sani

L'utilizzo dei microRNA come biomarcatori per la GVHD presuppone che questi possano essere facilmente identificati prima dell'insorgenza della complicanza e che siano in grado di predire lo sviluppo della stessa con una buona accuratezza. Il primo passo quindi consiste nel verificare la fattibilità dell'amplificazione di microRNA circolanti dopo trapianto allogenico. A tal fine è stata messa a punto una quantificazione mediante Real Time PCR di un ampio pannello di microRNA su campioni ottenuti al giorno +7 post trapianto e

raccolti sequenzialmente ogni settimana fino al giorno +100.

I dati ottenuti confermano evidenze presenti in letteratura che mostrano la presenza stabile di microRNA in fluidi biologici, in particolare nel plasma [17, 23, 26, 48, 52]. Nel nostro caso è ancor più importante confermare questo dato in quanto l'analisi è stata effettuata su pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. L'utilizzo del plasma come materiale di partenza su cui effettuare la successiva analisi di espressione di microRNA è di estrema importanza nell'ambito delle analisi post trapianto. Il paziente trapiantato infatti è un paziente con pochissime cellule circolanti, pertanto le analisi standard (ad es. citofluorimetriche) che richiedono grandi quantità di cellule sono pressoché impossibili da realizzare. Il plasma invece è un materiale di scarto, ottenuto dopo centrifugazione di una provetta da emocromo utilizzata per le indagini di routine post trapianto. In figura 4.26 è riportato il grafico di amplificazione di 380 microRNA circolanti mediante card microfluidica.

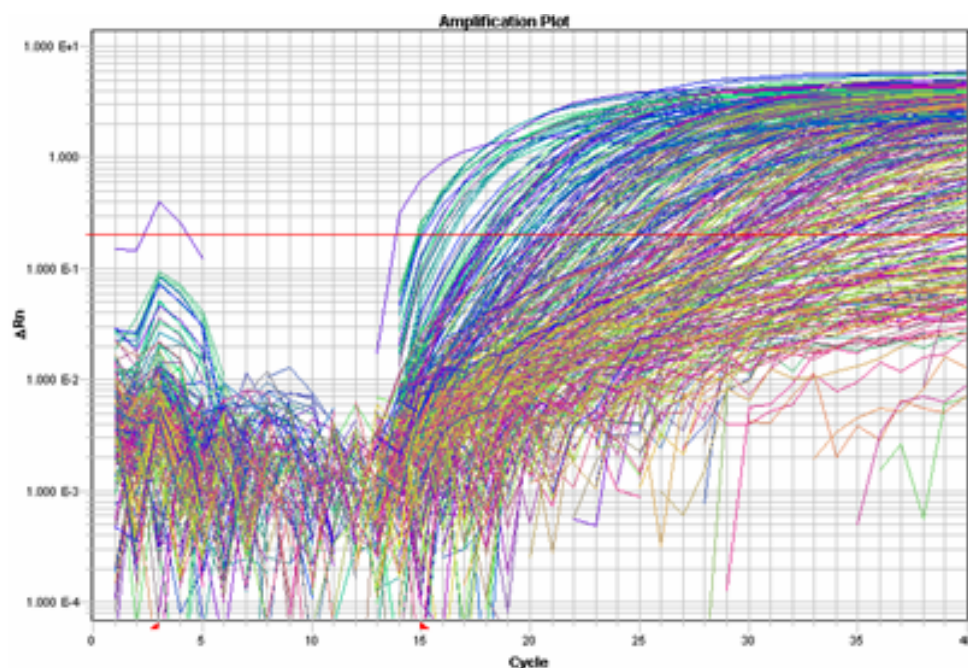


Figura 4.26: Amplificazione di 384 microRNA mediante tecnologia Applied Biosystems basata su cards microfluidiche.

Nonostante l'aggiunta di un passaggio di preamplificazione, al giorno +7 post trapianto in media solo 70 dei 380 microRNA presenti sulla card è rilevabile con un ciclo di amplificazione ( $C_t$ ) minore o uguale a 32 (*cutoff* scelto per etichettare un microRNA come

amplificato o meno)). A tempistiche successive, giorni +14 e +21, il numero di miRNA amplificati tende ad aumentare progressivamente, in accordo con le cinetiche di ricostituzione immune post trapianto. Al giorno +28 post trapianto, infine, è stato possibile rilevare l'amplificazione di una media di 195 microRNA rispetto ai 380 testati (figura 4.26).

Come atteso in un contesto di regime di condizionamento a ridotta intensità, i pazienti in studio hanno sviluppato la aGVHD dopo il giorno +30 post trapianto. Abbiamo quindi deciso di effettuare l'analisi del profilo di espressione di microRNA circolanti al giorno +28 in modo da avere un maggior numero di molecole amplificabili tra le quali ricercare dei biomarcatori predittivi dello sviluppo della aGVHD. Una prima analisi sui dati grezzi ha mostrato delle differenze in termini di numero di molecole amplificate paragonando pazienti allotrapiantati e donatori sani. In particolare al giorno +28 post trapianto il numero di microRNA circolanti nel plasma dei pazienti è significativamente più basso rispetto a quello di donatori sani: in media 195 microRNA nel plasma dei pazienti e 236 nel plasma dei donatori sani (p-value  $4.3 \times 10^{-7}$ ) (figura 4.27 A). Questo dato potrebbe riflettere la ricostituzione immune dei pazienti allotrapiantati, in cui il numero di cellule circolanti in grado di rilasciare microRNA nel torrente circolatorio è sicuramente inferiore se paragonato a soggetti sani [35].

Tuttavia, considerando solo i pazienti trapiantati è stato possibile rilevare delle differenze anche tra chi ha sviluppato la GVHD e chi non ha sviluppato la complicanza. In particolare, il plasma di pazienti che avrebbero successivamente sviluppato GVHD mostra un minor numero di microRNA amplificabili, come riportato nel grafico 4.27A (in media, 182 miRNA in campioni di pazienti con GVHD e 210 in pazienti senza, p-value 0.003). In linea con questo risultato, anche il livello di espressione dei microRNA in pazienti con GVHD è inferiore rispetto a coloro che non hanno sviluppato la complicanza (figura 4.27B). Il gruppo aGVHD mostra infatti dei valori medi di amplificazione (espressi in termini di  $C_t$ ) più alti, 25.8 contro il 24.9 del gruppo non-GVHD e 23.1 dei donatori sani (p-value 0.016).

Date le differenze di amplificazione tra i diversi gruppi analizzati, abbiamo deciso di concentrare la nostra analisi solo sui microRNA presenti in tutti i gruppi. Tra tutti e 380 i miRNA testati, solo 113 erano detectabili in tutti i campioni in analisi. Anche in questo caso, nonostante vengano presi in considerazione solo miRNA espressi da tutti e tre i gruppi, è stato possibile rilevare differenze statisticamente significative tra i livelli

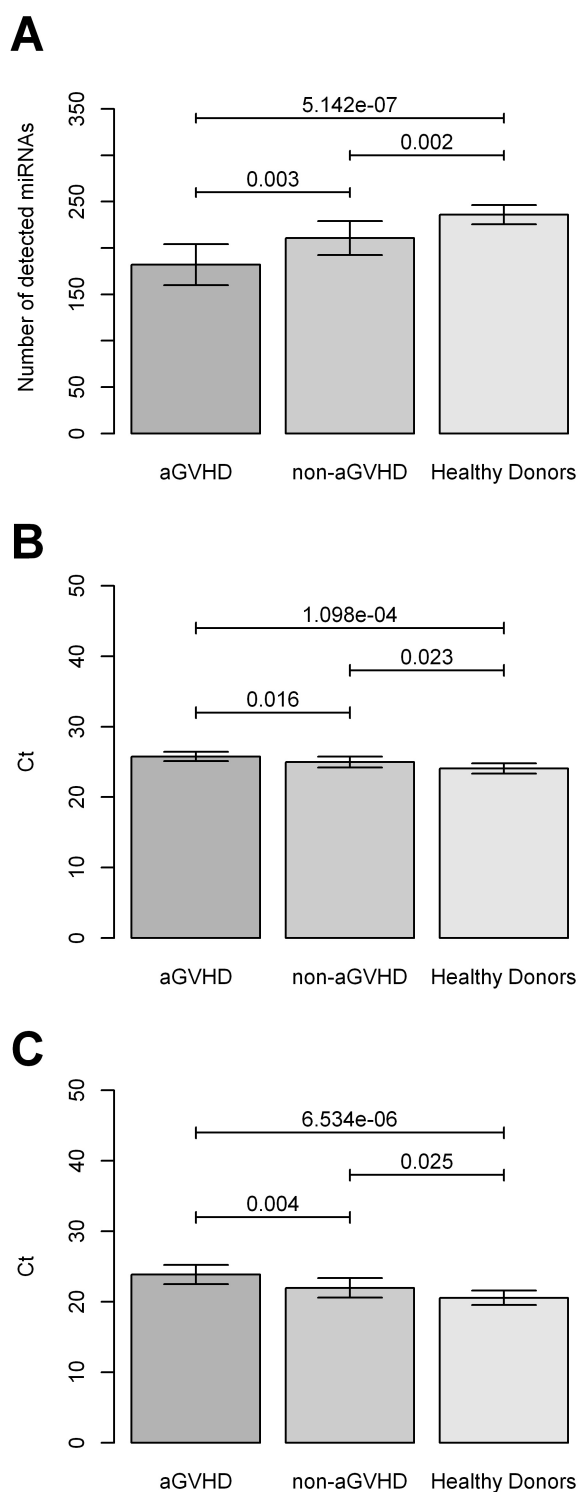


Figura 4.27: **Confronto del profilo di espressione di microRNA circolanti tra pazienti allotrapiantati e donatori sani.** **A.** Il numero medio di microRNA detectati è diverso tra i gruppi. I pazienti con aGVHD hanno un numero inferiore di miRNA detectati rispetto agli altri due gruppi. **B.** In accordo con un numero minore di miRNA detectabili, anche il livello di espressione nel gruppo aGVHD è inferiore, come indicato da valori di  $C_t$  più alti considerando tutti e 380 i miRNA della card. **C.** Livelli più bassi di espressione nel gruppo aGVHD sono anche confermati considerando solo miRNA detectati in tutti i campioni ( $C_t \leq 32$ ).

di espressione media (figura 4.27C), in particolare il gruppo aGVHD ha mostrato un'espressione media più bassa ( $C_t$  medio 23.9), il gruppo non-GVHD un livello di espressione intermedio ( $C_t$  medio 22), mentre i donatori sani hanno mostrato un livello di espressione medio maggiore rispetto ai due gruppi di pazienti allotrapiantati ( $C_t$  medio 21, p-value 0.004). Effettuando un t-test è stato inoltre possibile identificare 91 microRNA differenzialmente dei 113 presi in considerazione (confronto effettuato tra il gruppo aGVHD e quello nonGVHD, FDR <0.05).

