



# Summer School AIBT 2015 Favignana, Trapani

## Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

Marco Andreani, Ph.D

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti - Fondazione IME

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

L'obiettivo del trapianto di CSE è di fornire al ricevente una popolazione di cellule staminali sane che si differenzino in cellule ematiche per rimpiazzare gli elementi cellulari deficitari e/o patologici dell'ospite

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Pre – Trapianto

- 1) Sorgente di CSE
- 2) Condizionamento
- 3) Tipologia di trapianto
- 4) Istocompatibilità
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Post – Trapianto:

- 1) Attecchimento delle CSE infuse
- 2) Ricostituzione Immunologica**
- 3) Infezioni
- 4) Rigetto
- 5) Malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD)
- 6) Effetto anti-tumorale (GVL: *Graft versus leukemia*)
- 7) Recidiva post-trapianto

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

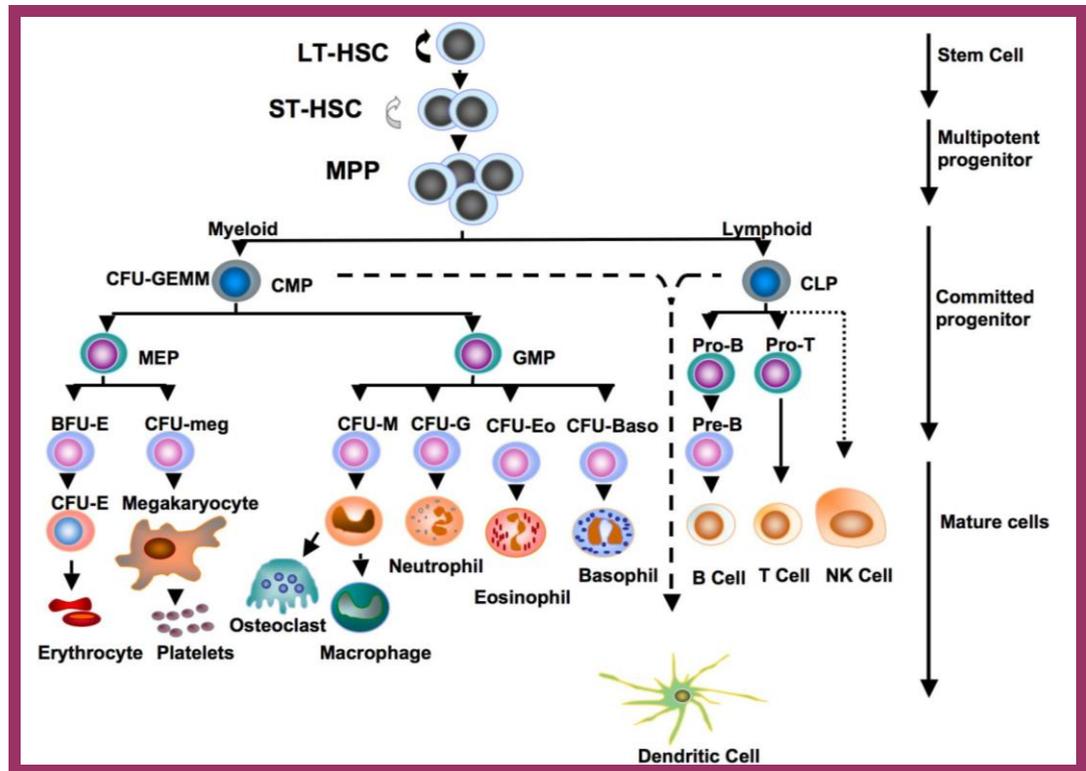
## Fase Pre – Trapianto

- 1) **Sorgente di CSE**
- 2) Condizionamento
- 3) Tipologia di trapianto
- 4) Istocompatibilità
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati

# CSE: Caratteristiche fenotipiche

Le CSE sono una popolazione morfologicamente ed immunologicamente eterogenea

- **Autoreplicazione illimitata**
- **Differenziamento** in tutti i componenti ematici sia di natura Mieloide che Linfoide



# CSE: Caratteristiche fenotipiche

---

IL **CD34** rappresenta il marcatore universalmente riconosciuto delle CSE

E' espressa sia sulle CSE che sui progenitori midollari precoci ed i suoi livelli di espressione diminuiscono proporzionalmente al differenziamento emopoietico

E' una molecola coinvolta nei processi di "homing" ed adesione cellulare caratterizzata da un pattern di espressione altamente conservato

# Fonti di CSE

---

**Le CSE sono isolabili da differenti fonti:**

**Midollo Osseo (BM):** CSE pari all' **1-3%** delle Cellule Mononucleate totali

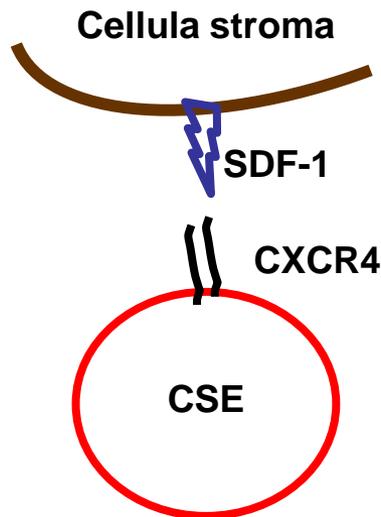
**Sangue venoso periferico (PB):** CSE pari allo **0,1-0,2%** delle Cellule Mononucleate totali

**Sangue di cordone ombelicale (UCB):** CSE pari allo **0,8-1,2%** delle Cellule Mononucleate totali

# CSE: mobilizzazione

---

Mobilizzazione delle CSE nel PB dovuto alla down-regolazione del fattore SDF-1 (stroma-derived factor 1 - fattore di derivazione stromale) presente sulla superficie delle cellule stromali midollari (CSM)



**SDF-1** (che lega il recettore **CXCR4**) media il processo di homing di HSCs e progenitori nel midollo dopo il trapianto

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Pre – Trapianto

- 1) Sorgente di CSE
- 2) Condizionamento**
- 3) Tipologia di trapianto
- 4) Istocompatibilità
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati

# Regime di Condizionamento

---

- Eradicare la **patologia**
- Favorire l' **homing** e l' **attecchimento** delle CSE
- Sopprimere l' attività del sistema immune del ricevente per evitare il **rigetto** e la **GVHD**

**Condizionamento Mieloablativo ad alte dosi**

**Condizionamento ad Intensità ridotta (RIC)**

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Pre – Trapianto

- 1) Sorgente di CSE
- 2) Condizionamento
- 3) Tipologia di trapianto**
- 4) Istocompatibilità
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

**Un fratello HLA identico è il miglior donatore di cellule staminali per il ridotto rischio di complicazioni immunologiche, come rigetto o GvHD**

