

DETERMINAZIONE DI "HLA -LOSS in due pazienti sottoposti a trapianto di cellule emopoietiche da donatore HLA aploidentico

Tiziana Galluccio

*Laboratorio d'Immunogenetica dei Trapianti
Dipartimento di Oncoematologia e Terapia Cellulare e Genica
IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù*

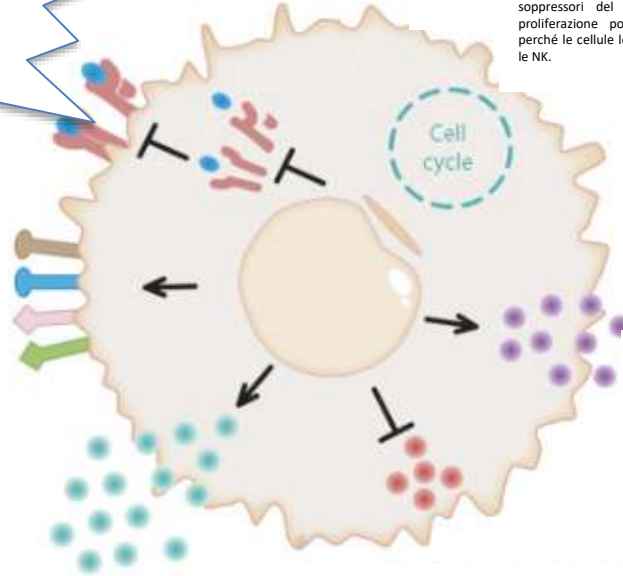
MECCANISMI DI IMMUNE ESCAPE

I DIVERSI MECCANISMI DI EVASIONE IMMUNITARIA dopo ALLO HSC sono mostrati in 6 CATEGORIE PRINCIPALI

Riconoscimento delle cellule leucemiche tramite perdita genomica/espressione alterata di HLA o DIFETTI DI PRESENTAZIONE DELL'ANTIGENE /HLA hanno un ruolo nella fuga immunitaria.

Sovraregolazione delle molecole del checkpoint immunitario: ruolo per la morte programmata (PD-1) nel linfoma di Hodgkin. CD155, B7-HR, H7-H4 svolgono un ruolo nella fuga immunitaria della leucemia mieloide acuta dopo allo-HCT

Aumento delle citochine antiinfiammatorie potrebbero svolgere un ruolo nella recidiva: interleuchina-10 (IL-10) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF-BETA)



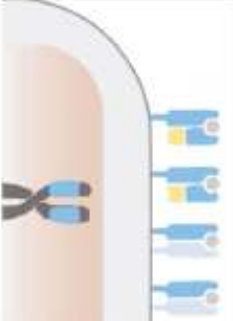
L'acquisizione di nuove mutazioni oncogene e la perdita di geni soppressori del tumore dopo allo-HCT. L'aumento della proliferazione potrebbe promuovere la fuga immunitaria perché le cellule leucemiche superano in numero le cellule T e le NK.

La produzione di molecole metabolicamente attive (IDO, indoleammina 2,3 -diossigenasi (IDO) e arginasi potrebbero svolgere un ruolo nella fuga immunitaria della LAM.

La ridotta produzione di IL-15 riduce le risposte immunitarie anti -AML dopo allo HCT. La soppressione del fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), promuove la maturazione delle cellule presentanti Ag APC, potrebbe svolgere un ruolo nella fuga infiammatoria AML dopo allo HCT.

La recidiva della malattia è una delle principali cause di morte dopo TMO allogenico di cellule ematopoietiche leucemiche. Le ricedute sono spiegate non solo dalla resistenza ai trattamenti chemioterapici, ma anche dalla fuga delle cellule tumorali dal controllo della **risposta immunitaria allogenica**. I meccanismi di evasione immunitaria possono portare la diminuzione del riconoscimento delle cellule leucemiche a causa della **perdita dei geni HLA**.