Al fine quindi di identificare miRNA espressi selettivamente in una delle tre condizioni, ciascuna molecola è stata definita come detectata ( $C_t \leq 32$ ) o non detectata ( $C_t > 32$ ) in ciascun campione ed è stato testato se fosse significativamente associata allo sviluppo di aGVHD. È stato effettuato un Fisher test che ha mostrato come la presenza o l'assenza di uno specifico miRNA non fosse statisticamente associabile allo sviluppo di GVHD (*cutoff* FDR 0.01). D'altro canto però, paragonando i donatori sani con i pazienti allotrapiantati, è stato possibile identificare 13 miRNA espressi solo in campioni provenienti da soggetti sani: miR-187, miR-496, miR-369-5p, miR-149, miR-485-5p, miR-576-5p, miR-365, miR-708, miR-501-5p, miR-342-5p, miR-154, miR-541. Questo dato suggerisce che queste molecole potrebbero essere rilasciate nel plasma da cellule che al giorno +28 post trapianto, giorno in cui è stata effettuata la nostra analisi, sono ancora sotto-rappresentate in pazienti allo-trapiantati. Questo dato inoltre è in linea con un recente lavoro presente in letteratura in cui si dimostra come 6 dei 13 miRNA da noi identificati siano espressi selettivamente da componenti cellulari del sangue [25].

#### 4.2.3.2 Identificazione di un pannello di miRNA differenzialmente espressi

Al fine di identificare delle molecole differenzialmente espresse tra coloro che avrebbero sviluppato aGVHD e coloro che non sono andati incontro alla complicanza, è stato necessario innanzitutto normalizzare i dati ottenuti dall'analisi in Real Time PCR. Ad oggi non è presente in letteratura un *consensus* su quale sia la strategia migliore per la normalizzazione di dati su microRNA circolanti. Diversi metodi sono stati proposti, tra cui l'utilizzo di un gene *housekeeping* o il metodo della *global mean*: nel nostro studio sono stati presi in considerazione e sono stati testati entrambi. Tuttavia, queste metodologie di analisi non tengono in considerazione la variabilità che ci può essere tra i campioni in termini di quantità di materiale di partenza [80], pertanto abbiamo deciso di cercare una

strategia di analisi alternativa.

Partendo dal presupposto che ad oggi non è possibile quantificare con precisione la concentrazione di microRNA nel campione in analisi, abbiamo sviluppato un *workflow* di analisi che tenesse conto di questo ostacolo. In particolare, la normalizzazione dei dati grezzi ottenuti in seguito ad amplificazione in Real Time PCR, è stata condotta utilizzando il metodo dei rapporti reciproci (altresì definiti *ratio*). Questo tipo di normalizzazione consiste nel calcolare il rapporto tra le quantità di ciascun microRNA che, essendo espresse in termini di  $C_t$  (di natura logaritmica), equivale a calcolare il  $\Delta C_t$  per ciascuna coppia di microRNA. In particolare, per quanto riguarda il calcolo di rapporti reciproci, viene calcolato il  $\Delta C_t$  tra ciascun miRNA presente sulla card ( $C_t$  miR1-  $C_t$  miR2,  $C_t$  miR1-  $C_t$  miR3,  $C_t$  miR1-  $C_t$  miRn etc ...) in maniera iterativa. Nella nostra analisi sono stati tenuti in considerazione solo miRNA amplificati in tutti i campioni (quindi con un ciclo di amplificazione minore o uguale a 32), ottenendo così un dataset finale di 1610 ratio da 23 campioni (un campione è stato scartato data la bassa qualità del dato grezzo). In questo modo, calcolando un rapporto tra quantità, viene superato il problema della quantificazione iniziale dell'RNA estratto. L'idea di base infatti è che per identificare delle reali differenze tra classi, il *ratio* tra le concentrazioni di due miRNA cambia solo se uno dei due è deregolato, oppure se lo sono entrambi ma in modo opposto (ovvero uno up- e l'altro downregolato o viceversa).

Al fine di identificare dei rapporti statisticamente diversi tra i due gruppi di pazienti e tenendo conto della ristretta casistica analizzata, abbiamo effettuato un t-test con un approccio di *Leave-One-Out Cross Validation* (LOOCV). Il paragone tra le due classi infatti è stato effettuato 23 volte, escludendo ad ogni ciclo di analisi un campione alla volta. Si tratta di un metodo statistico utilizzato in particolare nel caso di dataset molto ristretti al fine di poter trarre delle conclusioni più generali, pur non avendo a disposizione un'ampia casistica o un dataset di validazione. In questo modo è stato possibile identificare 30 *ratio* differenzialmente espressi (p-value < 0.01) in tutti e 23 i cicli di *Cross Validation* (vedi tabella 4.11). Considerando solo questi 30 *ratio* è stato effettuato un *clustering* gerarchico che ha mostrato una chiara separazione tra campioni aGVHD e non-GVHD, con l'unica eccezione di 4 pazienti che hanno in seguito sviluppato GVHD ma che sono stati classificati come non-GVHD (figura 4.28A).

Tabella 4.11: Lista dei 30 *ratio* selezionati in LOOCV. Il *fold change*, p-value e FDR (*False Discovery Rate*) riportati sono stati calcolati utilizzando tutti e 23 i campioni.

| <b>Rapporto</b>             | <b>Fold Change</b> | <b>p-value</b> | <b>FDR</b> |
|-----------------------------|--------------------|----------------|------------|
| hsa-miR-194_hsa-miR-374b    | -1.13              | 0.0002         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-590-5p  | -1.12              | 0.0004         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-652     | -1.13              | 0.0006         | 0.0597     |
| hsa-miR-26b_hsa-miR-194     | 1.15               | 0.0007         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-744     | -1.11              | 0.0008         | 0.0597     |
| hsa-miR-26a_hsa-miR-194     | 1.16               | 0.0009         | 0.0597     |
| hsa-miR-106a_hsa-miR-194    | 1.13               | 0.0010         | 0.0597     |
| hsa-miR-16_hsa-miR-194      | 1.15               | 0.0011         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-454     | -1.11              | 0.0011         | 0.0597     |
| hsa-miR-17_hsa-miR-194      | 1.14               | 0.0011         | 0.0597     |
| hsa-miR-16_hsa-miR-410      | 1.10               | 0.0012         | 0.0597     |
| hsa-miR-29c_hsa-miR-194     | 1.11               | 0.0013         | 0.0597     |
| hsa-miR-20a_hsa-miR-194     | 1.13               | 0.0013         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-484     | -1.12              | 0.0014         | 0.0597     |
| hsa-miR-142-3p_hsa-miR-194  | 1.13               | 0.0014         | 0.0597     |
| hsa-miR-126_hsa-miR-194     | 1.11               | 0.0016         | 0.0597     |
| hsa-miR-130a_hsa-miR-194    | 1.13               | 0.0017         | 0.0597     |
| hsa-miR-15a_hsa-miR-194     | 1.13               | 0.0017         | 0.0597     |
| hsa-miR-186_hsa-miR-194     | 1.12               | 0.0017         | 0.0597     |
| hsa-miR-185_hsa-miR-194     | 1.12               | 0.0017         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-339-3p  | -1.12              | 0.0018         | 0.0597     |
| hsa-miR-146a_hsa-miR-194    | 1.11               | 0.0018         | 0.0597     |
| hsa-miR-26a_hsa-miR-410     | 1.11               | 0.0018         | 0.0597     |
| hsa-miR-103_hsa-miR-194     | 1.14               | 0.0019         | 0.0597     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-328     | -1.12              | 0.0021         | 0.0647     |
| hsa-miR-146b-5p_hsa-miR-194 | 1.12               | 0.0022         | 0.0647     |
| hsa-miR-28-3p_hsa-miR-194   | 1.11               | 0.0023         | 0.0647     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-598     | -1.11              | 0.0024         | 0.0647     |
| hsa-miR-191_hsa-miR-194     | 1.12               | 0.0024         | 0.0647     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-339-5p  | -1.14              | 0.0026         | 0.0651     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-340     | -1.10              | 0.0026         | 0.0651     |
| hsa-miR-30c_hsa-miR-194     | 1.13               | 0.0028         | 0.0668     |
| hsa-miR-133a_hsa-miR-194    | 1.14               | 0.0029         | 0.0668     |
| hsa-let-7e_hsa-miR-194      | 1.13               | 0.0029         | 0.0668     |
| hsa-miR-30b_hsa-miR-194     | 1.13               | 0.0030         | 0.0674     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-335     | -1.11              | 0.0032         | 0.0676     |
| hsa-miR-132_hsa-miR-194     | 1.12               | 0.0033         | 0.0676     |
| hsa-miR-192_hsa-miR-194     | 1.11               | 0.0033         | 0.0676     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-331-3p  | -1.10              | 0.0035         | 0.0691     |
| hsa-let-7a_hsa-miR-194      | 1.16               | 0.0037         | 0.0719     |
| hsa-miR-139-5p_hsa-miR-194  | 1.12               | 0.0038         | 0.0719     |
| hsa-miR-148b_hsa-miR-194    | 1.12               | 0.0040         | 0.0730     |
| hsa-miR-374b_hsa-miR-518f   | 1.13               | 0.0041         | 0.0730     |
| hsa-miR-454_hsa-miR-518f    | 1.11               | 0.0042         | 0.0730     |
| hsa-miR-194_hsa-miR-374a    | -1.09              | 0.0042         | 0.0730     |