**QUALE E' IL MIGLIOR DONATORE ALTERNATIVO ?**

mismatched related

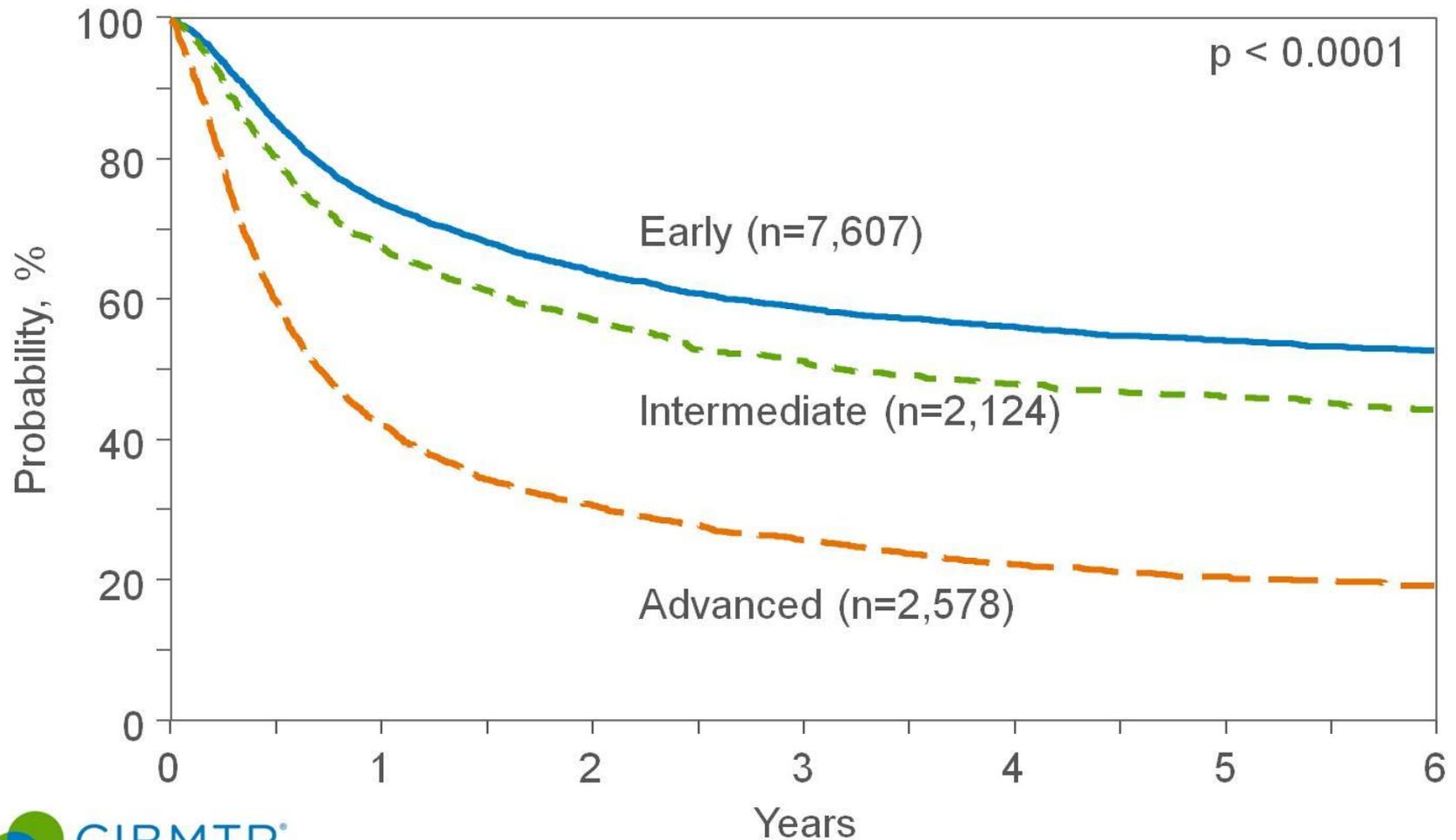
matched unrelated

mismatched unrelated

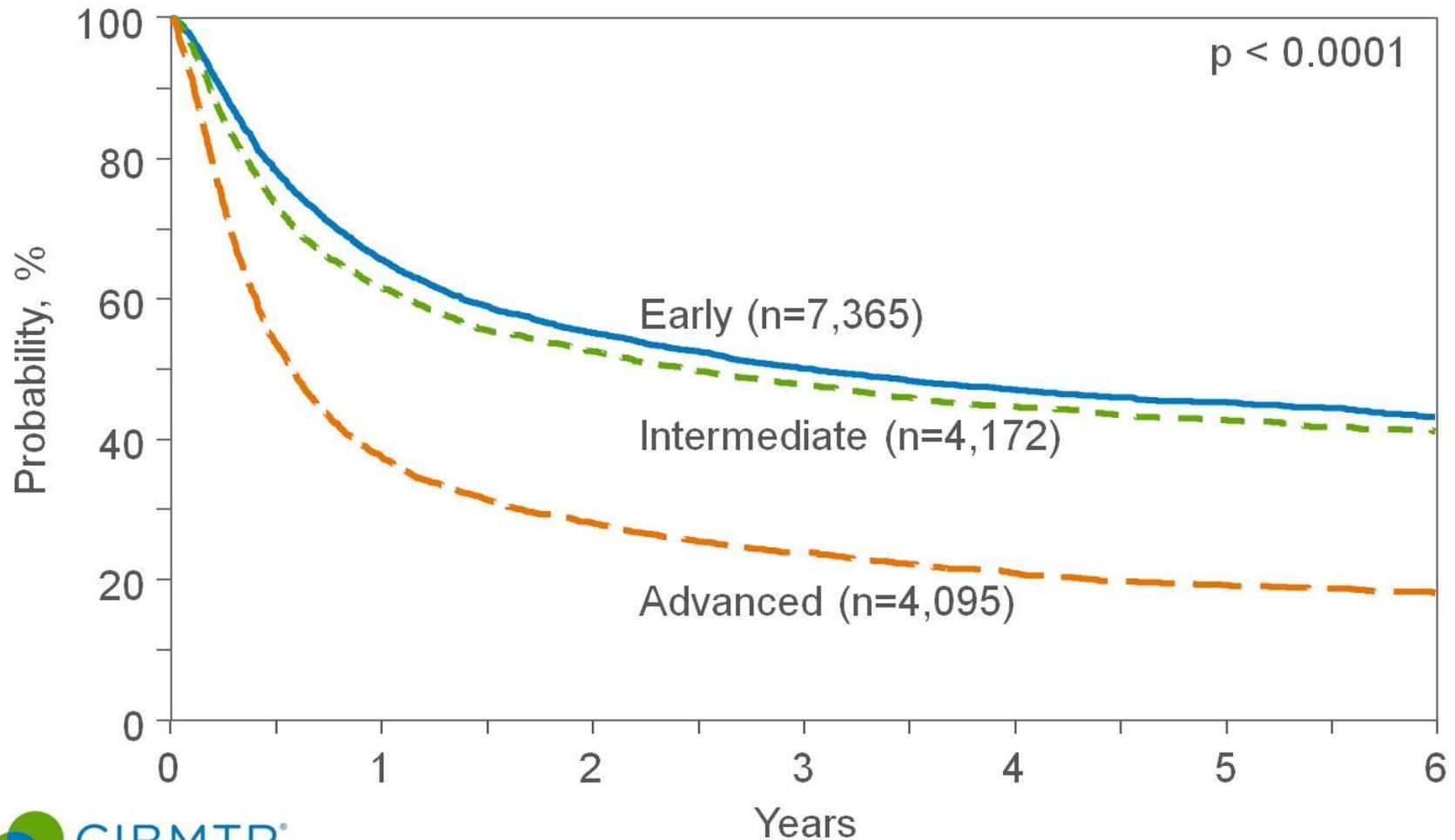
cord blood

haploidentical related

# Survival after HLA Match Sibling Donor Transplants for AML, 2002-2012



# Survival after Unrelated Donor Transplants for AML, 2002-2012

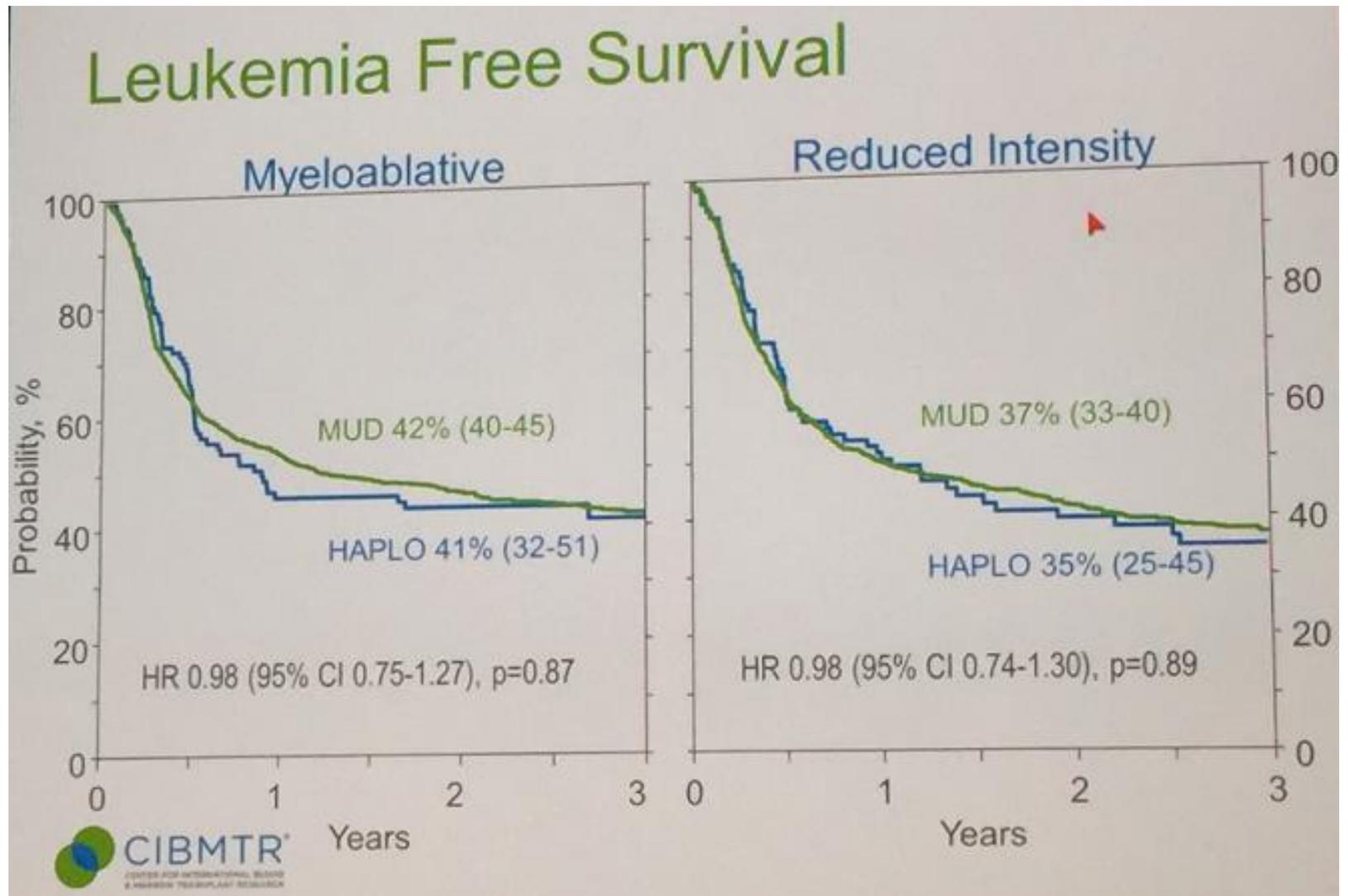


# Distribuzione trapianti aplo vs MUD

## Patients

- **Transplant period: 2008 – 2012**
- Age 21 – 70 years
- **Acute myeloid leukemia**
- Myeloablative conditioning regimens
  - 1245 Matched unrelated donor transplants
  - 104 Haplo-identical donor transplants
- Reduced intensity conditioning regimens
  - 737 Matched unrelated donor transplants
  - 88 Haplo-identical donor transplants

# Distribuzione trapianti aplo vs MUD



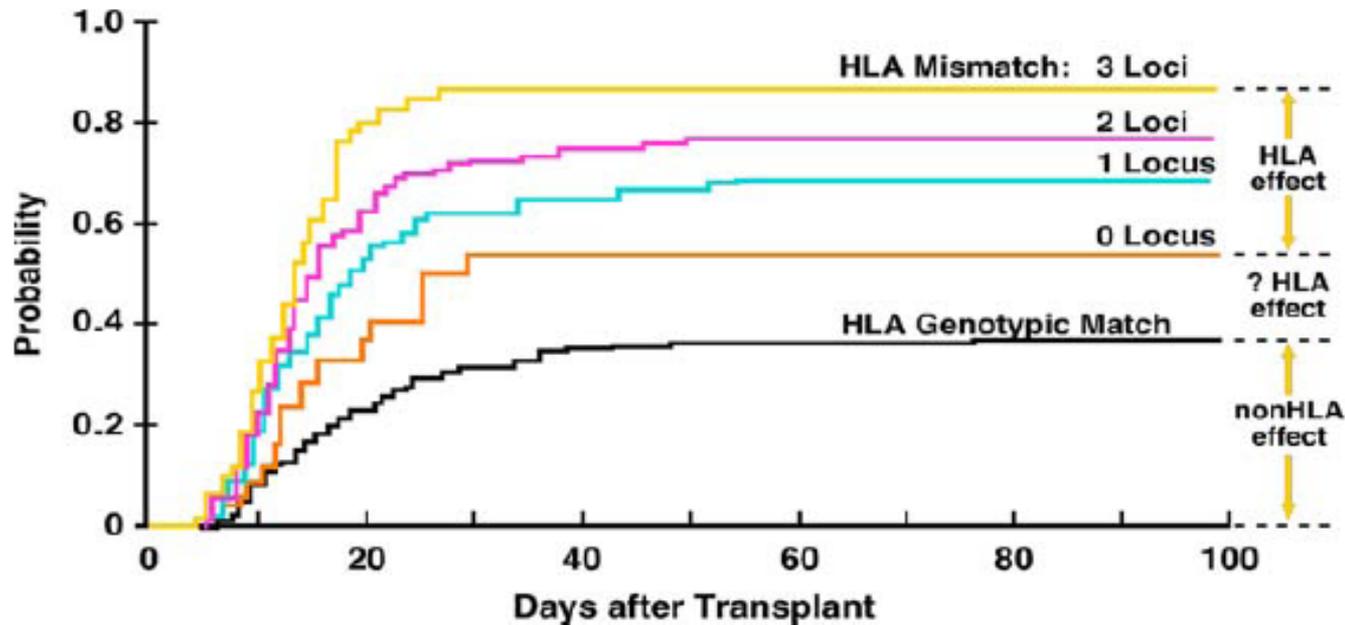
# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Pre – Trapianto

- 1) Sorgente di CSE
- 2) Condizionamento
- 3) Tipologia di trapianto
- 4) Istocompatibilità**
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati

# Differenze HLA tra donatore e ricevente sono un fattore di rischio per l'insorgenza della GvHD



# Rilevanza della compatibilità HLA

**Table 2** Effect of HLA mismatch (high- or low-resolution) on risk of death following transplantation. National Marrow Donor Program data<sup>a</sup>

Locus	Number	Relative risk (95% CI)	<i>P</i> -value
HLA-A	374	1.33 (1.15, 1.54)	0.0002
HLA-B	477	1.22 (1.06, 1.41)	0.007
HLA-C	749	1.21 (1.06, 1.38)	0.005
HLA-DRB1	311	1.23 (1.04, 1.45)	0.01
HLA-DQ	415	0.98 (0.84, 1.14)	0.80
HLA-DP	1648	1.07 (0.89, 1.27)	0.48

<sup>a</sup> Adapted from Flomenberg et al. [92]

Immunol Res (2008) 41:56–78, Genetics of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Role of HLA matching, functional variation in immune response genes. John A. Hansen Æ Effie W. Petersdorf Æ Ming-Tseh Lin Æ Steven Wang Æ Jason W. Chien Æ Barry Storer Æ Paul J. Martin

# **Rilevanza della compatibilità HLA**

---

**Combinazioni alleliche  
permissive**

# **Combinazioni alleliche permissive**

---

## **Impatto del DPB1 sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche**

# Combinazioni alleliche permissive

DPB1* alleles	TCE3 group	Immunogenicity
0901 1001 1701	1	
0301 1401 4501	2	
Altre	3	

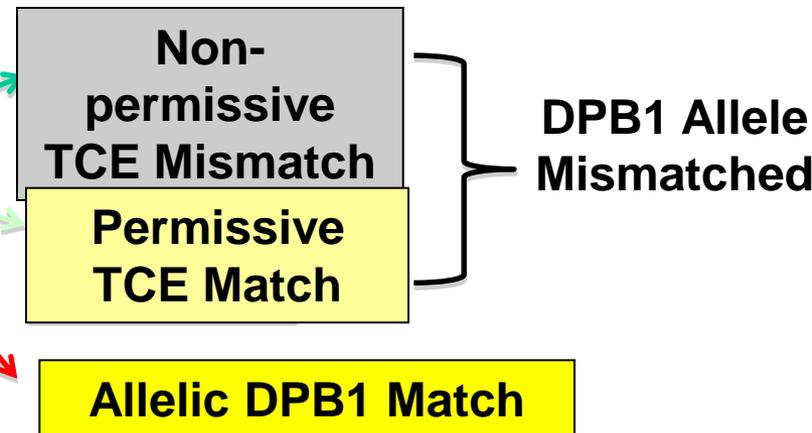
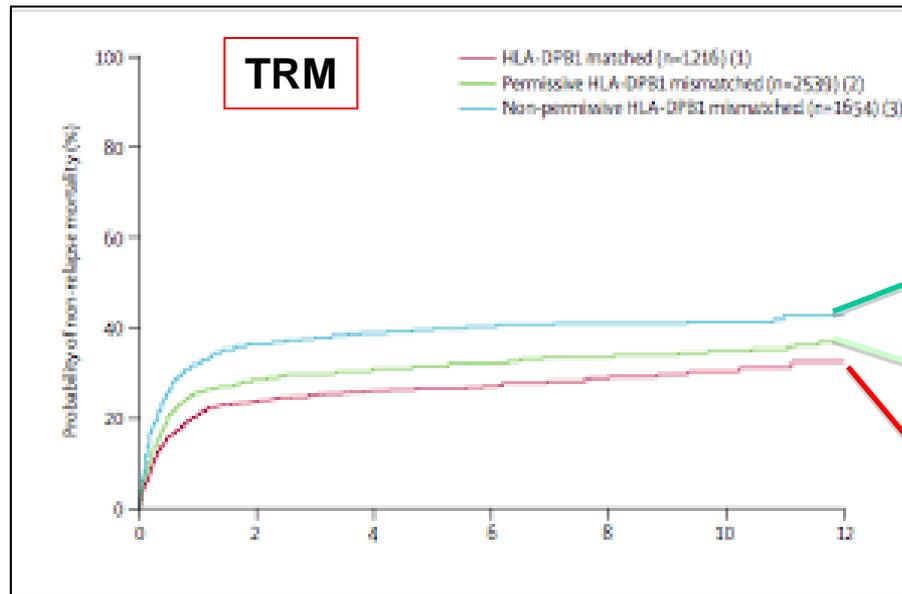
← TCE3 Grouping



		Recipient					
		1/1	1/2	1/3	2/2	2/3	3/3
D o n o r	1/1	permissive			non-permissive (HvG)		
	1/2						
	1/3						
	2/2	non-permissive (GvH)			permissive		permissive
	2/3						
	3/3						

# Analisi retrospettiva su 5428 UD-HSCT (10/10)

	HLA 10/10 match				
	Permissive HLA-DPB1 mismatch	HLA-DPB1 match		Non-permissive HLA-DPB1 mismatch	
		HR or OR	p value	HR or OR	p value
Overall mortality	1 (ref)	0.96 (0.87-1.06)	0.40	1.15 (1.05-1.25)	0.002
Non-relapse mortality	1 (ref)	0.86 (0.75-0.98)	0.03	1.28 (1.14-1.42)	<0.0001
Relapse*	1 (ref)	1.34 (1.17-1.54)	<0.0001	0.89 (0.77-1.02)	0.10
Grade 3-4 aGvHD	1 (ref)	0.84 (0.69-1.03)	0.09	1.31 (1.11-1.54)	0.001



# **Combinazioni alleliche permissive**

---

**Impatto di altri loci HLA  
sul trapianto di cellule staminali  
ematopoietiche**

# Combinazioni alleliche permissive

Table 1. Multivariable analysis of impact of mismatch pairs for sever aGVHD in HLA-A and -C