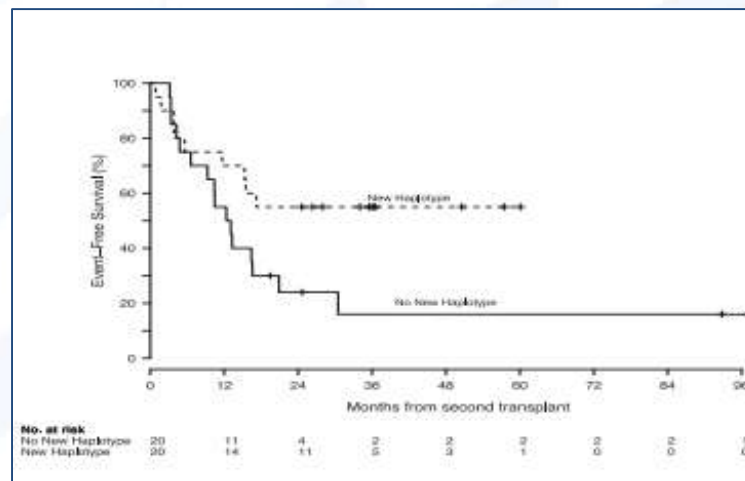
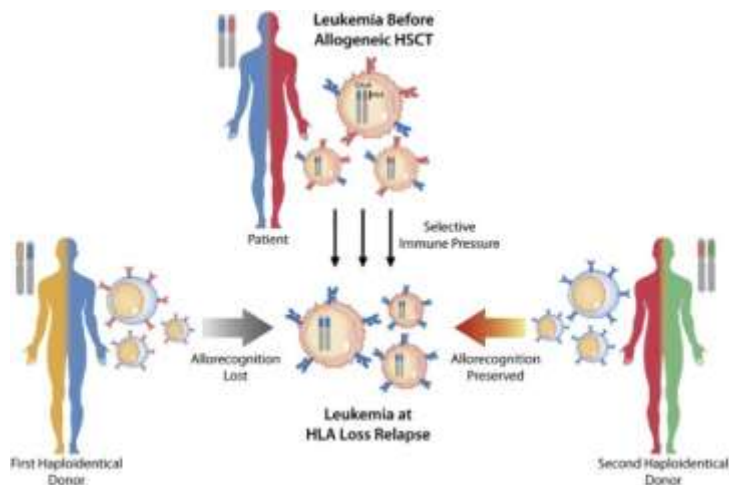
Background

	Alteration	Molecules involved	Frequency	Therapy
	Genomic HLA loss (CN-LOH)	Incompatible HLAs (both class I and II)	30% in haploidentical 5-10% in unrelated	Second transplantation or non-HLA-restricted immunotherapies

E' noto che la perdita dell'aplotipo HLA non condiviso del cromosoma 6 rappresenta una frequente causa di recidiva leucemica dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore aploidentico

Background

Una importante opzione terapeutica è quella di ricorrere ad un secondo trapianto aploidentico utilizzando un donatore compatibile con il paziente per l'altro aplotipo HLA, che garantisca una buona sopravvivenza per i pazienti.



CASE REPORT 1



Caratteristiche cliniche

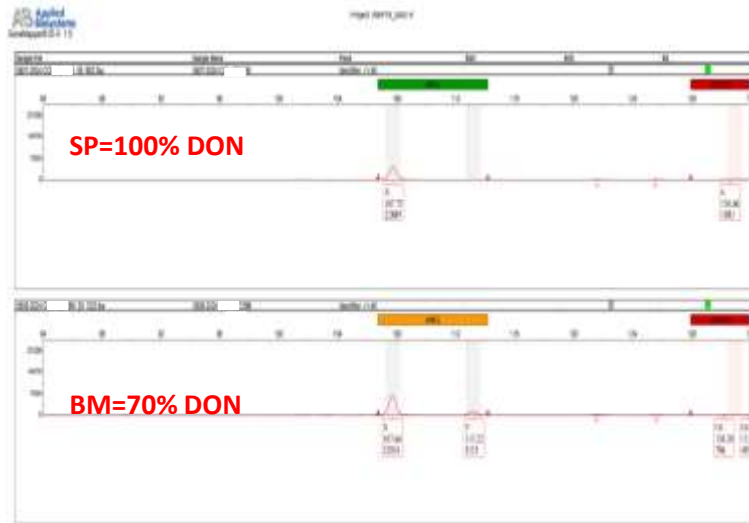
- Sesso: Maschio
- Età: 66 anni
- Diagnosi: Leucemia Mieloide Acuta (2015)
- Donatore: figlia aploidentica (2016)