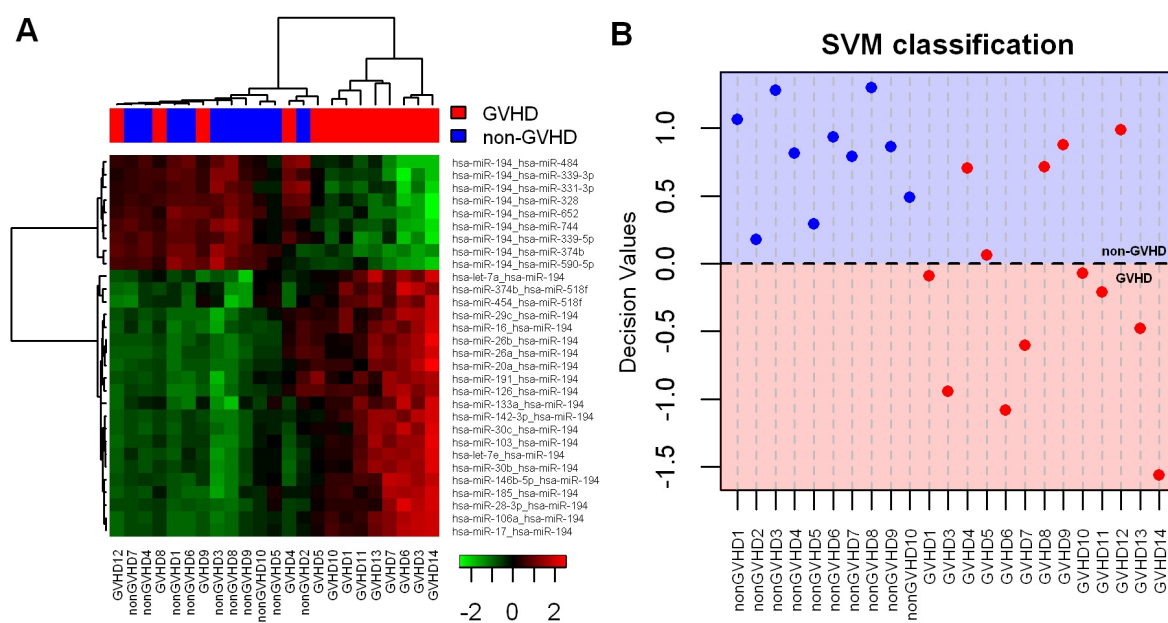


Figura 4.28: **I *ratio* differenzialmente espressi mostrano un profilo ben distinto tra i campioni aGVHD e non-aGVHD.** **A.** Il *clustering* gerarchico effettuato utilizzando i 30 *ratio* differenzialmente espressi divide, come atteso, i campioni aGVHD da quelli non-aGVHD, sebbene alcuni pazienti aGVHD vengano inclusi nel *cluster* non-aGVHD. **B.** Valori decisionali assegnati a ciascun campione dall’algoritmo SVM in LOOCV. Il valore decisionale rappresenta la confidenza con cui un classificatore SVM classifica un determinato campione. Un valore positivo assegna il campione alla classe non-aGVHD e viceversa. Gli stessi 4 campioni che vengono erroneamente classificati nel *clustering* gerarchico sono misclassificati anche in questo caso.

### 4.2.3.3 Costruzione di un predittore: *Support Vector Machine*

L'obiettivo principale della ricerca di un biomarcatore predittivo di aGVHD è sicuramente quello di identificare un pannello di molecole con un significato predittivo per lo sviluppo della complicità. Nel nostro caso abbiamo testato se i 30 *ratio* identificati precedentemente potessero avere un significato predittivo e potessero essere inclusi all'interno di un predittore. In particolare, abbiamo sviluppato un modello di *Support Vector Machines* per valutare l'abilità del nostro pannello di discriminare tra chi avrebbe sviluppato la GVHD e chi invece non sarebbe andato incontro alla complicità. Dato che il pannello di 30 *ratio* è stato identificato in una maniera non supervisionata e senza bias, abbiamo ritenuto valido utilizzare lo stesso pannello per "istruire" il nostro modello di SVM e costruire un modello in grado di riconoscere, attraverso algoritmi e modelli di regressione, dei *pattern* di espressione in grado di discriminare i due gruppi di pazienti. In particolare, il modello più performante ottenuto è in grado di predire lo sviluppo di aGVHD con una accuratezza del 78%, una specificità pari a 1 ed una sensibilità del 62%. Anche in questo caso è stata calcolata l'accuratezza del predittore in cross validazione, ovvero escludendo un campione alla volta: ad essa è stato associato un p-value di significatività statistica pari a  $9 \times 10^{-4}$ . Come per il *clustering* gerarchico, anche nel caso del predittore SVM 5 campioni sono stati classificati erroneamente, assegnandoli cioè alla classe nonGVHD come nel caso del *clustering* (vedi figura 4.28).

### 4.2.3.4 microRNA differenzialmente espressi in pazienti con aGVHD

Come già discusso in precedenza, il numero di microRNA circolanti in pazienti con aGVHD è significativamente inferiore rispetto al gruppo nonGVHD e al gruppo di donatori sani. Il livello di espressione dei miRNA detectati si è inoltre rivelato inferiore a quello delle altre classi, come documentato da un valore medio di  $C_t$  maggiore (23.9). Dovendo traslare il dato ottenuto dai *ratio* in una deregolazione di singoli microRNA, abbiamo ipotizzato che se un microRNA è deregolato, allora non dovrebbe seguire il *trend* di espressione dell'intero pannello di microRNA analizzati in ciascuna classe. Abbiamo pertanto effettuato un'analisi di correlazione (correlazione di Pearson's) tra i valori grezzi di amplificazione ( $C_t$ ) di ciascun miRNA presente nei 30 *ratio* precedentemente identificati e il livello di espressione media di campioni appartenenti al gruppo aGVHD o nonGVHD.

Questa analisi ha rivelato che il miR-194 e il miR-518f sono gli unici due microRNA non

correlati significativamente con il livello di espressione media (miR-194  $R^2=0.27$  con un p-value 0.21, miR-518f  $R^2 = 0.09$  con p-value di 0.68), mentre i restanti microRNA mostravano una correlazione media pari a 0.92. In particolare, analizzando i valori dei *ratio* in cui sono coinvolti, è possibile definire che il miR-194 e il 518f sono entrambi upregolati in pazienti che svilupperanno GVHD.

Questo risultato suggerisce quindi che queste due molecole esercitano molto probabilmente una funzione regolatoria nella patogenesi della GVHD, mentre gli altri miRNA presenti nei *ratio* sono più stabili e fungono da “miRNA *housekeeping*”. Interessante notare che il miR-194 era presente in 28 dei 30 *ratio* selezionati.

#### 4.2.3.5 Analisi delle vie di segnalazione

Una volta identificati i microRNA in grado di discriminare i due gruppi di pazienti, ci siamo chiesti quale fosse il loro coinvolgimento nei meccanismi patogenetici della aGVHD. Abbiamo pertanto condotto un’analisi in silico per identificare i geni bersaglio dei microRNA deregolati tra i due gruppi di pazienti e per studiare le vie di segnalazione in cui questi sono coinvolti.

A tal fine è stato utilizzato un software, *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) che permette innanzitutto di identificare i geni bersaglio dei diversi microRNA, sia basandosi su algoritmi di appaiamento che su evidenze sperimentali di lavori che documentano l’attività regolatoria di queste molecole nei confronti di geni specifici. Nella prima parte di analisi abbiamo identificato i geni bersaglio, tenendo in considerazione per le successive analisi solo i geni sperimentalmente validati o predetti con un alto punteggio da Target Scan. In questo modo è stato possibile identificare 389 geni bersaglio per il miR-194 e 34 per il miR-518f. Tra i più importanti, e sicuramente coinvolti nei meccanismi patogenetici della GVHD, uno dei geni bersaglio del miR-518f, ovvero EGR-1, un fattore di trascrizione che modula l’espressione di diversi geni coinvolti nell’infiammazione, nell’adesione e chemotassi di neutrofili e monociti, nella riparazione tissutale, nella rigenerazione e nello sviluppo [62, 102]. Inoltre, tra i bersagli del miR-194 è stato possibile identificare:

- SOCS2, una molecola cruciale della via di segnalazione JAK-STAT, coinvolta nei meccanismi di differenziazione Th2 e inibizione del segnale di recettori Toll-Like (TLR).

- Geni della famiglia delle MAPK che sono coinvolti ovviamente nella segnalazione di MAPK, nel signaling del *T-Cell receptor* (TCR) e nella via di segnalazione di NF $\kappa$ B.
- CXCL3 (*chemokine ligand 3*), una molecola coinvolta nell'interazione recettore-recettore e nel *signaling* chemochinico, un passaggio fondamentale nella patogenesi della aGVHD [8].

