



Dottorato di ricerca

Terapia pediatrica e farmacologia dello sviluppo

XXVIII Ciclo

ASSOCIAZIONE TRA I POLIMORFISMI DEI GENI NOD2/CARD15, TLR-4, IL23R E G_vHD , INFEZIONI E MORTALITA' PRECOCE NEL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE NELLA POPOLAZIONE PEDIATRICA SARDA TALASSEMICA. AMPLIAMENTO DEL PROGETTO CON LO STUDIO MOLECOLARE DI ALTRI GENI CANDIDATI.

Med/38

Coordinatore Dottorato Prof. Paolo Moi **Dottoranda:** Dott.ssa Maria Bonaria Piludu

Tutor/Relatore Dott.ssa Maria Grazia Orofino - Prof. Paolo Moi

Esame Finale Anno Accademico 2014-2015

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in

Terapia pediatrica e farmacologia dello sviluppo

dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali

Maria Bonaria Piludu gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.

INDICE

Introduzione	Pag. 4
GvHD	7
• Patogenesi	9
• Considerazioni immunogenetiche	12
Obiettivi e finalità del nostro studio	15
• Popolazioni di studio	16
• Materiali e metodi	18
• Analisi dei dati	19
• Risultati ottenuti	21
Discussione	22
Conclusioni e prospettive future	24
Bibliografia	25

INTRODUZIONE

Il trapianto allogenico di cellule progenitrici ematopoietiche HPC (Hematopoietic Progenitor Cells) rappresenta oggi una terapia potenzialmente curativa per molte patologie ematopoietiche maligne e non. A tutt'oggi per diverse malattie ematopoietiche il donatore migliore per il trapianto di HPC è un fratello HLA genotipicamente identico (25% dei casi).

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HCPT) è una procedura terapeutica innovativa in continua evoluzione soprattutto per i soggetti affetti da Beta Talassemia Major. Attualmente rappresenta l'unica terapia in grado di rendere questi pazienti definitivamente indipendenti dal regime trasfusionale cosa che non è possibile attualmente né con le terapie convenzionali, né con la terapia genica ancora sperimentale.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche consiste, appunto, nell'infusione di cellule progenitrici ematopoietiche (HPC) prelevate da un donatore sano, HLA genotipicamente o fenotipicamente istocompatibile. Lo scopo è sostituire e ripopolare il sistema emolinfopoietico del ricevente, precedentemente distrutto attraverso un regime di chemioterapia definito di condizionamento mieloablativo.

Dal punto di vista clinico, l'esito del trapianto dipende da diversi fattori, il primo in ordine di importanza è il livello di istocompatibilità maggiore (HLA), seguono poi, l'età del donatore e del ricevente, il tipo della malattia, le condizioni cliniche del paziente all'epoca del trapianto, la compatibilità di gruppo sanguigno (ABO) e lo stato sierologico del citomegalovirus (CMV) tra donatore / ricevente (D/R).

La procedura trapiantologica è inficiata da diversi fattori di rischio come: il rigetto del graft, la malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD- graft versus host disease), acuta e cronica, le infezioni batteriche, fungine e virali, la tossicità d'organo (soprattutto polmonite interstiziale e veno-occlusive disease [VOD] epatica).

Negli ultimi anni le ricerche cliniche hanno reso più sicura la procedura trapiantologica e ridotto il rischio di complicanze ad esso correlate con lo sviluppo di regimi di condizionamento mirati ad personam, con lo scopo di eradicare le emopatie maligne e non, ottenere l'attecchimento, riducendo la TMR(treatment related mortality) da tossicità.

Sono inoltre migliorate le misure di prevenzione delle infezioni opportunistiche, spesso responsabili della morte del paziente.

La più importante complicanza che impatta sulla sopravvivenza e sulla comorbidità post-trapianto di HPC rimane comunque la malattia del trapianto contro l'ospite GvHD (acuta e cronica), che può interessare il 25-30% dei pazienti trapiantati da donatore correlato, familiare, HLA identico, ed il 50-70% dei trapiantati da donatore volontario fenotipicamente identico (MUD).

Per le emoglobinopatie le guide internazionali impongono la scelta di un donatore MUD con compatibilità HLA con il ricevente molto stringente attuata con tecniche di biologia molecolare ad alta risoluzione. Una condizione di GvHD acuta di I°-II° grado può rivelarsi piuttosto utile nelle emopatie maligne in quanto consente l'eradicazione di cloni di cellule maligne residue dopo il condizionamento (GvL - graft versus leukemia). La GvL attualmente si è osservato avere un impatto importante nella leucemie mieloidi acute (LMA).

L'abilità nel predire la comparsa della GvHD e la sua severità potrebbe esser utile al clinico per creare una terapia su misura, su base individuale, per migliorare l'esito del trapianto riducendo l'incidenza della GvHD acuta e cronica, migliorando la qualità della vita del paziente e non ultimo riducendo i costi della sanità.

Se una GvHD di stadio I° e II° si può rivelare utile nei pazienti affetti da patologie maligne, non lo è altrettanto nei pazienti affetti da talassemia major dove può diventare una delle principali cause di fallimento del trapianto di HPC. A motivo di ciò è estremamente importante avere parametri clinici e di laboratorio che ci permettano di predire il rischio di comparsa di GvHD e la sua severità.

