

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

IL RUOLO DEL POLIMORFISMO HLA-G 14bp NELL'INVECCHIAMENTO

R. Rizzo,¹ M. Stignani,¹ L. Melchiorri,¹ A. Bontadini,²
A. Balboni,¹ M.T. Grappa,¹ A. Paparella,¹ R. Conte,²
O.R. Baricordi¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara, Via L. Borsari, Ferrara;
²Immunematologia e Servizio di Medicina Trasfusionale, Ospedale S. Orsola Malpighi, Via Massarenti, Bologna

Nel corso dell'invecchiamento, l'azione combinata di fattori intrinseci, ormoni e mediatori dell'infiammazione induce l'aumento di condizioni infiammatorie con una conseguente maggiore suscettibilità alle malattie.¹ L'infiammazione cronica rappresenta infatti un marker di differenti patologie associate all'invecchiamento come l'Alzheimer e il Parkinson che congiuntamente all'arterosclerosi e alle cardiopatie condizionano pesantemente l'aspettativa di vita. Recentemente, l'evidenza di una relazione negativa tra genotipi pro-infiammatori e l'invecchiamento ha confermato l'importanza dei meccanismi infiammatori nei soggetti anziani.² Gli antigeni HLA-G sono glicoproteine eterodimeriche presentanti peptidi, associate non covalentemente alla $\beta 2$ -microglobulina, caratterizzate da un polimorfismo proteico di soli 15 alleli, dalla presenza di diverse isoforme da splicing alternativo del mRNA ed una ristretta distribuzione tissutale. Le molecole HLA-G, sia di membrana (HLA-G1) che solubili (sHLA-G1 da taglio proteolitico e HLA-G5 da splicing alternativo), hanno evidenziato funzioni tolerogeniche nei confronti della risposta cellulare innata ed adattativa. È stata dimostrata la capacità inibitrice delle molecole HLA-G nei confronti dell'attività citotossica delle cellule natural killer, dei linfociti T CD8+ e di controllo dell'alloproliferazione dei linfociti T CD4+. La produzione quantitativa delle molecole HLA-G è regolata da un polimorfismo di inserzione/delezione di 14 paia di basi (14bp) localizzato nella regione 3' non tradotta del gene HLA-G.³ L'inserzione di 14bp risulta associata ad una instabilità dell'mRNA specifico con una conseguente ridotta produzione proteica. Sulla base di tali presupposti abbiamo analizzato l'ipotesi di un possibile ruolo del polimorfismo HLA-G 14bp nei complessi meccanismi che regolano il raggiungimento di un'età avanzata.

Materiali e Metodi. Due gruppi di soggetti sani, suddivisi in base all'età in inferiori ai 30 anni (n=149; uomini n=58; donne n=91; età media = 22.5±5.5 anni) e superiori ai 75 anni d'età (n=183; n=94; donne n=89; età media = 82.5±5.3 anni), sono stati genotipizzati, mediante PCR specifica, per il polimorfismo inserzione/delezione di 14bp del gene HLA-G3. I livelli plasmatici di HLA-G solubile (sHLA-G) sono stati analizzati mediante tecnica immunoenzimatica con l'anticorpo monoclonale MEM-G9 (Exbio, Praha), specifico per le isoforme sHLA-G1 e HLA-G5, 3 in un gruppo di soggetti sani con un'età compresa tra i 19 ed i 75 anni (n=154; uomini n=83; donne n=71; età media = 40.1±12.3 anni), studiati anche per i livelli plasmatici di IL-10.

Risultati. I due gruppi di soggetti sani con età diverse hanno presentato una frequenza simile dei 3 genotipi HLA-G 14bp. Comunque, il confronto tra i due sessi ha evidenziato una diminuita frequenza del genotipo +14/+14bp nei soggetti maschili anziani rispetto a quelli con età inferiore a 30 anni ($p=0.004$, OR=0.41; CI 95% = 0.1675-1.014). Nessuna differenza significativa è stata invece osservata nella distribuzione dei genotipi nella popolazione femminile. Inoltre, nell'ambito dei soggetti con età superiore ai 75 anni è stata riportata una frequenza significativamente diminuita del genotipo +14/+14bp nei maschi rispetto alle femmine ($p=0.03$, OR=0.43; CI 95%=0.1915-1.004). Entrambi i dati concordano quindi con l'ipotesi di un effetto negativo mediato dal genotipo +14/+14bp nell'aspettativa di vita dei soggetti maschili. L'ipotesi della presenza di uno specifico microambiente femminile, capace di controbalanciare l'effetto negativo del

genotipo +14/+14bp, è stata supportata dai dati ottenuti dalle analisi effettuate nel plasma. È stata infatti osservata una concentrazione più alta di molecole solubili HLA-G nei soggetti femminili ($p=0.0001$; Test U di Mann-Withney) rispetto a quelli maschili. In particolare, nel plasma dei soggetti femminili con genotipo +14/+14bp sono stati rilevati livelli di HLA-G5/sHLA-G1 più elevati (mediana 48.5 ng/mL, range 7.3-97.6 ng/mL) rispetto ai soggetti maschili (15.3 ng/mL, range 2.2-30.3 ng/mL) ($p=0.016$; Test U di Mann-Withney). Inoltre, a conferma della diversità del microambiente in relazione al sesso, è stata anche osservata una maggiore frequenza di campioni plasmatici dei soggetti femminili positivi per la presenza di IL-10, uno dei maggiori up-modulatori delle molecole HLA-G (soggetti femminili: 43/71 = 60.6% vs soggetti maschili: 19/83 = 22.9%; $p=1.8 \times 10^{-6}$; Test esatto di Fisher). I livelli di sHLA-G e di IL-10 sono risultati significativamente correlati ($\rho = 0.327$, $p < 0.0001$); Analisi di correlazione di Spearman), confermando la stretta relazione tra queste molecole. **Conclusioni.** I risultati ottenuti suggeriscono quindi un possibile ruolo funzionale del polimorfismo HLA-G 14bp nel regolare il raggiungimento di un'età avanzata e propongono la presenza di uno specifico microambiente femminile, che garantirebbe una maggiore capacità di produzione di molecole HLA-G influenzando positivamente l'aspettativa di vita.

Bibliografia

1. Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age related diseases. *Immun Ageing* 2005; 2:8.
2. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano A, Candore G, Bonafè M, et al. Inflammation, genetics, and longevity: further study on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoters SNP and its interaction with TNF- α -308 promoter SNP. *J Med Genet* 2003; 4: 296-9.
3. Rizzo R, Hviid TVF, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, et al. Relationship between HLA-G genotype and IL-10 levels in soluble HLA-G expression. *Immunogenetics* 2005; 57:172-81.

ANALISI DELLA MOBILIZZAZIONE DI PROGENITORI EMPOIETICI IN DONATORI SANI: INDICAZIONI PER LA PIANIFICAZIONE DELLE STAMINOAFERESI

L. Santoleri, G. Inghilleri, R. Corneo, G. Bottagisio,
P. Marengo, P. Pedrazzoli, G. Ferrioli, L. Pezzetti,
B. Scarpati, M. Romiti, S. Bellotti, S. Siena, E. Morra

Dipartimento Oncologico, Azienda Ospedaliera Niguarda Cà Granda, Milano

Il crescente utilizzo di protocolli chemioterapici di condizionamento ad intensità ridotta nel trapianto di midollo emopoietico (TMO), il cui successo terapeutico è strettamente legato all'effetto *grafi versus tumor* mediato dai T-linfociti, ha implicato un conseguente aumento di TMO con progenitori emopoietici circolanti (PEC), che come noto contengono una quota T-linfocitaria molto superiore al midollo. Fino ad un recente passato la raccolta di PEC, dopo mielostimolazione con G-CSF, era autorizzata solo nei donatori parentali, mentre era possibile nei donatori non consanguinei solo in caso di seconda donazione per lo stesso ricevente. Dal 01/01/2005 è divenuto attuativo un protocollo dell'Italian Bone Marrow Donor Registry (IBMMDR),¹ che prevede la raccolta di PEC da donatori non parentali anche in occasione della prima donazione. Va sottolineato che il TMO da donatore non parentale di PEC pone una serie di problematiche. Innanzitutto si ritiene etico, soprattutto in caso di donazione non parentale, cercare di somministrare i dosaggi minimi di G-CSF utili al raggiungimento del target di raccolta. Inoltre, è necessario programmare i giorni di raccolta prima dell'inizio della mielostimolazione, per sincronizzare le aferesi con il TMO dal momento che: 1) generalmente le staminoaferesi ed il TMO avvengono in due ospedali diversi; 2) il congelamento dei PEC raccolti non è consentito dal protocollo IBMMDR; 3) non si possono effettuare più di due stami-

noafesi consecutive, poiché una prolungata conservazione dei PEC a +4°C provoca un eccessivo decadimento della vitalità cellulare. Pertanto, il fenomeno della mobilizzazione nel donatore sano è stato oggetto di vari studi,^{2,5} che tuttavia non hanno prodotto indicazioni unanimi. Anche presso il nostro Servizio è stato condotto uno studio retrospettivo sui donatori di PEC, con l'obiettivo di valutare l'impatto di alcune caratteristiche biologiche quali sesso ed età sulla mobilizzazione di PEC, e definire quale sia, dall'inizio della mielostimolazione, la giornata in cui si osservi una mobilizzazione ottimale e dunque in cui sia opportuno programmare la prima seduta aferetica.

Materiali e Metodi. Sono stati analizzati i dati relativi a donazioni di PEC effettuate nel periodo 01/01/2002 - 31/05/2005. Il protocollo di mobilizzazione ha previsto la somministrazione di G-CSF al dosaggio di 10 microg/Kg/die, in due dosi giornaliere rifratte. Il monitoraggio della mobilizzazione di PEC è stato effettuato mediante la conta giornaliera con metodica citofluorimetrica (metodo ISHAGE) delle cellule CD34+ circolanti. Il monitoraggio è iniziato a partire dal giorno +3 o +4 dall'inizio della mielostimolazione, quando è stato raggiunto un valore di leucociti >20x10⁹/L. Al fine di definire l'impatto di età e sesso sulla mobilizzazione sono stati considerati, per ciascun donatore, i picchi di mobilizzazione di cellule CD34+ (espressi come CD34/microL) osservati in corso di monitoraggio. Inoltre, per definire i giorni di mobilizzazione ottimale, è stato calcolato, per ogni giorno compreso tra +3 e +5 dall'inizio della mielostimolazione, il valore medio delle concentrazioni di cellule CD34/microL osservate nei soggetti monitorati. L'analisi statistica delle differenze tra popolazioni a confronto è stata effettuata con il T-student test. Le raccolte di PEC sono state effettuate con separatori COBE Spectra (software 4.7), quando la mobilizzazione era > 20 CD34/microL. Il target di raccolta era > 4x10⁶ CD34/kg di peso corporeo del ricevente.

Risultati. Sono state analizzate le mobilizzazioni di 44 donatori (43 parentali ed 1 non consanguineo), con età media di 48.84±11.18 anni. Il valore medio di CD34/microL osservato nei maschi è risultato di 53.02±38.79, mentre nelle donne di 59.64±29.44 (p NS). È stata analizzata la mobilizzazione media di PEC nelle varie fasce d'età (Tabella 1). In 8/44 donatori non è stato possibile completare il programma di raccolta entro la giornata +5, per cui è stato determinato il conteggio delle CD34+ circolanti anche in giornata +6, con un valore medio di 18.2±8.3 CD34/microL. È stato raggiunto il target di raccolta in 37/44 (84%) donatori (raccolta media = 6.4 + 2.6 CD34x10⁶/Kg del ricevente). I 7 donatori che non hanno raggiunto il target avevano un'età media di 61±7 anni (raccolta media = 3.3±0.6 CD34x10⁶/Kg del ricevente). Nell'84% (37/44) dei donatori il target è stato raggiunto con un massimo di 2 aferesi. Di questo gruppo 31 (70% del totale dei donatori studiati) hanno iniziato la raccolta in giornata +4, e 6 (14%) in giornata +5. Dei donatori che hanno effettuato la prima aferesi in +4 il 35% (13/37) ha concluso il programma di raccolta con una sola procedura, risultato che è stato ottenuto in 4 dei 6 donatori raccolti a partire dal giorno +5. Sono state effettuate 3 aferesi in 7/44 (16%) donatori, di cui 6/7 hanno effettuato la prima in giornata +4 e solo 1 in giornata +5.

Conclusioni. secondo alcuni Autori nei soggetti di sesso maschile si osserva una migliore mobilizzazione di PEC rispetto a quelli di sesso femminile², mentre nella nostra esperienza la differenza tra i due sessi non è statisticamente significativa. I risultati pubblicati in letteratura sono controversi anche circa la correlazione tra età e mobilizzazione, poiché secondo alcuni Autori³, e secondo quanto osservato nel nostro Studio, i soggetti di età superiore a 50 anni mobilizzano meno dei soggetti più giovani, mentre secondo altri Autori⁴ non vi è alcuna correlazione tra età e mobilizzazione. Per quanto riguarda la programmazione della prima seduta aferetica, alcuni Autori^{3,5} e lo stesso IBMDR1 raccomandano di eseguire la prima raccolta di PEC in giornata +5. Secondo la nostra esperienza, nei donatori sani, sembra indicato effettuare la prima aferesi in giornata +4 dall'inizio della mielostimolazione, momento che coincide con un elevato grado di mobilizzazione che si mantiene in +5. Inoltre, l'esecuzione della

prima aferesi in +4 consente di ridurre le dosi di G-CSF somministrate, qualora si raggiunga il target di raccolta con un'unica procedura (35% dei casi), ed in caso contrario di effettuarne una seconda in +5 in presenza di una mobilizzazione di PEC ancora ottimale. È infine da rilevare che anche nel gruppo di donatori in cui la raccolta di PEC è stata iniziata nel giorno +5, nel 33% (2/6) dei casi è stato necessario eseguire 2 staminoafesi per raggiungere il target di raccolta, stimolando il donatore sino alla giornata +6. In conclusione, nei casi in cui sia necessario stabilire i giorni di raccolta prima dell'inizio della mielostimolazione così come avviene nel caso della donazioni di staminali periferiche da donatore non parentale (secondo il protocollo IBMDR), si ritiene indicato, specie nel caso di donatori di età inferiore a 50 anni, programmare la prima aferesi in +4 evitando così al donatore un inutile prolungamento della mielostimolazione.

Tabella 1.

Età	N° donatori	CD34/microL (media±DS)
18-40 anni	15	62.96±19.52
40-50 anni	6	92.95±59.23
50-60 anni	17	41.34±22.20
> 60 anni	6	41.20±40.44

Tabella 2.