TIPIZZAZIONE HLA pre - post TMO del paziente C#1 in NGS		
	PAZ. PRE-TMO C#1	DONATORE C#2
HLA-A*	03:01, 01:01	03:01, 24:563
HLA-B*	14:02, 15:17	14:02, 51:01
HLA-C*	08:02, 07:01P	08:02, 16:02
DRB1*	11:04, 13:02	11:04, 13:02
DQB1*	01:02P, 05:01P	01:02P, 05:01P

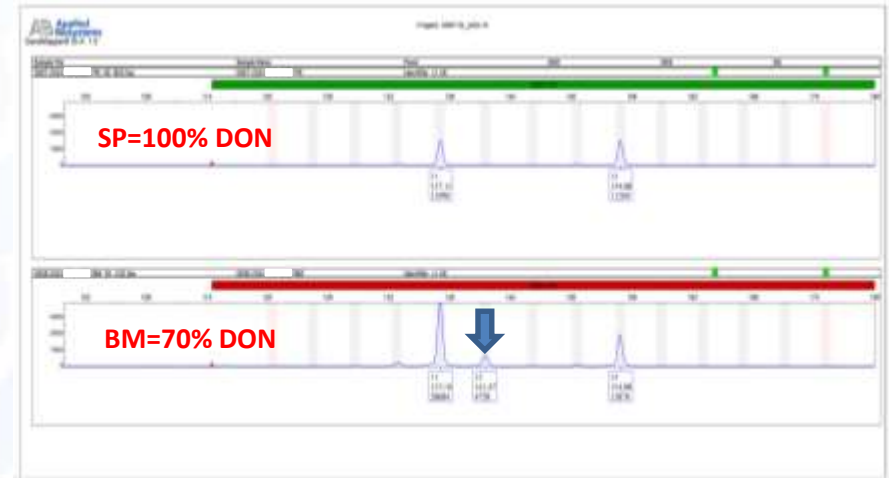
CASE REPORT 1

Follow-up dopo 4 anni dal trapianto

- Recidiva (morfologia) Aprile 2020
- Monitoraggio attecchimento: chimerismo misto del 70% (donatore) 30% (ricevente)



AMEL



STR D8S1179
PAZ:11,15
DON:11,12,
CHIMERA MISTA: 11,12,15

CASE REPORT 1



Nessuna evidenza della tipizzazione dell'aplotipo non condiviso, nonostante la presenza del 30% di cellule del ricevente (SSP e NGS)

TIPIZZAZIONE HLA pre - post TMO del paziente C#1 in NGS			
	PAZ. PRE-TMO C#1	DONATORE C#2	CHIMERA 70% DON POST-TMO C#3
HLA-A*	01:01, 03:01	03:01,24:563	03:01,24:563
HLA-B*	14:02, 15:17	14:02, 51:01	14:02, 51:01
HLA-C*	07:01P,08:02	08:02,16:02	08:02,16:02
DRB1*	11:04,13:02	11:04, 13:02	11:04, 13:02
DQB1*	01:02P, 05:01P	01:02P, 05:01P	01:02P, 05:01P

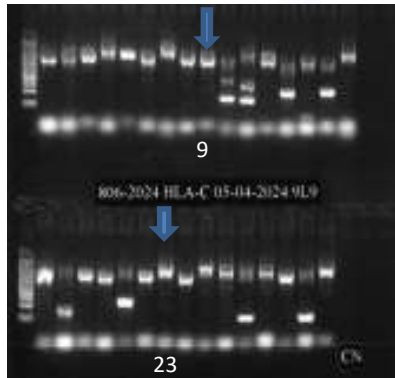
CASE REPORT 1

NGS e SSP: confermata la perdita dell'antigene HLA di classe I nonostante la presenza di 30% cellule del ricevente