I biomarkers attualmente in uso per predire e monitorare la GvHD acuta e cronica includono il geni HLA e non. Tra i markers non HLA correlati vengono considerati i polimorfismi dei geni codificanti le citochine sieriche, le cellule T (CD4+ CD8+, Natural killer, cellule T regolatorie FOXP3+CD4+CD25+) e le cellule dendritiche (DC). I recenti studi di proteomica per identificare nuovi biomarkers rappresentano interessanti evoluzioni nello studio della GvHD.

Il biomarker biologico o genomico è per definizione un indicatore oggettivamente misurabile, con test di laboratorio, che serve a valutare un processo biologico normale o patologico. I biomarkers attualmente utilizzati servono appunto a predire il rischio di sviluppo della GvHD,

misurarne l'attività, distinguere tra danni reversibili e d irreversibili, predire la risposta al trattamento così da stabilire la prognosi clinica per uno specifico paziente.

GvHD

La GvHD è la manifestazione clinica di un attacco immunologico dei linfociti T maturi CD4+ e CD8 + contenuti nel graft, contro i tessuti sani (cute, fegato, intestino, polmoni) del ricevente con una espansione clonale di T linfociti citotossici alloreattivi (TCLs) innescando una vera propria tempesta citochinica infiammatoria di tipo Th1 (IL2, INF γ , TNF α ,IL6) a cui contribuiscono le APCs (Antigen-Presenting Cell) del ricevente e le cellule dell'immunità innata del donatore e del ricevente¹⁻².

Nei trapianti allogenici da donatore familiare ha un'incidenza del 25-30%, e del 50-70 % nel donatore volontario non familiare (MUD).

La GvHD inizialmente descritta da Barnes Loutit e Micklem è stata classificata poi da Billingham come una sindrome in cui le cellule immunocompetenti del donatore allogenico riconoscono e attaccano i tessuti immunocompromessi del ricevente³⁻⁴.

Dal punto di vista clinico e patogenetico la GvHD si distingue in una forma acuta(aGvHD), che compare entro i primi 100 giorni dal trapianto ed in una cronica (cGvHD) dopo i 100 giorni. La GvHD acuta e cronica, si sviluppano attraverso due distinti meccanismi patogenetici in particolare nella forma acuta prevale la componente infiammatoria, mentre nella cronica prevalgono le caratteristiche di autoimmunità e di fibrosi⁵.

Lo sviluppo e la severità della GvHD nel ricevente dipende da diversi fattori: età, tipo di condizionamento (nella talassemia sempre mieloablativo) , sorgente delle cellule staminali (midollari, periferiche o cordonali), tipo di trapianto (donatore correlato, non familiare, aploidentico) e dal tipo di profilassi per la stessa GvHD.

Gli steroidi rappresentano la prima linea di trattamento ma esiste una quota di pazienti (40%), non responder ed in tali casi, anche instaurando una terapia immunosoppressiva con anticorpi monoclonali o con terapie cellulari (MSC- cellule staminali mesenchimali), la mortalità a lungo termine si attesta intorno all'80-90%⁵.

La GvHD cronica, originariamente definita come GvHD che insorge dopo 100 giorni dal trapianto, ha caratteristiche cliniche di presentazione che la rendono molto simile alle patologie autoimmuni vascolari e la distinguono nettamente dalla forma acuta. Compare nel 12-20% dei riceventi talassemici sottoposti a trapianto di HPC allogeniche e nella forma

estesa, ha un impatto sulla qualità di vita del paziente estremamente grave. La mortalità a 5 anni, nella forma estesa con interessamento degli organi viscerali (cute, polmone, fegato, apparato digerente), si attesta intorno al 50%, ed è principalmente dovuta alle conseguenze della disregolazione immunitaria e delle infezioni opportunistiche⁵.

Attualmente questa distinzione temporale tra acuta e cronica non è più così netta e si preferisce parlare di GvHD persistente, ricorrente o di "Overlap Syndrome" quando su un quadro clinicamente silente ("spento") di GvHD si sviluppano delle vere e proprie riacutizzazioni di sintomi e segni clinici tipici della forma acuta⁶.

Nella fase pre-trapianto, il regime di condizionamento, l'eventuale insorgenza di infezioni determinano un danno tissutale con conseguente rilascio di citochine (IL1, TNF β , IL6) con effetto pro infiammatorio e di attivazione sulle APCs (Antigen-Presenting Cell). Queste ultime vengono attivate anche a livello intestinale dal danno della parete e dalla conseguente traslocazione di componenti antigeniche batteriche (Lipopolisaccaride- LPS).

Le citochine sono in grado di determinare un danno tissutale a livello delle cellule epiteliali ed endoteliali ed indurre l'espressione degli antigeni del complesso maggiore (HLA) e minore (mHAg) di istocompatibilità. Il riconoscimento di differenze antigeniche risulta peraltro facilitato dall'aumentata espressione di queste molecole da parte dei tessuti del ricevente⁷⁻¹⁰.

PATOGENESI

La patogenesi della GvHD a può essere schematizzata in tre fasi distinte¹¹ (figura 1).