	Età 18-50 anni (N° donatori = 21)	Età > 50 anni (N° donatori = 23)	p (T-student)
CD34/μL (media±DS)	71.53±36.56	41.31±27.02	<0.05

Tabella 3.

	Giorno +3 22 determinazioni	Giorno +4 39 determinazioni	Giorno +5 31 determinazioni
CD34/μL (media±DS)	10.86±5.87	47.10±27.61	48.16±38.70

Bibliografia

- Standard di funzionamento dell'IBMDR (revisione gennaio 2006).
- Martino M, Morabito F, Callea I, et al. Harvesting peripheral blood progenitor cells from healthy donors with a short course of recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion Medicine* 2005; 15: 323-8.
- Lysák D, Koza V, Jindra P. Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. *Transfusion and Apheresis Science* 2005; 33: 275-283.
- Kröger N, Renges H, Kröger W, et al. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte-stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation *Br J Haematol* 2000; 111: 761-5.
- Stroncek DF, Clay ME, Herr G. The kinetics of G-CSF mobilization of CD34+ cells in healthy people *Transfus Med* 1997; 7: 19-24.

HLA DPB1 E RISPOSTA A TERAPIA AFERETICA IN PAZIENTI AFFETTI DA COLITE ULCEROSA

G. Menardi,¹ L. Perotti,¹ M. Prucca,¹ D. Marenchino,¹ L. Maddalena,¹ R. Balbo,¹ A. Manca,² R. Pulitanò,² G. Peano¹
¹Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale; ²Divisione di Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera S. Croce e Carle, Cuneo

Le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD) sono caratterizzate da un'anomala risposta immunologico/infiammatoria nei confronti di antigeni comunemente presenti nel lume intestinale. A causa di una perdita della tolleranza o di un'alterata permeabilità intestinale, viene attivata la risposta immune senza che si verifichino i normali meccanismi di controllo della risposta stessa con conseguente processo infiammatorio cronicamente attivato. Studi epidemiologici e di linkage hanno suggerito che i fattori genetici giocano un ruolo chiave nel determinare la suscettibilità alle IBD. In letteratura è dimostrato che la leucoferesi selettiva su colonna rappresenta un trattamento capace di condizionare la remissione di malattia in pazienti affetti da colite ulcerosa (UC) non responder alle terapie convenzionali. Presso il SIMT di Cuneo da alcuni mesi i pazienti affetti da UC sono trattati utilizzando un sistema aferetico modificato in grado di rimuovere, in unica seduta combinata, linfociti e citochine infiammatorie. Al fine di individuare possibili alleli predisponenti alla patologia e l'eventuale correlazione con i risultati terapeutici ottenuti, abbiamo studiato i pazienti sia per HLA che per alcuni microsatelliti o STR (Short Tandem Repeat).

Materiali e Metodi. 9 pazienti con UC (7 con rettocolite ulcerosa e 2 con pancolite), avviati al trattamento aferetico dalla Divisione di Gastroenterologia, sono stati tipizzati per HLA-A*, B*, Cw*, DRB*, DQA1*, DQB1* e DPB1* con tecniche di PCR-SSP e SSO in bassa ed alta risoluzione (Elpha Biotest, GenoVision Biospa) e per i seguenti STR: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA (AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit). Successivamente i pazienti trattati sono stati divisi in 2 gruppi a seconda della remissione (sei casi) o non remissione (tre casi) della patologia dopo trattamento aferetico.

Risultati e Conclusioni. la tipizzazione HLA non ha mostrato alcuna correlazione con gli alleli HLA di classe I; per quanto riguarda lo studio degli alleli di classe II, tutti i pazienti affetti da rettocolite ulcerosa sono risultati positivi agli aplotipi correlati alla malattia celiaca (1-3): due pazienti posseggono gli aplotipi classici DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 e DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*0301 (28.6%); 5 pazienti sono portatori degli aplotipi non classici DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 (3 pazienti, 42.8%) e DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505 (2 pazienti, 28.6%). I 2 pazienti con pancolite risultano negativi per detti aplotipi. Per quanto riguarda i risultati della terapia aferetica, i pazienti che sono andati in remissione non hanno evidenziato alcuna correlazione con gli alleli HLA di classe I, DRB o DQB1 mentre tutti risultavano HLA-DPB1*04 positivi, a differenza dei pazienti che non hanno avuto alcun beneficio dalla terapia aferetica, di cui nessuno risultava HLA-DPB1*04 ($p=0.0061$). Lo studio dei microsatelliti mette in risalto che l'allele 13 del microsatellite vWa, situato sul braccio corto del cromosoma 12 è presente in 6 di 7 pazienti affetti da UC (frequenza allelica 0.4286), rispetto alla normale distribuzione nella popolazione di 0.2245 ($p=0.0141$). La stessa cosa vale per l'allele 17 del microsatellite D16S539 situato sul braccio lungo del cromosoma 16 con frequenza allelica 0.4286 rispetto a quella della popolazione 0.1595 ($p=0.0203$). Questi risultati pur essendo preliminari e riferiti ad una casistica ridotta, mettono in evidenza una possibile correlazione degli aplotipi HLA correlati alla celiachia con una patologia infiammatoria dell'intestino quale la rettocolite ulcerosa ed evidenziano come la tipizzazione HLA-DPB1 possa risultare utile nello screening dei pazienti da sottoporre a terapia con linfocito-plasmaferesi. Lo studio dei microsatelliti conferma che pos-

sibili geni correlati alle IBD possono essere situati sui cromosomi 12 e 16, come già evidenziato da altri autori⁴ con microsatelliti diversi. Inoltre in questa casistica risulta che anche sul cromosoma 18 potrebbero essere presenti eventuali geni correlati a UC: infatti l'allele 13 del microsatellite D18S51 presenta una frequenza allelica 0.4286 più elevata rispetto a quella della popolazione normale, 0.179 ($p=0.0422$).

Bibliografia

1. Louka AS, Sollid LM. Tissue Antigens, 2003; 61:105-17.
2. Zubillaga P. et al., Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2002; 34:548-54.
3. Karell K. et al., Human Immunology, 2003; 64:469-77.
4. Annese V et al., J Med Genet 2003; 40:837-41.

INTRODUZIONE DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER L'ESTRAZIONE DEL DNA NEL LABORATORIO DI ISTOCOMPATIBILITÀ

T. Valentini, A. Moschetti, O. Loreti, M.R. Gallone, M. Mariani, C. De Sanctis

Laboratorio HLA - SIMT, Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma

Nel nostro laboratorio si esegue la tipizzazione molecolare dei geni che codificano per le proteine di membrana del sistema HLA su : pazienti avviati al trapianto, campioni di sangue cordonale, donatori di midollo osseo, pazienti con malattie genetiche e autoimmuni ed inoltre lo studio dei maggiori antigeni piastrinici ed eritrocitari. L'attività principale è rappresentata dalla tipizzazione molecolare dei loci HLA di classe I e II dei pazienti ematologici e del loro nucleo familiare, finalizzata all'individuazione di soggetti compatibili alla donazione di midollo osseo e, nei casi di assenza di un familiare compatibile, della tipizzazione molecolare di donatori di midollo osseo non correlati (Marrow Unrelated Donor, MUD). L'estrazione del materiale genomico rappresenta la fase preliminare delle metodiche di biologia molecolare e il DNA estratto deve essere di ottima qualità e in quantità adeguata per eseguire le tecniche di PCR-SSP e PCR-SSO utilizzate in laboratorio. Recentemente, l'incremento del numero di campioni da analizzare, ha reso necessaria l'introduzione di un sistema automatico di estrazione del DNA da affiancare alla tradizionale metodica del Salting-Out.

Materiali e Metodi. Dal 1° marzo 2005 è in uso nel nostro laboratorio un sistema automatico a marchio EASY DNA HAMILTON MICROLAB® SAMPLER SC (distribuito dalla Soc. Essemmedical S.r.l.) per l'estrazione del DNA da sangue periferico (PB) e cordonale (SCO), dotato di un separatore magnetico termostato interno AGOWA® SEP BOX 7200 che prevede l'impiego del kit di estrazione AGOWA® mag MAXI Isolation Kit Plus per un massimo di 288 campioni e di un software dedicato MicroLab-EASY DNA. Tale sistema è basato sull'utilizzo di biglie magnetiche costituite da un nucleo di Fe₃O₄ e ricoperte da una matrice legante il DNA. Il procedimento di estrazione prevede le seguenti fasi:

- 1) trattamento dei campioni con buffer per l'arricchimento in linfociti con una diluizione 1: 2 per i campioni di sangue periferico e di 1:5 per i campioni di sangue cordonale;
- 2) lisi con proteinasi e tamponi di lisi e successiva aggiunta di biglie magnetiche a cui si lega il DNA;
- 3) lavaggi per eliminare i residui di proteine, polisaccaridi e lipidi;
- 4) essiccazione del DNA legato alle biglie;
- 5) eluizione del DNA con buffer e raccolta del materiale genomico.

La prima fase viene eseguita manualmente al fine di ottenere una maggiore resa dell'arricchimento del campione, mentre le successive vengono svolte in completa automazione. Ogni seduta prevede la possibilità di lavorare un massimo di 32 campioni in circa 5 ore, compresa la fase manuale. Il DNA così ottenuto è immediatamente disponibile per l'uso del laboratorio.

Tabella 1.

N° Campioni estratti		Campioni/seduta media	A260/A280 media		Concentrazione DNA media ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		Quantità DNA media (μg)	
587		22,6						
PB	SCO		PB	SCO	PB	SCO	PB	SCO
464	123		1,78	1,79	0,075	0,11	9,75	14,3
			(DS \pm 0,09)	(DS \pm 0,05)	(DS \pm 0,06)	(DS \pm 0,08)		

Materiali e Metodi. In un anno di attività abbiamo estratto con il sistema automatico EASY DNA e kit AGOWA, 587 campioni di cui 464 di sangue periferico e 123 di sangue cordonale con una media di 22,6 campioni estratti per ogni seduta. Il volume di partenza è stato di 3 ml per i campioni di sangue periferico e di 800-1000 μL per i campioni di sangue cordonale. Al termine di ogni seduta il DNA estratto dai campioni era risospeso in un volume totale di 130 μL . La quantità e la purezza del materiale genetico sono state valutate allo spettrofotometro. La concentrazione media di DNA è stata di 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (DS \pm 0,06) per i campioni di PB e di 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (DS \pm 0,08) per i campioni di SCO, che corrisponde rispettivamente ad una quantità totale media di DNA di 9,75 μg per il sangue periferico e di 14,3 μg per quello cordonale. La purezza, calcolata dal rapporto A260/280, è stata di 1,78 (DS \pm 0,09) per il PB e di 1,79 (DS \pm 0,05) per lo SCO come valore medio. Nella Tabella 1 sono riassunti i dati ottenuti.

Conclusioni. Il sistema automatico EASY DNA presenta importanti vantaggi:

- facilità di esecuzione;
- utilizzo di reagenti chimici non tossici;
- svolgimento di tutte le fasi della metodica a temperatura ambiente;
- possibilità di estrarre un elevato numero di campioni in tempi brevi;
- ridotte dimensioni dello strumento;
- DNA ottenuto pronto all'uso;
- software di facile utilizzazione.

Nella nostra esperienza il DNA estratto è stato impiegato nelle metodiche di PCR-SSP e PCR-SSO applicate alla tipizzazione degli antigeni del sistema HLA, dei gruppi eritrocitari e piastrinici. Le reazioni di amplificazione eseguite sono state estremamente soddisfacenti e l'assenza di episodi di mancata amplificazione conferma l'ottima qualità del prodotto di estrazione. La quantità di DNA ottenuta è stata sufficiente per eseguire tutti i test di routine di laboratorio. Nei pazienti candidati al trapianto di midollo e dei relativi donatori MUD, è stato necessario utilizzare più campioni per ottenere la quantità di DNA sufficiente all'esecuzione dei numerosi tests di amplificazione. Alla luce della nostra esperienza, possiamo affermare che in un laboratorio di tipizzazione tissutale, l'introduzione del sistema automatico EASY DNA è uno strumento indispensabile per ottimizzare i tempi operativi della fase di estrazione; ciò consente una migliore gestione del flusso operativo con una più efficiente organizzazione dell'attività del laboratorio.

Bibliografia

- Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225.
- De Vreese K, Baryski et al: Performance characteristics of updated INNO LiPA assays for molecular typing of human leucocyte antigen A (HLA-A), HLA-B and HLA-DQB1 alleles. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:430.
- Miller S, Dykes D, Polesky H: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;16:1215.

STUDIO PRELIMINARE SUL MATCHING TRA DONATORI NON CORRELATI E RICEVENTI NEL TRAPIANTO DI CSE

S. Fornaciari,¹ M. Curcio,¹ M. De Donno,¹ S. Davini,¹ F. Papineschi,² E. Benedetti,² C. Favre,³ M. Nardi,³ F. Scatena,¹ M.L. Mariotti¹

¹U.O. Immunematologia II – A.O.U. Pisana; ²U.O. Ematologia – A.O.U. Pisana; ³U.O. Oncoematologia Pediatrica – A.O.U. Pisana

Il trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (CSE) da donatore non correlato può costituire il trattamento di elezione in patologie linfoematopoietiche e nei disordini congeniti quando non sia possibile individuare un fratello compatibile.¹⁻³ Grazie alla sensibilizzazione di un numero sempre maggiore di individui nei confronti di tale problematica si è raggiunta una considerevole espansione dei registri di donatori di CSE sia in Italia sia all'estero, che fa sì che per ciascun ricevente sia possibile individuare uno o più donatori. La probabilità di match per i loci HLA-A, B, DRB1 tra un ricevente ed almeno un donatore cresce infatti in funzione del logaritmo del pool di donatori.⁴ Tecniche di biologia molecolare ad alta risoluzione, unitamente al sequenziamento diretto, vengono utilizzate per la tipizzazione del DNA non solo a livello dei suddetti loci, ma anche dei loci HLA-C, DPB1, DRB, DQB1, identificando matches e mismatches non valutati nella valutazione primaria e che permettono perciò una selezione più accurata del donatore più idoneo e quindi, come emerge da studi recenti, di aumentare la probabilità di riuscita del trapianto.⁴ Scopo del presente lavoro è stato la creazione di un data base che permettesse di valutare e visualizzare nel modo più chiaro possibile il campione di potenziali donatori (selezionati nel corso del biennio 2004 – 2005 dai nostri centri trapianto PI 01 - Ematologia Pediatrica e PI02 – Ematologia Adulti) per i pazienti tipizzati presso il nostro Laboratorio di Immunogenetica. La tabulazione di questi dati ha permesso di effettuare un'analisi preliminare del grado di match tra ricevente e donatore non correlato che in futuro potrà essere sviluppata in una analisi non solo descrittiva ma anche statistica.