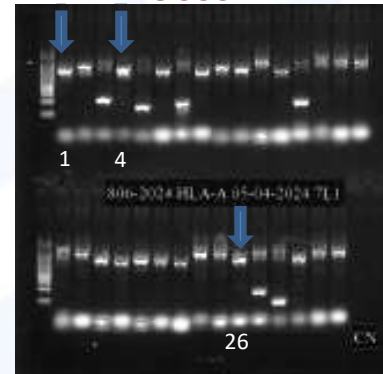
Final Assignment:

Locus	Allele Assignment	Final Assignment	Sero
A	A*03:01:01:01 A*24:563	A*03:01:01 A*24:563	A3 A-
B	B*14:02:01:01 B*51:01:01:12	B*14:02:01 B*51:01:01	B65(Bw6) B51(Bw4)
C	C*08:02:01:01 C*16:02:01:01	C*08:02:01 C*16:02:01	Cw8 C-

LOCUS C

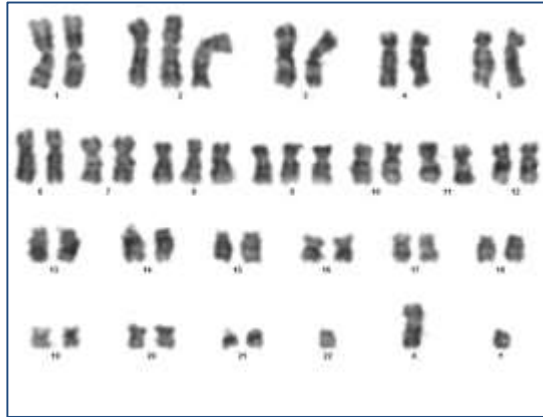


LOCUS A

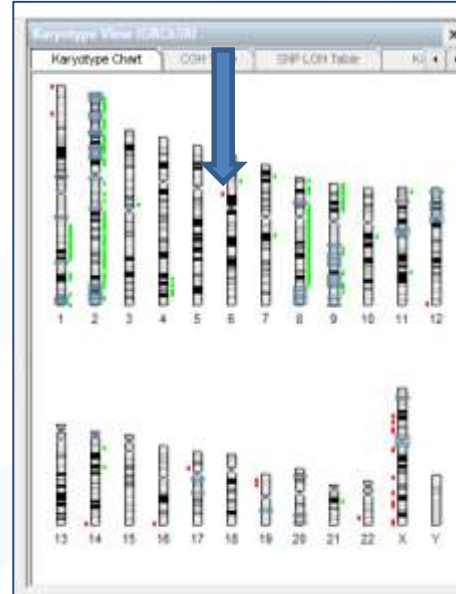


CASE REPORT n.1 PAZ. 70%DON/ 30% RECIPIENT ASPIRATO MIDOLLARE

Per confermare la perdita dell'eterozigotità, è stata eseguita anche un'analisi SNP-array sui campioni C#1, C#2 C#3 e un'idagine FISH.



49,XY,+2,+8,+9[15]



DIAGNOSI DI LAM:

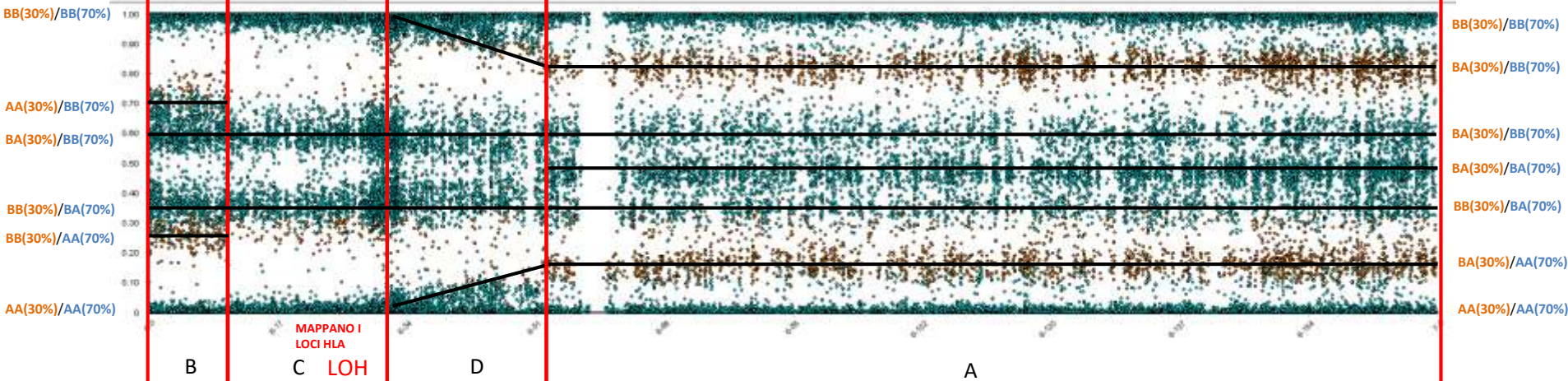
Eseguita FISH presso ospedale PTV con la collaborazione del campus biomedico, mostra trisomia del 2, 8, 9. Perdita dell'aplotipo NON condiviso evidenziata dalla metodica degli SNP-array.

Il braccio corto del cromosoma 6, nella regione 6pter → 6p12.2 ha mostrato un profilo di frequenza allelica peculiare, compatibile con LOH. La regione 6p24.3→6p21.33 (hg38:10 Mb-31.6 Mb), dove sono localizzati i loci HLA, ha mostrato la perdita selettiva degli alleli che il ricevente non condivideva con il donatore.

CASE REPORT n.1 70%DON/ 30% RECIPIENT ASPIRATO MIDOLLARE

■ RICEVENTE
■ DONATORE

■ RICEVENTE
■ DONATORE



B-Allele Frequency (BAF) del cromosoma 6. Rappresentazione grafica della frequenza dei polimorfismi biallelici SNP identificati dal sistema come B. Le frequenze alleliche presentano distribuzioni differenti permettendo di distinguere 4 regioni cromosomiche:

- 6p12.2 -> 6qter. Coesistenza di cellule del donatore (70% circa) e cellule del ricevente (30% circa). Evidenza di 7 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili tra il ricevente e il donatore aploidentico: 1, 0.85, 0.65, 0.5, 0.35, 0.15, 0
- 6pter -> 6p24.3. Presenza di LOH completa nelle cellule del ricevente, con perdita dell'allele condiviso con il donatore e duplicazione dell'allele NON condiviso. Evidenza di 6 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili: 1, 0.7, 0.65, 0.35, 0.3, 0
- 6p24.3 -> 6p21.33. Presenza di LOH completa nelle cellule del ricevente, con **perdita dell'allele NON condiviso con il donatore e duplicazione dell'allele condiviso**. Evidenza di 4 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili: 1, 0.65, 0.35, 0. Nella regione C mappano i loci HLA.
- 6p21.33 -> 6p12.2. Zona con LOH incompleta: coesistenza di cloni del donatore e di cloni del ricevente con SNP in LOH e in normale eterodisomia. In base all'estensione della regione in LOH nei diversi cloni del donatore, la frequenza dell'allele B si modifica progressivamente da 0 o 1 fino a convergere nelle due popolazioni 0.15 e 0.85 presenti in una normale condizione di eterodisomia in un chimerismo misto (come da regione A)