Nella prima fase, il danneggiamento dei tessuti del paziente causato dalla terapia di condizionamento (chemioterapia e/o radioterapia) scatena il cosiddetto “cytokine storm” con il rilascio di citochine infiammatorie come il TNF α e l’IL1. Inoltre, vengono danneggiate le vie di trasmissione dei secondi messaggeri come l’ATP, e l’ADP, come pure le proteine della matrice extracellulare e biglicani che promuovono l’attivazione e la maturazione delle cellule presentanti l’antigene (APCs)¹². Sono soprattutto i danni indotti sull’epitelio gastrointestinale a consentire la traslocazione dei lipopolisaccaride (LPS) dei batteri della flora microbica intestinale, e la conseguente attivazione dell’immunità innata attraverso i Toll-like receptors. I Toll-like receptor a loro volta determinano e favoriscono l’attivazione della cascata delle citochine¹³. I polimorfismi nei geni delle citochine hanno dimostrato influenzare il grado di severità della GvHD¹⁴. Le APCs del ricevente sono preposte alla digestione delle grosse molecole proteiche danneggiate dalla chemioterapia. I peptidi così ottenuti sono esposti sulla superficie delle APCs legati alle molecole HLA di classe I o II e divengono il target allogenico dei linfociti T del donatore. I TCR (T cell receptor) dei linfociti T CD4 + e CD8+ del graft riconoscono gli antigeni di istocompatibilità sia maggiori che minori presenti appunto sulle APCs dell’ospite¹⁵⁻¹⁶.

Nella seconda fase questo riconoscimento determinerà l’attivazione e l’espansione clonale degli stessi linfociti T ed una vera e propria tempesta citochinica in cui prevalgono soprattutto le citochine Th1 (TNF α , IL1, IL23 e IL 6), il cui livello sierologico è codificato da geni, non HLA correlati, caratterizzati da polimorfismi individuali. Pertanto a seconda del polimorfismo genetico posseduto, un individuo potrà essere geneticamente definito come alto o basso produttore di citochine, condizionandone così il loro livello sierico. Tali polimorfismi, geneticamente determinati, caratterizzano l’individuo e variano a seconda del ceppo etnico considerato¹⁴.

Nella terza ed ultima fase si realizza il danneggiamento degli organi target (cute, fegato e tratto gastroenterico e polmoni). La cascata infiammatoria, secondaria all'attivazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ del donatore, le citochine infiammatorie, le chemochine e le molecole di adesione, sono responsabili del danneggiamento degli organi target e dell'induzione di apoptosi delle cellule epiteliali¹⁷.

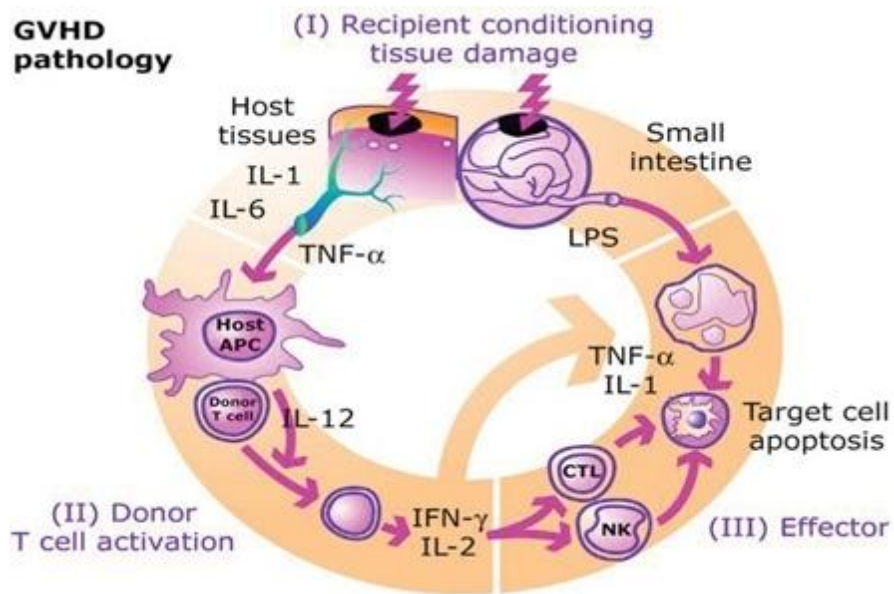


Figura 1. Patogenesi della GvHD¹⁸

Sebbene nella patogenesi della aGvHD il ruolo determinante sia giocato dai linfociti T, è di recente riscontro che anche i linfociti B possano avere un ruolo nella presentazione dell'antigene, nella produzione di citochine e di anticorpi¹⁹.

Esiste una correlazione tra insorgenza di aGvHD e numero delle cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ contenute nel graft che non devono essere $> 5 \times 10^6/\text{kg}^{20}$.

In particolare un'analisi retrospettiva suggerisce una stretta correlazione tra la quota di linfociti B infusi nel graft e la possibilità di predire l'incidenza e l'evoluzione della cGvHD, questo ha consentito di attuare una profilassi durante il regime di condizionamento con un anticorpo monoclonale anti CD20 (Rituximab)²¹⁻²².

Tra le componenti cellulari linfocitarie i T regolatori (CD4+ CD25+ FoxP3 +), noti come Tregs,

avrebbero, invece, un ruolo inibitorio contribuendo così a determinare tolleranza ed anergia verso il graft tramite la produzione di citochine di tipo Th2 (IL10, TGF β). Questo aprirebbe nuovi fronti di ricerca e di studio nella prevenzione e nella terapia della GvHD²³⁻²⁴.

La aGvHD si presenta clinicamente in 4 distinti gradi in ordine di severità dal I° al IV° , interessando uno o più dei seguenti organi: cute , fegato, intestino, polmoni ²⁵⁻²⁷. Una delle classificazioni della stadiazione della aGvHD, è quella di Glucksberg ²⁸(Tabella 1).