Una volta identificati i geni bersaglio dei miRNA differenzialmente espressi, questi sono stati utilizzati per identificare quali vie di segnalazione fossero coinvolte ed alterate nel contesto della GVHD. L'analisi di IPA ha mostrato il coinvolgimento di questi geni all'interno di 25 "macro *network*" tra cui le più significative (p-value <0.05) sono rappresentate da "Malattie infettive, morte e sopravvivenza cellulare, crescita cellulare e proliferazione" e "Sviluppo cellulare, sviluppo embrionico, sviluppo e funzionamento del sistema ematopoietico". Le molecole chiave di queste due "reti" sono rappresentate da ERK, NF $\kappa$ B e IL-10, tutte e tre strettamente coinvolte in meccanismi di regolazione della GVHD e processi infiammatori.

Oltre queste vie di segnalazione, è stata effettuata un'analisi su vie di segnalazione "canoniche", da cui sono emerse (vedi figura 4.29):

- Wnt/Beta catenina: dati presenti in letteratura indicano come questa via di segnalazione sia coinvolta nella rigenerazione dell'epitelio gastrointestinale dopo danno da chemioterapia [88]
- TGF $\beta$ : la via di segnalazione di TGF $\beta$  gioca un ruolo importante nella modulazione delle risposte immuni, con conseguenze dirette sulla patofisiologia della GVHD [11]
- TLR *signaling*: i recettori Toll Like sono degli importanti componenti dell'immunità innata e sono noti per la loro capacità di riconoscere diversi ligandi batterici o segnali di pericolo, specialmente nell'intestino. Di interesse notare che mutazioni nei TLR, in particolare TLR4, sono state associate con una ridotta responsività dei macrofagi ai lipopolisaccaridi, probabilmente riducendo il rischio di GVHD. Tuttavia, le stesse mutazioni sono state associate ad un aumentato rischio di danno intestinale ed infezioni microbiche, accelerando in questo modo la GVHD.

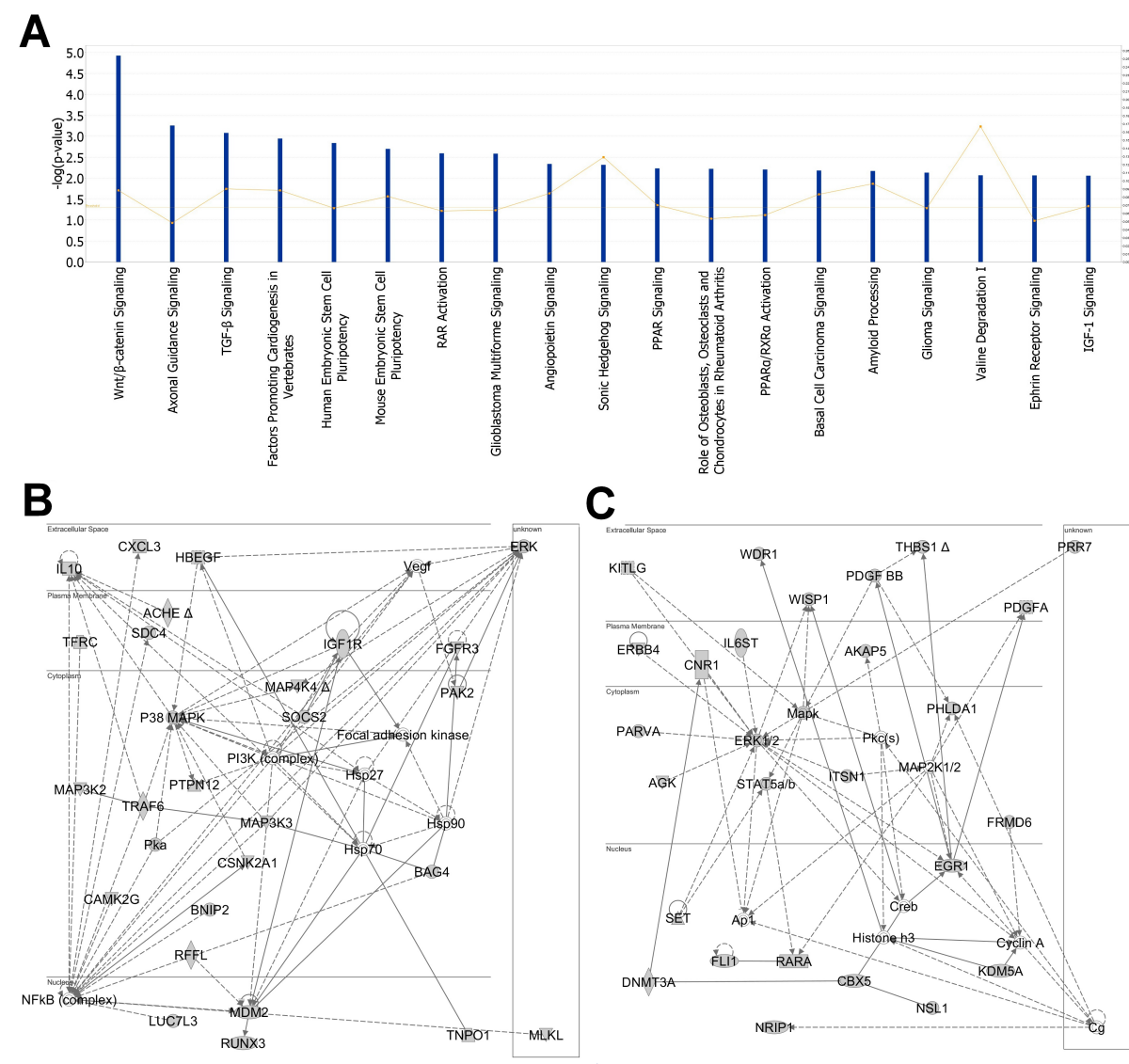


Figura 4.29: Analisi funzionale del miR194 e miR518f attraverso l'analisi di vie di segnalazione e *network* dei rispettivi geni bersaglio. **A.** Analisi globale delle vie di segnalazione canoniche **B.** Rappresentazione grafica della *network* “Malattie infettive, morte e sopravvivenza cellulare, crescita cellulare e proliferazione”. **C.** Rappresentazione grafica della *network* “Sviluppo cellulare, sviluppo embrionale, sviluppo e funzionamento del sistema ematopoietico”.

In una visione d'insieme quindi, questi risultati suggeriscono come il *targeting* e la seguente down-regolazione di geni coinvolti nelle vie di segnalazione sopra citate possa essere di grande interesse nell'ambito della GVHD acuta.

# Capitolo 5

## Discussione

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche rappresenta un'importante opzione terapeutica per la cura di numerose patologie ematologiche. In particolare, in un contesto oncologico, questo approccio terapeutico si è dimostrato altamente promettente grazie alla capacità delle cellule del sistema immunitario trapiantato di sviluppare una reazione allogenica, definita GVT (*Graft Versus Tumor*), che permette un efficace controllo della malattia neoplastica. Tuttavia, le stesse cellule trapiantate possono reagire contro i tessuti sani del ricevente, riconoscendoli come estranei, dando così luogo ad una reazione indesiderata nota come GVHD (*Graft Versus Host Disease*). Questa infatti rappresenta la principale causa di mortalità associata al trapianto allogenico, limitandone l'applicabilità.

Il condizionamento pre-trapianto gioca un ruolo chiave nella patogenesi della GVHD acuta (aGVHD, definita tale quando si manifesta entro 100 giorni dal trapianto). Esso infatti favorisce l'instaurarsi di un microambiente citochinico pro-infiammatorio necessario all'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) che attivano i linfociti T *naïve* del donatore. I linfociti T alloreattivi hanno un ruolo di primaria importanza nella fase effettrice della aGVHD, essi infatti riconoscono complessi MHC e/o miHA estranei sulle cellule dell'ospite e mediano il danno tissutale strettamente associato alla malattia. Tenendo a mente quindi la patogenesi della complicanza, i protocolli ad oggi in uso per la prevenzione della GVHD prevedono la somministrazione di combinazioni di glucocorticoidi ed altri farmaci immunosoppressori. Questi farmaci hanno come bersaglio molecole espresse a livello ubiquitario, pertanto ad essi sono associati effetti avversi secondari generalizzati

che, a lungo termine, ostacolano la corretta ricostituzione immune e compromettono la risposta GVT. Il problema principale è rappresentato quindi dalla mancanza di farmaci in grado di inibire la risposta GVHD senza esporre il paziente ad infezioni opportunistiche dovute ad una inefficace ricostituzione immune, ma soprattutto senza compromettere la risposta GVT.