Materiali e Metodi. Il nostro studio ha preso in esame un campione di 39 pazienti affetti da disordini ematologici, di cui 3 di nazionalità estera (questi ultimi provenienti dall' U.O. di Oncoematologia Pediatrica). Come da nostro protocollo interno, ciascun soggetto in esame è stato sottoposto ad un'indagine suddivisibile in due steps: 1 – tipizzazione molecolare in bassa risoluzione dei loci HLA-ABC/DRB1DQB1 di un primo campione di DNA; 2 – tipizzazione molecolare in alta risoluzione e sequenziamento diretto dei loci suddetti e del locus DPB1, su di un secondo campione di DNA. Per la tipizzazione dei donatori (90) si è utilizzato il medesimo campione per entrambi gli steps sopraindicati. Nel nostro laboratorio i campioni di DNA sono ottenuti con estrazione da sangue periferico con la metodica del Salting-out e processati con PCR-SSP con l'uso di Kit diagnostici (Biotest e Protrans per la bassa risoluzione, Olerup e Protrans per l'alta risoluzione, Kit SBT Protrans per il Sequenziamento Diretto). Una volta ottenuta la tipizzazione si è provveduto alla compilazione del database nel quale i dati di ogni ricevente sono stati accoppiati a quelli dei donatori selezionati, in modo da visualizzare e quantificare facilmente il numero di match e mismatch e successivamente calcolare

il grado di mismatch tra riceventi e donatori.

Risultati e conclusioni. Dalla nostra analisi è emerso che per ognuno dei pazienti in studio sono stati selezionati, in media, 2,30 potenziali donatori, ognuno dei quali, a sua volta, presenta una media di 3,36 mismatch sui 14 match totali nei confronti del proprio ricevente (considerando gli alleli precedentemente citati). Esaminando la compatibilità donatore-ricevente è stato osservato il 26% di mismatch, così scomposto: HLA-A 12,2%, B 18,8%, C 39,4%, DRB1 6,6%, DQB1 14,4%, DPB1 66,1%, DRB3 10,0%, DRB4 1,1%, DRB5 4,4%. La percentuale di mismatch scende al 20% qualora si vada a considerare soltanto i donatori (42) ed i riceventi italiani (36), ed è così distribuita: HLA-A 9,5%, B 14,2%, C 26,1%, DRB1 4,7%, DQB1 8,3%, DPB1 66,6%, DRB3 13,0%, DRB4 0%, DRB5 1,1%. Dal confronto, invece, tra i riceventi italiani (36) ed i donatori esteri (44) il totale dei mismatch risulta essere 173 a cui corrisponde una percentuale del 28%: HLA-A 15,9%, B 22,7%, C 52,2%, DRB1 6,8%, DQB1 17,0%, DPB1 65,9%, DRB3 5,6%, DRB4 2,2%, DRB5 7,9%. Per i 3 riceventi stranieri sono stati selezionati solo donatori di origine estera. Questo studio preliminare ha permesso di quantificare il grado di mismatch di un campione di donatori e riceventi, limitatamente ad un biennio, e sul quale attualmente è in atto un'indagine ulteriore rivolta a verificare in che modo l'outcome del trapianto possa essere relazionata al grado ed al tipo di mismatch. Emerge che la percentuale più elevata di mismatch (28%) si ottiene confrontando le tipizzazioni di pazienti italiani e donatori esteri e risulta essere di ben 8 punti percentuale più alta rispetto a quella relativa al confronto tra pazienti e riceventi italiani. Sebbene l'esiguità del campione non abbia permesso un'analisi statistica dei dati, tuttavia questo risultato ci consente di confermare quanto già emerso nella letteratura attualmente disponibile, ossia che il grado di mismatch è riconducibile anche a differenze etniche tra riceventi e donatori non correlati.

Bibliografia

1. Ash RC, Casper CR, Hansen R, Bunin N, Truitt RL, Langton C, Murray K, et al. Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *N Engl J Med* 1990;322:485-94.
2. Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift FA, Petersdorf EW, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:962-68.
3. Ansetti C. Advances in unrelated donor hematopoietic cell transplantation: improved matching and use of blood stem cell. *Haematologica* 2002;87: 1-3.
4. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz MM, et al. Impact of HLA-Class I and Class II high resolution matching on outcome of unrelated donor BMT. *Blood* 2001;98:813.

NUOVE STRATEGIE PER IL SEQUenziAMENTO DEI GENI DEL SISTEMA MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ

P. Caropreso,¹ M. Berrino,¹ F. Bertinetto,¹ R. Chidichimo,¹ E. Garino,¹ G. Mazzola,¹ F. Tondat,¹ A. Amoroso²

¹S.C. Immunologia dei Trapianti, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino; ²Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università degli Studi di Torino

Il successo ottenuto nello sviluppo di nuove tecnologie per il sequenziamento diretto del genoma umano (PCR-SBT) ha incrementato in modo significativo il numero di alleli HLA e di conseguenza il numero di ambiguità nei risultati di tipizzazione.¹ I kit di sequenziamento del sistema HLA validati per la diagnostica (marchio CE) non permettono al momento di sequenziare separatamente due alleli dello stesso locus; di conseguenza le sequenze presentano più punti eterozigoti, che portano ad un risultato di tipizzazione non univoco. Inoltre non è possibile risolvere le ambiguità nel caso in cui il polimorfismo si trovi al

di fuori della regione sequenziata. Al momento attuale una strategia per risolvere le ambiguità derivanti da una tipizzazione ottenuta con tecnica SBT è quella di ricorrere a kit SSP in alta risoluzione. Questa è la via attualmente adottata nel nostro laboratorio, che si avvale dell'utilizzo dei kit prodotti dalla ditta Atria (Atria Genetics, Inc., South San Francisco, CA, USA), distribuiti dalla ditta Abbott (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) e dei kit PCR-SSP (Dynal Biotech Ltd., Wirral, UK) in alta risoluzione. I nuovi sviluppi nel campo della tecnica di sequenziamento automatico sono rivolti alla progettazione di sistemi di sequenziamento mono-allelico in grado di risolvere almeno in parte le ambiguità. A tale scopo, l'oggetto di questo studio è stato quello di valutare i kit di risoluzione delle ambiguità proposti dalla ditta Atria.

Materiali e Metodi. La casistica è costituita da pazienti affetti da malattie ematologiche maligne e da donatori di cellule staminali emopoietiche (CSE) sia consanguinei (fratelli) sia non consanguinei (MUD): sono stati selezionati 140 campioni per il locus A, 174 per il locus B e 186 per il locus DR con tipizzazione ambigua tra tutti i 373 campioni sequenziati nell'anno 2004 all'interno del nostro laboratorio con i kit *Molecular Diagnostics HLA-A/B/DR Resolution Typing System Amplification and Sequencing Module* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le sequenze sono state processate con il sequenziatore automatico ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e analizzate con il software di lettura Assign SBTM 3.2.7 (Conexio Genomics, Applecross, Western Australia).² Per il polimorfismo HLA di classe I sono stati provati due kit della ditta Atria Genetics-Abbott: uno di risoluzione delle ambiguità relative all'allele HLA-A*02 (*AlleleSEQR HLA-A2 GSA*) tramite amplificazione allele specifica e l'altro per risolvere le ambiguità relative al locus B (*AlleleSEQR HLA-B GSA*) tramite un pattern di miscele di amplificazione gruppo allelico specifiche. Per la classe II sono state valutate due tipi di strategie proposte dalla ditta per la risoluzione delle ambiguità: la prima si basa sull'utilizzo di un kit di amplificazione gruppo specifico (*AlleleSEQR HLA-DRB1 GSA*) che ha la stessa tipologia del kit Applied Biosystems in uso nel 2004; la seconda consiste nell'abbinare al kit base (Core Kit: *AlleleSEQR HLA-DRB1*), che usiamo attualmente in laboratorio, il kit che sfrutta una reazione di sequenza gruppo specifica (*AlleleSEQR HLA-DRB1 GSSP*).³

Risultati e Conclusioni. Kit *AlleleSEQR HLA-A2 GSA*: le tipizzazioni ambigue per l'HLA-A nel 2004 sono state 26 in totale di cui 13 erano relative ad almeno un allele A*02. I risultati ottenuti con il kit gruppo specifico sono riportati nella Tabella 1. Il kit ha dato ottimi risultati, l'unica tipizzazione non risolvibile era relativa ad un genotipo A*02 omozigote, per il quale è stato impossibile separare gli alleli. La tipizzazione univoca per un solo allele ha comunque portato ad un risultato univoco per l'allele HLA-A*02, ma è rimasta ambigua per l'allele HLA-A*68. È chiaro che in questo momento questo tipo di strategia risolve solamente le ambiguità per A*02, la ditta dovrà produrre nuovi kit anche per gli altri alleli. Kit *AlleleSEQR HLA-B GSA*: il kit si basa su un di pattern di miscele di amplificazione gruppo specifiche che vanno scelte opportunamente sulla base di uno schema che è riportato all'interno della metodica del kit stesso. Per questo motivo, sulla base delle tipizzazioni ambigue della casistica (76 in totale), abbiamo per prima cosa valutato, a livello teorico, per quali tipizzazioni si potesse applicare il kit (49 tipizzazioni). I risultati sono riassunti nella seguente Tabella 2. Il kit ha permesso di sequenziare solo gli esoni 2 e 3. Tutte le tipizzazioni con risultato non univoco si potevano distinguere esaminando regioni diverse degli esoni 2 e 3, distribuite sui gruppi allelici rappresentati nella Tabella 3. La ditta produttrice sta mettendo a punto un nuovo kit base, locus specifico, che permetterà di sequenziare, oltre agli esoni 2, 3 e 4, anche l'1 e il 5. In un futuro prossimo ci renderanno disponibili anche gli esoni 6 e 7. Certamente, con l'aggiunta anche solo degli esoni 1 e 5, la risoluzione delle ambiguità più comuni potrà risultare ottimale. Kit *AlleleSEQR HLA-DRB1 GSA*: il kit è già validato per la diagnostica, ed è stato testato sulle 51 tipizzazioni ambigue della casi-

Tabella 1.

Tipizzazioni totali	Tip. univoche per entrambi gli alleli	Tip. univoche per un solo allele	Tip. non univoche
13	11 (85%)	1 (7,5%)	1 (7,5%)

Tabella 2.

Tipizzazioni totali	Tip. univoche per entrambi gli alleli	Tip. univoche per un solo allele	Tip. non univoche
49	15 (30,6%)	13 (26,5%)	21 (42,9%)

Tabella 3.

Alleli irrisolti	n°esone	n°codone	codone	
0705	5	282	ATC	
0706			GTC	
1801	1	-9	TGG	
1817N			TAG	
2705	1	-20	GCG	
2713			GAG	
3501	1	-16	GTC	GCC
3542			CTC	GCT

Tabella 4.

Tipizzazioni totali	Tip. univoche per entrambi gli alleli	Tip. univoche per un solo allele	Tip. non univoche
51	23 (45%)	3 (6%)	25 (49%)

stica. Presenta la stessa tipologia e chimica del kit GSA Applied Biosystems, infatti i risultati sono riproducibili fra i due kit senza però ottenere risultati di tipizzazione univoci. Kit *AlleleSEQR HLA-DRB1* abbinato al *AlleleSEQR HLA-DRB1 GSSP*: sono stati testati gli stessi campioni del kit GSA, i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 4. Le tipizzazioni univoche per entrambi gli alleli sono risultate pari al 45%. Il 6% dà un risultato univoco per un solo allele. Il 49% delle tipizzazioni sono rimaste ambigue, perché le differenze alleliche si trovano al di fuori dell'esone 2. Infine abbiamo eseguito un confronto fra i tre kit di sequenziamento, verificando che il kit GSA Atria Genetics, il kit GSA della ditta Applied Biosystems e il Core kit dessero risultati riproducibili: come già detto i due kit GSA hanno dato gli stessi risultati sulle 51 tipizzazioni ambigue, il Core Kit ha dato 48/51 risultati di tipizzazione identici al kit GSA, mentre 3/51 hanno un'alternativa in più rispetto al GSA che viene però risolta grazie all'abbinamento Core kit-kit GSSP. Per il momento la strategia migliore sembrerebbe quella di abbinare al Core kit (meno laborioso del GSA) il kit GSSP per avere una risoluzione delle ambiguità del 45% contro lo 0% del GSA.

Bibliografia

- www.ebi.ac.uk/imgt/hla
- Sayer DC et al. Assign 2.0: software for the analysis of Phred quality values for quality control of HLA sequencing-based typing. *Tissue Antigens* 2004 ; 64(5): 556-65.
- Carrier C et al. High-Throughput DRB1 Typing at the Allele Level: Results in 1046 Cord Blood. Donor. *Human Immunology*, 2001:62(supplement 1).