Tabella 1: Classificazione secondo Glucksberg

aGvHD staging and grading based on modified criteria			
<i>Stage</i>	<i>Cutaneous rash</i>	<i>Hepatic (bilirubin)</i>	<i>Gut (diarrhea/nausea)</i>
1	<25% BSA	34-50 mmol/L	>500 mL or nausea
2	25-50% BSA	51-102 mmol/L	>1000 mL
3	Generalised erythroderma	103-255 mmol/L	>1500mL
4	Generalised erythroderma with bullae and desquamation	> 255 mmol/L	Pain/Ileus
<i>Functional grading</i>	<i>Cutaneous</i>	<i>Hepatic</i>	<i>Gut</i>
I	Stage 1 and 2	0	0
II	Stage 3 or	Stage 1 or	Stage 1
III and IV	Stage 4 or	Stages 2-4 or	Stages 2-4

Per la stadiazione clinica della cGvHD si usano i criteri dell' NIH consensus (National Institute of Health)²⁹.

CONSIDERAZIONI IMMUNOGENETICHE

Vari fattori sia genetici che clinici sono alla base della GvHD, quello più importante è il grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente^{30.-34}, infatti il matched allelico degli antigeni HLA tra donatore familiare e ricevente, riduce il rischio di GvHD migliorando l'outcome dopo trapianto di HPC allogenico³⁵⁻³⁶.

In aggiunta agli antigeni di istocompatibilità maggiore, esistono polimorfismi di geni non HLA correlati (geni kir, geni che codificano citochine, antigeni minori di istocompatibilità) differenti tra donatore e ricevente, che possono contribuire a montare una risposta alloreattiva dei TCLs (cloni di linfociti T citotossici) inducendo l'infiammazione ed il danno tessutale nella GvHD³⁷. Per alcune di queste differenze è stata accertata la correlazione non solo con la severità³⁸⁻³⁹ ma anche con la durata della GvHD⁴⁰⁻⁴⁵.

Gli studi internazionali di Holler et al., su popolazioni del nord Europa hanno permesso di dimostrare un'associazione positiva tra i polimorfismi dei geni NOD2/CARD15, e IL23R e l'esito del trapianto di HPC in modo particolare con aGvHD, TRM, e infezioni nel post-trapianto⁴⁶⁻⁴⁷.

È stato descritto inoltre il polimorfismo rs 4986790, situato nel gene che codifica per il Toll-like receptor 4 (TLR4), che sembra possa influenzare il rischio di severa GvHD nei pazienti sottoposti a trapianto di HPC⁴⁸.

Tre SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) del gene NOD2/CARD15, sono stati associati ad un aumentato rischio di severa GvHD intestinale ed aumentata mortalità trapiantologica precoce (TRM)⁴⁶⁻⁴⁷. Questi sono localizzati nell'esone 4 (rs2066844 -SNP8), nell' 8 (rs2066845 - SNP12) e nell'11 (rs2066847- SNP13)⁴⁹⁻⁵⁰.

Di questi lo SNP 13 (rs2066847) è stato associato ad un aumentato rischio di sepsi, mentre lo SNP8(rs2066844) ad aumentato rischio di riattivazioni virali (Citomegalovirus, Herpes , HHV6)⁵¹. Tali associazioni riportate in letteratura non sono state osservate nella nostra popolazione di pazienti trapiantati per il numero esiguo di pazienti che hanno presentato complicanze infettive gravi.

E' conosciuto da tempo il ruolo degli SNP 8 12 e 13 e dell'IL23 nel determinare un aumentato del rischio di comparsa della Malattia di Crohn nella popolazione di differenti etnie⁵⁰⁻⁵².

Dati contrastanti sono stati riportati per polimorfismo rs 11209026 (1142 G> A), situato nel gene che codifica per il recettore dell'interleuchina 23 (IL23-R), che secondo certi autori avrebbe invece un ruolo protettivo nell'insorgenza della aGvHD ⁵³.

Il gene IL23R, è associato, come il NOD2/CARD15, all'aumentata suscettibilità delle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) in quanto avrebbe un ruolo nella differenziazione delle cellule T naive in cellule T helper 17, che sono implicate nei meccanismi di infiammazione organo- specifica. L'IL23R è espresso nei linfociti T e nelle cellule NK (natural killer). A seguito del legame tra recettore e specifica IL23 indotto dalla stimolazione di antigeni batterici, si ha l'attivazione delle CD (cellule dendritiche) e dei macrofagi con proliferazione delle cellule infiammatorie e liberazione di interleuchine Th1. Questa funzione spiegherebbe il ruolo di questo recettore nella patogenesi della GvHD.

I geni NOD2/CARD15 e TLR-4 appartengono al sistema dell'immunità innata che ha lo scopo di sorvegliare e svelare precocemente la presenza di infezioni da parte di patogeni, attraverso un sistema sofisticato di recettori e secondi messaggeri. Questo complesso sistema rappresenta così la prima linea della difesa della mucosa gastrointestinale (GI).

Quando questa linea di difesa viene alterata dal regime di condizionamento/radioterapia, viene resa permeabile alle componenti batteriche costituenti la normale flora microbica intestinale con conseguente attivazione del sistema recettoriale atto a riconoscere le componenti estranee ed attivare la risposta immunitaria nei loro confronti.