Mismatch combination, donor-patient	N	HR (95% CI)	P
A locus match	4510	1	NA
A0201-A0206	138	1.23 (0.87-1.73)	.223
A0206-A0201	131	1.78 (1.32-2.41)	< .001
A0201-A0207	28	0.83 (0.34-2.03)	.699
A0207-A0201	20	1.12 (0.42-3.02)	.809
A0201-A0210	11	1.57 (0.58-4.23)	.367
A0206-A0207	27	3.45 (2.09-5.70)	< .001
A0207-A0206	22	0.71 (0.23-2.24)	.571
A2402-A2420	60	0.64 (0.32-1.30)	.225
A2420-A2402	30	1.18 (0.56-2.49)	.66
A2601-A2602	24	0.64 (0.26-1.58)	.34
A2602-A2601	21	3.35 (1.89-5.91)	< .001
A2601-A2603	34	1.37 (0.73-2.57)	.326
A2603-A2601	35	2.17 (1.29-3.64)	.003
A2602-A2603	10	1.23 (0.30-4.98)	.763
A2603-A2602	12	1.50 (0.48-4.68)	.485
A other mismatch	97	1.47 (1.00-2.15)	.047

# Combinazioni alleliche permissive

---

## Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation

Mismatches in alleles C\*03:03/C\*03:04 were most frequent (68.7%) among the transplants with a single allele level mismatch in HLA-C

The 7/8 C\*03:03/C\*03:04 mismatch group was not significantly different from the 8/8 HLA matched transplants in any transplant outcome

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Pre – Trapianto

- 1) Sorgente di CSE
- 2) Condizionamento
- 3) Tipologia di trapianto
- 4) Istocompatibilità
- 5) Fattori genetici non-HLA correlati**

# Fattori genetici non-HLA correlati

---

**Geni codificanti Citochine:** TNF- $\alpha$  , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  , IL-1, TGF- $\beta$

**Geni codificanti** molecole coinvolte nella **risposta immunitaria Innata**

*A. M. Dickinson. Curr Opin Immunol 17, 2005*

---

**Polimorfismo in posizione -308 del gene promotore del TNFalfa**  
(Haplotype-linked TNF polymorphism)

*E.W. Petersdorf. Blood Rev: 27, 2012*

---

Attraverso la genome wide analysis sono stati identificati due geni, *BAT2* e *BAT3*, associati al rigetto dopo trapianto di CSE da donatore correlato HLA-identico nella beta-talassemia

*I. Piras, M. Testi, M Andreani et al. BMT:10, 2014*

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Post – Trapianto:

- 1) **Attecchimento delle CSE infuse**
- 2) Ricostituzione Immunologica
- 3) Infezioni
- 4) Rigetto
- 5) Malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD)
- 6) Effetto anti-tumorale (GVL: *Graft versus leukemia*)
- 7) Recidiva post-trapianto

# Attecchimento di CSE

---

**Processo attraverso il quale le CSE del donatore infuse nel PB del ricevente sono convertite in cellule residenti**

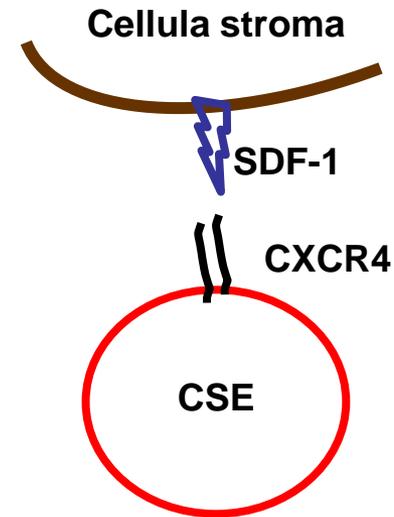
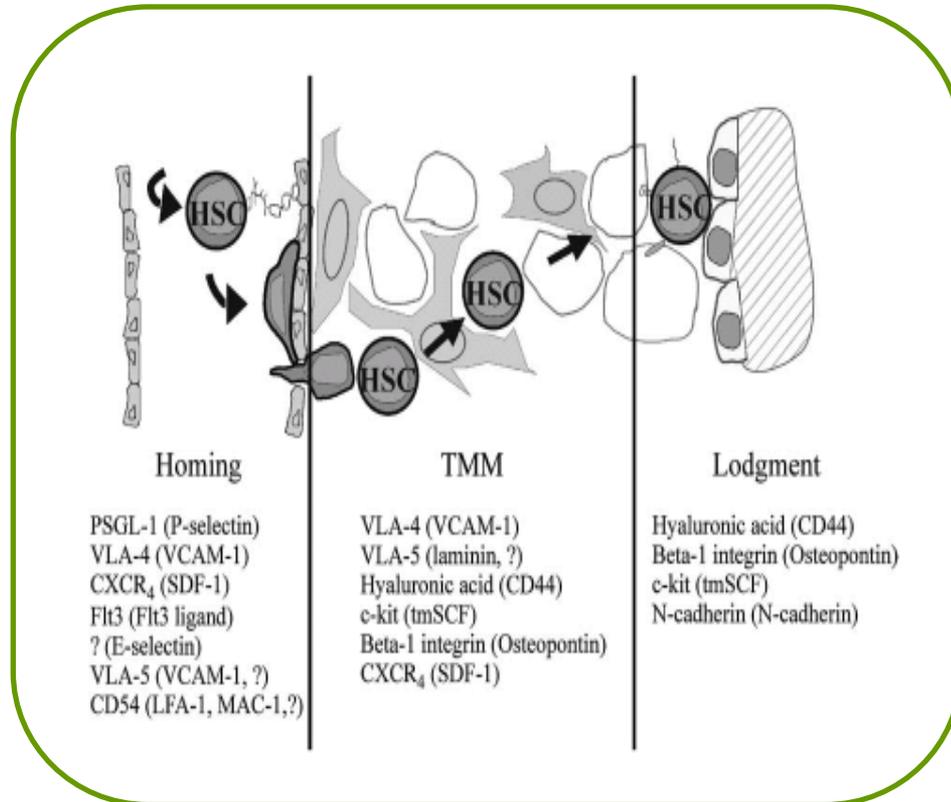
**Homing** - Reclutamento delle CSE

**Migrazione transendoteliale** - Migrazione transendoteliale delle CSE a livello dei cordoni emopoietici extravascolari del midollo

**Alloggiamento** - Migrazione delle CSE nel midollo verso le “nicchie”

# Attecchimento di CSE

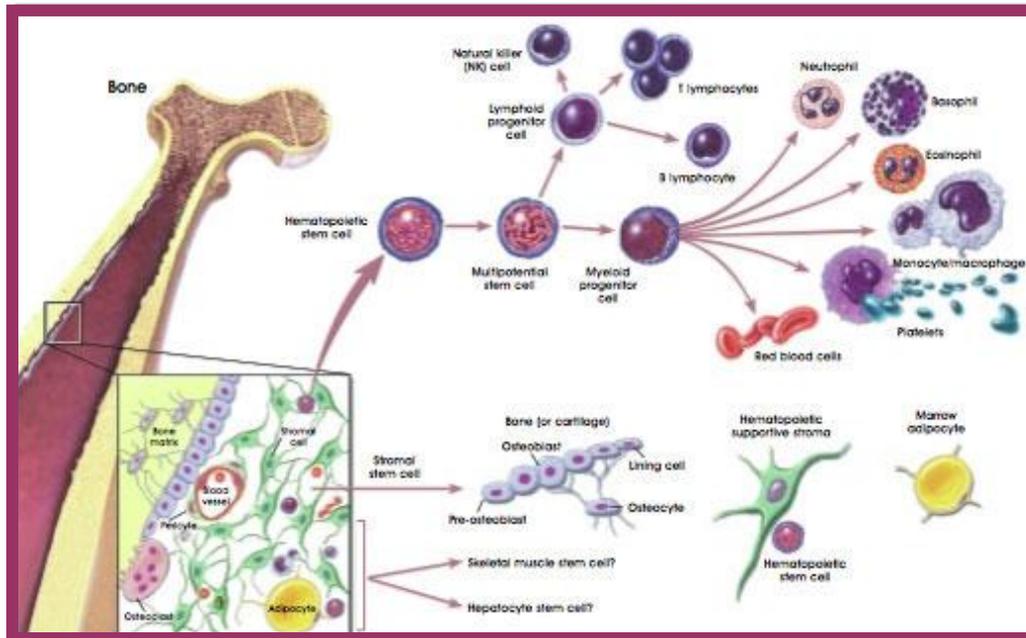
SDF-1 viene prodotto dallo stroma midollare per attrarre le CSE CXCR4+



*S.K. Nilsson. Exp Haematol 34, 2006*

# Attecchimento di CSE

Una volta nelle nicchie midollari, le CSE si sviluppano in stretto contatto con i componenti dello stroma midollare



**Monitoraggio  
attecchimento**

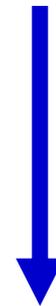
Regolazione, automantenimento e differenziamento CSE

# Attecchimento di CSE

---

**Marker comunemente usati per il monitoraggio dell'attecchimento nelle cellule nucleate**

- **HLA**
- **VNTR**
- **FISH analysis** (se sex mismatched)
- **STR** (2-5%)
- **Real Time PCR** (0.1 – 0.05%)



**Aumento  
della  
sensibilità**

# Aspetti immunologici del trapianto emopoietico

---

## Fase Post – Trapianto:

1) Attecchimento delle CSE infuse

**2) Ricostituzione Immunologica**

3) Infezioni

4) Rigetto

5) Malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD)

6) Effetto anti-tumorale (GVL: *Graft versus leukemia*)

7) Recidiva post-trapianto

# Ricostituzione Immunologica

---

**La ricostituzione immunologica è indispensabile per il successo del TCSE**

## **Influenzata da:**

- Patologia e e pregressa chemioterapia
- Sorgente di CSE e possibile mobilizzazione
- Tipologia di Trapianto e Condizionamento
- Identità HLA
- Profilassi anti-GVHD ed infezioni
- DLI

# Ricostituzione Immunologica

---

I componenti dell'Immunità Adattativa sono caratterizzati da cinetiche di ricostituzione immunologica più lente rispetto a quelle dell'Immunità Innata

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Innata

**PMN** - I livelli ematici dei Polimorfonucleati si normalizzano entro 1 mese dal TCSE e dipendono dal tipo di trapianto, dalla fonte di CSE, dall'età del paziente e dalla comparsa di GVHD. Il recupero numerico non correla con il recupero della funzionalità immunologica

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Innata

**Cellule NK** - I livelli ematici e la funzionalità delle cellule NK si normalizzano entro **1-2 mesi** dal TCSE indipendentemente dal tipo di trapianto, dalla fonte di CSE, dall'età del paziente o dalla GvHD

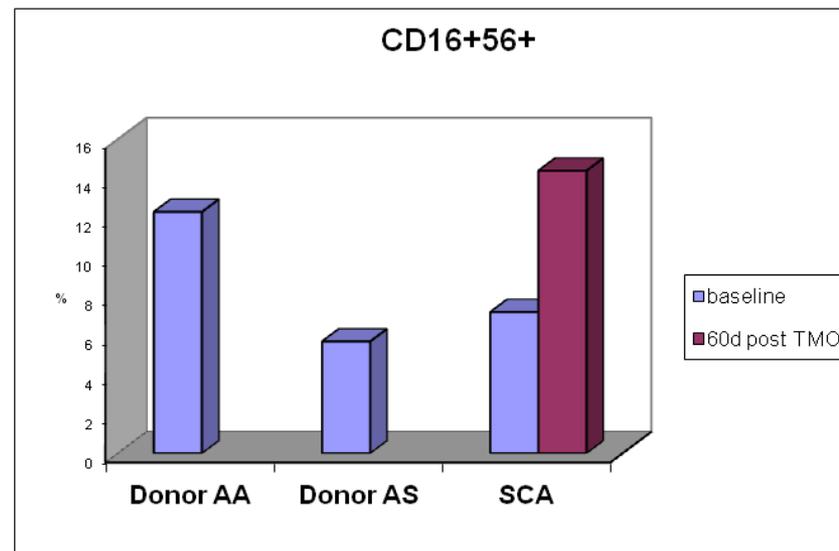
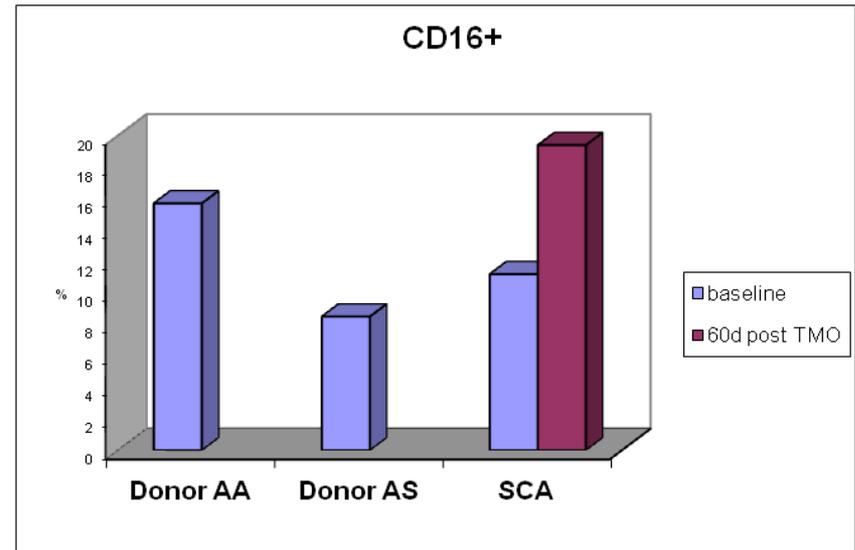
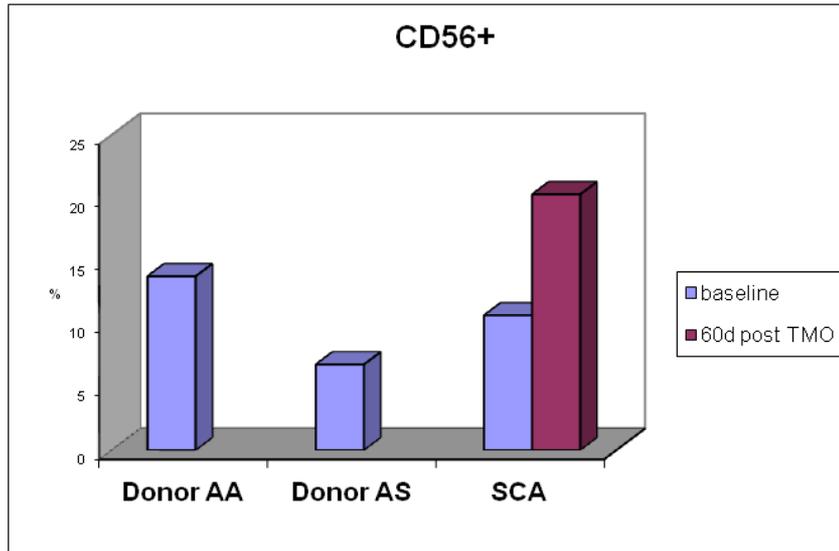
Sono prodotte prima cellule NK **CD56<sub>bright</sub>CD16<sub>dim</sub>** caratterizzate da:

1. Alti livelli produzione citochine
2. Bassa attività citotossica naturale ed ADCC
3. Elevata attività citotossica linfochine-dipendente

Quindi sono prodotte cellule NK **CD56<sub>dim</sub>CD16<sub>+</sub>** caratterizzate da:

1. Bassi livelli produzione citochine
2. Elevata attività citotossica naturale ed ADCC
3. Elevata attività citotossica linfochine-dipendente

# Ricostituzione immunologica dopo 60 gg dal trapianto di CSE in pazienti affetti da emoglobinopatie (SCA)



**NK cells**

# Ricostituzione immunologica dopo 60 gg dal trapianto di CSE in pazienti affetti da emoglobinopatie (SCA)

---

## Immunità Innata

**NK cells** - La velocità di recupero di questa popolazione si spiega col fatto che i linfociti NK subiscono un processo di maturazione a livello del midollo osseo che non richiede riarrangiamenti somatici dei propri recettori

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Innata

### Cellule Dendritiche

DC mieloidi (mDC) si normalizzano entro **3 mesi** dal TCSE

DC linfoidi (plasmocitoidi - pDC) si normalizzano entro **1 anno** dal TCSE

Ricostituzione dipende principalmente dalla fonte di CSE (midollo osseo più rapido) e dalla manipolazione dell'inoculo

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Adattiva

**Linfociti B** - I livelli ematici dei linfociti B naive si normalizzano entro **3 mesi** dal TCSE. Nonostante la loro conta possa essere normale a tre mesi dal trapianto, la loro funzionalità viene recuperata più lentamente.

Diversi autori hanno riscontrato una diminuzione nelle popolazioni memory (sia IgM/IgD che IgG) ed un incremento nella popolazione naive fino ad un anno dal trapianto (D'Orsogna L.J. et al 2009; Avanzini M.A. et al 2005).

La produzione di altre classi immunoglobuliniche può essere sub-ottimale fino ad un anno di distanza.

In particolare la produzione di IgA può essere deficitaria fino a 2 anni dal trapianto esponendo i pazienti ad un aumentato rischio di infezione delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale (Geddes M e Storek J, 2007).

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Adattiva

**Linfociti B** - I Centri Germinativi (GC) non sono osservabili fino ad 1 anno dal TCSE. E' probabile che il regime di condizionamento sia responsabile di un danno strutturale a livello del centro germinativo stesso con conseguente alterazione nello sviluppo dei linfociti B.

La cinetiche della ricostituzione può essere più rapide in assenza di GVHD e in relazione alla fonte di CSE: **PB > BM e UCB**

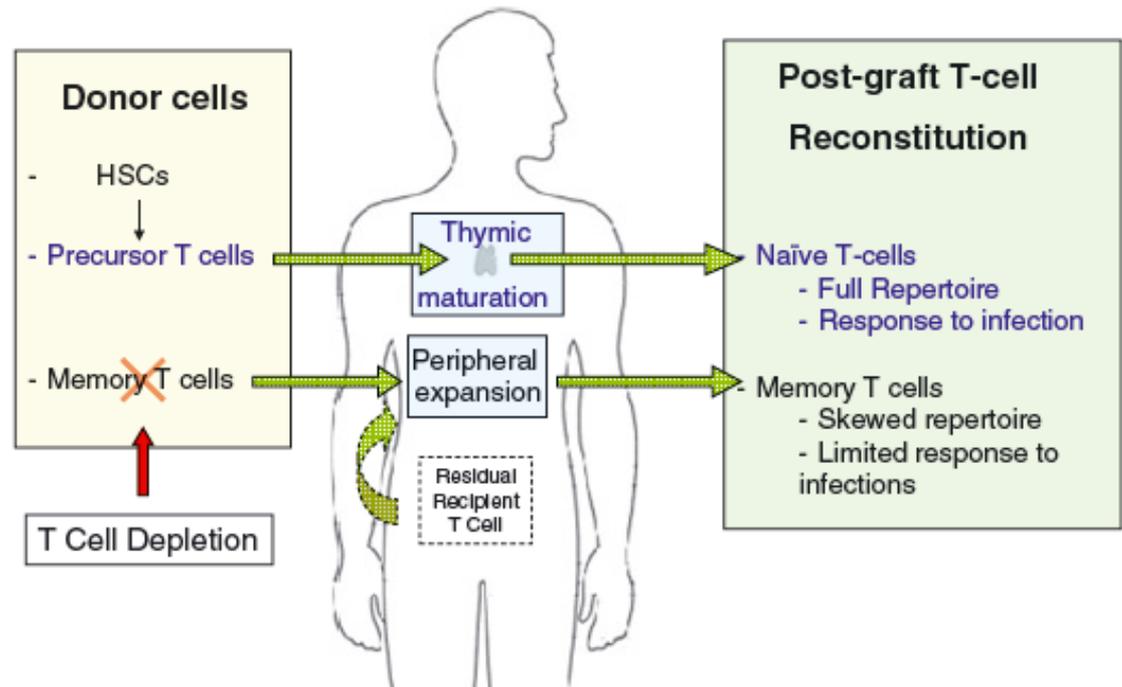
Diversi gruppi hanno osservato un aumento nel numero di linfociti B circolanti in pazienti allotrapiantati a 5 e 10 anni dal trapianto (Quan Le R. *et al*, 2011).

# Ricostituzione Immunologica

## Immunità Adattiva

Cellule T – ricostituzione ha luogo attraverso due principali meccanismi:

1. Timo-indipendente
2. Timo-dipendente



# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Adattiva

### Timo-indipendente

Espansione cellule T mature periferiche residue del ricevente e/o cellule T mature periferiche del donatore contenute nell'inoculo stimolata dall'ambiente linfopenico

- Generazione pool T linfoide con limitato repertorio TCR
- Generazione pool T linfoide con difetti quali/quantitativi

# Ricostituzione Immunologica

---

## Immunità Adattiva

### Timo-indipendente

I linfociti che si espandono mediante questo meccanismo sono generalmente linfociti CD8<sup>+</sup> (citotossici) e proliferano in seguito all'esposizione ad opportuni stimoli antigenici quali antigeni virali ed antigeni minori o maggiori di istocompatibilità.

Per questo motivo la conta dei linfociti CD8<sup>+</sup> raggiunge livelli normali a tre/quattro mesi dal trapianto e diverse evidenze sperimentali sembrano attribuire a questo tipo cellulare lo sviluppo della reazione GVH (Douek *et al.* 2000 ; Peggs *et al.* 2004).

# Ricostituzione Immunologica

---

## Timo-dipendente

- Età del paziente
- Tossicità Condizionamento e Profilassi/Terapia GVHD

Produzione di un nuovo repertorio T cellulare dai precursori pre-timici del donatore

- Analisi citofluorimetrica
- Analisi quantitativa dei **TRECs** (TCR excision circles)
- **Spectrotyping** del **TCR repertoire**

# Ricostituzione Immunologica

---

## Timo-dipendente

- **Analisi citofluorimetrica**
- Analisi quantitativa dei **TRECs** (TCR excision circles)
- **Spectrotyping** del TCR repertoire

# Ricostituzione Immunologica

---

## Timo-dipendente

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

# Ricostituzione Immunologica

---

Il rapporto fra la popolazione helper e quella citotossica è circa 2:1 ma varie condizioni possono alterare tale rapporto. Tra queste il TCSE, dove il rapporto è invertito tra le due popolazioni cellulari.

Diversi lavori hanno evidenziato la persistenza di alterazioni nei rapporti relativi di queste due popolazioni fino a 5 anni dopo trapianto allogenico (F.M. Sanchez-Guijo, *et al.* 2005)

# Ricostituzione Immunologica

---

Il perdurare di questa alterazione potrebbe essere imputabile a due meccanismi:

- lenta ricostituzione nel comparto helper presumibilmente per via della lenta produttività timica (F.M. Sanchez-Guijo, et al. 2005)
- espansione periferica di linfociti citotossici in risposta a stimoli di varia natura.

# Ricostituzione immunologica dopo trapianto di CSE in pazienti affetti da emoglobinopatie (beta - thalassemia)

---

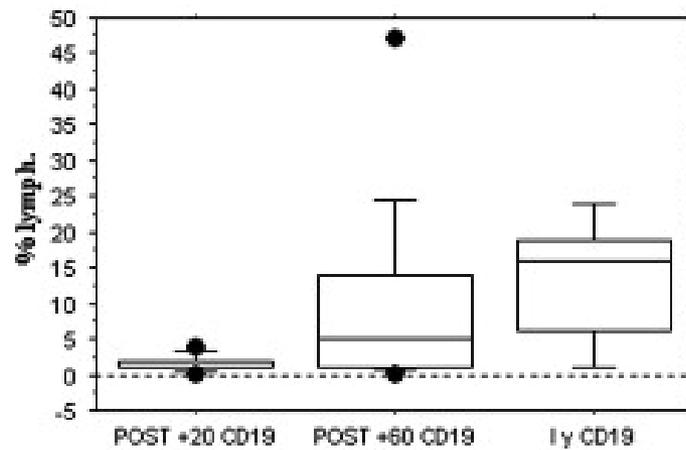
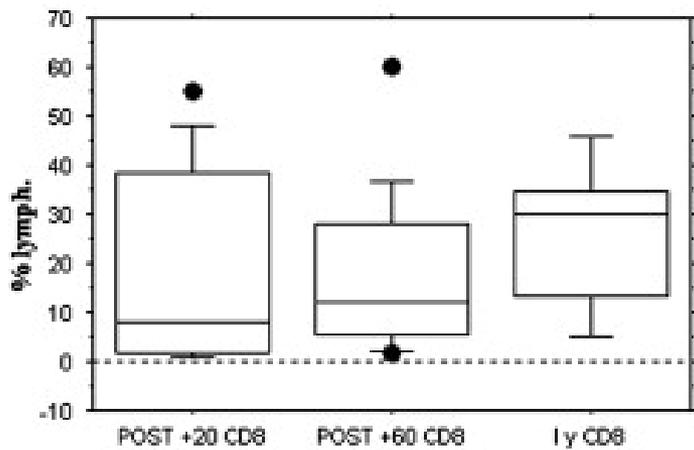
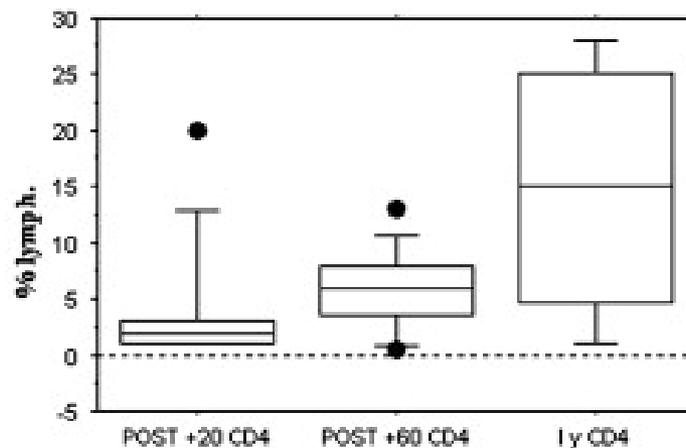
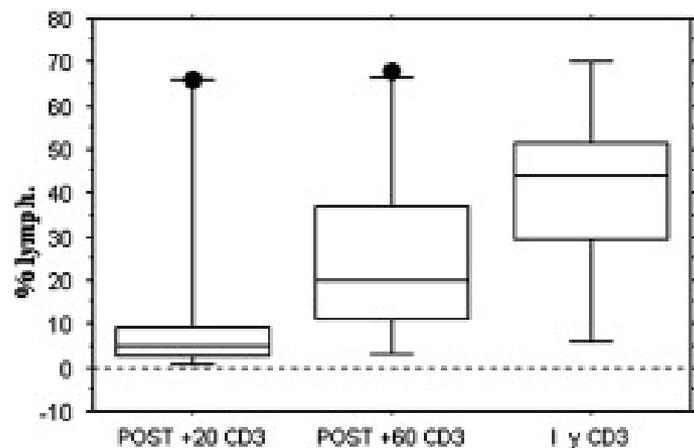
Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Nov;16(11):1557-66. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.05.003. Epub 2010 Jun 25.