LA DISTRIBUZIONE DEGLI SNPs AL CODONE 10 (T>C) E 25 (G>C) DEL TGFβ1 IN UN GRUPPO DI 122 PAZIENTI ITALIANI AFFETTI DA TELEANGECTASIA EMORRAGICA EREDITARIA MOSTRA DELLE DIFFERENZE SIGNIFICATIVE RISPETTO AI CONTROLLI

C.Olivieri,¹ C.Badulli,² E. Sanzani,¹ F. Pagella,³ E. Buscarini,⁴ M.A. Scappaticci,¹ C. Pizzochero,² A.M. Iannone,² F. Garlaschelli,² M. Martinetti,² C. Danesino^{1,5}

¹Laboratorio di Genetica Medica, Genetica Medica, Università di Pavia, Pavia; ²Laboratorio HLA, Servizio di Immunematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS S. Matteo, Pavia; ³Clinica Otorinolaringoiatria, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia; ⁴U. O. Gastroenterologia, Ospedale Maggiore di Crema, Crema; ⁵Servizio di Consulenza Genetica, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

La Teleangectasia Emorragica Ereditaria (HHT) (OMIM 187300) è una patologia a carico del Sistema Vascolare che manifesta ereditarietà di tipo autosomico dominante. Presenta tipicamente teleangectasie a livello mucocutaneo (le quali possono causare epistassi e sanguinamenti gastrointestinali che possono divenire talmente gravi e frequenti da indurre anemizzazione del paziente e richiedere trasfusioni) e malformazioni artero-venose (AVMs) a livello degli organi interni. Le teleangectasie (e di conseguenza le epistassi) sono il sintomo più frequente, presente in più del 95% dei pazienti. Le AVMs vengono osservate principalmente a livello di polmoni, fegato e cervello e possono essere causa di complicanze che mettono a repentaglio la vita del paziente. Il fenotipo mostra un'ampia variabilità, anche all'interno di una singola famiglia e la penetranza viene considerata completa dopo i 40 anni.¹ Più dell'80% dei pazienti è portatore di una mutazione in uno dei due geni: ENG (OMIM #131195), che se mutato causa la HHT1; ACVRL1 (OMIM #601284) che causa la HHT2. Tali geni codificano, rispettivamente, per un recettore di tipo III ed un recettore di tipo I del TGFβ. Inoltre è stata dimostrata l'evidenza di un terzo locus nella regione 5q32

ma il gene causativo non è ancora stato identificato. Recentemente è stata dimostrata l'associazione del fenotipo HHT con la Poliposi Giovanile del colon (JP).² In questo caso le mutazioni coinvolgono il gene *MADH4*, che codifica per SMAD4, effettore del segnale del TGF β al nucleo. Questa nuova sindrome è stata chiamata JPHT (OMIM #175050). In alcuni casi, il fenotipo HHT si associa anche ad ipertensione polmonare; Trembath et al nel 2001⁴ hanno dimostrato l'associazione di tale fenotipo con mutazioni in *ACVRL1*, dato confermato di recente anche da un nostro studio su un'ampia coorte di pazienti.³ Il TGF β è una citochina che modula un ampio spettro di attività biologiche, tra le quali la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'angiogenesi, l'adesione e la formazione della matrice cellulare. I livelli plasmatici della citochina possono subire variazioni a seconda dell'età, del sesso, dell'attività fisica e della presenza di alcune patologie (ad esempio tumori); inoltre, nel gene *TGF β 1* sono noti diversi polimorfismi, per la maggior parte SNPs, alcuni dei quali ne influenzano la trascrizione, causando differenze individuali nella produzione della proteina. Abbiamo pertanto deciso di studiare la distribuzione dei genotipi per i polimorfismi del TGF β ai codoni 10 e 25 (che sono noti per essere correlati a diversi livelli di produzione della proteina) in un gruppo di 122 pazienti italiani affetti da Teleangectasia Emorragica Ereditaria (di cui 58 casi indice) in cui fosse nota la mutazione causativa in *ENG* o *ACVRL1*.

Materiali e Metodi. Con la tecnica della PCR è stato amplificato un frammento di 500 bp del gene *TGF β 1* contenente i

codoni 10 e 25. Tale frammento è stato successivamente sottoposto a digestione con due diverse endonucleasi di restrizione: *MspA1I* (codone 10) e *FseI* (codone 25). I prodotti di digestione sono stati analizzati su gel di poliacrilammide denaturante al 7% (cod 10) e gel di agarosio al 3% (cod 25). Una parte dei pazienti è stata genotipizzata anche tramite PCR-SSP, utilizzando il *cytokine typing kit* della Ditta Pel Freez. In una proporzione dei pazienti il dato ottenuto è stato confermato tramite sequenziamento diretto. In base ai genotipi osservati, i pazienti sono stati classificati come *high*, *intermediate* e *low producers* di TGF β in accordo con i dati di letteratura.⁵ L'analisi statistica dei risultati è stata condotta con il test del χ^2 , utilizzando per il confronto 202 controlli italiani.

Risultati e conclusioni. È stata osservata una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi ad entrambi i codoni nei pazienti rispetto ai controlli. I risultati sono riassunti nelle tabelle sotto riportate. Nella Tabella 1 sono inserite le frequenze dei genotipi e della produzione del TGF β , nella Tabella 2 i risultati dei calcoli statistici con il test del χ^2 . Dal momento che la HHT è una patologia causata da mutazioni in geni coinvolti nella trasduzione del segnale del TGF β , valuteremo se differenze nella produzione geneticamente determinata di questa citochina contribuiscono alle variazioni fenotipiche intra ed inter-familiari osservate. I risultati ottenuti permetteranno di valutare nell'esteso campione di pazienti HHT disponibile se vi siano correlazioni genotipo-fenotipo per i principali segni clinici della malattia.

Tabella 1. Frequenze osservate nella distribuzione dei genotipi e della produzione del TGF β . Tra parentesi sono riportate le frequenze nei sottogruppi dei pazienti mutati in *ACVRL1* ed in *ENG*.

	CC	CT	TT	
TGF β cod 10				
Casi Indice	18(12/5)%	55(35/20)%	27(18/9)%	N° Totale
Totale	19(13/5)%	58(48/10)%	23(15/8)%	Casi Indice
Controlli	21%	47%	32%	60(39/19)
TGF β cod 25	CC	CG	GG	
Casi Indice	1.5(1.5/0)%	27(18/9)%	71.5(45/23)%	N° Totale
Totale	1(1/0)%	29(23/6)%	70(52/17)%	Pazienti
Controlli	2.5%	11%	86.5%	122 (92/28)
Produzione TGF β	H	I	L	N° Totale
Casi Indice	60%	33%	7%	Controlli
Totale	61%	31%	8%	220
Controlli	71%	24%	5%	

Tabella 2. Risultati del test del χ^2 .

	Cod 10	Cod 25	TGF- β prod
Tot vs c	n.s.	$p < 0.0001$	n.s.
CI vs c	n.s.	$p < 0.005$	n.s.
CI E vs c	n.s.	n.s.	n.s.
CI A vs c	n.s.	$p < 0.01$	n.s.
Tot E vs c	n.s.	$p < 0.05$	n.s.
Tot A vs c	$p < 0.02$	$p < 0.0001$	n.s.
CI A vs CI E vs c	n.s.	$p < 0.0001$	$p < 0.05$
Tot A vs Tot E vs c	$p < 0.001$	$p < 0.0001$	$p < 0.02$

CI: Casi indice; c: controlli; A: mutati in *ACVRL1*; E: mutati in *ENG*.

Bibliografia

1. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 2006;43:97-110. Epub 2005 May 6.
2. Gallione CJ et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 2004;363:852-9.
3. Olivieri C et al. Echocardiographic screening discloses increased values of pulmonary artery systolic pressure in 9 of 68 unselected patients affected with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Genet Med* 2006;8:183-90.
4. Trembath RC et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2003;345:325-34.
5. Uboldi de Capei MU et al. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet.* 2003;30:5-10.

ANALISI QUANTITATIVA E QUALITATIVA DEL MICROCHIMERISMO SISTEMICO MEDIANTE REAL-TIME PCR IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI ORGANO SOLIDO

M. Curcio,¹ S. Chelazzi,² M. Mosca,⁴ B.M. Longoni,² U. Boggi,² F. Vistoli,² M.L. Mariotti,¹ S. Fornaciari,¹ G. Paleologo,³ G. Rizzo,³ F. Mosca F,² F. Scatena¹

¹U.O. Immunoematologia II, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa; ²Chirurgia Generale e Trapianti, Università di Pisa, Pisa; ³U.O. Nefrologia e Trapianti, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa; ⁴U.O. Reumatologia-Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa, Pisa

Il microchimerismo è un fenomeno che si sviluppa a seguito di trapianto di organo solido, trasfusione di sangue e gravidanza. Nonostante la sua esistenza sia stata ampiamente documentata il significato immunologico appare ancora poco chiaro. Lo scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto un protocollo metodologico atto a valutare la presenza di DNA microchimerico nella popolazione leucocitaria di sangue periferico di pazienti sottoposti a trapianto di organo solido. Le correlazioni del microchimerismo con variabili epidemiologiche, cliniche, genetiche ed immunologiche potrebbero aiutare a chiarire l'eventuale ruolo del fenomeno con l'andamento del trapianto.

Materiali e Metodi. La ricerca del microchimerismo è stata effettuata utilizzando la tecnica della Real-time PCR attraverso l'utilizzo di opportuni primers allele-specifici per il gene HLA-DRB1* del donatore. Il *probe*, marcato al 5' con Fam ed al 3' con Tamra, riconosce una regione centrale non polimorfica dell'esone 2 del gene HLA-DRB1. Sono stati studiati un totale di 49 pazienti (con follow-up 0-12 mesi) di cui quindici *pancreas transplant alone* (PTA), sedici *simultaneous pancreas kidney* (SPK), e diciotto *kidney alone* (KA).

Risultati. Il microchimerismo presenta caratteristiche di notevole variabilità in tutte le tipologie di trapianto studiate, con la tendenza ad una stabilizzazione e diminuzione sia nella quantità (dati non mostrati) sia nella presenza (Tabella 1). L'analisi comparativa della quantità di microchimerismo non ha evidenziato sostanziali differenze nelle tre tipologie di trapianto. Va comunque sottolineato che la maggiore quantità di cellule microchimeriche è stata riscontrata nei pazienti PTA. L'analisi statistica (*test t di Student*) non ha evidenziato nessuna correlazione tra andamento del graft e quantità di cellule del donatore, così come nessuna rilevante differenza è stata riscontrata tra quantità di chimerismo ed episodi di rigetto. Infine, nessuna significativa differenza è stata evidenziata confrontando i valori dell'intensità del microchimerismo, match-HLA ed *outcome del grafti* (dati non mostrati).

Conclusioni. Il metodo di quantificazione appare abbastanza semplice e riproducibile, consentendo la quantificazione di piccole quantità di DNA. Diversamente dalle metodiche fino ad ora utilizzate, quali la nested (*o eminested*) PCR, in cui sono state

ampiamente riportati problemi di miss-priming, la *real-time* PCR permette di minimizzare i rischi di falsi positivi determinando una maggiore precisione e riproducibilità nella quantificazione.

Tabella 1. Pazienti negativi per tipologia di trapianti: analisi nel follow-up 0-12 mesi.

Giorni	PTA(%)	SPK(%)	KA(%)
7	4 (26,6)	4 (25)	6 (33,3)
14	2 (13,3)	6 (37,5)	4 (22,3)
30	7 (46,6)	7(46,6)	5 (27,8)
90	8 (53,3)	9 (75)	6 (33,3)
180	4 (50)	6 (50)	12 (66,6)
360	3 (43%)	5 (41)	9 (56,3)

Distribuzione dei pazienti per presenza di microchimerismo. I pazienti sono confrontati per tipologia di trapianto e per follow-up.

Per quanto riguarda il significato di questo fenomeno, in letteratura sono riportate interpretazioni contrastanti: alcuni autori come Starzl^{1,2} suggeriscono che il microchimerismo indurrebbe uno stato di immuno-tolleranza, mentre, altri considerano lo sviluppo del microchimerismo come una conseguenza del trapianto stesso. I nostri dati mostrerebbero che nei primi sei-dieci mesi dal trapianto il fenomeno del chimerismo presenta caratteristiche di fluttuazioni marcate, sia nella quantità sia nella presenza, che tendono ad un equilibrio immunologico difficilmente correlabile con il *graft*. Di conseguenza il microchimerismo, almeno nei primi mesi post-trapianto, sembrerebbe manifestarsi più come epifenomeno e non come un fenomeno con caratteristiche proprie.

Bibliografia

1. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet* 1992;339:1579-82.
2. Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation. PNAS colloquium 2004.
3. Artlett CM, Dito CG, Christner PJ. *Biol Proced Online. Methodology for Detecting Trace Amounts of Microchimeric DNA from Peripheral Murine White Blood Cells by Real-time PCR.* Epub 2003;5:103-7.
4. M. Mengel, U. Lehmann and H. Kreipe. Chimerism after solid organ transplantation. *American Journal of transplantation* 2005;5: 3021.
5. Hakemi M, Najafi I, Ganji MR, Khosravi F, Nikbin B. Periperal blood microchimerism in female renal recipients from male donors. *Transplant Proc.* 2001;33:2852-3.

DEFINIZIONE DI NUOVI ALLELI HLA: PERCHÉ NON ISTITUIRE UN LABORATORIO AIBT DI SUPPORTO?

E. Garino,¹ M. Berrino,¹ F. Bertinetto,¹ P. Caropreso,¹ G. Mazzola,¹ F. Tondat,¹ A. Amoroso²

¹S.C. Immunologia dei Trapianti, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino; ²Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università degli Studi di Torino

L'elevato numero di specificità HLA fino ad oggi descritte esprime bene l'alto livello di polimorfismo dei geni HLA e la complessità di analisi a livello molecolare che ne deriva. Le tecniche di tipizzazione HLA sono in continuo sviluppo e il miglioramento delle tecnologie di sequenziamento automatico (PCR-SBT) ha incrementato nel tempo il numero di alleli HLA noti, poiché l'SBT, al contrario delle altre metodiche di tipizzazione molecolare, permette la rivelazione di potenziali nuovi alleli. Di conseguenza nuovi alleli HLA vengono di continuo scoperti e aggiunti

all'IMGT/HLA Database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>), banca dati ufficiale di tutte le sequenze HLA note¹: il rapporto ufficiale della nomenclatura pubblicato nel 2004² indica un totale di 422 nuovi alleli HLA aggiunti a partire dalla precedente pubblicazione che risale al 2002.

Materiali e metodi. Quando viene identificato un potenziale nuovo allele, normalmente a causa di discrepanze tra le varie metodiche utilizzate per la tipizzazione, di un anomalo risultato ottenuto con una di esse, o, ancora, incongruenze nella segregazione familiare, è necessario sottoporlo al riconoscimento ufficiale da parte del World Health Organization (WHO) HLA Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. La procedura è standardizzata secondo linee guida e può essere effettuata tramite gli strumenti on-line presenti sul sito dell'IMGT/HLA Database che permettono di sottoporre sia sequenze nuove sia di conferma direttamente al WHO Nomenclature Committee. La procedura prevede di:

- effettuare la sequenza completa in entrambe le orientazioni (forward e reverse) o, soltanto se la mutazione si trova in regioni codificanti, è permesso sequenziare gli esoni 2 e 3 per gli alleli della classe I e l'esone 2 per gli alleli della classe II.

Nel caso di individui eterozigoti, dove uno degli alleli è nuovo, è necessario sequenziarlo isolato dal secondo allele;

- ottenere un *accession number* tramite la sottomissione della sequenza ad una delle banche dati disponibili, europea, americana o giapponese, che collaborano a livello internazionale scambiandosi giornalmente i dati in modo da assicurare una raccolta di sequenze uniforme: EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/Submissions/index.html>; GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>; DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/sub-e.htm>, queste banche dati sono aggiornate ogni tre mesi;

- sottoporre la sequenza al WHO Nomenclature Committee tramite gli strumenti on-line disponibili sul sito <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/subs/submit.html>.