Nel contesto del trapianto di cellule staminali ematopoietiche è stato osservato che la via di segnalazione JAK/STAT contribuisce alla risposta GVHD [14, 6] poiché le chinasi JAK sono fisiologicamente associate a recettori per le principali citochine coinvolte nella patogenesi della reazione acuta contro i tessuti sani dell'ospite. L'idea che l'inibizione selettiva delle proteine della famiglia JAK possa portare ad una modulazione dell'alloreattività T mediata ci ha spinti ad investigare il ruolo di questa via segnalazione nel contesto del trapianto di cellule staminali ematopoietiche. In particolare sono stati testati due differenti farmaci JAK inibitori: CP690,550, selettivo per JAK3 e recentemente descritto come efficace nel prevenire la GVHD in un modello murino [74], e INC-424, un inibitore selettivo per JAK1/2 che esplica un effetto anti-tumorale e una rapida downregolazione delle citochine pro-infiammatorie [37]. È stato utilizzato un modello murino geneticamente incompatibile per il complesso maggiore di istocompatibilità, trattato con CP-690 o INC-424 per 14 giorni secondo le dosi pubblicate in letteratura [74, 95, 83]. La presenza di GVHD è stata valutata mediante l'analisi della sopravvivenza globale e monitorando la perdita di peso. I topi riceventi sono stati sacrificati al giorno 14 e 30 dopo il trapianto, sono stati raccolti gli organi per l'analisi istopatologica ed è stata effettuata un'accurata analisi immunofenotipica dei linfociti splenici. Sia gli animali trattati con CP-690 che quelli trattati con INC-424, dopo la sospensione del trattamento farmacologico hanno mostrato un netto peggioramento delle condizioni di salute e la comparsa di segni clinici di GVHD (quali pelo arruffato, postura rannicchiata, perdita dell'integrità cutanea etc...). Questi segni esteriori sono stati confermati dalle analisi istologiche, suggerendo quindi la necessità di un trattamento farmacologico cronico al fine di downmodulare la segnalazione JAK/STAT ed impedire l'attivazione dei linfociti del donatore in senso allogenico contro i tessuti sani del ricevente. L'analisi immunofenotipica dei linfociti T splenici non ha evidenziato grandi differenze in termini di attivazione o di maturazione tra le diverse coorti sperimentali. Viene sicuramente confermato il dato ottenuto dall'analisi istologica secondo cui è necessario un trattamento cronico con l'inibitore di JAK/STAT per ottenere un effetto anti-GVHD duraturo. In termini di attivazione dei linfociti T è stata riscontra-

ta una minor attivazione, soprattutto per quanto riguarda i linfociti T citotossici, nelle coorti trattate farmacologicamente. Anche rispetto alla maturazione dei linfociti è stato possibile delineare un *trend* secondo cui le coorti trattate con gli inibitori di JAK/STAT mostrano delle percentuali maggiori di linfociti *Tnaive* e minori di *effector memory*. I dati ottenuti dalla reazione linfocitaria mista dimostrano inoltre come il trattamento con INC-424 sia più efficace nell'inibire l'alloreattività dei linfociti T. Possiamo quindi concludere che l'inibizione selettiva di JAK1 e JAK2 è più efficace della singola inibizione di JAK3 nel limitare l'alloreattività e favorire lo sviluppo della GVHD acuta.

I dati ottenuti dal paragone dei due trattamenti farmacologici sono incoraggianti, tuttavia l'utilizzo di INC-424 alle dosi pubblicate in letteratura ha dimostrato una forte linfocitotossicità che ha richiesto ulteriori indagini per identificare la dose ottimale di farmaco da utilizzarsi nel contesto del trapianto allogenico. Inoltre, ci siamo chiesti se l'inibizione di JAK1/JAK2, oltre a diminuire l'alloreattività associata alla risposta GVHD, andasse ad inficiare l'effetto GVT associato al trapianto. Utilizzando lo stesso modello murino di aGVHD inoculato con cellule di leucemia (RMB-1) o linfoma (A20), abbiamo valutato se il trattamento con INC-424 alla dose ottimale (in termini di inibizione JAK1/2 e tossicità) di 45mg/Kg/die abrogasse o meno l'effetto GVT. L'osservazione dei segni esteriori di aGVHD e di malattia tumorale ha portato alla conferma di un'azione protettiva di INC-424 nei confronti della aGVHD per entrambi i modelli tumorali e alla conferma di un mantenimento dell'effetto GVT, ma solo nel modello di linfoma. Il modello di leucemia, probabilmente dovuto all'aggressività intrinseca della malattia e ad un dosaggio non ottimale di cellule tumorali somministrate, ha mostrato invece evidenti segni di malattia tumorale. L'idea dell'utilizzo del farmaco JAK1 e JAK2 inibitore INC-424 per il trattamento della aGVHD deriva dall'evidenza dell'azione di questa molecola nella downregolazione delle principali vie di segnalazione citochiniche pro-infiammatorie e dalla constatazione di una sua azione inibitoria nei confronti della funzionalità delle cellule dendritiche [41]. Una possibile spiegazione del mantenimento dell'effetto GVT, come documentato dal nostro modello murino di linfoma, deriva o da un'azione anti-tumorale dell'INC-424 o dalla capacità del farmaco stesso di downregolare l'attività migratoria dei linfociti T alloreattivi, agendo direttamente sull'espressione del recettore chemochinico CXCR3 e sulla produzione di IFN $\gamma$  [18]. Ulteriori esperimenti *in vitro* dimostrano come non vi sia alcuna influenza del trattamento con INC-424 sull'attività anti-tumorale dei linfociti splenici posti in co-coltura con le cellule delle due linee tumorali (vedi Risultati

4.1.4).

Sebbene in contrasto con dati recentemente pubblicati (ASH 2014 Annual Meeting, Poster 2001 e 3253), i nostri risultati mostrano solo una modesta riduzione dell'attivazione e soprattutto una ridotta diminuzione della produzione di  $\text{IFN}\gamma$  da parte dei linfociti T negli animali trattati farmacologicamente. Tuttavia, in accordo con un lavoro recentemente pubblicato su *Blood* [18], nonostante una diminuita attività dei linfociti T, i nostri dati confermano la capacità di questo trattamento farmacologico di inibire la aGVHD senza alterare l'effetto benefico GVT. L'ipotesi del meccanismo d'azione del farmaco, come sottolineato anche dagli autori del lavoro, consisterebbe quindi in una alterata capacità migratoria dei linfociti T. Risultati preliminari della nostra analisi istologica sui tessuti bersaglio della aGVHD confermano infatti questa ipotesi, dimostrando una diminuita infiltrazione linfocitaria a livello degli organi bersaglio. Il blocco del traffico linfocitario permetterebbe infatti ai linfociti di reagire contro le cellule tumorali presenti negli organi linfoidi secondari, ma non di migrare negli organi bersaglio della aGVHD e reagire contro i tessuti dell'ospite. L'inibitore selettivo di JAK1/2 INC-424 si propone quindi come valida alternativa terapeutica nel trattamento della aGVHD, data la sua capacità in un modello preclinico di abrogare l'effetto GVHD pur mantenendo l'effetto GVT. Tuttavia, sarebbe auspicabile poter predire la complicità prima che questa si manifesti clinicamente.

Ad oggi purtroppo non sono disponibili test diagnostici in grado di predire la aGVHD, sebbene siano state identificate alcune proteine ad essa associate [73, 81, 3]. La recente scoperta dei microRNA come molecole secrete in forma stabile in diversi fluidi biologici e la loro natura regolatoria in diversi processi biologici fisio/patologici [67, 17, 42] gli attribuiscono un ruolo come candidati biomarcatori nell'ambito di diverse patologie. In particolare, il ruolo dei microRNA nel trapianto allogenico non è ancora chiaro. Un nostro report preliminare [13] dimostra che anche nel contesto del trapianto allogenico, nel primo periodo post trapianto è possibile rilevare la presenza di microRNA circolanti amplificabili mediante Real Time PCR. In particolare, nel presente studio definiamo come tempistica ottimale per il profilo di espressione di microRNA circolanti il giorno +28 post trapianto, ovvero quando il numero di microRNA amplificati è sufficientemente adeguato e non si è ancora instaurata la risposta aGVHD. A questa tempistica l'analisi del profilo di espressione è in grado di discriminare pazienti che svilupperanno aGVHD da coloro che non svilupperanno la complicità. È stata applicata una metodologia semplice e diretta che si basa sull'estrazione di un volume fisso di plasma ottenuto dopo centrifugazione di

una provetta da emocromo prelevata per esami di *routine* post trapianto. Per l'analisi del profilo di espressione dei microRNA è stata inoltre scelta una metodologia semplice e applicabile a tutti i laboratori come la Real Time PCR.

Sebbene i nostri risultati appaiano promettenti, ci sono diversi problemi da tenere in considerazione nell'utilizzo dei microRNA come biomarcatori. Innanzitutto l'accuratezza del *profiling* dei microRNA circolanti dipende esclusivamente dal tipo di campione, il metodo di processamento dello stesso e il metodo di analisi dei microRNA. I risultati ottenuti dall'analisi potrebbero inoltre essere influenzati dal tipo di normalizzazione scelta, nel caso specifico in cui una metodologia di Real Time PCR venga scelta per l'analisi del profilo di espressione [55]. Ad oggi infatti, e questo rimane il problema principale, non esiste una metodica per la quantificazione dei microRNA nel plasma, pertanto la standardizzazione delle metodiche non è ancora effettiva. Infine, un recente studio ha dimostrato come vi sia una scarsa concordanza tra studi simili e condotti indipendentemente riguardo all'analisi di espressione di miRNA circolanti [55].

Diverse altre metodologie di analisi sono state proposte, quali ad esempio la citofluorimetria, studi di espressione con microarray, *deep sequencing* [51], e nuove tecnologie vengono man mano proposte per cercare di aumentare la solidità dell'analisi [43]. In questo studio è stata scelta una metodica di Real Time PCR per aumentare la sensibilità di analisi e utilizzare una metodica semplice ed applicabile a tutti i laboratori senza la necessità di un *expertise* specifico. Il problema principale associato alla scelta di una quantificazione mediante Real Time PCR risiede nei metodi di normalizzazione scelto. Sono state proposte diverse strategie [66], come ad esempio l'uso di molecole sintetiche aggiunte come controlli *spike-in* al fine di normalizzare il livello di espressione dei microRNA bersaglio. Queste molecole, sebbene utili per la validazione con saggi singoli e come controllo di qualità [52], non tengono tuttavia in considerazione le differenze in termini di qualità del campione o di efficienza della reazione di retrotrascrizione. In studi precedenti, il livello di espressione di microRNA circolanti è stato valutato mediante l'utilizzo di controlli interni quali RNU6, RNU6B, 18s e miR-16 [17]. La stabilità nel plasma di queste molecole è tuttavia controversa e, nel caso particolare del nostro studio, molti dei "miRNA invariati" erano al limite della detection. Un altro approccio proposto [93, 1] è quello di selezionare i miRNA invariati mediante l'utilizzo di algoritmi creati per valutare la variabilità di potenziali miRNA *housekeeping* all'interno di un campione. Più recentemente è stata proposta l'utilizzo della normalizzazione mediante *global mean*, ovvero utilizzando

il livello di espressione medio all'interno di ciascun campione [64]. Invece di utilizzare un singolo gene (in questo caso miRNA), il metodo della *global mean* usa il livello di espressione medio di tutti i miRNA detectati in un singolo campione come fattore di normalizzazione, assumendo che il livello di espressione medio di tutti i miRNA analizzati sia costante quando si utilizza la stessa quantità di RNA di partenza. Data la mancanza di un *consensus*, e tenendo a mente i diversi problemi associati a ciascuna strategia di normalizzazione, nel nostro studio abbiamo voluto testare tutti i metodi sopra menzionati. È stato interessante notare come vi fossero differenze nei profili di espressione tra pazienti GVHD e non-GVHD utilizzando sia il singolo miR-16 come controllo, che combinando diversi miRNA come normalizzatori, tuttavia non è stata riscontrata una concordanza di risultati utilizzando i diversi metodi. Questo risultato ci ha spinti quindi ad utilizzare una strategia alternativa, tenendo a mente che ad oggi non esiste una metodica standardizzata per quantificare miRNA circolanti.