**Immuno-hematologic reconstitution in pediatric patients after T cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation for thalassemia.**

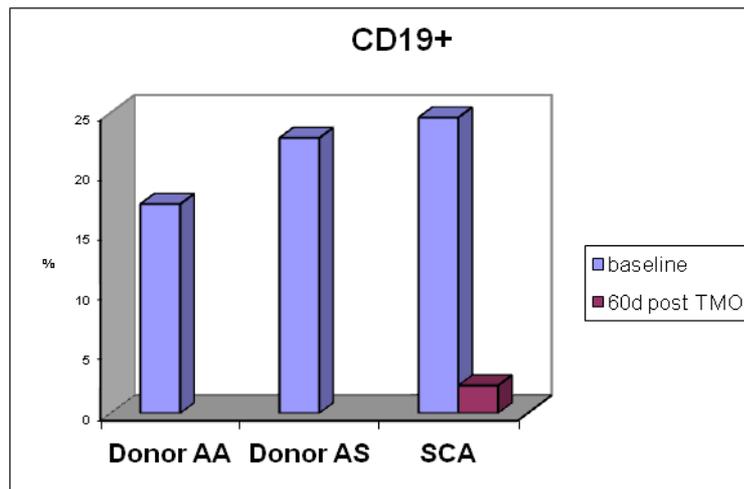
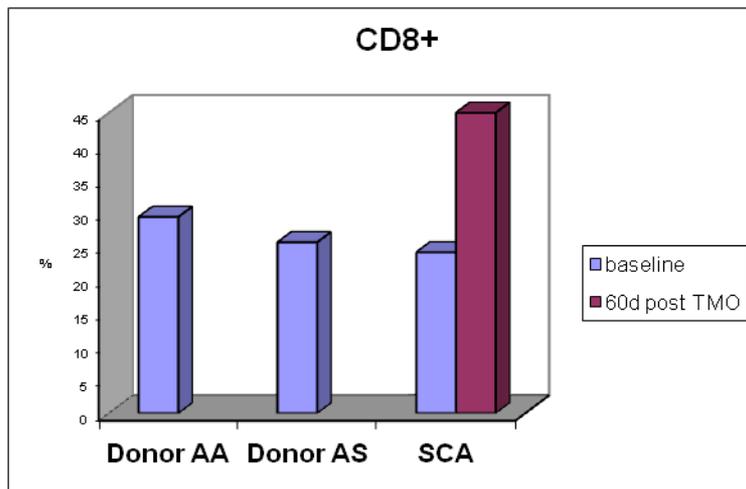
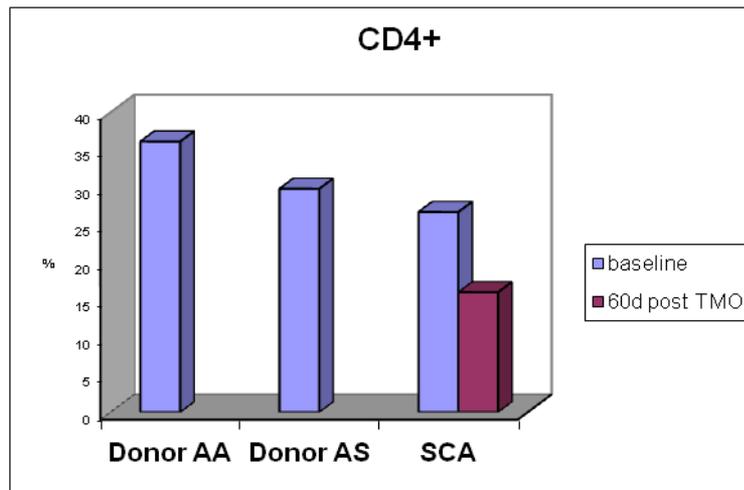
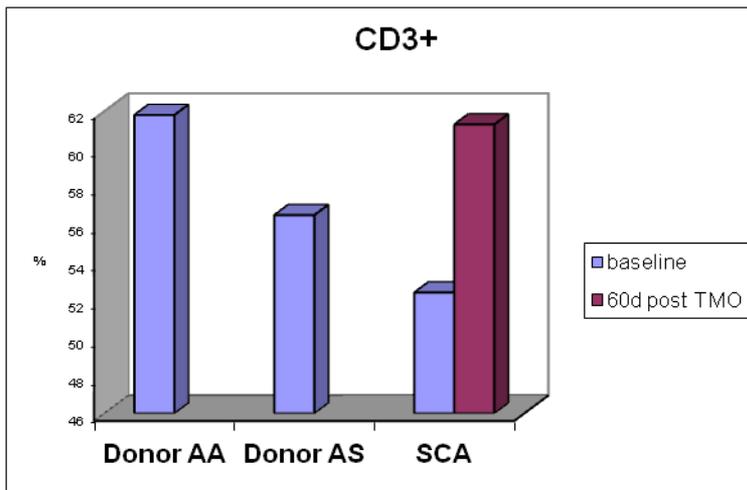
Isgrò A<sup>1</sup>, Marziali M, Sodani P, Gaziev J, Erer B, Polchi P, Paciaroni K, Roveda A, De Angelis G, Gallucci C, Alfieri C, Simone MD, Zinno F, Isacchi G, Adorno G, Lanti A, Leti W, Aiuti F, Fraboni D, Andreani M, Lucarelli G.

# Ricostituzione immunologica dopo trapianto di CSE in pazienti affetti da emoglobinopatie (beta - thalassemia)

---



# Ricostituzione immunologica dopo 60 gg dal trapianto di CSE in pazienti affetti da emoglobinopatie (SCA)



Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Nov;16(11):1557-66. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.05.003. Epub 2010 Jun 25.

**Immunohematologic reconstitution in pediatric patients after T cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation for thalassemia.**

Isgrò A<sup>1</sup>, Marziali M, Sodani P, Gaziev J, Erer B, Polchi P, Paciaroni K, Roveda A, De Angelis G, Gallucci C, Alfieri C, Simone MD, Zinno F, Isacchi G, Adorno G, Lanti A, Lefi W, Aiuti F, Fraboni D, Andreani M, Lucarelli G.

# Ricostituzione Immunologica

---

Biol Blood Marrow Transplant. 2015 May 19. pii: S1083-8791(15)00321-3. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.04.025. [Epub ahead of print]

## **Post-transplant Cyclophosphamide and Sirolimus after Haploidentical HSCT Using a Treosulfan-based myeloablative conditioning and PBSC.**

Cieri N<sup>1</sup>, Greco R<sup>2</sup>, Crucitti L<sup>3</sup>, Morelli M<sup>2</sup>, Giglio F<sup>2</sup>, Levati G<sup>2</sup>, Assanelli A<sup>2</sup>, Carrabba MG<sup>2</sup>, Bellio L<sup>4</sup>, Milani R<sup>4</sup>, Lorentino F<sup>2</sup>, Lupo Stanghellini MT<sup>2</sup>, De Freitas T<sup>2</sup>, Markt S<sup>2</sup>, Bernardi M<sup>2</sup>, Corti C<sup>2</sup>, Vago L<sup>3</sup>, Bonini C<sup>5</sup>, Ciceri F<sup>6</sup>, Peccatori J<sup>2</sup>.

We investigated in a cohort of 40 high-risk hematological patients the feasibility of PBSC grafts after a treosulfan-melphalan myeloablative conditioning, followed by a PTCy and sirolimus-based GVHD prophylaxis (Sir-PTCy).

Donor engraftment occurred in all patients with full donor chimerism achieved by day 30.

Post-HSCT recovery of lymphocyte subsets was broad and fast, with a median time to CD4>200/μl of 41 days.

# Ricostituzione Immunologica

---

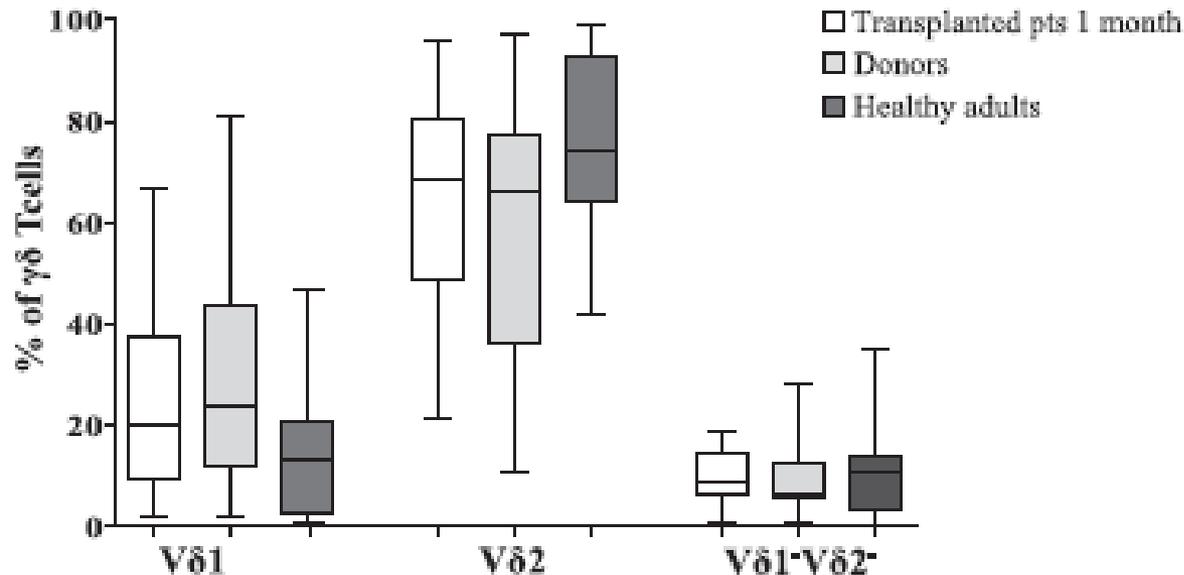
## IMMUNOBIOLOGY

### **$\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ lymphocytes**

Ima Airoidi,<sup>1</sup> Alice Bertaina,<sup>2</sup> Ignazia Prigione,<sup>1</sup> Alessia Zorzoli,<sup>1</sup> Daria Pagliara,<sup>2</sup> Claudia Cocco,<sup>1</sup> Raffaella Meazza,<sup>3</sup> Fabrizio Loiacono,<sup>4</sup> Barbarella Lucarelli,<sup>2</sup> Maria Ester Bernardo,<sup>2</sup> Giulia Barbarito,<sup>1</sup> Daniela Pende,<sup>3</sup> Alessandro Moretta,<sup>5</sup> Vito Pistoia,<sup>1</sup> Lorenzo Moretta,<sup>6</sup> and Franco Locatelli<sup>2,7</sup>

# Ricostituzione Immunologica

---



They demonstrated that both V $\delta$ 1 and V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells promptly reconstitute in children given haplo-HSCT depleted of  $\alpha\beta$  T and CD19 B cells, with a prevalence of the V $\delta$ 2 subset, and that these  $\gamma\delta$  T-cell subsets express a phenotype similar to that found in the haplo-HSCT donors

# Ricostituzione Immunologica

---

## Timo-dipendente

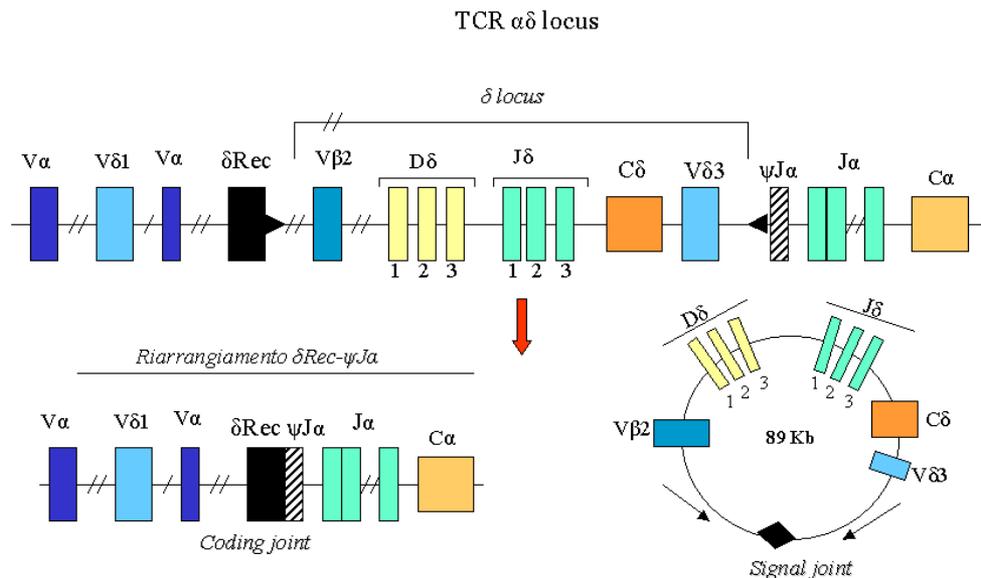
- Analisi citofluorimetrica
- **Analisi quantitativa dei TRECs (TCR excision circles)**
- Spectrotyping del TCR repertoire

# Ricostituzione Immunologica

## Valutazione dell'output timico – TREC :

La linfopoiesi T si svolge a livello timico e prevede una serie di passaggi sequenziali di maturazione dei precursori linfoidi.

Una fase precoce del processo di commissionamento nella neogenesi delle cellule T è l'excisione del locus  $\delta$ , una porzione interna al locus TCR  $\alpha$ , che genera un frammento episomale di DNA.