Studi recenti della letteratura hanno dimostrato l'importanza della decontaminazione intestinale e dell'uso orale di probiotici che possano competere nella traslocazione dei LPS batterici (lipopolisaccaridi) nella fase pre-trapianto allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare GvHD intestinale ⁵⁴⁻⁵⁵

L'espressione del gene NOD2/CARD15 è limitata alle cellule dell'epitelio intestinale, ai monociti ed alle linee cellulari macrofagiche. La proteina NOD2, in particolare, è coinvolta nel riconoscimento intracellulare del muramil dipeptide (MDP) derivato dal peptidoglicano batterico. Si ipotizza che il MDP penetri all'interno della cellula mediante un meccanismo sconosciuto e poi legghi e attivi NOD2. Questa proteina ha un duplice ruolo nella risposta ai patogeni: essa infatti permette l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB che, tramite la

secrezione di chemochine, attiva la risposta immunitaria, e, contemporaneamente, stimola la secrezione di peptidi antimicrobici, tra cui le α -defensine⁵⁰.

Le funzioni che le proteine NOD2 svolgono nel citoplasma sono analoghe e complementari a quelle svolte dai TLR sulla superficie cellulare.

I recettori Toll like costituiscono un sofisticato sistema di recettori transmembrana, in grado di fornire un'efficace attività di difesa nei confronti di un'ampia varietà di patogeni (batteri, virus, protozoi) e sostanze estranee. In particolare il TLR4 è responsabile del riconoscimento dell'endotossina batterica.

Sono state identificate almeno 10 forme di recettori Toll like, che sono espressi sulle cellule mielomonocitiche, sulle cellule epiteliali, endoteliali e sulle cellule di vari organi.

Dati contrastanti sono stati descritti da Nguyen Y et al. che hanno dimostrato su una coorte di 390 coppie D/R la mancanza di una correlazione tra gli SNPs (8, 12, 13) del gene NOD2/CARD15, implicati nella genesi delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI), e la comparsa di complicanze post-trapianto⁵⁶

OBIETTIVI E FINALITA' DEL NOSTRO STUDIO

Nel nostro Centro Trapianti Pediatrico dell'Ospedale Microcitemico A. Cao, abbiamo verificato l'impatto tra i polimorfismi del gene NOD2/CARD15 (rs2066842 - SNP5, rs2066844 - SNP8, rs2066845 -SNP12, rs2066847- SNP13), IL23R (rs 11209026 ed rs 11465804b) e TLR 4 (rs4986790 ed rs 4986791) e la comparsa della GvHD nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di HPC.

L'originalità del nostro lavoro consiste nel verificare l'associazione di SNPs, notoriamente coinvolti nella patogenesi delle Malattie Infiammatorie Croniche intestinali con lo sviluppo della GvHD intestinale con cui potrebbe condividere gli stessi meccanismi immunopatogenetici.

In particolare la nostra attenzione si è focalizzata su uno SNP il 5 (Pro268Ser; rs 2066842) la cui associazione con le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI) e con la GvHD non è stata ancora verificata nella letteratura recente.

È stata invece accertato che lo SNP 5 (rs 2066842) produce una mutazione missenso (Pro268 Se) che è associata, in letteratura, con un'uveite cronica ⁵⁷, con Morbo di Parkinson nella popolazione cinese⁵⁸ così da suggerire un possibile ruolo nella modulazione della infiammazione.

Popolazioni di studio

La nostra popolazione oggetto di studio è composta da 86 pazienti sardi sottoposti a trapianto allogenico di HPC e dai rispettivi donatori. Le coppie riceventi/donatori (D/R) sono state suddivise in due gruppi:

1) Riceventi del primo gruppo hanno manifestato GvHD acuta dopo trapianto allogenico di HPC, (gruppo aGvHD+)

2) Riceventi del secondo gruppo senza aGvHD (aGvHD -)

La popolazione dei riceventi e dei donatori è stata confrontata con una popolazione random di controllo composta da 150 individui sardi sani.

Degli 86 pazienti che sono stati sottoposti a trapianto di HPC, 67 (78%) erano affetti da beta talassemia major ed avevano un donatore correlato HLA identico. In tutto retrospettivamente abbiamo esaminato 86 trapianti (86 pazienti ed i loro rispettivi donatori). Di questi 86 pazienti 37 (43%) ha presentato una GvHD severa con grado \geq al II°; di questi pazienti 13 (35%), hanno avuto la forma gastrointestinale e 4 sono deceduti per refrattarietà al trattamento con diversi immunosoppressori (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti e dei donatori..

<i>Age (range) years</i>	
Patients (range)	1-45
Donors	5-40
<i>Sex (Females/Males)</i>	
Patients	43/43
Donors	33/53
<i>HLA recipient/donor/pair</i>	
HLA-matched siblings	67 (78%)
Matched Unrelated Donor	19 (22%)
<i>Diagnosis</i>	
Thalassemia	67 (78%)
Acute lymphocytic leukemia	2
Acute myeloid leukemia	11 (12.7%)
Severe aplastic anemia	3
Lymphomas	1
Histiocytosis	2
<i>Severe GvHD II-IV*</i>	36 (42%)
<i>GvHD prophylaxis</i>	
CsA and MTX	50 (58%)
CsA and MTX and ATG	36 (42%)
<i>Graft source</i>	
PBSC	7 (8%)
BM	79 (92%)

CsA: Cyclosporine; MTX: Methotrexate; ATG: Serum anti-T- lymphocyte;

PBSC: Peripheral Blood Stem Cells; BM: Bone Marrow

Materiali e Metodi

Per ciascun individuo delle popolazioni in esame è stato estratto il DNA genomico a partire da campioni di sangue periferico mediante kit Qiagen (QIAamp® DNA blood mini kit).

Ogni DNA è stato quindi genotipizzato per gli 8 polimorfismi in esame.