CASE REPORT 2

Caratteristiche cliniche

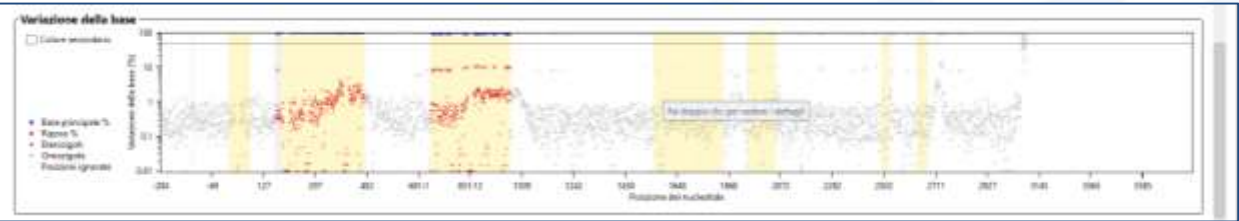
- Sesso: Femmina
- Età: 55 anni
- Diagnosi: Leucemia Mieloide Acuta (2018)
- Donatore: fratello aploidentico (2018)
- Recidiva : Luglio 2019

TIPIZZAZIONE HLA pre - post TMO del paziente C#1 in NGS		
	PAZ. PRE-TMO M#1	DONATORE M#2
HLA-A*	24:02:01, 69:01:01	24:02:01, 30:01:01
HLA-B*	40:01:02, 58:01:01	40:01:02, 50:01
HLA-C*	03:04:01, 03:02:02	03:04:01,06:02:01
DRB1*	13:02:01, 11:01:01	13:02:01,03:01:01
DQB1*	06:04:01, 03:01:01	06:04:01, 02:01



CASE REPORT n.2: NGS

<input checked="" type="checkbox"/> A*24:02:01:01, A*24:02:01:01	CHIMERA 18% DON M#3- POST-TMO
<input checked="" type="checkbox"/> B*40:01:02:01, B*40:01:02:01	24:02:01
<input checked="" type="checkbox"/> C*03:04:01:01, C*03:04:01:01	40:01:02
<input checked="" type="checkbox"/> DRB1*03:01:01:01, DRB1*13:02:01:01	03:04:01
<input checked="" type="checkbox"/> DRB3*03:01:01:01	13:02:01
<input checked="" type="checkbox"/> DQB1*06:04:01:01, DQB1*06:04:01:01	06:04:01
<input checked="" type="checkbox"/> DQA1*01:02:01:04, DQA1*01:02:01:04	
<input checked="" type="checkbox"/> DPB1*03:01:01:01, DPB1*03:01:01:01	
<input checked="" type="checkbox"/> DPA1*01:03:01:03, DPA1*01:03:01:03	



Perdita dell'intero complesso HLA (HLA classe I e/o classe II)

- Meccanismo genomico irreversibile
- L'LOH si verifica solo nelle cellule leucemiche e diventa rapidamente prevalente a livello clonale
- HLA Loss è controbilanciata dalla duplicazione dell'altro aplotipo (cambia il livello di espressione)