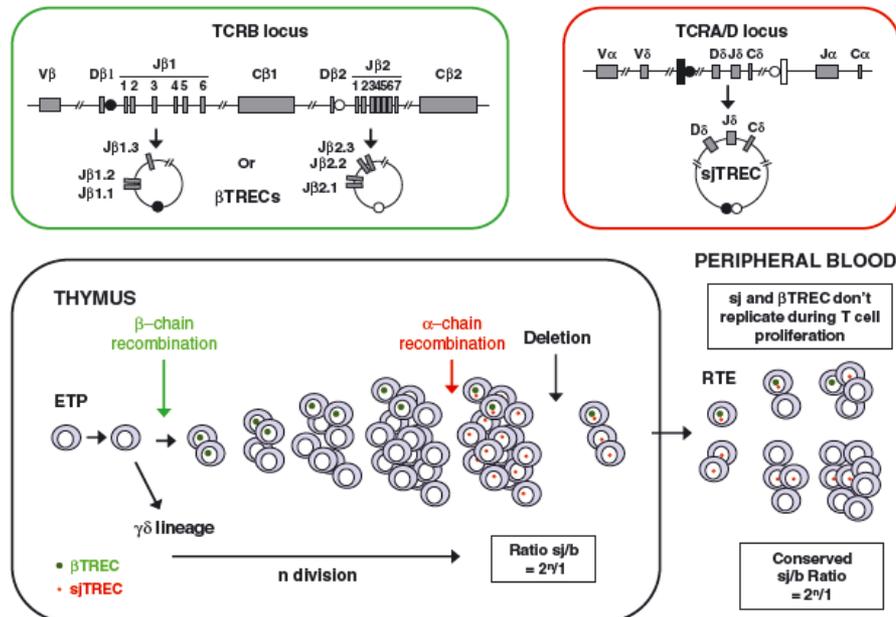


# Ricostituzione Immunologica

## Valutazione dell'output timico – TREC :

L'anello che si forma dal riarrangiamento del gene TCR viene identificato con il nome di T-Cell Receptor Excision Circles (TREC)

Tale processo si verifica esclusivamente nelle cellule che esprimeranno il recettore TCR  $\alpha\beta$ , durante la maturazione timica



# Ricostituzione Immunologica

---

**TREC** - diversi gruppi hanno dimostrato una ridotta produttività timica in pazienti allotrapiantati sia ad un anno (Dodero A et al, 2009) che a punti più avanzati post trapianto (Castermans E. et al, 2011).

Uno dei principali fattori in grado di influenzare la produzione di nuovi linfociti a singola specificità antigenica a livello timico è l'età.

La produzione di emigranti timici sia praticamente nulla in pazienti oltre i 60 anni (Castermans E. et al, 2011).

# Ricostituzione Immunologica

---

## Timo-dipendente

- Analisi citofluorimetrica
- Analisi quantitativa dei TRECs (TCR excision circles)
- **Spectrotyping del TCR repertoire**

# Ricostituzione Immunologica

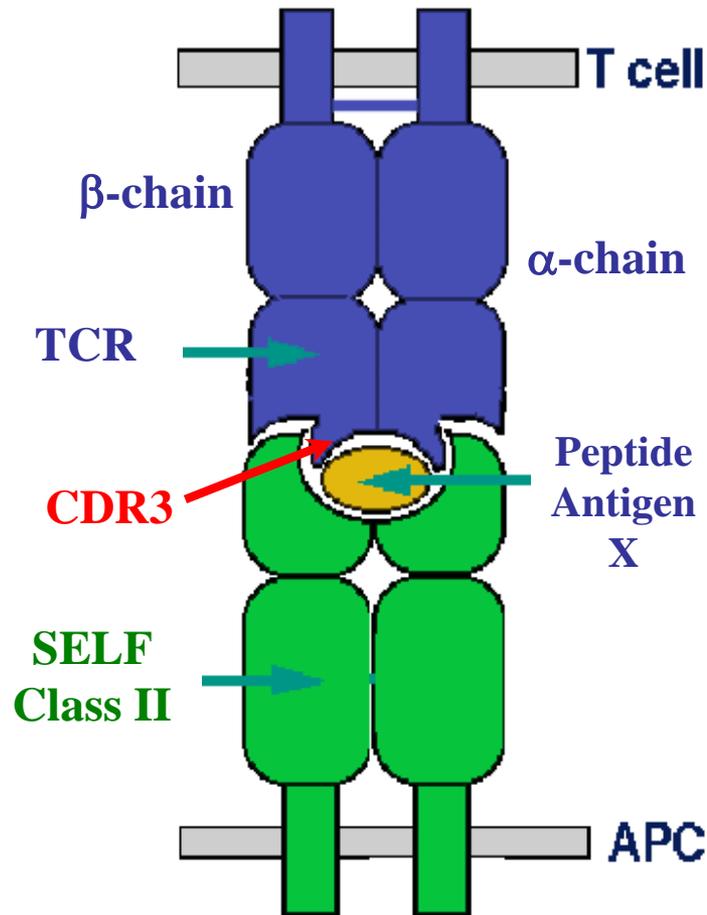
---

## Spectrotyping

Riarrangiamenti della regione CDR3 (complementary determining region 3) del recettore dei linfociti T (T cell receptor - TCR)

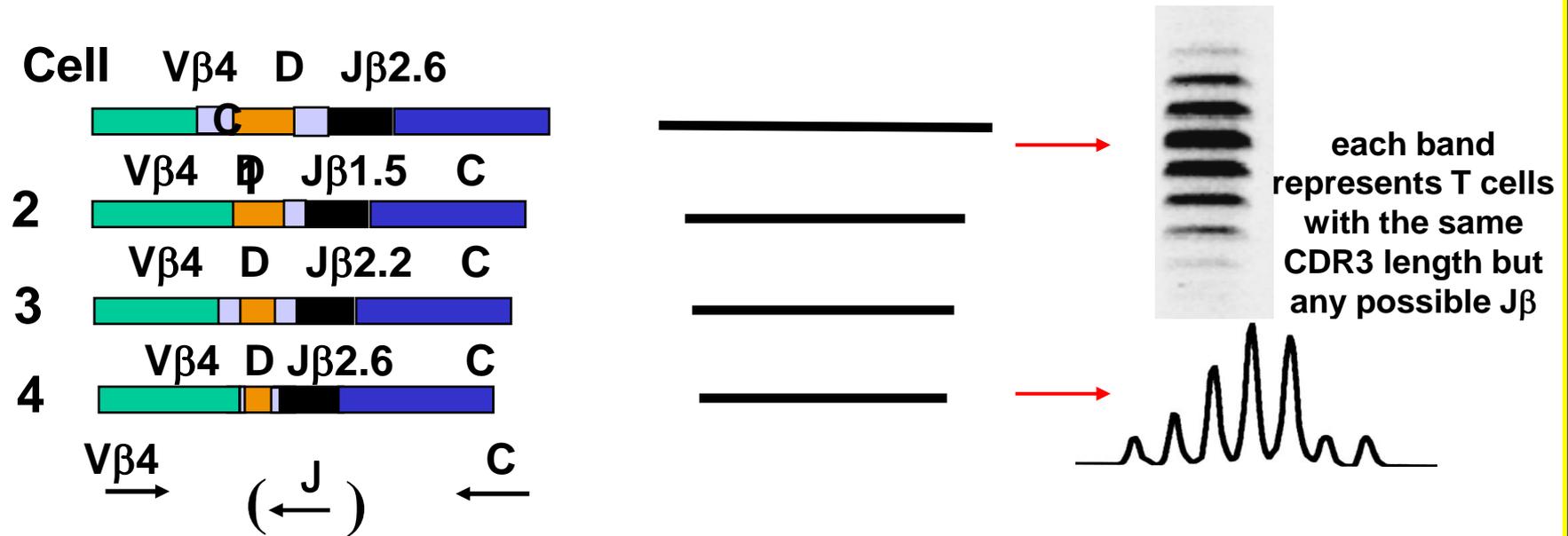
# Ricostituzione Immunologica

---



Il riconoscimento del complesso MHC-peptide da parte delle cellule T cells avviene attraverso il TCR

# V $\beta$ Spectratyping

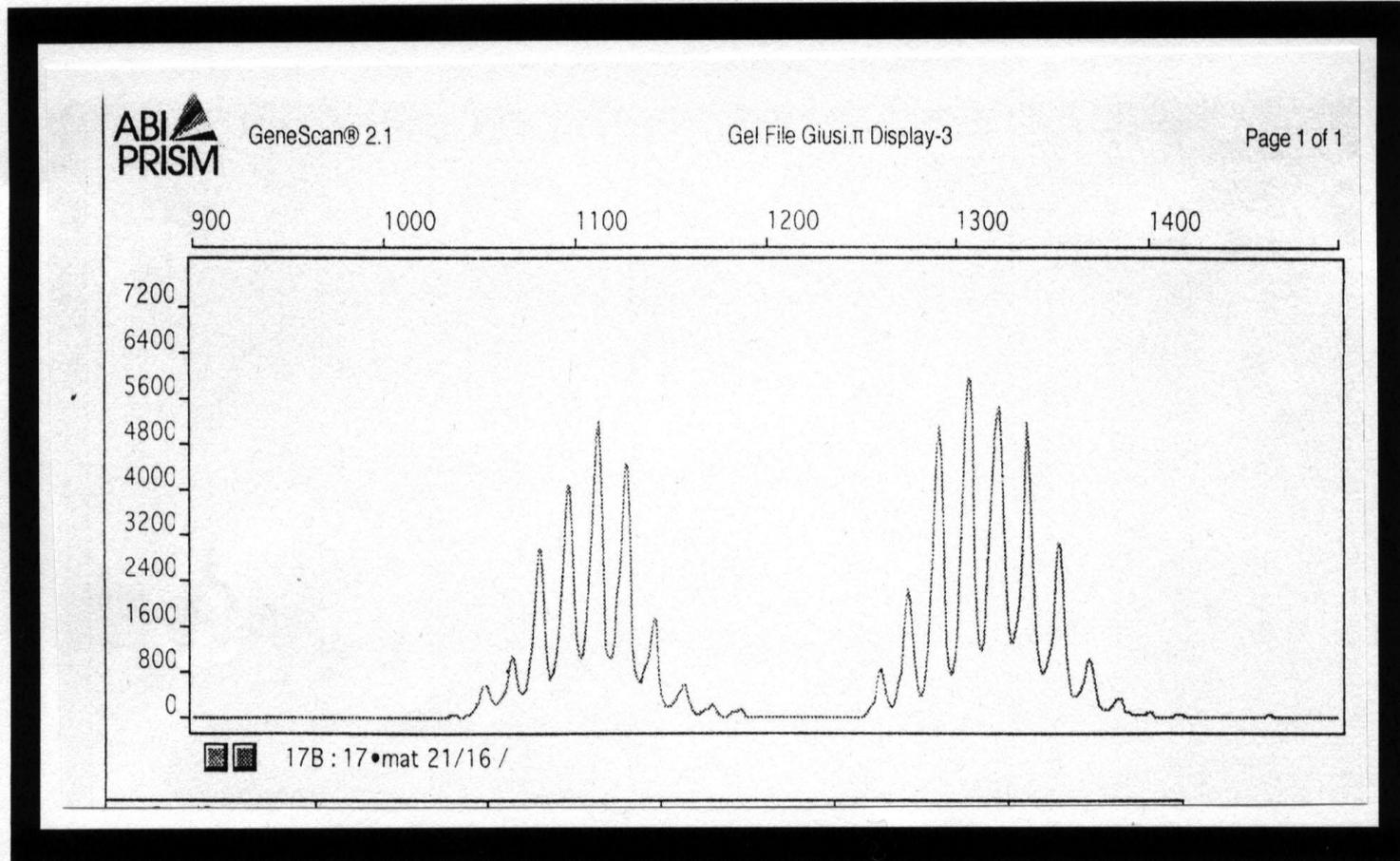


For any V $\beta$  family, a spectrum of **CDR3** sizes is possible.

PCR with V $\beta$  and constant (J) primers results in products of different length easily resolved on a sequence gel. They are 3 bp apart, as functional mRNA has to be in-frame.

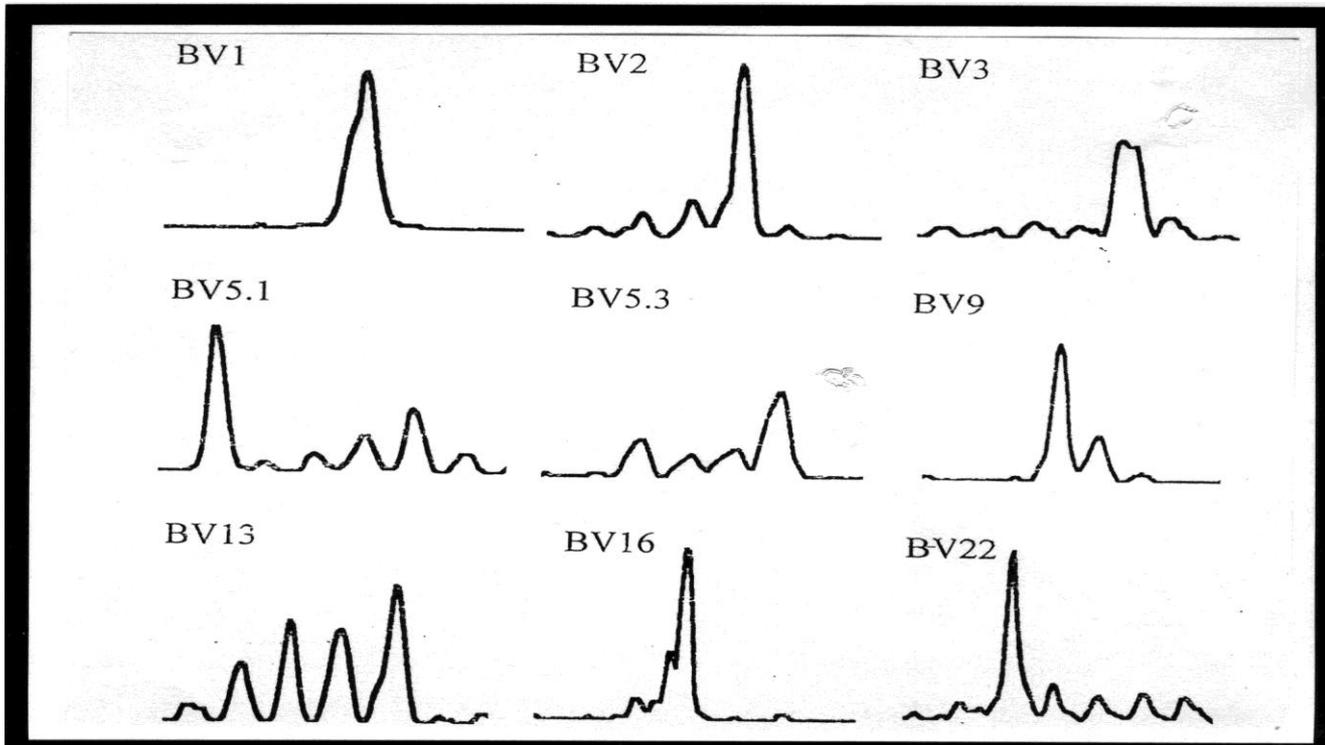
- Band intensity reflects both TCR complexity and quantity
- Band number is a direct measurement of repertoire complexity

# Normal Spectrotyping



# Ricostituzione Immunologica

---



Il repertorio linfocitario risulta profondamente alterato nei primi mesi post-trapianto nei pazienti, probabilmente a causa dell'espansione di cloni linfocitari in risposta ad infezioni opportunistiche e all'insorgenza di GvHD. (Dodero et al, 2005).