Per gli SNPs 5 (Pro268Ser; rs2066842), 8 (Arg702Trp; rs2066844) e 12 (Gly908Arg; rs2066845) del gene NOD2/CARD15, e per i polimorfismi rs11209026 (Arg381Gln) e rs11465804 del gene IL23R, le analisi dei genotipi sono state effettuate mediante RT-PCR e Discriminazione Allelica con TaqMan® SNP Genotyping Assay.

Per lo SNP 13 (rs2066847) del gene NOD2, e gli SNP del gene che codifica per il TLR4, rs4986790 (Asp299Gly) e rs4986791 (Thr399Ile), sono stati utilizzate tecniche di amplificazione genica con sequenze primers specifiche a cui fa seguito l'uso di restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Analisi dei dati

Le frequenze genotipiche per ogni polimorfismo sono state espresse come percentuali sul totale degli individui di ogni coorte studiata (86 riceventi, 86 donatori e 150 controlli sani della popolazione generale sarda). Le differenze di distribuzione delle frequenze genotipiche tra il gruppo GvHD⁺ e GvHD⁻ sono state valutate sia per i riceventi che per i donatori. A tal fine sono stati elaborati modelli di regressione logistica considerando, oltre ad ogni singolo SNP, anche il sesso donatore/ricevente (D/R) come covariata. Inoltre, quando lo SNP considerato è risultato significativamente associato all'evento GvHD tramite il modello di regressione logistica, è stato riportato il corrispondente test allelico.

Le percentuali genotipiche per le diverse coorti e i risultati delle elaborazioni statistiche sono mostrati in tabella 3

Tabella 3

SNP	Genotype	Patients				Donors			
		Total	no GvHD	GvHD	p-value	Total	no GvHD	GvHD	p-value
rs2066842 (NOD2) zSNP5 / Pro268Ser	CC	37%	24%	56%	0.014 (allelic test: p=0.002)	34%	28%	44%	0.92
	CT	32%	32%	31%		37%	44%	25%	
	TT	31%	44%	13%		29%	28%	31%	
rs2066844 (NOD2) SNP8 / Arg702Trp	CC	98%	95%	100%	0.999	97%	98%	97%	0.707
	CT	2%	5%	0%		3%	2%	3%	
	TT	0%	0,0%	0%		0%	0%	0%	
rs2066845 (NOD2) SNP12 / Gly908Arg	GG	98%	96%	100%	0.999	95%	96%	94%	0.702
	GT	2%	4%	0%		5%	4%	6%	
	TT	0%	0%	0%		0%	0%	0%	
rs2066847 (NOD2) SNP13 / Leu1007fsinsC	- -	98%	98%	97%	0.972	99%	100%	97%	0.999
	- C	2%	2%	3%		1%	0%	3%	
	CC	0%	0%	0%		0%	0%	0%	
rs11209026 (IL23R)	GG	88%	88%	88%	0.884	90%	92%	88%	0.755
	AG	12%	12%	12%		10%	8%	12%	
	AA	0%	0%	0%		0%	0%	0%	
rs11465804 (IL23R)	TT	85%	83%	88%	0.884	90%	92%	88%	0.755
	GT	15%	17%	12%		10%	8%	12%	
	GG	0%	0%	0%		0%	0%	0%	
rs4986790 (TRL4) Asp299Gly	AA	86%	88%	82%	0.662	83%	80%	88%	0.405
	AG	14%	12%	18%		14%	16%	12%	
	GG	0%	0%	0%		3%	4%	0%	
rs4986791 (TRL4) Thr399Ile	CC	83%	84%	82%	0.646	81%	76%	88%	0.268
	CT	17%	16%	18%		17%	20%	12%	
	TT	0%	0%	0%		2%	4%	0%	

Risultati ottenuti

L'unico SNP sufficientemente polimorfico da mostrare significative differenze di distribuzione dei genotipi fra il gruppo con GvHD+ e il gruppo GvHD - è lo SNP 5 (rs2066842) del gene NOD2/CARD15. Gli altri markers erano troppo rari nella popolazione sarda per essere statisticamente significativi. Un lieve aumento dell'allele mutato si può osservare per i due SNPs rs4986790 (Asp299Gly) e rs4986791 (Thr399Ile) del gene TRL4 nei donatori della coorte senza GvHD, tuttavia tale differenza non è risultata essere significativa (rispettivamente $p=0.405$ e $p=0.268$). Invece l'rs2066842(SNP5), presenta una netta differenza di distribuzione delle frequenze genotipiche nella coorte dei riceventi ($p=0.014$ tramite modello di regressione logistica corretto per sesso e $p=0.002$ tramite test allelico). Si nota, infatti, nei pazienti che non hanno presentato GvHD, rispetto a quelli che l'hanno presentata, un notevole incremento dell'allele mutato versus il wild type. Tale differenza non è stata riscontrata invece nella coorte dei donatori.

DISCUSSIONE

In base ai dati statistici e genetici riportati sui polimorfismi dei geni TRL4, NOD2/CARD15 e IL23R esaminati e al loro impatto sulla aGvHD, possiamo concludere quanto segue:

1. Il polimorfismo rs2066842; (SNP5) del gene NOD2/CARD15 ha un impatto statisticamente significativo ($p=0.002$) come fattore protettivo nel gruppo di pazienti che non hanno presentato aGvHD severa. Infatti il gruppo con aGvHD presenta maggiormente l'allele WT (wild type) e non quello mutato.
2. La discrepanza che si osserva tra la frequenza dell'allele mutato nei donatori (29,3%) versus popolazione di controllo (16%) è legata probabilmente al fatto che, nel gruppo dei donatori, 19 individui (il 22%) erano non familiari e di etnia diversa dalla popolazione sarda perché provenienti dai Registri Donatori Internazionali (IBM-DR).