Se l'allele sottoposto e la corrispondente descrizione rispondono ai criteri di accettazione il Nomenclature Committee assegna ufficialmente il nome e l'elenco dei nuovi alleli viene pubblicato nell'aggiornamento mensile della nomenclatura sulle riviste *Tissue Antigens*, *Human Immunology* e *International Journal of Immunogenetics*. Successivamente al riconoscimento ufficiale è auspicabile una pubblicazione in cui venga descritto il nuovo allele. Naturalmente è una procedura lunga che richiede tempo, sia a livello di esecuzione delle analisi di laboratorio sia a livello informatico. Infatti per ottenere la sequenza è necessario usare kit commerciali, se disponibili, o primers casalinghi che permettano da un lato di separare gli alleli e dall'altro di sequenziare il tratto di interesse. È inoltre preferibile richiedere i campioni dei genitori, se disponibili, e procedere ad una ricostruzione familiare. A livello informatico durante la sottomissione ad una delle tre banche dati citate in precedenza vengono richieste, oltre alla sequenza nucleotidica, informazioni aggiuntive quali una breve descrizione della sequenza, il nome scientifico e la tassonomia dell'organismo, le referenze bibliografiche e una tabella delle caratteristiche che elenca le aree di interesse biologico come le regioni codificanti e le proteine corrispondenti, le regioni ripetute e i siti di mutazioni o modificazioni. Quando poi si sottomette la sequenza al WHO Nomenclature Committee è necessario inserire i risultati della tipizzazione sierologica, se disponibile, e molecolare del campione analizzati e di tutti gli altri componenti della famiglia: naturalmente più sono completi questi dati più è facile capire se l'allele mutato appartiene ad aplotipi noti. Inoltre sono richieste le sequenze dei primers utilizzati per il sequenziamento e i tipi di metodiche molecolari usate per la conferma della mutazione.

Risultati. Nella nostra esperienza di laboratorio sono stati identificati 14 nuovi alleli a partire dal 2000, anno in cui abbiamo iniziato ad usare l'SBT come metodica di routine per la tipizzazione HLA dei pazienti ematologici e dei corrispondenti donatori correlati e non (MUD). In particolare la nostra strategia di lavoro prevede la tipizzazione mediante sequenziamento dei loci A, B, C e DR dei pazienti e dei loro fratelli HLA identici, nonché dei

pazienti che vanno incontro all'attivazione della ricerca di un MUD. Quando poi vengono selezionati diversi MUD per lo stesso paziente si ripete l'analisi in SBT su un secondo prelievo del paziente e sui campioni dei MUD. Alcuni di questi alleli sono stati riconosciuti ufficialmente e quindi inseriti nell'IMGT/HLA Database, mentre altri sono ancora in corso di studio. Sicuramente negli ultimi due anni si è riscontrato un aumento di incidenza forse anche dovuto alla maggiore eterogeneità etnica di provenienza dei campioni. L'ultimo caso di assegnazione ha riguardato un allele del locus A, A*0297 (HWS10003638 – DQ409217), che è stato identificato in una unità di sangue cordonale raccolta dalla Banca di Sangue Cordonale di Torino.³ Il campione (A*02,29) presentava una mutazione al codone 232 nel 4° esone che risultava in un cambiamento aminoacidico da Glu (GAG) ad Asp (GAC) nel dominio alfa-3 coinvolto nell'interazione con il CD8, co-recettore del T Cell Receptor. Stiamo completando lo studio di modeling molecolare per capire quale impatto abbia questa modificazione sulle interazioni delle diverse molecole coinvolte nel riconoscimento antigenico durante la risposta immunitaria.

Conclusioni. Il fallimento nell'identificazione dei nuovi alleli può influire in modo negativo sul decorso del trapianto di cellule staminali emopoietiche, con conseguenze quali la graft vs host disease o il rigetto. L'impatto dei nuovi alleli sul risultato del trapianto dipende dalla loro incidenza e dalla probabilità di rivelazione da parte dei metodi di tipizzazione usati dai diversi laboratori.⁴ Nel momento in cui, però, un nuovo allele sia stato identificato è necessario seguire rapidamente la procedura per il suo riconoscimento ufficiale, soprattutto nei casi in cui la/le mutazioni portino a cambiamenti aminoacidici. In conclusione la proposta che qui vogliamo avanzare è quella di rendere disponibile un laboratorio di supporto a livello italiano a cui possano rivolgersi quei centri che per i motivi più diversi non abbiano la possibilità di eseguire tutta la procedura che porta al riconoscimento ufficiale di nuovi alleli HLA in tempi ragionevoli. In base poi alle esigenze dei diversi laboratori, si potranno definire le modalità esecutive.

Bibliografia

1. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SGE. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003;31:311-4.
2. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005;65:301-69.
3. Garino E, Berrino M, Bertinetto F, Caropreso P, Mazzola G, Tondat F, Amoroso A. Identification of a novel HLA-A *02 allele in an Italian cord blood unit [Abstract]. *Tissue Antigens* 2006;67:472.
4. Smith DM, Baker JE, Gardner WB, Martens GW, Agura ED. HLA class I null alleles and new alleles affect unrelated bone marrow donor searches. *Tissue Antigens* 2005;66:93-98.

RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE E DELLA RISPOSTA IMMUNE NELL'ATEROSCLEROSI: STUDIO DEL POLIMORFISMO ASP299GLY DEL GENE TLR4 (TOLL LIKE RECEPTOR 4) IN PAZIENTI CAD

I. Sbarsi,¹ C. Boiocchi,¹ C. Falcone,² E. Emmanuele,² M. Cuccia^{1,3}

¹Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia; ²Dipartimento di Cardiologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; ³Autore referente per la corrispondenza: Prof. Mariacarla Cuccia, Lab. Immunogenetica - Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

L'aterosclerosi costituisce la principale causa alla base dell'insorgenza delle patologie coronariche (CAD = Coronary Artery Disease); recenti studi dimostrano che l'infiammazione e la risposta immune hanno un ruolo cruciale nella formazione della placca aterosclerotica e nell'instaurarsi delle sue complicanze.

In questo ambito sembra interessante il ruolo svolto dal recettore per il lipopolisaccaride batterico Toll Like Receptor 4 (TLR4). Questo, infatti, è coinvolto nella risposta immunitaria innata contro i batteri Gram- ed è espresso a livello delle lesioni aterosclerotiche. In questa sede l'attivazione del recettore TLR4 determina la produzione di mediatori infiammatori che esercitano effetti aterogenici, come ad esempio l'aumentata espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali, la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'attivazione di cellule del sistema immunitario e l'attivazione della risposta di fase acuta.¹ Il gene per TLR4 nell'uomo è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 9; è stata descritta una mutazione missenso localizzata nel quarto esone che determina la sostituzione di un residuo di Acido Aspartico con una Glicina a livello dell'amminoacido 299;² tale mutazione altera la struttura del dominio extracellulare del recettore³ andandone probabilmente ad influenzare l'affinità per il ligando e quindi la capacità delle cellule stesse di rispondere al lipopolisaccaride.⁴ Dati recenti relativi all'indagine di questo polimorfismo in pazienti siciliani affetti da infarto al miocardio e in individui ultracentenari dimostrano che gli individui geneticamente predisposti a sviluppare una debole risposta infiammatoria sembrerebbero avere meno probabilità di sviluppare patologie cardiovascolari e quindi vivere più a lungo.⁵ Partendo da queste considerazioni, abbiamo analizzato lo stesso polimorfismo nella nostra popolazione di pazienti CAD, più eterogenea per quanto riguarda i fattori di rischio di quella considerata da Balestrieri *et al.*⁵

Pazienti e metodi. nel nostro studio sono state determinate, tramite PCR-RFLP, le frequenze genotipiche ed alleliche del polimorfismo TLR4 Asp299Gly in 302 pazienti CAD e 116 controlli sani armonizzati per etnia, sesso ed età.

Risultati e Conclusioni. considerando l'intero gruppo di pazienti CAD i nostri dati non evidenziano significative differenze nelle frequenze genotipiche ed alleliche (86% AA; 13% AG e 1% GG) rispetto ai controlli sani (85% AA; 15% AG). Partendo dai dati sperimentali che dimostrano che *in vitro* la presenza dell'allele G è associata ad una debole risposta infiammatoria abbiamo considerato i nostri dati in base alla gravità della patologia coronarica suddividendo i pazienti in tre diversi gruppi a seconda del numero di stenosi presenti (1, 2, 3 vasi coronarici compromessi). Da questa indagine emerge una tendenza ad una minore frequenza (8%) degli individui con almeno un allele G (AG+GG) nei pazienti CAD con 2 o 3 stenosi rispetto ai controlli sani (15%). La nostra analisi sembrerebbe quindi evidenziare un possibile coinvolgimento della risposta infiammatoria innescata dal recettore TLR4 nella predisposizione allo sviluppo delle patologie coronariche almeno per quanto riguarda quelle che si presentano nella forma più grave.

Bibliografia:

1. Arroyo-Espliguero R, et al. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart* 2004;90:983-8.
2. Lorenz E, et al. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques* 2001;31:22-4.
3. van der Graaf C, et al. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005;30:264-8.
4. Arbour NC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
5. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso M, Hoffmann E, Franceschi C, Caruso C. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004;292:2339-40.

ASSOCIAZIONE TRA IL POLIMORFISMO -374 T/A DEL GENE RAGE (HLA CLASSE III) E LO SVILUPPO DI RISTENOSI DOPO ANGIOPLASTICA CORONARICA

I. Sbarsi,¹ C. Falcone,² C. Boiocchi,¹ E. Emmanuele,² M. Cuccia^{1,3}

¹Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia;

²Dipartimento di Cardiologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia;

³Autore referente per la corrispondenza: Prof. Mariaclara Cuccia, Lab. Immunogenetica, Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

Il gene RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) mappa nella regione HLA di classe III e codifica per un recettore di superficie appartenente alla superfamiglia delle Ig. È un recettore multiligando che interagisce con molecole implicate in vari processi: omeostasi, sviluppo e infiammazione.¹ Nella formazione e nella progressione della placca aterosclerotica, l'accumulo di ligandi di RAGE, come ad esempio di AGEs, determina un aumento dell'espressione del recettore su vari tipi cellulari (cellule endoteliali, muscolari lisce e fagociti mononucleari). Le cellule che esprimono RAGE risultano attivate secondo un meccanismo di *feedback loop positivo*.³ La sovraregolazione di RAGE potrebbe giocare un ruolo di fondamentale importanza nella formazione della neointima in seguito a danno vascolare: il polimorfismo regolatorio -374 T/A, localizzato a livello della regione del promotore, è associato ad una alterata espressione del gene e potrebbe esercitare un effetto nell'ambito dello sviluppo delle patologie vascolari.^{3,4} La nostra indagine è stata condotta al fine di valutare l'impatto di questo SNP in pazienti che presentano o meno ristrenosi dopo angioplastica coronarica.

Pazienti e metodi. La frequenza delle varianti alleliche del polimorfismo RAGE -374 T/A è stata valutata tramite PCR-RFLP in 267 pazienti CAD (Coronary Artery Disease) dopo angioplastica coronarica e angiografia di controllo a 6-9 mesi dall'intervento.

Risultati e Conclusioni. dai nostri risultati emerge che i soggetti con genotipo omozigote RAGE -374 AA presentano una significativa riduzione del rischio di sviluppare ristrenosi coronarica dopo rispetto ai pazienti con genotipo AT o TT [odds ratio (OR) = 0,25, 95% CI: 0.09-0.68; $p=0.007$]. Inoltre dall'analisi tramite test delle interazioni multiple emerge che la presenza del genotipo omozigote AA conferisce un rischio significativamente minore di sviluppo di ristrenosi nei pazienti non diabetici (multivariate-adjusted OR=0.05; 95% CI: 0.01-0.38; $p=0.004$) rispetto ai pazienti diabetici (multivariate-adjusted OR=0.41; 95% CI: 0.10-1.75; $p=0.23$). Dai nostri dati emerge, dunque, che la presenza del genotipo RAGE -374 AA potrebbe essere associata con un rischio ridotto di sviluppare ristrenosi dopo angioplastica coronarica in pazienti CAD non diabetici. L'effetto del polimorfismo RAGE -374 T/A si attenuerebbe nel caso della patologia diabetica, caratterizzata da sovraregolazione cronica del gene RAGE stesso.

Bibliografia

1. Schmidt AM, Stern DM. Receptor for age (RAGE) is a gene within the major histocompatibility class III region: implications for host response mechanisms in homeostasis and chronic disease. *Front Biosci* 2001;6:1151-60.
2. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:99-111.
3. Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M. Relationship between the 374 T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. *Int J Mol Med* 2004;14, 6:1061-5.
4. Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Geroldi D, Belvito C, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M. -374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005;354:111-6.

sTNF E RECETTORI TNF SOLUBILI IN PAZIENTI CON SLA (SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA)

C. Boiocchi,¹ C. Cereda,² I. Sbarsi,¹ M. Ceroni,^{2,3}
M. Cuccia¹

¹Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia; ²Laboratorio di Neurobiologia Sperimentale, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico C. Mondino, Pavia; ³Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Pavia

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa ad esito fatale che colpisce i motoneuroni centrali e periferici. La SLA si presenta sia in forma sporadica (90% dei casi), sia in forma familiare (10%). Nel 20% dei casi familiari l'insorgenza della patologia è correlata con mutazioni del gene Sod1 che codifica per l'enzima Cu,Zn-Superossido-Dismutasi (SOD1). Per i casi sporadici l'eziologia è del tutto sconosciuta anche se molti fattori probabilmente contribuiscono sia all'insorgenza sia allo sviluppo della patologia. Tra questi lo stress ossidativo sembra avere un ruolo centrale nell'attivazione di pathway di trasduzione del segnale che porta a morte del motoneurone con un processo apoptotico mitocondrio-dipendente.¹ Risulta inoltre ormai evidente che nel processo neurodegenerativo concorra anche un processo di *cross-talk* tra motoneuroni e cellule gliali sostenuto da neurotrasmettitori e citochine. Esperimenti di co-culture tra linee cellulari di neuroblastoma, trasfettate con il gene umano mutato sod1, e cellule gliali portano la stessa mutazione, dimostrano un incremento dell'espressione del TNF (Tumor Necrosis Factor), la più importante citochina pro-infiammatoria, e di IFN e di TGF 1 e 2 (Transforming Growth Factor). Il locus TNF è collocato nella porzione più telomeric della classe III di HLA; si estende per una dimensione di 12 Kb ed è caratterizzato dalla presenza di tre geni: TNF (Tumor Necrosis Factor), LTA (Linfotossina α) e LTB (Linfotossina b). La principale attività biologica del TNF α quella di favorire il reclutamento di neutrofili e monociti a livello dei focolai di infezione, attivandone le funzioni microbicide.² Partendo da dati sperimentali che evidenziano livelli anormali di IL-6 e TNF- α nel fluido cerebrospinale e nel siero di pazienti affetti da SLA e che TNF- α e il suo recettore solubile sono stati trovati significativamente più alti nel siero di tali pazienti,³ abbiamo deciso di valutare le concentrazioni di queste tre molecole (TNF, TNFR1 e TNFR2) nei nostri pazienti SLA in varie fasi del decorso della patologia.