È stato ipotizzato che la quantificazione dell'RNA totale correlasse con la concentrazione di microRNA [56], tuttavia nel nostro studio non siamo riusciti a confermare questo dato. Abbiamo pertanto utilizzato un volume fisso di plasma di partenza e abbiamo utilizzato una normalizzazione basata sull'utilizzo di *ratio* reciproci per minimizzare le differenze in termini di quantità di materiale di partenza. Questa metodica consiste nel calcolare il  $\Delta C_t$  per ciascun paio di singoli miRNA in una maniera iterativa, ottenendo così 6328 *ratio* per ciascun campione in analisi. Paragonando i gruppi GVHD e non-GVHD siamo stati in grado di identificare 30 *ratio* che discriminano tra le due differenti condizioni biologiche. Inoltre, l'analisi dei singoli microRNA ha mostrato una upregolazione di due miRNA, il miR-194 e il miR-518f, in pazienti che avrebbero in seguito sviluppato GVHD. L'analisi integrata della vie di segnalazione coinvolte nella regolazione miRNA-dipendente ha evidenziato come i geni bersaglio del miR-194 e miR-518f siano coinvolti in processi infiammatori e di proliferazione quali il *pathway* di NF $\kappa$ B, proliferazione e differenziamento delle cellule T, supportando così l'ipotesi che questi miRNA siano coinvolti nella patogenesi e nella regolazione della GVHD.

È stato recentemente pubblicato un lavoro che identifica un gruppo di 4 miRNA circolanti come potenziali biomarcatori per aGVHD [100]. Sebbene gli autori abbiano usato una strategia di Real Time PCR (basata sull'utilizzo di SYBR green) molto simile a quella utilizzata nel nostro studio, nelle nostre mani, nessuno dei miRNA riportati è in grado di distinguere pazienti con GVHD da quelli che non sviluppano la complicanza. Rispetto a

questo lavoro, il nostro studio ha sicuramente un numero di pazienti molto ridotto, tuttavia la mancanza di concordanza o perlomeno di sovrapposizione tra i risultati ottenuti dimostra la necessità di sviluppare degli standard universalmente riconosciuti per lo studio di microRNA circolanti. Un discreto numero di variabili preanalitiche e analitiche, come ad esempio il tipo di campione, la quantificazione dei miRNA circolanti, il processamento, il metodo di analisi e la strategia di normalizzazione, sono responsabili delle potenziali differenze riscontrate nel nostro studio comparato con quello recentemente pubblicato così come anche in altri contesti [10, 55].

In conclusione, i dati ottenuti nel presente studio dimostrano la fattibilità dell'analisi del profilo di espressione di miRNA circolanti in un contesto allogenico ma l'utilità dei microRNA circolanti come biomarcatori per la predizione, diagnosi e prognosi della aGVHD è tuttora dubbia. La standardizzazione e la riproducibilità rimangono infatti i due principali obiettivi da raggiungere per traslare l'analisi dei microRNA circolanti dal laboratorio alla pratica clinica.

# Bibliografia

- [1] C. L. Andersen, J. L. Jensen, and T. F. Ørntoft. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64(15):5245–50, Aug 2004.
- [2] D. Anglicheau, V. K. Sharma, R. Ding, A. Hummel, C. Snopkowski, D. Dadhania, S. V. Seshan, and M. Suthanthiran. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13):5330–5335, Mar 2009.
- [3] K. J. August, K.-Y. Chiang, R. M. Bostick, W. D. Flanders, E. K. Waller, A. Langston, D. Worthington-White, P. Rowland, K. F. Moore, H. J. Khoury, and J. T. Horan. Biomarkers of immune activation to screen for severe, acute gvhd. *Bone Marrow Transplant*, 46(4):601–4, Apr 2011.
- [4] D. P. Bartel. Micrnas: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97, Jan 2004.
- [5] D. P. Bartel. Micrnas: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215–33, Jan 2009.
- [6] B. C. Betts, A. Veerapathran, J. Pidala, X.-Z. Yu, and C. Anasetti. Stat5 polarization promotes itregs and suppresses human t-cell alloresponses while preserving ctl capacity. *J Leukoc Biol*, Sep 2013.
- [7] B. R. Blazar, B. M. Carreno, A. Panoskaltsis-Mortari, L. Carter, Y. Iwai, H. Yagita, H. Nishimura, and P. A. Taylor. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an ifn-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*, 171(3):1272–7, Aug 2003.

- [8] B. R. Blazar, W. J. Murphy, and M. Abedi. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*, 12(6):443–58, Jun 2012.
- [9] M. G. Boy, C. Wang, B. E. Wilkinson, V. F.-S. Chow, A. T. Clucas, J. G. Krueger, A. S. Gaweco, S. H. Zwillich, P. S. Changelian, and G. Chan. Double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study to evaluate the pharmacologic effect of cp-690,550 in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(9):2299–2302, 2009.
- [10] M. Callari, P. Tiberio, L. De Cecco, E. Cavadini, M. Dugo, C. Ghimenti, M. G. Daidone, S. Canevari, and V. Appierto. Feasibility of circulating mirna microarray analysis from archival plasma samples. *Anal Biochem*, 437(2):123–5, Jun 2013.
- [11] C. Carli, M. Giroux, and J.-S. Delisle. Roles of transforming growth factor-beta in graft-versus-host and graft-versus-tumor effects. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18(9):1329–40, Sep 2012.
- [12] M. J. Carlson, M. L. West, J. M. Coghill, A. Panoskaltsis-Mortari, B. R. Blazar, and J. S. Serody. In vitro-differentiated th17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*, 113(6):1365–74, Feb 2009.
- [13] C. Carniti, S. A. Gimondi, A. Bermema, A. Vendramin, M. Morelli, and P. Corradini. Analysis of circulating microrna expression profile in patients transplanted from matched unrelated donors (mud) identifies mir203 as a putative marker of agvhd. In *BLOOD*, volume 116, pages 953–953. AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA, 2010.
- [14] M. Cetkovic-Cvrlje, B. A. Roers, B. Waurzyniak, X. P. Liu, and F. M. Uckun. Targeting janus kinase 3 to attenuate the severity of acute graft-versus-host disease across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood*, 98(5):1607–13, Sep 2001.
- [15] P. S. Changelian, M. E. Flanagan, D. J. Ball, C. R. Kent, K. S. Magnuson, W. H. Martin, B. J. Rizzuti, P. S. Sawyer, B. D. Perry, W. H. Brissette, et al. Prevention of organ allograft rejection by a specific janus kinase 3 inhibitor. *Science*, 302(5646):875–878, 2003.

- [16] P. S. Changelian, D. Moshinsky, C. F. Kuhn, M. E. Flanagan, M. J. Munchhof, T. M. Harris, D. A. Whipple, J. L. Doty, J. Sun, C. R. Kent, et al. The specificity of jak3 kinase inhibitors. *Blood*, 111(4):2155–2157, 2008.
- [17] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, and C.-Y. Zhang. Characterization of micrnas in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18(10):997–1006, Oct 2008.
- [18] J. Choi, E. D. Ziga, J. Ritchey, L. Collins, J. L. Prior, M. L. Cooper, D. Piwnica-Worms, and J. F. DiPersio. Ifngamma-r signaling mediates alloreactive t-cell trafficking and gvhd. *Blood*, 120(19):4093–103, Nov 2012.
- [19] S. W. Choi, C. L. Kitko, T. Braun, S. Paczesny, G. Yanik, S. Mineishi, O. Krijanovski, D. Jones, J. Whitfield, K. Cooke, R. J. Hutchinson, J. L. M. Ferrara, and J. E. Levine. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of gvhd and survival. *Blood*, 112(4):1539–42, Aug 2008.
- [20] F. J. Clark, R. Gregg, K. Piper, D. Dunnion, L. Freeman, M. Griffiths, G. Begum, P. Mahendra, C. Craddock, P. Moss, and R. Chakraverty. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood cd4+cd25high regulatory t cells. *Blood*, 103(6):2410–6, Mar 2004.
- [21] K. R. Cooke, L. Kobzik, T. R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr, J. M. Crawford, and J. L. Ferrara. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. the roles of minor h antigens and endotoxin. *Blood*, 88(8):3230–9, Oct 1996.
- [22] P. Corradini, C. Tarella, A. Olivieri, A. M. Gianni, C. Voena, F. Zallio, M. Ladetto, M. Falda, M. Lucesole, A. Doderio, F. Ciceri, F. Benedetti, A. Rambaldi, M. R. Sajeve, M. Tresoldi, A. Pileri, C. Bordignon, and M. Bregni. Reduced-intensity conditioning followed by allografting of hematopoietic cells can produce clinical and