# Ricostituzione Immunologica

---

Overall, early after HSCT (within 6 months after graft), many abnormalities of the T-cell repertoire occur and are difficult to correlate with the clinical status of the patient .

Conversely, late after graft (after 1 year at least) and in a still ongoing process even 2–3 years post-transplant, it is possible to correlate repertoire diversity with the occurrence of GvHD, severe infectious complications or relapse.

T-cell repertoire reconstitution is delayed in cases of T-cell depletion or in CD34+ purified grafts and is improved in cases of full donor hematopoiesis.

Techniques of T-cell receptor (TCR)  $\beta$ -chain sequencing have also clearly separated T-cell clones mediating GvHD and GvL as a proof of principle to monitor GvHD-causing clones in HSCT recipients.

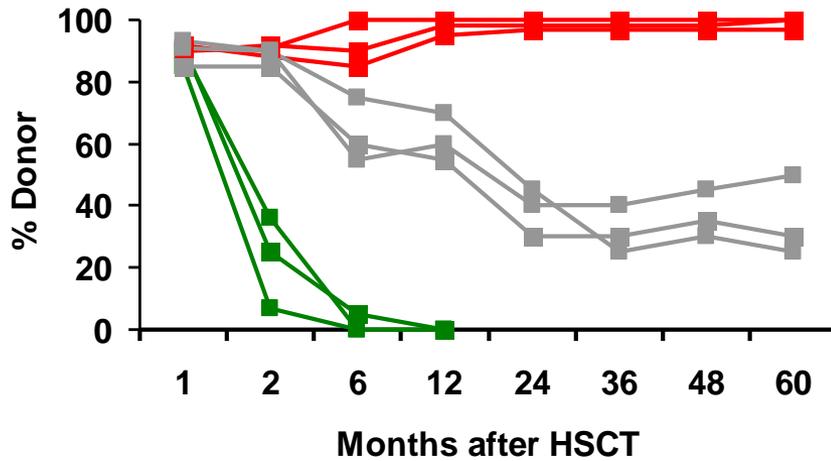
# Ricostituzione Immunologica

---

**TOLLERANZA  
IMMUNOLOGICA**

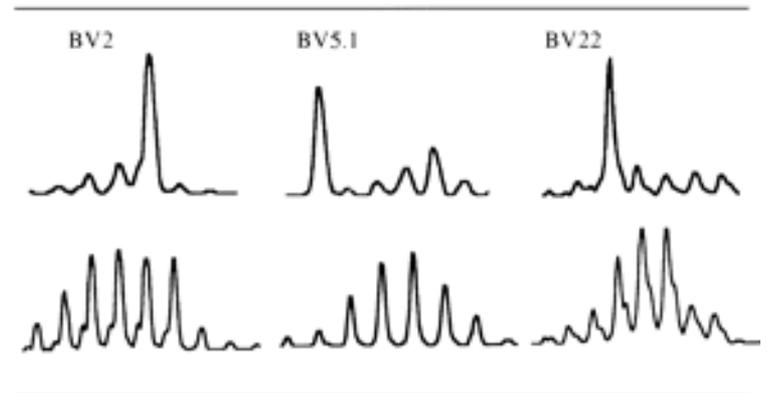
# Ricostituzione Immunologica

---

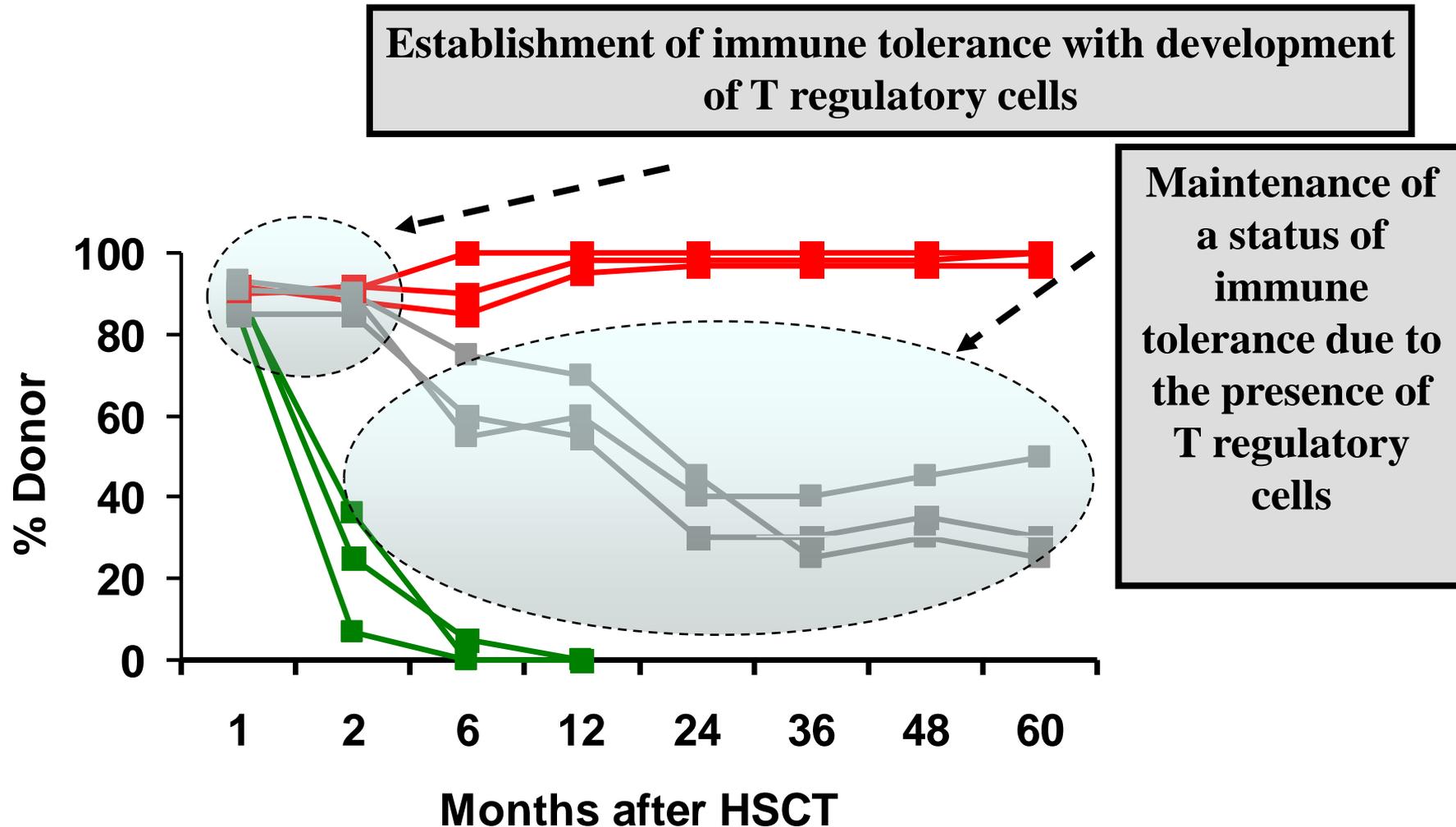


**Monitoraggio  
attecchimento**

**TCR repertoire prima e dopo  
stimolazione con PHA**



# Mixed Chimerism in Thalassemia after HSCT



# Tolleranza Immunologica

---

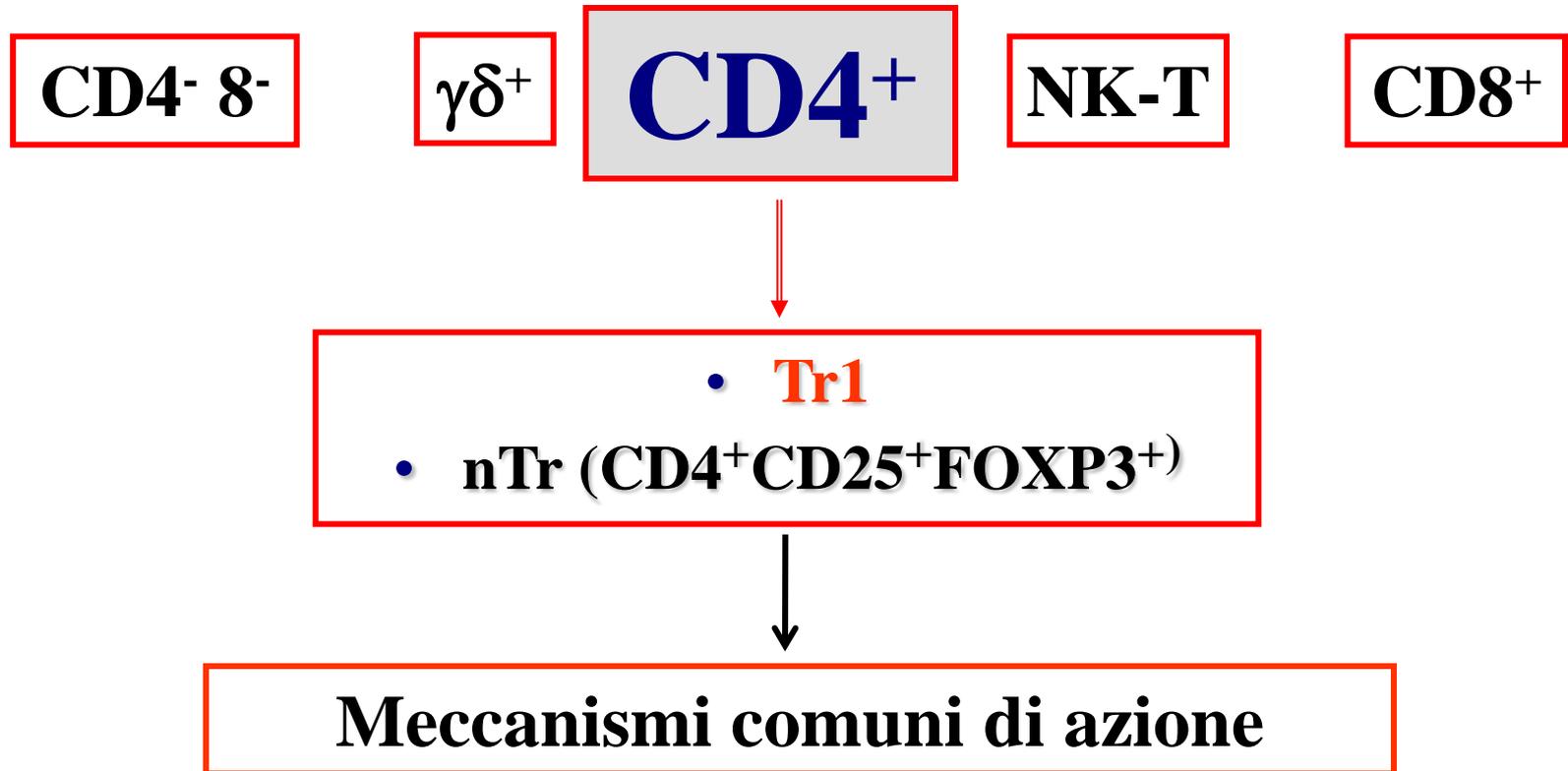
**Definizione:** La tolleranza immunologica è la mancata responsività dei linfociti nei confronti di un specifico antigene.

**Significato:** Un individuo in condizioni normali è tollerante verso i propri antigeni, fenomeno noto come tolleranza verso il self.

La rottura della “self-tolerance” genera le malattie autoimmuni.

Potenziamenti terapeutici: Induzione della tolleranza per prevenire il rigetto dei trapianti d'organo o le reazioni di GvHD, per il trattamento di malattie autoimmuni e le allergie, o prevenire le risposte immuni dopo terapia genica.