Pazienti e Metodi. Nello studio sono stati compresi 88 pazienti con diagnosi di SLA a cui sono stati fatti prelievi di sangue ogni due mesi per sei anni. Tramite kit commerciale ELISA (Bender MedSystems, Vienn, Austria) sono stati valutati in questi i livelli di TNF- α solubile e di sTNFR1 e sTNFR2.

Risultati e Conclusioni. Lo scopo del nostro lavoro era quello di osservare l'espressione del TNF- α nel siero e descrivere il suo decorso nel tempo durante la progressione della malattia. Sono stati esaminati nel siero i valori medi di TNF- α e dei suoi recettori (TNFR1 e TNFR2); tali valori sono poi stati confrontati con i valori plasmatici nei controlli. I livelli di TNF- α plasmatici erano più alti nell'86% di pazienti SLA rispetto ai controlli, mentre solo il 13% e il 10% di tali pazienti mostravano rispettivamente più alti livelli di TNFR1 e TNFR2. Alti livelli di TNF- α solubile confermano l'attivazione di un processo infiammatorio in corso che potrebbe agire utilizzando TNFR1 e TNFR2 cellulari attivando la cascata apoptotica. Questa ipotesi è sostenuta anche dal fatto che nel plasma dei pazienti non abbiamo trovato elevati livelli di recettori solubili che probabilmente restano espressi sulla superficie cellulare. D'altro canto è stato recentemente dimostrato che gli mRNA dei TNFR1 e TNFR2 risultano sovraespressi nei motoneuroni di topo trasgenico G93A in fasi precoci della patologia e che i recettori restano localizzati a livello della membrana cellulare attivando il pathway di morte cellulare.

Bibliografia

1. Ferrante RJ, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1997;69:2064-74.
2. Bazzoni F, et al. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-25.
3. Poloni M, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 200;287:211-4.

SINDROME DA STANCHEZZA CRONICA E GENI KIR: IPOTESI IMMUNOLOGICA PER L'INSORGENZA DELLA MALATTIA

A. Pasi,¹ N. Carlo-Stella,² S. Bozzini,³ C. Monti,¹
S. Sachetto,¹ A. De Silvestri,¹ M. Martinetti,¹
L. Salvaneschi,¹ M. Cuccia²

¹Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale IRCCS San Matteo-Pavia; ²Dipartimento di Genetica e Microbiologia Università di Pavia-Pavia

La sindrome da stanchezza cronica (CFS: Chronic Fatigue Syndrome) è poco conosciuta in Italia e di difficile inquadramento nosologico. È caratterizzata da sfinitimento in assenza di segni obiettivi riconducibili ad altre patologie. A tutt'oggi l'epidemiologia e l'eziologia restano incerte. È presente con maggior frequenza nel sesso femminile, nell'età compresa tra i 18 e i 50 anni. La varietà delle modalità d'insorgenza (graduale o immediata, in seguito ad un episodio infettivo simil-influenzale, in seguito a mononucleosi o in assenza di qualsiasi fase prodromica), la variabilità del decorso clinico (ciclico, gradualmente ingravesciente o stazionario con lento miglioramento fino alla guarigione) e la comorbidità psichiatrica, reumatologica o allergica frequente in questi pazienti hanno indotto ad ipotizzare diverse possibili eziologie: infettiva, neurologica, immunologica. Per quanto riguarda l'ipotesi immunologica non si sono evidenziati difetti o alterazioni gravi del sistema immune. Gli unici parametri che risultano consistentemente alterati sono l'attività delle cellule NK, che è difettosa, e l'espressività di alcuni marcatori di attivazione delle cellule T.¹ A sostegno di un possibile coinvolgimento del sistema immune vi sono i dati pubblicati di recente dal nostro gruppo di ricerca sul polimorfismo del TNF e dell'IFN γ dai quali risulta che i pazienti con CFS hanno un genotipo proinfiammatorio.² Si è pensato di indagare il polimorfismo dei geni KIR che codificano per glicoproteine espresse sulla membrana delle cellule NK che svolgono un'importante funzione nella risposta immunitaria. Il sistema genico KIR contiene una famiglia di geni polimorfici che mappa sul cromosoma 19q13.4 all'interno di una regione di 1 Mb detta LCR (Leukocyte Receptor Complex). Sono state trovate associazioni tra la presenza di alcuni geni KIR e patologie quali l'artrite reumatoide,³ l'artrite psoriasica,⁴ la progressione dell'HIV⁵ ed il carcinoma della cervice.⁶ Studi eseguiti negli ultimi anni hanno rivelato una grande variabilità a livello della regione genomica KIR sia per quantità di geni, sia per l'elevato polimorfismo degli stessi. Il pattern di espressione dei geni KIR può, inoltre, variare in maniera clonale e tutto ciò aggiunge un altro livello di complessità al sistema e lo rende interessante per gli studi di associazione con patologie a componente immunologica.

Materiali e metodi. Lo studio è stato condotto su DNA estratto da campioni di sangue periferico di 46 pazienti italiani affetti da CFS. La diagnosi è stata fatta nei centri clinici di Aviano (Prof. Tirelli) e nel centro di Malattie Infettive di Chieti. La genotipizzazione KIR dei campioni è stata effettuata mediante PCR-SSP con l'uso di kit commerciali (ditta Pel Freez) e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di una popolazione di 217 controlli italiani sani. Sono stati presi in considerazione sia i singoli geni KIR che i genotipi ottenuti per conta diretta. È stata inoltre effettuata un'analisi di linkage a due punti tra i vari geni KIR.

Risultati. Dall'analisi del contenuto genico della regione KIR (inteso come presenza o assenza dei vari geni) risulta che la percentuale di pazienti portatori del gene KIR3DS1 è aumentata nei pazienti rispetto ai controlli: 54.3% vs 35.4%, OR= 2.16 e $p=0.0171$. Nel loro complesso i pazienti presentano 19 diverse combinazioni genotipiche, indistinguibili nei rispettivi aplotipi per mancanza di analisi familiare. Notiamo tuttavia che un genotipo, portatore di tutti i geni KIR tranne il 2DS5, sembra significativamente più frequente nei malati rispetto ai controlli: 15.2% vs 3.7 %, OR= 4.69 e $p=0.0029$. L'analisi di linkage a 2 punti fra i diversi geni KIR presenta dati sovrapponibili rispetto ai controlli e conferma l'esistenza di uno stretto linkage disequilibrium fra i geni KIR.

Discussione. Alla luce di questi risultati ipotizziamo che la presenza del gene KIR attivatorio 3DS1, soprattutto in una particolare combinazione genotipica, possa conferire suscettibilità alla CFS e ciò va a supportare uno scenario in cui il rischio di sviluppare la malattia è, per una serie di eventi, dipendente dal livello di attivazione delle cellule NK da parte di epitopi ligandi dei recettori attivatori KIR. Non si sa ancora molto del ligando del 3DS1 ma si suppone appartenere al Bw4. Sicuramente il KIR3DS1 è incluso nell'aplotipo di tipo B ed escluso dall'aplotipo A. Non è però possibile sapere se il genotipo più rappresentato nei pazienti sia omozigote B o eterozigote A/B in assenza di un'analisi familiare. Altre patologie sono state associate al KIR3DS1, sottolineando l'importanza della presenza di questo gene nel determinismo di alcune condizioni morbose (5,6). L'alto grado di linkage disequilibrium fra i geni KIR rende probabile l'ipotesi che il KIR3DS1 possa non essere direttamente coinvolto nella patogenesi ma sia marcatore di un gene che si trova nelle vicinanze. Il coinvolgimento di un gene KIR attivatore lascia aperte almeno due ipotesi: 1) la malattia potrebbe essere legata, ad esempio alla presenza del gene KIR3DS1 in assenza del ligando corrispondente e la condizione di sanità essere legata invece all'equilibrio fra recettore attivatore NK e ligando specifico in grado di controllare la fase attivatoria della risposta immune NK- mediata; 2) alternativamente, in presenza di un genotipo proinfiammatorio, l'eccesso di geni KIR attivatori potrebbe favorire e sostenere nel tempo una risposta citotossica aberrante contro eventi stressanti di qualsiasi natura.

Bibliografia

1. Natelson BH et al. Evidence for the presence of immune dysfunction in chronic fatigue syndrome. *C Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 747-52.
2. Carlo-Stella N et al. A first study of cytokine genomic polymorphisms in CFS: positive association of TNF-857 and IFN γ 874 rare alleles. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 179-82.
3. Warrington KJ et al. CD4+, CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 13-20.
4. Martin MP et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002 15; 169: 2818-22.
5. Carrington M et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005 4;201: 1069-75.
6. Martin MP et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429-34.

HLA-B*4904: UN NUOVO ALLELE HLA IDENTIFICATO IN DUE INDIVIDUI NON CONSANGUINEI PROVENIENTI DALLA REGIONE MARCHE

S. Nesci,¹ A. Iliescu,¹ O. Buffi,¹ P. Scalari,² M.M. Luchetti³

¹Laboratorio di Tipizzazione Tissutale, Patologia Clinica, Azienda Ospedale San Salvatore, Pesaro; ²Servizio Regionale di Immunologia Clinica e Tipizzazione Tissutale, Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti, Ancona; ³Laboratorio di Medicina Molecolare, Istituto di medicina Interna, Ematologia e Immunologia Clinica, Polo Didattico Scientifico, Ancona

Questo lavoro descrive l'identificazione di un nuovo allele HLA-B*49 in due individui non imparentati entrambi provenienti dalle Marche e rilevato indipendentemente da due diversi laboratori. Il primo individuo eseguiva la tipizzazione HLA per un paziente familiare; il secondo, un paziente con emopatia maligna, era stato proposto per un trapianto da donatore non correlato.

Metodi e Risultati. I campioni sono stati originariamente tipizzati al locus HLA-B con PCR-SSP (DYNAL Biotech Ltd., UK) e rev SSO (Innogenetics, Belgium) a bassa risoluzione. In entrambi i casi risultati ottenuti non erano interpretabili e facevano supporre la possibile presenza di nuovi alleli HLA-B*49. Si è quindi proceduto al sequenziamento automatico degli esoni 2, 3 e 4 (Atria Genetics, San Francisco, CA)¹ e all'analisi dei dati mediante il software di sequenza Assign (Conexio Genomics, Applecross, Western Australia). Sorprendentemente le sequenze di entrambi i campioni, mostravano gli stessi pattern eterozigoti ambigui alle posizioni nucleotidiche 113, 114 e 116 anche se in combinazione con diversi alleli HLA-B: B*38 e B*40 rispettivamente nei due campioni testati. Poiché l'identificazione definitiva dell'allele nuovo richiedeva la separazione dei due alleli, i prodotti PCR sono stati clonati nel pDrive Cloning Vector (Qiagen PCR Cloning Kit; Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) e i cloni ottenuti, sequenziati. Dei dodici cloni ottenuti dal primo campione, sette sono stati assegnati come HLA-B*3801 e cinque come HLA-B*49new mentre dei sei cloni ottenuti dal secondo campione, due sono stati assegnati come B*4001 e quattro come B*49new.

Conclusioni. La nuova variante allelica HLA-B*4904 (accession number AJ969238), identificata in due individui non correlati, differisce dall'originale B*4901 per quattro sostituzioni nucleotidiche nell'esone 3 alle posizioni 113 (da T a C), 114 (da A a G) e 116 (da T a C e da A a C) che risultano in tre diversi prodotti aminoacidici: da Tyr a His al cod 113, da Asn a Asp al cod 114 e da Leu a Ser al codone 116.

Bibliografia

1. Pozzi S, Longo A, Ferrara GB. HLA-B locus sequencing-based typing. *Tissue Antigens* 1999;53:275-81.

ASSOCIAZIONE TRA I LOCI HLA DI CLASSE II E LA RISPOSTA ALLA VACCINAZIONE HBV IN DONATORI DI SANGUE CON MARCATORE ANTI-CORE ISOLATO

A. Mazzocchi, C. Lombardo, M.C. Gianni, F. Arienti, P. Coluccia, A. Falanga, M. Galbiati, C. Biasuz, A.M. Gorla, F. Ravagnani

SIMT, Istituto Nazionale Tumori, Milano

Dati contrastanti sono stati riportati in letteratura sulla possibile associazione tra insorgenza di epatiti post-trasfusionali e utilizzo di unità di sangue da donatori con anti-HBcAg (anticore) isolato. Al fine quindi di migliorare la sicurezza delle donazioni, si è deciso di sottoporre i donatori con tale profilo virologico, afferenti al nostro centro, a un ciclo di vaccinazioni, allo scopo di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti anti-HBcAg. Il protocollo di vaccinazione utilizzato prevedeva che le dosi somministrate variassero sulla base della risposta immunologica osservata: una sola dose ai soggetti che sviluppavano

una risposta secondaria con un titolo protettivo (100 IU/mL, secondo le linee guida del WHO), una seconda e successivamente una terza dose a coloro che non rispondevano alla prima. Lo studio condotto su un totale di 123 donatori ha evidenziato 19 soggetti con risposta anticorpale alla prima dose, 90 con risposta a fine ciclo (*responders*), e 14 con assenza di risposta (*non-responders*).

Le frequenze di soggetti *responders* e *non-responders* del nostro studio sono in linea con quanto noto. Infatti, dati riportati in letteratura hanno mostrato come la risposta indotta dal vaccino, dipendente dai linfociti T CD4+, porti alla produzione di anticorpi neutralizzanti protettivi in circa il 90% dei soggetti. La non risposta alla vaccinazione è stata associata con la presenza di alcuni alleli HLA di classe II, in particolare con l'allele HLA-DRB1*0301; quest'ultima potrebbe essere dovuta alla scarsità di peptidi derivati dalla proteina S, costituente principale del vaccino ricombinante, in grado di legarsi alla proteina HLA-DR3 (Hepatology 2005; 41:1383-1390).

Abbiamo quindi valutato, nell'ambito della nostra casistica, l'associazione tra espressione di antigeni HLA-DRB1 e DQB1 e risposta al vaccino. La tipizzazione HLA è stata condotta mediante SSO e SSP, prevalentemente in bassa risoluzione. Paragonando le frequenze alleliche tra i gruppi *responders* e *non-responders* si è riscontrato un aumento della frequenza (seppur non statisticamente significativa) di DRB1*03 nel gruppo dei donatori *non-responders*. Nel gruppo dei soggetti *responders* si è invece osservato un considerevole aumento della frequenza di DQB1*05 rispetto ai *non-responders* ($p=0.036$, RR=6.8), che potrebbe suggerire il ruolo di un allele nell'ambito di DQB1*05 in grado di indurre una risposta immune al vaccino o di essere associato ad altri geni coinvolti nella risposta.