- molecular remissions in patients with poor-risk hematologic malignancies. *Blood*, 99(1):75–82, Jan 2002.
- [23] M. A. Cortez and G. A. Calin. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 9(6):703–711, Jun 2009.
- [24] A. Deisseroth, E. Kaminskis, J. Grillo, W. Chen, H. Saber, H. L. Lu, M. D. Rothmann, S. Brar, J. Wang, C. Garnett, J. Bullock, L. B. Burke, A. Rahman, R. Sridhara, A. Farrell, and R. Pazdur. U.s. food and drug administration approval: ruxo-litinib for the treatment of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis. *Clin Cancer Res*, 18(12):3212–7, Jun 2012.
- [25] R. Duttagupta, R. Jiang, J. Gollub, R. C. Getts, and K. W. Jones. Impact of cellular mirnas on circulating mirna biomarker signatures. *PLoS One*, 6(6):e20769, 2011.
- [26] T. El-Hefnawy, S. Raja, L. Kelly, W. L. Bigbee, J. M. Kirkwood, J. D. Luketich, and T. E. Godfrey. Characterization of amplifiable, circulating rna in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*, 50(3):564–573, Mar 2004.
- [27] M. R. Fabian, N. Sonenberg, and W. Filipowicz. Regulation of mrna translation and stability by micrornas. *Annu Rev Biochem*, 79:351–79, 2010.
- [28] M. C. Fantini, A. Rizzo, D. Fina, R. Caruso, C. Becker, M. F. Neurath, T. T. Macdonald, F. Pallone, and G. Monteleone. Il-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between treg and th17 cells. *Eur J Immunol*, 37(11):3155–63, Nov 2007.
- [29] I. Faraoni, F. R. Antonetti, J. Cardone, and E. Bonmassar. mir-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*, 1792(6):497–505, Jun 2009.
- [30] A. Ferrajoli, S. Faderl, F. Ravandi, and Z. Estrov. The jak-stat pathway: a therapeutic target in hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*, 6(8):671–9, Dec 2006.

- [31] J. E. Foley, J. Mariotti, K. Ryan, M. Eckhaus, and D. H. Fowler. Th2 cell therapy of established acute graft-versus-host disease requires il-4 and il-10 and is abrogated by il-2 or host-type antigen-presenting cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(9):959–72, Sep 2008.
- [32] D. Frasca, F. Guidi, M. Arbitrio, C. Pioli, F. Poccia, R. Cicconi, and G. Doria. Hematopoietic reconstitution after lethal irradiation and bone marrow transplantation: effects of different hematopoietic cytokines on the recovery of thymus, spleen and blood cells. *Bone Marrow Transplant*, 25(4):427–33, Feb 2000.
- [33] J. S. Fridman, P. A. Scherle, R. Collins, T. C. Burn, Y. Li, J. Li, M. B. Covington, B. Thomas, P. Collier, M. F. Favata, X. Wen, J. Shi, R. McGee, P. J. Haley, S. Shepard, J. D. Rodgers, S. Yeleswaram, G. Hollis, R. C. Newton, B. Metcalf, S. M. Friedman, and K. Vaddi. Selective inhibition of jak1 and jak2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of incb028050. *J Immunol*, 184(9):5298–307, May 2010.
- [34] R. Garzon and C. M. Croce. Micrnas in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*, 15(4):352–358, Jul 2008.
- [35] M. Geddes and J. Storek. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20(2):329–348, Jun 2007.
- [36] K. Ghoreschi, M. I. Jesson, X. Li, J. L. Lee, S. Ghosh, J. W. Alsup, J. D. Warner, M. Tanaka, S. M. Steward-Tharp, M. Gadina, et al. Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (cp-690,550). *The Journal of Immunology*, 186(7):4234–4243, 2011.
- [37] V. Gupta, P. Hari, and R. Hoffman. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in the era of jak inhibitors. *Blood*, 120(7):1367–79, Aug 2012.
- [38] A. M. Hanash, L. W. Kappel, N. L. Yim, R. A. Nejat, G. L. Goldberg, O. M. Smith, U. K. Rao, L. Dykstra, I.-K. Na, A. M. Holland, J. A. Dudakov, C. Liu, G. F. Murphy, W. J. Leonard, G. Heller, and M. R. M. van den Brink. Abrogation of donor t-cell il-21 signaling leads to tissue-specific modulation of immunity and separation of gvhd from gvl. *Blood*, 118(2):446–55, Jul 2011.

- [39] A. Harris, S. M. Krams, and O. M. Martinez. Micrnas as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant*, 10(4):713–719, Apr 2010.
- [40] A. C. Harris, J. L. M. Ferrara, T. M. Braun, E. Holler, T. Teshima, J. E. Levine, S. W. Choi, K. Landfried, K. Akashi, M. Vander Lugt, D. R. Couriel, P. Reddy, and S. Paczesny. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute gvhd. *Blood*, 119(12):2960–3, Mar 2012.
- [41] A. Heine, S. A. E. Held, S. N. Daecke, S. Wallner, S. P. Yajnanarayana, C. Kurts, D. Wolf, and P. Brossart. The jak-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*, 122(7):1192–202, Aug 2013.
- [42] H. M. Heneghan, N. Miller, A. J. Lowery, K. J. Sweeney, J. Newell, and M. J. Kerin. Circulating micrnas as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*, 251(3):499–505, Mar 2010.
- [43] C. M. Hindson, J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessella, and M. Tewari. Absolute quantification by droplet digital pcr versus analog real-time pcr. *Nat Methods*, 10(10):1003–5, Oct 2013.
- [44] P. Hoffmann, J. Ermann, M. Edinger, C. G. Fathman, and S. Strober. Donor-type cd4(+)cd25(+) regulatory t cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*, 196(3):389–99, Aug 2002.
- [45] V. M. Hubbard, J. M. Eng, T. Ramirez-Montagut, K. H. Tjoe, S. J. Muriglan, A. A. Kochman, T. H. Terwey, L. M. Willis, R. Schiro, G. Heller, G. F. Murphy, C. Liu, O. Alpdogan, and M. R. M. van den Brink. Absence of inducible costimulator on alloreactive t cells reduces graft versus host disease and induces th2 deviation. *Blood*, 106(9):3285–92, Nov 2005.
- [46] C. Iclozan, Y. Yu, C. Liu, Y. Liang, T. Yi, C. Anasetti, and X.-Z. Yu. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(2):170–8, Feb 2010.
- [47] K. Kalwak, D. Turkiewicz, M. Ussowicz, E. Gorczyńska, J. Toporski, R. Ryczan, B. Rybka, D. Noworolska-Sauren, and A. Chybicka. Clinical value of the flow

- cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: spontaneous activation of t-cell subpopulations is associated with acute gvhd. *Transplant Proc*, 35(4):1559–62, Jun 2003.
- [48] R. C. Kamm and A. G. Smith. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem*, 18(6):519–522, Jun 1972.
- [49] L. W. Kappel, G. L. Goldberg, C. G. King, D. Y. Suh, O. M. Smith, C. Ligh, A. M. Holland, J. Grubin, N. M. Mark, C. Liu, Y. Iwakura, G. Heller, and M. R. M. van den Brink. Il-17 contributes to cd4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*, 113(4):945–52, Jan 2009.
- [50] C. L. Kitko, S. Paczesny, G. Yanik, T. Braun, D. Jones, J. Whitfield, S. W. Choi, R. J. Hutchinson, J. L. M. Ferrara, and J. E. Levine. Plasma elevations of tumor necrosis factor-receptor-1 at day 7 postalloeneic transplant correlate with graft-versus-host disease severity and overall survival in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(7):759–65, Jul 2008.
- [51] W. Kong, J.-J. Zhao, L. He, and J. Q. Cheng. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol*, 218(1):22–5, Jan 2009.
- [52] E. M. Kroh, R. K. Parkin, P. S. Mitchell, and M. Tewari. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-pcr (qrt-pcr). *Methods*, 50(4):298–301, Apr 2010.
- [53] S. G. Kwatra, T. S. Dabade, C. J. Gustafson, and S. R. Feldman. Jak inhibitors in psoriasis: a promising new treatment modality. *J Drugs Dermatol*, 11(8):913–8, Aug 2012.
- [54] C. H. Lawrie, S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boulton, J. S. Wainscoat, C. S. R. Hatton, and A. L. Harris. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large b-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141(5):672–675, May 2008.
- [55] R. S. Leidner, L. Li, and C. L. Thompson. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One*, 8(3):e57841, 2013.

- [56] J. Li, P. Smyth, R. Flavin, S. Cahill, K. Denning, S. Aherne, S. M. Guenther, J. J. O’Leary, and O. Sheils. Comparison of mirna expression patterns using total rna extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (ffpe) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol*, 7:36, 2007.
- [57] Q. Li, Z. Zhai, X. Xu, Y. Shen, A. Zhang, Z. Sun, H. Liu, L. Geng, and Y. Wang. Decrease of cd4(+)cd25(+) regulatory t cells and tgf-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res*, 34(9):1158–68, Sep 2010.
- [58] Q. Lin, D. Meloni, Y. Pan, M. Xia, J. Rodgers, S. Shepard, M. Li, L. Galya, B. Metcalf, T.-Y. Yue, et al. Enantioselective synthesis of janus kinase inhibitor incb018424 via an organocatalytic aza-michael reaction. *Organic letters*, 11(9):1999–2002, 2009.
- [59] D. Liu, C. Yan, L. Xu, Y. Wang, W. Han, X. Zhang, K. Liu, and X. Huang. Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe acute graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(11):1567–75, Nov 2010.
- [60] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, 435(7043):834–838, 2005.
- [61] C. L. Mackall and R. E. Gress. Pathways of t-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev*, 157:61–72, Jun 1997.
- [62] S. B. McMahon and J. G. Monroe. The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response. *Journal of leukocyte biology*, 60(2):159–166, 1996.
- [63] M. Merad, P. Hoffmann, E. Ranheim, S. Slaymaker, M. G. Manz, S. A. Lira, I. Charo, D. N. Cook, I. L. Weissman, S. Strober, and E. G. Engleman. Depletion of host langerhans cells before transplantation of donor alloreactive t cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med*, 10(5):510–7, May 2004.