# Induzione della tolleranza periferica tramite cellule T regolatorie



Le cellule Tr1 sono caratterizzate dalla loro abilità di produrre IL-10 in assenza di IL-4 e sono le principali protagoniste della induzione e mantenimento della tolleranza periferica

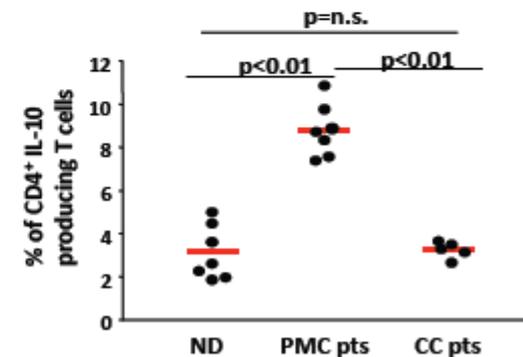
# Identificazione e selezione delle cellule Tr1 dopo trapianto di CSE nella talassemia

Type 1 regulatory T cells are associated with persistent split erythroid/lymphoid chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia

by Giorgia Serafini, Marco Andreani, Manuela Testi, MariaRosa Battarra, Andrea Bontadini, Katharina Fleischhauer, Sarah Markt, Guido Lucarelli, Maria Grazia Roncarolo, and Rosa Bacchetta

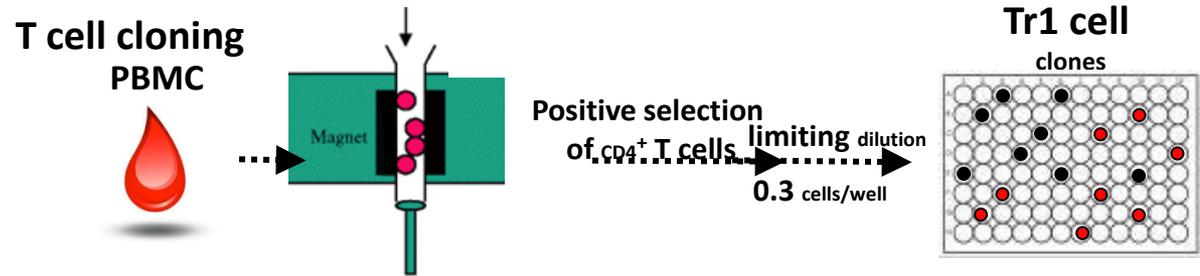
*Haematologica* 2009 [Epub ahead of print]

- High frequency of IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells in PBMC of PMC pts;
- Tr1 cell clones of both donor and host origin can be isolated from PBMC of PMC pts;
- Tr1 cell clones are able to inhibit the function of effector T cells of both donor and host origin;
- The suppressive activity towards both host and donor cells was mediated by IL-10 since anti-IL-10R neutralizing mAb could revert suppression and anergy of patients' PBMC *in vitro*.

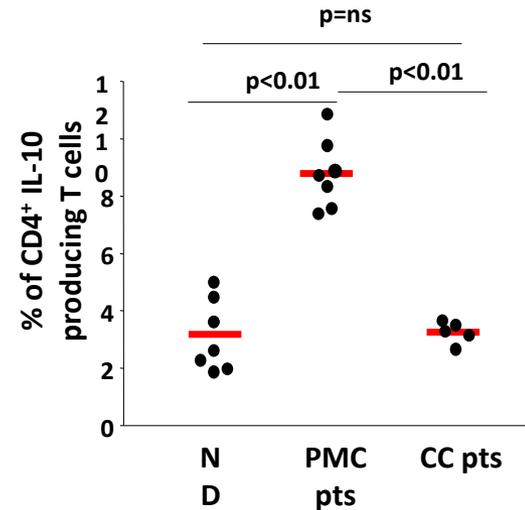


# Identificazione cellule Tr1

## Clonaggio



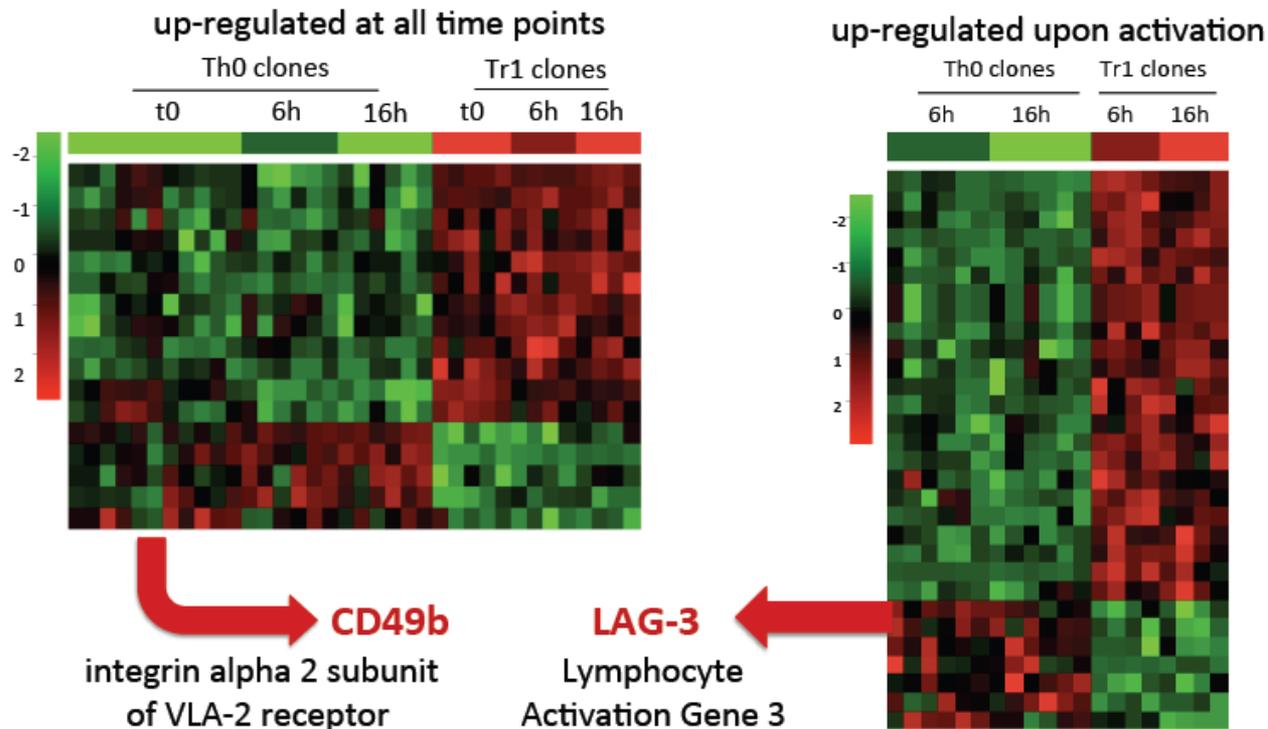
## Staining intracellulare delle citokine



# Nuovi marcatori per identificare cellule Tr1

Identification of CD49b and LAG-3 by gene expression profiling of Tr1 cells

## SURFACE MOLECULES

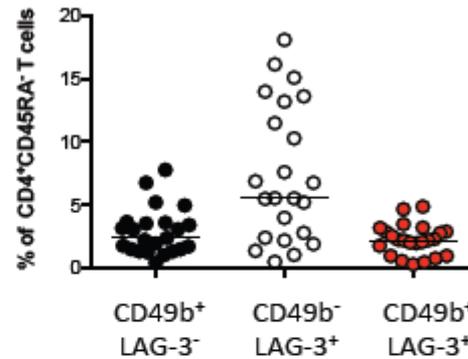
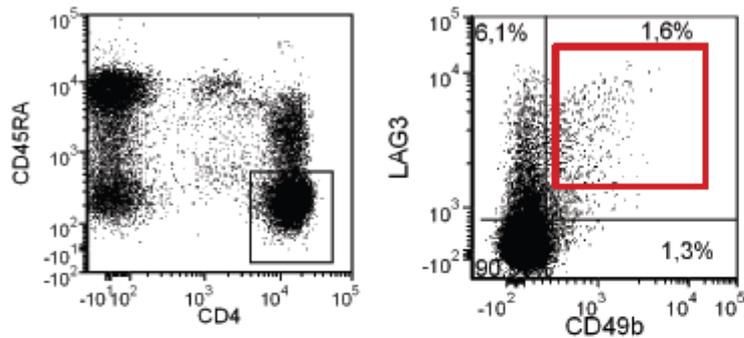


[Nat Med.](#) 2013 Jun;19(6):739-46. doi: 10.1038/nm.3179. Epub 2013 Apr 28.

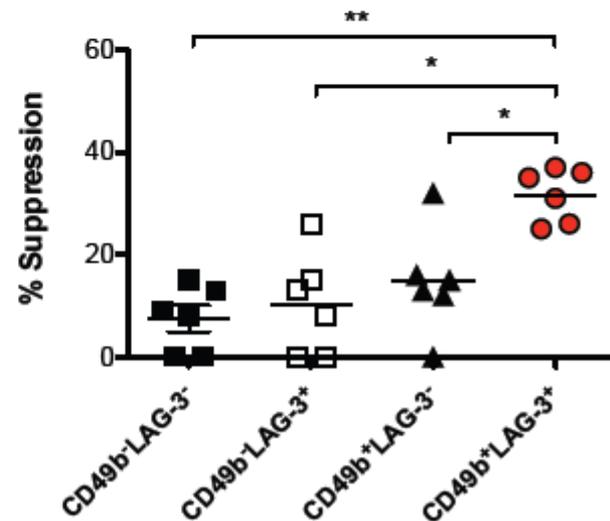
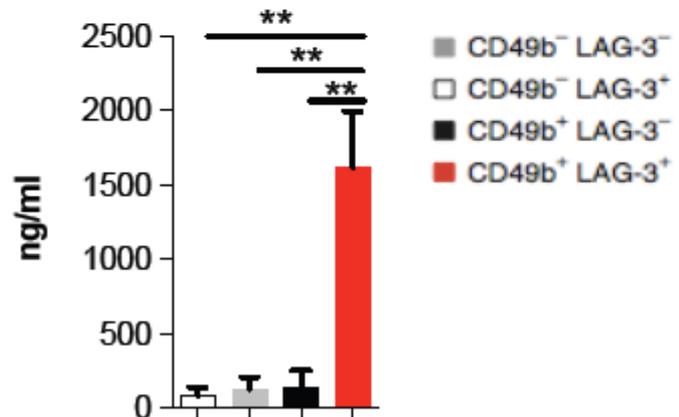
**Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells.**

[Gagliani N<sup>1</sup>](#), [Magnani CF](#), [Huber S](#), [Gianolini ME](#), [Pala M](#), [Licona-Limon P](#), [Guo B](#), [Herbert DR](#), [Bulfone A](#), [Trentini F](#), [Di Serio C](#), [Bacchetta R](#), [Andreani M](#), [Brockmann L](#), [Gregori S](#), [Flavell RA](#), [Roncarolo MG](#).

# Human Tr1 cells are CD45RA<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>



## IL-10



Gagliani N., Magnani C., and Huber S., Nat Med 2013  
19/03/15

IME

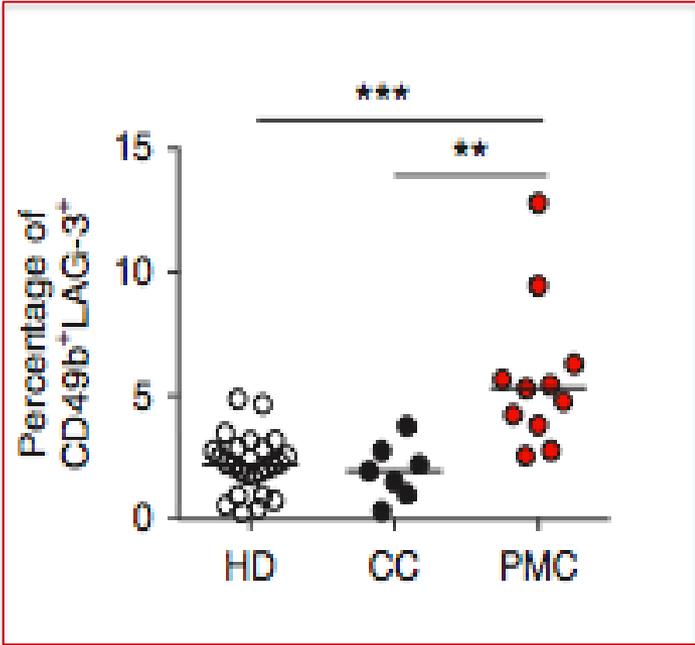
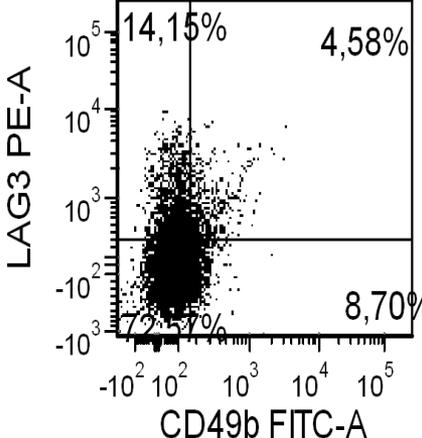
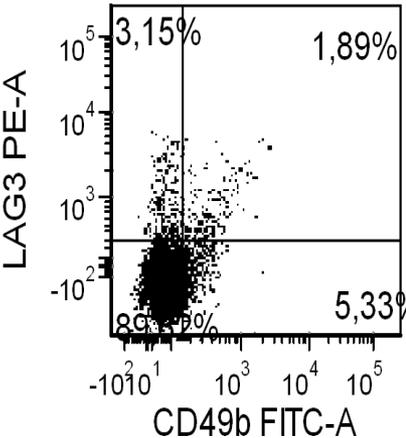
31

# Cellule CD45RA<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> Tr1 sono altamente rappresentate in pazienti talassemici con PMC

Pazienti talassemici con tolleranza  
Dopo trapianto di CSE

Control Pt  
CC

Tolerant Pt  
PMC



# Nuovi protocolli per il trapianto di CSE: utilizzo di cellule Tr1

---

Curr Top Microbiol Immunol. 2014;380:39-68. doi: 10.1007/978-3-662-43492-5\_3.

**Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications.**

Roncarolo MG<sup>1</sup>, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M.

# LIBT – Fondazione IME



**Giuseppe Testa**



**Chiara Stellitano**



**Tiziana Galluccio**



**Martina Mangione**



**Mariarosa Battarra**



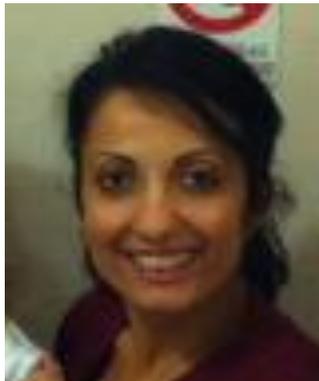
**Manuela Testi**



**Rossella Condello**



**Eleonora Paladini**



**Annalisa Guagnano**



**Maria Troiano**



**Andrea Di Luzio**