STUDIO DELLE DIFFERENZE IMMUNOGENETICHE NEL TRAPIANTO APOLOIDENTICO NELLA TALASSEMIA: POSSIBILE RUOLO DEL MISMATCH AL LOCUS DPB1

M. Testi, P. Sodani, A. Isgrò, B. Erer, R. Rosati, M. Battarra, M. Amadei, P. Indigeno, A. Guagnano, G. Lucarelli, G. Federici,¹ M. Andreani

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione IME, *Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di Tor Vergata, Roma

Una possibile alternativa al trapianto di midollo osseo da donatore correlato per i pazienti privi di un donatore HLA identico in ambito familiare è rappresentata dal trapianto da dona-

toire aploidentico. È noto infatti che i pazienti che non hanno un donatore compatibile dispongono almeno di un potenziale donatore tra i familiari HLA aploidentici incompatibili per tre loci. Simili coppie donatore/ricevente possono essere incompatibili nelle due direzioni *host versus graft* e *graft versus host*. La scelta della madre come donatrice aploidentica è supportata dall'ipotesi che durante la gravidanza si instauri un meccanismo di tolleranza materno-fetale legata agli antigeni non ereditati (NIMA). Secondo questo razionale, 14 pazienti affetti da beta talassemia e privi di donatore HLA compatibile sono stati sottoposti nel nostro centro a trapianto aploidentico dalla madre. In questo studio abbiamo valutato le caratteristiche immunogenetiche (HLA-DPB1, geni dei recettori KIR, HLA-Cw) di 7 coppie donatore/ricevente per valutarne l'influenza sull'andamento clinico.

Pazienti, materiali e metodi. Quattordici pazienti talassemici (4 in classe di rischio 2 e 10 in classe di rischio 3, secondo la classificazione di Pesaro, età media 5 anni), sono stati trapiantati da madre incompatibile per un intero aplo tipo. Tutti i pazienti hanno ricevuto dal giorno -59 al giorno -11 Hydroxyurea (OHU) 60 mg/kg e Azathioprina 3 mg/kg, Fludarabina (FLU) 30 mg/m² dal giorno -17 al giorno -13, Busulfano (BU) 14 mg/kg dal giorno -10 al giorno -6, Ciclofosfamide (CY) 200 mg/kg al giorno dal giorno -5 al giorno -1, Thiotepa 10 mg/kg il giorno -6 e ATG Sangstat 2.5 mg/kg dal giorno -7 al giorno -3. Al giorno 0 sono state scongelate e infuse sia le cellule midollari che quelle staminali periferiche. La donatrice è stata stimolata con G-CSF. Dopo 4-7 giorni di stimolazione sono state effettuate da 1 a 4 leucaferesi, ciascuna leucaferesi è stata sottoposta a selezione positiva tramite procedura Clini Max. Il midollo raccolto e infuso fresco il giorno del trapianto è stato sottoposto a T deplezione con selezione negativa. In 7 coppie donatore/ricevente sono state eseguite con metodica di PCR-SSP le tipizzazioni genomiche dei geni KIR (Pel Freez KIR Genotyping kit, Invitrogen, CA, USA), del locus HLA Cw (Pel Freez Cw High Resolution SSP Unitray, Invitrogen, CA, USA) e del locus HLA DPB1 (Dynal AllSet + SSP DPB1, Invitrogen, CA, USA).

Risultati e Conclusioni. Le caratteristiche immunogenetiche delle coppie studiate sono riportate nella Tabella 1. Dei 7 pazienti osservati nessuno ha sviluppato GvHD acuta di grado superiore a 1; tutti i pazienti sono vivi, tuttavia 3 hanno rigettato il trapianto. Per quanto riguarda i profili KIR, le coppie sono state classificate in base al contenuto di geni, nel seguente modo:

D=R Concordanza tra donatore e ricevente, n° coppie = 3;

D≠R Discordanza tra geni KIR del donatore e geni KIR del ricevente (GvHD o Rigetto), n coppie = 1;

R<D Il donatore contiene i geni del ricevente (possibile vet-

Tabella 1.

Coppia D/R	HLA-Cw	KIR D/R	HLA-DPB1	classificazione DPB1	attecchimento
1 R D	C1 C2 C1 C1	D≠R	*0401 *0401 *2601	3/3 3/3	PERM CC
2 R D	C1 C2 C1 C2	R<D	*0402 *0402 *0901	3/3 1/3	HvG rigetto
3 R D	C1 C2 C1 C2	D=R	*0401 *0401 *3001 *0902	3/3 1?/3	HvG rigetto
4 R D	C2 C2 C1 C2	D=R	*0401 *0401 *0402	3/3 3/3	PERM CC
5 R D	C2 C2 C2 C2	D<R	*0401 *0401 *1001 *1001	1/3 1/3	PERM CC
6 R D	C2 C2 C2 C2	R<D	*0401 *0401	3/3 3/3	PERM CC
7 R D	C1 C2 C1 C2	D=R	*0401 *0401 *1301 *1301	3/3 3/3	PERM rigetto

tore GvHD), n coppie = 2;

D<R Il ricevente contiene i geni del donatore. (possibile vettore Rigetto), n coppie = 1.

Gli alleli Cw sono stati classificati a seconda della loro appartenenza al gruppo C1 (HLA-Cw Asn80) e C2 (HLA-Cw Lys80).

L'analisi dei geni KIR e dei loro ligandi HLA-Cw, dato l'esiguo numero di coppie esaminato, non permette di confermare i risultati suggeriti da precedenti studi che hanno associato l'andamento clinico alla classificazione riportata. Inoltre non viene confermato il dato secondo il quale la condizione di omozigotità per uno dei due gruppi C1 o C2 possa predisporre al rigetto o alla GvHD. Gli alleli DPB1 sono stati classificati, in riferimento a quanto proposto recentemente, in tre classi a crescente immunogenicità; successivamente ogni coppia donatore/ricevente è stata valutata applicando un algoritmo di disparità DPB1, classificando i mismatches come permissivi o non permissivi in direzione HvG o GvH. In 3 coppie donatore/ricevente (coppie n°5, 6, 7) entrambi gli alleli DPB1 erano *matched*, in 2 coppie (n°1 e 4) la disparità dell'allele non ereditato era classificata come permissiva, in una coppia donatore/ricevente (n°2) era presente un mismatch DPB1 classificato come non permissivo in direzione di rigetto, mentre nell'ultima coppia (n°3) è stato evidenziata la presenza dell'allele raro DPB1*0902. In uno su tre dei pazienti che hanno rigettato il trapianto non sono state rilevate differenze per l'allele DPB1; il secondo possiede un mismatch DPB1 indicato come non permissivo in direzione rigetto (DPB1*0901 vs DPB1*0401), mentre l'ultimo mostra un mismatch nei confronti della donatrice che presenta l'allele DPB1*0902. L'immunogenicità di questo allele non è stata ancora classificata; l'ipotesi che rientri nella categoria di quelli a forte immunogenicità è in corso di valutazione mediante studi funzionali.

Bibliografia

1. VanRood JJ, Loberiza FR Jr, Zhang MJ, et al. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood*. 2002;99:1572-7.
2. Ichinohe T, Uchiyama T, Shimazaki C, et al. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood* 2004 104:3821-8.
3. Bignon JD, Gagne K. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation *Curr Opin Immunol*.2005;17:553-9 Review
4. Zino E, Frumento G, Marktel S, et al. A T-cell epitope by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation *Blood*. 2004;103:1417-24.
5. 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;107:2984-92.

PRESENZA DI CELLULE T REGOLATORIE (Tr1) IN UN PAZIENTE CON CHIMERISMO MISTO PERSISTENTE DOPO OTTO ANNI DAL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

M. Andreani, G. Serafini, R. Bacchetta,¹ M. Testi, M. Battarra M. Battaglia,¹ G. Federici,² G. Lucarelli, MG Roncarolo¹

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione IME, ¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di Tor Vergata, Roma; ²San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET, Milano

La Talassemia è una malattia genetica caratterizzata da una difettosa sintesi di emoglobina A e che può essere curata attraverso il trapianto di midollo osseo (TMO). L'attecchimento delle cellule che derivano dal donatore rappresenta un evento cruciale per quanto riguarda il successo del trapianto. Tuttavia è stato dimostrato che una emopoiesi completa del donatore non è essenziale affinché il trapianto allogenico funzioni. Infatti è stato osservato che la contemporanea presenza di cellule del donatore e del ricevente non è un evento raro nel TMO per la Talassemia e le cellule del donatore e del ricevente possono coesistere sviluppando uno stato definito di *attecchimento funzionale* identificato come chimerismo misto persistente (PMC). Questi pazienti sono pertanto curati dalla espressione fenotipica di questa malattia ematologica ereditaria. Sebbene i pazienti con chimerismo misto persistente mostrino funzioni immunologiche normali, è stato osservato che il repertorio del recettore Vbeta delle cellule T è alterato, con la presenza di picchi predominanti che ne alterano la normale distribuzione gaussiana. Tuttavia dopo stimolazione con il mitogeno PHA una normale distribuzione di questi picchi viene ripristinata. Questa osservazione suggeriva che la presenza di tale alterazione potesse essere dovuta a una espansione clonale di linfociti T. Per cercare di capire meglio i meccanismi responsabili del chimerismo misto, abbiamo cercato di caratterizzare i cloni derivanti da cellule CD4 positive ottenute da sangue periferico di un paziente con chimerismo misto persistente. In particolare abbiamo cercato la presenza di cellule T regolatorie di tipo 1 (Tr1) per cercare di capire se avessero un ruolo nel mantenimento della tolleranza periferica. I dati preliminari mostrano che una alta percentuale dei cloni CD4 positivi ottenuti produce una quantità elevata di IL-10 in un paziente con chimerismo misto dopo 8 anni dal trapianto. La specificità donatore/ricevente dei cloni ottenuti è stata determinata e sono in corso esperimenti per verificare la capacità soppressiva di questi cloni *in vitro*.

Questo lavoro è stato supportato dalla Fondazione Berloni contro la Talassemia

Bibliografia

- Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. Cd4+ regulatory t cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmunity reviews*2005;4:491-6.
- Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E, et al. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant* 2000.

VALUTAZIONE DELL'ATTECCIMENTO DOPO TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO NELLA TALASSEMIA

M. Battarra, M. Testi, M. Amadei, R. Rosati, A. Guagnano, P. Indigeno, G. Lucarelli, G. Federici,¹ M. Andreani

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione IME, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di Tor Vergata, Roma

Il trapianto di midollo osseo rappresenta una terapia di cura radicale per la talassemia. Dopo due anni dal trapianto di midollo osseo, circa il 10% dei pazienti talassemici sviluppa uno stato di chimerismo misto persistente (PMC), caratterizzato dalla stabile coesistenza di cellule del donatore e del ricevente. La percentuale di cellule residue dell'ospite (RHC) osservata in alcuni di questi pazienti è estremamente elevata (fino al 70%). Questi pazienti sono curati dalla talassemia e sintetizzano alti livelli di catene beta dell'emoglobina. Tuttavia quando osservato nei primi due mesi dopo il trapianto, il chimerismo misto non è stabile. In particolare la presenza di un numero elevato di cellule del ricevente rappresenta un fattore di rischio per il rigetto. Inoltre, anche la presenza di uno *split-chimerism*, nel compartimento linfoide rappresenta un ulteriore fattore di rischio per il rigetto del trapianto. Lo studio del chimerismo rappresenta pertanto un utile strumento per monitorare l'andamento clinico del TMO.

Pazienti. Sono stati esaminati 50 pazienti, (46 affetti da Talassemia, 1 da Microdrepanocitosi, 3 da Anemia Falciforme), sottoposti a trapianto di midollo osseo presso il centro della Fondazione IME da Luglio 2004 a Maggio 2006. Dei 50 pazienti, 44 hanno ricevuto il midollo osseo da familiare HLA genotipicamente identico, 2 da familiare fenotipicamente identico, e 4 da familiare HLA aploidentico. L'età media osservata era di 10 anni (2-18 anni); 25 pazienti erano femmine, 25 erano maschi.

Materiali e Metodi. L'attecchimento è stato determinato a intervalli di tempo regolari, a +20gg, +60gg, +180gg, +365gg e ogni 6 mesi dal TMO mediante lo studio dei polimorfismi STR con un'amplificazione multipla utilizzando il Kit AmpFISTR Profiler Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I risultati sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare con il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystem, e valutati mediante il software Genemapper. Per ogni paziente dal sessantesimo giorno in poi è stato effettuato lo studio del chimerismo anche sulle seguenti sottopopolazioni linfocitarie periferiche: CD3, CD19 e CD56. A questo scopo sono state usate due metodiche: MiniMacs, Miltenyi Biotec, e RosetteSep, StemCell Technologies Inc.; la prima basata su una selezione positiva, la seconda su una selezione negativa. La purezza delle popolazioni linfocitarie ottenute, valutate al citofluorimetro, è stata superiore al 95%.

Risultati e conclusioni. In questo studio abbiamo valutato la percentuale di attecchimento in 50 pazienti sottoposti a trapianto a Roma dall'equipe della Fondazione IME, da Luglio 2004 a Maggio 2006. A due mesi dal trapianto, un solo paziente non ha mostrato segni di attecchimento, mentre 34 pazienti (gruppo 1), hanno avuto un attecchimento completo (CC) e 15 pazienti (gruppo 2), hanno evidenziato un chimerismo misto (CM). Nel gruppo dei pazienti con attecchimento completo, 3 hanno rigettato il trapianto (8,8%), mentre nel gruppo 2 hanno rigettato 5 pazienti con una percentuale di rigetto del 33%, confermando che il chimerismo misto rappresenta un fattore di rischio per il trapianto. È interessante rilevare inoltre come il chimerismo completo rilevato in uno dei tre pazienti che ha rigettato il trapianto nel gruppo 1 sia evoluto in chimerismo misto transitorio a 6 mesi per poi scomparire completamente dopo 8 mesi dal TMO. Del gruppo 2, due pazienti hanno sviluppato un attecchimento completo a sei mesi dal TMO. La Tabella 1 riassume i dati osservati. La valutazione della percentuale di cellule residue dell'ospite nelle sottopopolazioni linfocitarie ha rilevato che, la presenza di *split chimerism* non è un evento raro dopo TMO. Sarà necessario un follow up più lungo per questi pazienti per evi-

denziare una correlazione tra *split chimerism* e rigetto. In tabella 2 sono riportati, come esempio, i dati di 2 pazienti che hanno mostrato uno *split-chimerism*, nel compartimento linfoide.