- [64] P. Mestdagh, P. Van Vlierberghe, A. De Weer, D. Muth, F. Westermann, F. Speleman, and J. Vandesompele. A novel and universal method for microRNA rt-qPCR data normalization. *Genome Biol*, 10(6):R64, 2009.
- [65] D. M. Meyer, M. I. Jesson, X. Li, M. M. Elrick, C. L. Funckes-Shippy, J. D. Warner, C. J. Gross, M. E. Dowty, S. K. Ramaiah, J. L. Hirsch, et al. Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the jak1/jak3 inhibitor, cp-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis. *Journal of Inflammation*, 7(1):41, 2010.
- [66] S. U. Meyer, M. W. Pfaffl, and S. E. Ulbrich. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett*, 32(12):1777–88, Dec 2010.
- [67] P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30):10513–10518, Jul 2008.
- [68] Y. Miura, C. J. Thoburn, E. C. Bright, M. L. Phelps, T. Shin, E. C. Matsui, W. H. Matsui, S. Arai, E. J. Fuchs, G. B. Vogelsang, R. J. Jones, and A. D. Hess. Association of foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*, 104(7):2187–93, Oct 2004.
- [69] E. K. O. Ng, W. W. S. Chong, H. Jin, E. K. Y. Lam, V. Y. Shin, J. Yu, T. C. W. Poon, S. S. M. Ng, and J. J. Y. Sung. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58(10):1375–81, Oct 2009.
- [70] B. Nikolic, S. Lee, R. T. Bronson, M. J. Grusby, and M. Sykes. Th1 and th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest*, 105(9):1289–98, May 2000.
- [71] A. F. Olena and J. G. Patton. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, 222(3):540–545, Mar 2010.

- [72] S. Paczesny, D. Hanauer, Y. Sun, and P. Reddy. New perspectives on the biology of acute gvhd. *Bone Marrow Transplant*, 45(1):1–11, Jan 2010.
- [73] S. Paczesny, O. I. Krijanovski, T. M. Braun, S. W. Choi, S. G. Clouthier, R. Kuick, D. E. Misek, K. R. Cooke, C. L. Kitko, A. Weyand, D. Bickley, D. Jones, J. Whitfield, P. Reddy, J. E. Levine, S. M. Hanash, and J. L. M. Ferrara. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*, 113(2):273–8, Jan 2009.
- [74] H.-B. Park, K. Oh, N. Garmaa, M. W. Seo, O.-J. Byoun, H.-Y. Lee, and D.-S. Lee. Cp-690550, a janus kinase inhibitor, suppresses cd4+ t-cell-mediated acute graft-versus-host disease by inhibiting the interferon-gamma pathway. *Transplantation*, 90(8):825–835, 2010.
- [75] M. Paz Morante, J. Briones, E. Canto, H. Sabzevari, R. Martino, J. Sierra, J. L. Rodriguez-Sanchez, and S. Vidal. Activation-associated phenotype of cd3 t cells in acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*, 145(1):36–43, Jul 2006.
- [76] K. S. Peggs and S. Mackinnon. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 124(4):407–20, Feb 2004.
- [77] A. Quintás-Cardama, K. Vaddi, P. Liu, T. Manshouri, J. Li, P. A. Scherle, E. Caulder, X. Wen, Y. Li, P. Waeltz, M. Rupal, T. Burn, Y. Lo, J. Kelley, M. Covington, S. Shepard, J. D. Rodgers, P. Haley, H. Kantarjian, J. S. Fridman, and S. Verstovsek. Preclinical characterization of the selective jak1/2 inhibitor incb018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 115(15):3109–17, Apr 2010.
- [78] P. Ratajczak, A. Janin, R. Peffault de Latour, C. Leboeuf, A. Desveaux, K. Keyvanfar, M. Robin, E. Clave, C. Douay, A. Quinquenel, C. Pichereau, P. Bertheau, J. Y. Mary, and G. Socié. Th17/treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood*, 116(7):1165–71, Aug 2010.
- [79] P. Reddy, R. Negrin, and G. R. Hill. Mouse models of bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(1 Suppl 1):129–35, Jan 2008.

- [80] G. Reid, M. B. Kirschner, and N. van Zandwijk. Circulating micrnas: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*, 80(2):193–208, Nov 2011.
- [81] M. Remberger, M. Jaksch, M. Uzunel, and J. Mattsson. Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*, 70(6):384–91, Jun 2003.
- [82] K. E. Resnick, H. Alder, J. P. Hagan, D. L. Richardson, C. M. Croce, and D. E. Cohn. The detection of differentially expressed micrnas from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time pcr platform. *Gynecol Oncol*, 112(1):55–59, Jan 2009.
- [83] A. D. Shilling, F. M. Nedza, T. Emm, S. Diamond, E. McKeever, N. Punwani, W. Williams, A. Arvanitis, L. G. Galya, M. Li, S. Shepard, J. Rodgers, T.-Y. Yue, and S. Yeleswaram. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [14c]incb018424, a selective janus tyrosine kinase 1/2 inhibitor, in humans. *Drug Metab Dispos*, 38(11):2023–31, Nov 2010.
- [84] A. Shimabukuro-Vornhagen, M. J. Hallek, R. F. Storb, and M. S. von Bergwelt-Baildon. The role of b cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*, 114(24):4919–4927, Dec 2009.
- [85] J. Skog, T. WÃ\_rdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky, and X. O. Breakefield. Glioblastoma microvesicles transport rna and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10(12):1470–1476, Dec 2008.
- [86] G. Socié and B. R. Blazar. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*, 114(20):4327–4336, Nov 2009.
- [87] M. Stanzani, S. L. R. Martins, R. M. Saliba, L. S. St John, S. Bryan, D. Couriel, J. McMannis, R. E. Champlin, J. J. Molldrem, and K. V. Komanduri. Cd25 expression on donor cd4+ or cd8+ t cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after hla-identical stem cell transplantation in humans. *Blood*, 103(3):1140–6, Feb 2004.

- [88] S. Takashima, M. Kadowaki, K. Aoyama, M. Koyama, T. Oshima, K. Tomizuka, K. Akashi, and T. Teshima. The wnt agonist r-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*, 208(2):285–94, Feb 2011.
- [89] D. D. Taylor and C. Gercel-Taylor. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110(1):13–21, Jul 2008.
- [90] E. D. Thomas, H. L. Lochte, J. H. Cannon, O. D. Sahler, and J. W. Ferrebee. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*, 38:1709–1716, Oct 1959.
- [91] N. B. Y. Tsui, E. K. O. Ng, and Y. M. D. Lo. Stability of endogenous and added rna in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*, 48(10):1647–1653, Oct 2002.
- [92] J. O. Valenzuela, C. Iclozan, M. S. Hossain, M. Prlic, E. Hopewell, C. C. Bronk, J. Wang, E. Celis, R. W. Engelman, B. R. Blazar, et al. *Pkcθ* is required for alloreactivity and gvhd but not for immune responses toward leukemia and infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(12):3774, 2009.
- [93] J. Vandesompele, K. D. Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. V. Roy, A. D. Paeppe, and F. Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7):RESEARCH0034, Jun 2002.
- [94] D. Vasilatou, S. Papageorgiou, V. Pappa, E. Papageorgiou, and J. Dervenoulas. The role of micrnas in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol*, 84(1):1–16, Jan 2010.
- [95] S. Verstovsek. Therapeutic potential of jak2 inhibitors. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pages 636–42, 2009.
- [96] D. Weisdorf, R. Haake, B. Blazar, W. Miller, P. McGlave, N. Ramsay, J. Kersey, and A. Filipovich. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*, 75(4):1024–30, Feb 1990.

- [97] E. Willems, S. Humblet-Baron, O. Dengis, L. Seidel, Y. Beguin, and F. Baron. Elevations of tumor necrosis factor receptor 1 at day 7 and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 45(9):1442–8, Sep 2010.
- [98] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3):228–234, Mar 2009.
- [99] T.-S. Wong, X.-B. Liu, B. Y.-H. Wong, R. W.-M. Ng, A. P.-W. Yuen, and W. I. Wei. Mature mir-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res*, 14(9):2588–2592, May 2008.
- [100] B. Xiao, Y. Wang, W. Li, M. Baker, J. Guo, K. Corbet, E. L. Tsalik, Q.-J. Li, S. M. Palmer, C. W. Woods, Z. Li, N. J. Chao, and Y.-W. He. Plasma microRNA signature as a noninvasive biomarker for acute graft-versus-host disease. *Blood*, 122(19):3365–75, Nov 2013.
- [101] T. Yi, Y. Chen, L. Wang, G. Du, D. Huang, D. Zhao, H. Johnston, J. Young, I. Todorov, D. T. Umetsu, L. Chen, Y. Iwakura, F. Kandeel, S. Forman, and D. Zeng. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of th1, th2, and th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*, 114(14):3101–12, Oct 2009.
- [102] W. Yu, Z. Lin, J. P. Hegarty, X. Chen, A. A. Kelly, Y. Wang, L. S. Poritz, and W. A. Koltun. Genes differentially regulated by nkx2-3 in b cells between ulcerative colitis and crohn’s disease patients and possible involvement of egr1. *Inflammation*, 35(3):889–99, Jun 2012.