Pertanto, dal punto di vista clinico, per lo score immunologico donatore/ricevente (D/R) pre-trapianto il nostro centro adotterà anche l'esame genetico dei polimorfismi del gene NOD2/CARD15 come routine, tenendo conto del polimorfismo rs2066842; (SNP5) come fattore protettivo e modulando in maniera meno immunosoppressiva la profilassi della GvHD prima dell'infusione delle HPC.

In Sardegna è emersa la peculiarità dello SNP 5 del gene NOD2/CARD15 nello studio della coorte dei riceventi e dei donatori. In letteratura questo SNP non risulta essere stato studiato in altre popolazioni europee quanto gli SNP 8, 12 e 13 del medesimo gene. Questi ultimi invece ricorrono con una maggiore frequenza allelica in altre popolazioni di pazienti sottoposti a trapianto, rispetto a quella sarda.

Questo dato sull'effetto protettivo del polimorfismo Pro 268Ser (rs2066842; SNP5) si sommerà prima del trapianto, alle informazioni immunologiche della coppia Donatore/Ricevente, definite, dalla compatibilità HLA, dalla genetica delle citochine, dagli aplotipi dei geni Kir e dagli antigeni minori di istocompatibilità, per attuare uno score immunologico che possa prevedere il rischio relativo (RR) della aGvHD, della mortalità trapiantologica, delle infezioni e della tossicità del regime di condizionamento chemioterapico.

Il nostro obiettivo specifico, in base al rischio immunologico pre-trapianto, è modulare:

1. il regime di condizionamento chemioterapico, utilizzando farmaci più immunosoppressivi e meno mieloablativi;
2. la profilassi e la terapia immunosoppressiva della GvHD acuta;
3. la profilassi antimicrobica con ciprofloxacina e metronidazolo per ottenere una più efficace decontaminazione intestinale così da ridurre il rischio di infezioni intestinali che possano attivare la GvHD.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il nostro progetto consiste nell' identificare nuovi determinanti genetici del sistema HLA e non che abbiano impatto sulla GvHD e sulle maggiori complicanze del trapianto come le infezioni e la mortalità precoce, in pazienti sottoposti a trapianto di HPC sia da donatore correlato che da donatore volontario non familiare.

Poter identificare nuove varianti genetiche con lo studio di altri TLR (TLRs9) o dell'intero gene NOD2/CARD15, ci permetterebbe di creare uno "score-risk", ancora più completo. In questo caso potremmo sommare la conoscenza di nuovi polimorfismi genici alle altre già testate nel nostro laboratorio come: sistema HLA, citochine, geni Kir , antigeni minori di istocompatibilità e non ultimo il polimorfismo SNP 5, per identificare in maniera ancora più precisa il rischio di complicanze nel post trapianto.

Un estensione dello studio dello SNP 5 del gene NOD2/CARD15 potrebbe essere effettuata sulla popolazione pediatrica sarda affetta da malattia di Crohn per meglio chiarire se questo polimorfismo ha un impatto su tale popolazione.

Bibliografia

- 1.)Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone marrow transplantation*. 1995;15:825-828.
- 2.)Martin PJ, Gooley T, Anasetti C, Petersdorf EW, Hansen JA. HLAs and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 1998;4:128-133.
- 3)Barnes D, Loutit JF et al : Secondary disease of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann. NY Acad Sci*. 1962, 99,374-385
- 4) BillinghamR : The biology of graft-versus –host-reaction. *Harvey Lect* 1966. .62, 21-78
- (5) Blazar B, Murphy W, Abedi M. Advances in graft- versus- host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology* 2012; Vol 12 443-458
- 6)Sung AD Nelson J Chao Concise Review : Acute Graft-Versus- Host Disease: Immunology, Prevention, and Treatment. Stem cells. *Translational medicine* 2013; 2:25-35
- 7)Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease:rationale for the use of cytochine shield in allogenic bone marrow transplantation. *Blood*.2000;95(9):2754 – 2759
- 8)Nestel FP, Price KS, Seemayer TA LAppWS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-trigger release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus host-disease. *J Exp Med*.1992;175 (2) :405-413
- 9) Ferrara LL, Reddy P. Pathophysiology of graft- versus- host-disease. *Semin Hematol*.2006;43 (1) 3-10
- 10) Sociè G, Blazar BR Acute graft- versus-host- disease: from the bench to the bedside. *Blood*.2009 Vol 114,number 20
- 11)Welniak LA, Blazar BR, Murphy W Immunobiology of allogenic Hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:139-170
- 12) Zeiser R, Penack O, Holler E et al. Danger signals activating innate immunity in graft-versus- host- disease. *J Mol Med* 2011;89:833-845
- 13)Hill GR Crawford JM, Cooke KR et al. Total body irradiation and acute graft versus host disease; The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90:3204 -3213.
- 14) Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V et al Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004; 127:479- 490.