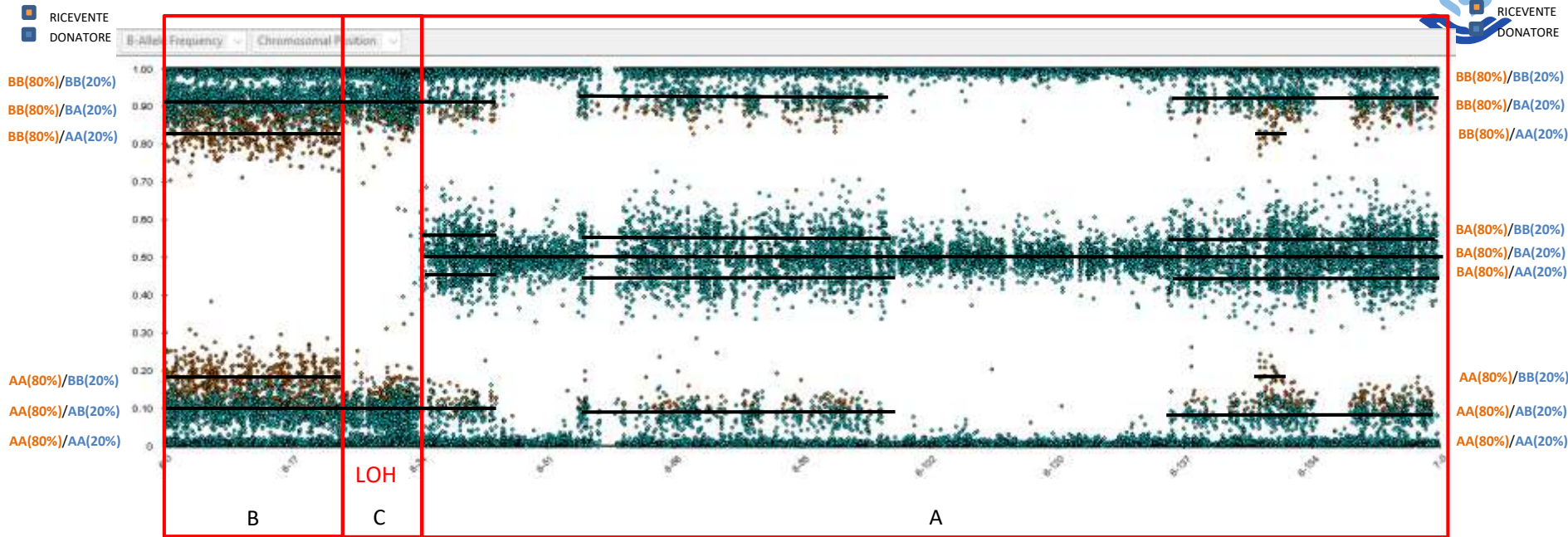
<input checked="" type="checkbox"/> A*24:02:01:01, A*30:01:01:01	CHIMERA 18% DON M#3-POST-TMO
<input checked="" type="checkbox"/> B*40:01:02:01, B*50:01:01:01	24:02:01,30:01:01
<input checked="" type="checkbox"/> C*03:04:01:01, C*06:02:01:02	40:01:02,50:01
<input checked="" type="checkbox"/> DRB1*03:01:01:01, DRB1*13:02:01:01	03:04:01,06:02:01
<input checked="" type="checkbox"/> DRB3*03:01:01:01	03:01,13:02:01
<input checked="" type="checkbox"/> DQB1*06:04:01:01, DQB1*06:04:01:01	02:01,06:04:01
<input checked="" type="checkbox"/> DQA1*01:02:01:04, DQA1*01:02:01:04	
<input checked="" type="checkbox"/> DPB1*03:01:01:01, DPB1*03:01:01:01	
<input checked="" type="checkbox"/> DPA1*01:03:01:03, DPA1*01:03:01:03	

CASE REPORT 2

Nessuna evidenza della tipizzazione dell'aplotipo non condiviso, nonostante la presenza del 18% di cellule del ricevente (NGS)

TIPIZZAZIONE HLA NGS			
	PAZ. PRE-TMO M#1	DON. M#2	CHIMERA 18% DON M#3-POST-TMO
HLA-A*	24:02:01, 69:01:01	24:02:01,30:01:01	24:02:01,30:01:01
HLA-B*	40:01:02, 58:01:01	40:01:02,50:01	40:01:02,50:01
HLA-C*	03:04:01, 03:02:02	03:04:01,06:02:01	03:04:01,06:02:01
DRB1	13:02:01, 11:01:01	03:01,13:02:01	03:01,13:02:01
DQB1*	03:01:01 ,06:04:01	02:01,06:04:01	02:01,06:04:01

CASE REPORT n.2: SNIP ARRAY APPLICATI NELL'LOH



B-Allele Frequency (BAF) del cromosoma 6. Rappresentazione grafica della frequenza dei polimorfismi biallelici SNP identificati dal sistema come B. Le frequenze alleliche presentano distribuzioni differenti permettendo di distinguere 3 regioni cromosomiche:

- 6p21.31 -> 6qter. Coesistenza di cellule del donatore (20% circa) e cellule del ricevente (80% circa). Evidenza di porzioni cromosomiche caratterizzate da 9, 7 e 3 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B. I profili sono relativi alle diverse combinazioni alleliche possibili per le regioni nelle quali ricevente e donatore (fratelli) condividono entrambi gli alleli (3 profili con frequenza 0, 0.1, 0.4, 0.5, 0.6, 0.9, 1), nessun allele (9 profili con frequenza 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9, 1) 6pter -> 6p24.3. Presenza di LOH completa nelle cellule del ricevente, con perdita dell'allele condiviso con il donatore e duplicazione dell'allele NON condiviso. Evidenza di 6 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili: 1, 0.7, 0.65, 0.35, 0.3, 0
- 6pter -> 6p22.3. Presenza di LOH completa nelle cellule del ricevente, con perdita dell'allele condiviso con il donatore e duplicazione dell'allele NON condiviso. Evidenza di 6 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili: 1, 0.9, 0.8, 0.2, 0.1, 0
- 6p22.3 -> 6p21.31. Presenza di LOH completa nelle cellule del ricevente, con **perdita dell'allele NON condiviso con il donatore e duplicazione dell'allele condiviso**. Evidenza di 4 distinte popolazioni relative alla frequenza stimata dell'allele B per le diverse combinazioni alleliche possibili: 1, 0.9, 0.1, 0. Nella regione C mappano i loci HLA.

CONCLUSIONI

- **LA DISOMIA UNIPARENTALE SEGMENTALE** è un evento genetico acquisito nella leucemia mieloide acuta recidivante.
- Necessaria un **SINERGIA** continua tra immunogenetista, ematologo e citogenetista per poter monitorare la recidiva e la valutazione in cui avviene esattamente LOH.
- In letteratura sono emerse delle **COMBINAZIONI ALLELICHE PIU' FREQUENTI ASSOCIATE ALLA 6p CN LOH**: HLA-B*14:02 e HLA-C*08:02, HLA-DRB1*07:01 e DQB1*02:02, alleli con una frequenza maggiore rispetto alla popolazione caucasica di controllo. **INSTABILITA' CROMOSOMICA**
- E' stato analizzato per il caso n.1, l'assetto dei recettori KIR per valutare se la perdita selettiva degli alleli HLA potesse causare una riduzione della potenziale attività di sorveglianza delle cellule NK dirette verso le cellule mutate. Dal momento che gli epitopi di classe I, ligandi dei recettori KIR, risultano uguali tra donatore e paziente, **LA REATTIVITA NK VIENE MANTENUTA.**
- Oggi la **TIPIZZAZIONE HLA in NGS**, ci permette di ottenere un **ELEVATO LIVELLO DI TIPIZZAZIONE HLA** e diventa essenziale caratterizzare funzionalmente quali differenze strutturali / incompatibilità siano funzionalmente rilevanti.



Campus Biomedico

Dott. Enrico Santinelli
Dott. Francesco Marchesi

Immunogenetica dei trapianti

Direttore Marco Andreani

Martina Mangione
Dott.ssa Mariarosa Battarra
Dott.ssa Maria Troiano
Dott.ssa Giustiniani Paola
Dott. G. Antonio Bianculli
Tecnico Testa Giuseppe
Tecnico Guagnano Annalisa
Tecnico Di Luzio Andrea
Tecnico Besi Francesca

Ringraziamenti

ONCOEMATOLOGIA OPBG

Direttore Franco Locatelli
Dott.ssa Rita Pinto

Genetica Medica OPBG

Direttore Antonio Novelli
Dott.ssa Viola Alesi Citogenetista
Dott.ssa Claudia Alicata



Tiziana Galluccio

Tiziana.galluccio@opbg.net

U.O.S. Laboratorio d'Immunogenetica dei Trapianti
presso U.O.C. Oncoematologia, Trapianto Emopoietico e Terapie
Cellulari
IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma RM
Tel. 06/68594256



Ospedale PTV-Tor Vergata

Direttore Raffaella Cerretti
Dott. Gottardo De Angelis
Dott.ssa Pannetta Paola Citogenetista





Tiziana Galluccio

Tiziana.galluccio@opbg.net

U.O.S. Laboratorio d'Immunogenetica dei Trapianti
presso U.O.C. Oncoematologia, Trapianto Emopoietico e Terapie Cellulari
IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma RM
Tel. 06/68594256



Bambino Gesù
OSPEDALE PEDIATRICO