- 15) Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen presenting cells. *Science* 199 ; 285:412 - 415
- 16) Matte CC, Liu J, Cormier J et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVK.. *NAT Med* 2004; 10:987-992
- 17) Braun MY, Lowin B, French L et al. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft – versus – host – disease. *J Exp Med* 1996; 183:675-661.
- 18) Ferrara JL, Levi R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanism of acute graft-vs-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 199;5:347-356.
- 19) Rowe V, Banovic T, MacDonald KP et al. Host B cells produce IL10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2006;108:2485-2492
- 20) Gaziev J, Isgrò A, Marziali M, Daniele N et al. Higher CD34+ cell doses in the graft increase the incidence of acute GVHD in children receiving BMT for Thalassemia. *Bone marrow transplantation.* 2012 ;47, 107-114
- 21) Santopoulou S, Stevenson KE, Kim HT et al. Altered B cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft – versus – host disease. *Blood* 2009; 113:3865 – 3874.
- 22) Kouri IF, Mc Laughlin P, Saliba RM et al. Eight-year experience with allogeneic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* 2008;111:5530-5536
- 23) Hess AD. Reconstitution of self-tolerance after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res* 2010;47:143-152
- 24) Beres AJ, Haribhai D, Chadwich AC et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *J Immunol* 2012; 189:464-474.
- 25) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, et al. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *International journal of hematology.* 2011;93:532-541.
- 26) Komanduri KV, Couriel D, Champlin RE. Graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: evolving concepts and novel therapies including photopheresis. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2006;12:1-6.
- 27) Antin JH, Chen AR, Couriel DR, Ho VT, Nash RA, Weisdorf D. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2004;10:655-668.

- 28) Glucksberg H, Storb R , Fefer A, et al. Clinical manifestation of graft – versus – host disease in human recipients of marrow from HLA- matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18:295-304.
- 29) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-956.
- 30) Orofino M, Badiali M, Sanna M A, et al No significant correlation between mismatched minor histocompatibility HA1 antigen and the development of acute GvHD after HLA identical sibling bone marrow transplantation in Sardinia patients. *Bone marrow transplantation* 2003 suppl 1 :31.
- 31) Orofino M, Badiali M, Sanna M A et al. Mismatched minor histocompatibility HA1 antigen and the development of acute GvHD after HLA identical sibling bone marrow transplantation in Sardinia patients. *Blood* .2003 :102 :478 a
- 32) Orofino M, Contu D, Argiolu F, et al. No influence of chromosome Y haplogroup variation in acute graft-versus-host disease in Sardinia. *Transplantation*. 2006;82(11):1529-1532.
- 33) Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M, et al. Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction. *Blood*. 2006;107(7):2984-2992.
- 34.) Orofino M, Congia M, Sanna MA, et al. The Impact of cytokine genetic polymorphisms in acute graft versus host disease in HLA matched sibling bone marrow transplants in the Sardinian population. *Bone Marrow Transplantation*. 2009;43.
- 35) Beatty P, Clift R, Mickelson E, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med*. 1985;313:765–771.
- 36) Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Current opinion in hematology*. 2004;11:386-391
- 37) Takami A. The role of non-HLA gene polymorphisms in graft-versus-host disease. *International journal of hematology*. 2013;98:309-318.
- 38) Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1997;64:553-558.
- 39)** Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-
Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1997;64:553-558.
- 40)** Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood*. 1998;92:3943-3948.
- 41) Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2010;45:1-11.

- 42) Espinoza J, Takami A, Onizuka M, et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GvHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone Marrow Transplantation*. 2011;46(11):1455–1463.
- 43) Espinoza J, Takami A, Nakata K, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2011;6(10).
- 44) Ting C, Alterovitz G, Merlob A, Abdi R. Genomic studies of GVHD-lessons learned thus far. *Bone marrow transplantation*. 2013;48:4-9.
- 45) Hansen JA, Chien JW, Warren EH, Zhao LP, Martin PJ. Defining genetic risk for graft-versus-host disease and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Current opinion in hematology*. 2010;17:483-492.
- 46) Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006;107:4189-4193.
- 47) Holler E, Rogler G, Herfarth H, et al. Both donor and Recipient NOD2/CARD15 mutation associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplant. *Blood*. 2004;10:889-894.
- 48) Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, et al. Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*. 26;81:247-254.
- 49) Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO Journal* 2004; vol 23,7: 1587-1597
- 50) Mayor NP, Shaw BE, Madrigal AJ et al. NOD2 Polymorphism and their impact on Haematopoietic Stem Cell Transplant outcome. *Bone Marrow Research*. 2012. Vol 2012 Article ID 180391
- 51) Jaskula E, Lange A, Kyrz-Krzemien S, et al. NOD2/CARD15 Single Nucleotide Polymorphism 13 (3020insC) is Associated with Risk of Sepsis and Single Nucleotide Polymorphism 8 (2104C>T) with Herpes Viruses Reactivation in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(3):409-414.
- 52) Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, et al. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16:1753-1758.
- 53) Elmaagacli AH, Koldehoff M, Landt O, Beelen DW. Relation of an interleukin-23 receptor gene polymorphism to graft-versus-host disease after hematopoietic-cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2008;41:821-826.

- 54) Gerbitz A, Schultz M, Wilke A et al. Probiotic effect on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood*. 2004;103 (11): 4365-4367.
- 55) Penack O., Holler E. Graft versus host disease : regulation by microbe – associated molecule and innate immune receptors. *Blood*, -2010 Volume 115 , number 10
- 56) Nguyen Y, Lehibi A, Gorbe E et al. Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease- associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation.. *Blood Journal* 2010. Vol 115, number 17
- 57) Marrani E, Cimaz R, Lucherini OM, et al. The common NOD2/CARD15 variant P268S in patients with non-infectious uveitis: a cohort study. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2015;13:38.
- 58) Ma Q, An X, Li Z, et al. P268S in NOD2 associates with susceptibility to Parkinson's disease in Chinese population. *Behav Brain Funct*. 2013;9:19.