Tabella 1.

Entro i primi 2 mesi dal TMO	N	Rigetto	%RIG
Gruppo 1 - Chimere Complete (CC)	34	3	8.8%
Gruppo 2 - Chimere Miste (CM)	15	5	33%

Tabella 2.

UPN	+60gg	+180gg	+240gg	Andamento clinico
1	100 PB	55 PB	50 PB	Rigetto
	100 BM	45 BM	80 CD3	
	100 CD3	100 CD3	25 CD19	
	100 CD19	18 CD19	50 CD56	
	100 CD56	57 CD56		
2	68 PB	65 PB		
	75 BM	80 BM		
	20 CD3	18 CD3		
	97 CD19	94 CD19		
	97 CD56	92 CD56		

Bibliografia

- Gaziev J, Lucarelli G., et al. Stem cell transplantation and gene therapy for hemoglobinopathies. *Curr Hematol Rep* 2005 4:126-31.
- Gaziev J, Sodani P, Polchi P, Andreani M, Lucarelli G. Bone marrow transplantation in adults with thalassemia: treatment and long-term follow-up. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:196-205.
- Andreani M, Nesci S, Lucarelli G. et al. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:401-4.

NUOVI APLOTIPI HLA RILEVATI NELL'ANALISI DELLA SEGREGAZIONE DI 196 NUCLEI FAMILIARI

M. Amadei, M. Testi, M. Battarra, R. Rosati, A. Guagnano, P. Indigeno, M. Troiano, G. Lucarelli, G. Federici,¹ M. Andreani

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione IME, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di Tor Vergata, Roma

La percentuale di ricombinazioni genetiche osservate nel sistema HLA ha una frequenza normalmente non superiore all'1% e come noto costituisce un evento cruciale nella formazione di nuovi alleli e di nuovi aplotipi. Tali ricombinazioni in genere avvengono in regioni specifiche denominate "hotspots", localizzate per la classe I tra il locus A e il locus Cw, e per la classe II in due zone diverse: DPB1-RING3 e DQB3-DQB1. Scopo di questo studio è di osservare la presenza di eventi di ricombinazione in diversi nuclei familiari - provenienti dai paesi del Medio Oriente - durante la routinaria attività di tipizzazione HLA per pazienti talassemici in attesa di trapianto di midollo osseo.

Materiali e Metodi. Nel Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti della Fondazione IME presso il Policlinico

Universitario di Tor Vergata da Giugno 2005 a Maggio 2006 sono state tipizzate 196 famiglie per un totale di 987 individui provenienti da diversi paesi dell'area mediorientale: 35 famiglie (193 individui) dal Kurdistan, 58 famiglie (265 individui) dal Libano, 28 famiglie (124 individui) dall'Egitto, 19 famiglie (89 individui) dall'Iraq, 23 famiglie (123 individui) dalla Palestina e 33 famiglie (193 individui) dalle Maldive. Di 158 famiglie è stato eseguito lo studio dei loci HLA-A, B, Cw, DRB1 e DQB1, di 38 famiglie è stato eseguito lo studio dei loci HLA-A, B e DRB1 con metodica di revPCR-SSO e PCR-SSP con Kit forniti dal commercio (Pel-Freez, Dynal, Innogenetics). Di ogni nucleo familiare è stato poi eseguito lo studio della segregazione aplo-tipica. Le coppie paziente/donatore compatibili sono state tipizzate su un nuovo prelievo, come stabilito dagli standards EFI.

Risultati e conclusioni. In 11 famiglie studiate è stata messa in evidenza la formazione di un nuovo aplotipo dovuto ad un evento di ricombinazione. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1.

Provenienza	n° Famiglie	n° Individui	n° Aplotipi	n° Crossing Over	%
Kurdistan	35	193	137	2	1.04
Libano	58	265	224	3	1.13
Egitto	28	124	107	1	0.81
Iraq	19	89	67	1	1.12
Palestina	23	123	83	2	1.62
Maldive	33	193	135	2	1.04

La percentuale di crossing over rilevata va da 0.81 a 1.62 % nelle diverse popolazioni. Degli 11 eventi di ricombinazione riscontrati, 9 di origine materna e 2 di origine paterna, 5 sono localizzati tra A e Cw, 5 tra B e DRB1 e 1 tra DQB1 e DPB1. Quest'ultimo è di particolare interesse in quanto si è verificato in un paziente per il quale era stato selezionato un fratello HLA compatibile per i loci A, B, Cw e DQB1. Il test eseguito come tipizzazione di conferma ha invece messo in evidenza un mismatch al locus DPB1, sottolineando l'importanza di studiare questo locus anche nei familiari HLA identici.

Bibliografia

- Alper C.A, Larsen C.E, Dubey D.P, et al. The Haplotype structure of the Human Major Histocompatibility Complex. *Hum Immunol* 2006;67:73-84.
- Carrington M. Recombination within the human MHC. *Immunol Rev.* 1999;167:245-56.Review.
- Jeffreys AJ, Neumann R, Panayi M, et al. H recombination hot spots hidden in regions of strong marker associations. *Nat.Genet.* 2005 Jun;37:601-6 Epub 2005 May.

APLOTIPI ANCESTRALI SARDI E SCLEROSI MULTIPLA

P.P. Bitti, S.A. Romio, V. Cipriani, M. Barca, V. Saggi, M.L. Piras, L. Musu, R. Ferrai, A. Ticca, B.S. Murgia, L. Bernardinelli

Centro Tipizzazione Tissutale, Ospedale San Francesco, Nuoro, Italy

Nell'articolo di Bitti *et al.* (2001) è stata studiata l'associazione tra l'aplotipo ancestrale A₃₀B₁₈DR3 e la Sclerosi Multipla (SM) in Sardegna attraverso uno studio caso-controllo. L'ipotesi di indipendenza tra l'aplotipo citato e la malattia è stata saggiata utilizzando il modello log-lineare e l'algoritmo Expectation-Maximization (EM). Gli autori hanno ottenuto un p-value significativo

per l'associazione tra aplotipo e SM. Inoltre, hanno valutato l'ipotesi di associazione tra l'aplotipo unidimensionale DR3 e la SM, condizionatamente all'aplotipo A₃₀B₁₈, ottenendo un p-value non significativo. Alla luce di questi risultati gli autori hanno concluso che l'aplotipo bidimensionale A₃₀B₁₈ è responsabile dell'associazione. Presentiamo ora uno studio di replicazione che utilizza casi nuovi originati dalla stessa popolazione e stesso insieme di controlli ai quali ne sono stati aggiunti 37 nuovi. Insieme al dataset_1 (104 casi e 370 controlli), ovvero quello utilizzato in,¹ sono stati analizzati il dataset_2 (114 casi e 407 controlli) e il dataset_3 (218 casi e 407 controlli), unione dei primi due. I tre set di dati sono analoghi per ciò che riguarda la frequenza di casi e controlli, la distribuzione del sesso, il rapporto donne/uomini nei casi e il decorso della malattia. Come nell'articolo citato, per le analisi statistiche è stato utilizzato il software STATA, in particolare i comandi *hapipf* e *proftap* per la stima delle frequenze aplotipiche, il calcolo degli OR e i relativi intervalli di confidenza (IC). Si è saggiata l'ipotesi di linkage disequilibrium (LD) tra i loci dell'aplotipo d'interesse, quindi l'associazione di questo e degli aplotipi parziali con la SM. L'ipotesi di linkage equilibrium (LE) tra i loci è stata rifiutata, ottenendo p-value molto bassi (ordine di grandezza compreso tra 10⁻¹⁰⁰ e 10⁻³⁹), a conferma del fatto che gli aplotipi studiati sono ancestrali. Dai risultati ottenuti dall'analisi del dataset_1 e riportati nella Tabella 1, si rilevava chiaramente l'esistenza di associazione tra l'aplotipo A₃₀B₁₈DR3 e la SM, così come il fatto che l'aplotipo A₃₀B₁₈ potesse essere considerato associato alla malattia.

Tabella 1.

aplotipo	casi	controlli	OR	IC
A ₀₀ B ₀₀ DR ₀₀	100.2	462.6	1.00	Reference
A ₀₀ B ₀₀ DR ₃	17.4	59.5	1.35	0.75-2.34
A ₀₀ B ₁₈ DR ₀₀	20.0	50.6	1.83	1.07-3.05
A ₀₀ B ₁₈ DR ₃	8.4	22.3	1.74	0.73-3.78
A ₃₀ B ₀₀ DR ₀₀	9.5	27.8	1.56	0.68-3.32
A ₃₀ B ₀₀ DR ₃	2.0	9.0	1.03	0.00-4.84
A₃₀B₁₈DR₀₀	10.3	22.9	2.08	0.97-4.18
A₃₀B₁₈DR₃	40.2	85.3	2.17	1.49-3.15

Il p-value ottenuto saggiando l'ipotesi d'indipendenza tra DR₃ e la SM, condizionatamente ad A₃₀B₁₈, era pari a 0.94 ($\chi^2 = 0.77$, g.l.=4), quindi l'associazione tra A₃₀B₁₈DR3 e SM era stata attribuita all'aplotipo bidimensionale che non contiene il locus DR3. Nel dataset_2 (Tabella 2) l'aplotipo completo è ancora associato alla SM, mentre l'aplotipo bidimensionale a cui attribuire l'associazione con la malattia è B18DR3.

Tabella 2.

aplotipo	casi	controlli	OR	IC
A ₀₀ B ₀₀ DR ₀₀	116.07	501.91	1	Reference
A ₀₀ B ₀₀ DR ₃	17.44	66.73	1.13	0.84-1.98
A ₀₀ B ₁₈ DR ₀₀	13.61	57.25	1.03	0.51-1.8
A₀₀B₁₈DR₃	14.88	29.11	2.21	0.83-4.7
A ₃₀ B ₀₀ DR ₀₀	7.31	29.43	1.07	0.54-2.42
A ₃₀ B ₀₀ DR ₃	3.18	8.92	1.54	0.77-8.09
A ₃₀ B ₁₈ DR ₀₀	8.01	27.4	1.26	0.63-2.84
A₃₀B₁₈DR₃	47.5	93.23	2.20	1.38-3.58

Infatti, saggiando l'ipotesi di indipendenza tra A₃₀ e SM, condizionatamente a B₁₈DR₃, si ottiene un p-value di 0.99 ($\chi^2=0.28$, g.l.= 4).

Tabella 3.

aplotipo	casi	controlli	OR	IC
A ₀₀ B ₀₀ DR ₀₀	216.63	501.91	1	Reference
A ₀₀ B ₀₀ DR ₃	34.47	66.73	1.20	0.90-2.09
A ₀₀ B ₁₈ DR ₀₀	33.43	57.25	1.35	1.01-2.37
A₀₀B₁₈DR₃	23.47	29.11	1.87	1.40-3.27
A ₃₀ B ₀₀ DR ₀₀	16.46	29.43	1.29	0.65-2.91
A ₃₀ B ₀₀ DR ₃	5.45	8.92	1.41	0.71-6.01
A ₃₀ B ₁₈ DR ₀₀	18.48	27.4	1.56	0.78-2.73
A₃₀B₁₈DR₃	87.50	93.23	2.18	1.36-2.99

La Tabella 3 riporta i risultati ottenuti sul dataset_3. Si osserva che sia l'aplotipo completo che quello bidimensionale B₁₈DR₃ rivelano un'associazione statisticamente significativa con la SM. Rispetto al dataset_2, le stime degli OR sono più precise, l'intervallo di confidenza corrispondente all'aplotipo B₁₈DR₃ non contiene il valore 1 ed è molto simile a quello ottenuto per l'aplotipo completo. Questi risultati sono supportati dai valori della potenza dei test condotti che presentano un andamento crescente nei tre set di dati (0.54, 0.71 e 0.82, rispettivamente, con $\alpha = 0.05$). Dunque, i risultati ottenuti sul dataset_3, insieme al valore della potenza, ci permettono di concludere che l'aplotipo associato alla SM è B₁₈DR₃ anziché A₃₀B₁₈, come era emerso nella prima analisi (dataset_1). Ciononostante, si è replicato il risultato sull'importanza di B₁₈ nell'associazione, come si osserva dalle analisi condotte su dataset_1 e dataset_3. Utilizzando la stessa metodologia, è stata infine studiata l'associazione tra la SM e un altro aplotipo ancestrale, A₂B₅₈DR₂, il secondo più frequente in Sardegna dopo A₃₀B₁₈DR₃. È stato osservata l'associazione tra l'aplotipo completo e la SM nei tre set di dati ($\chi^2=31.32$, g.l.= 7, p -value= $5.4 \cdot 10^{-5}$ per il dataset_1, ($\chi^2=23.88$, g.l.=7, p -value=0.0012 per il dataset_2 e ($\chi^2=43.02$, g.l.=7, p -value= $3.30 \cdot 10^{-7}$ per il dataset_3), nonché l'associazione con l'aplotipo unidimensionale DR₂. Nel dataset_1 l'OR e il rispettivo IC per l'aplotipo completo sono pari a 0.096 e 0.05-0.29. L'aplotipo completo dunque ha un effetto protettivo statisticamente significativo sulla malattia. Lo stesso risultato è stato ottenuto anche in dataset_2 e dataset_3 (OR=0.25, IC=0.12-0.75 e OR=0.17, IC=0.08-0.5, rispettivamente). Anche l'aplotipo unidimensionale DR₂ risulta protettivo (nel dataset_3 si ottiene OR=0.48, IC = 0.36-0.72). Non risulta però possibile discriminare tra gli aplotipi parziali in quanto le frequenze aplotipiche sono molto basse, in particolare quella relativa all'aplotipo A₀₀B₅₈DR₀₀. Il risultato sul carattere protettivo dell'aplotipo completo e di quello unidimensionale si rivela molto interessante dal momento che nelle popolazioni caucasiche è accettata l'ipotesi che il locus DR₂ sia invece deleterio. In effetti, nel dataset_3 A₂B₀₀DR₂ diventa deleterio: OR=1.74 con IC=1.3-3.0. Questo risultato suggerisce che l'allele B₅₈ abbia un effetto fortemente protettivo e la sua assenza nell'aplotipo ancestrale ne faccia emergere l'effetto deleterio. Complessivamente, i nostri risultati mettono in luce l'importanza del locus B, ovvero della regione genomica intorno ad esso, per la suscettibilità alla SM negli aplotipi ancestrali. Data la ricchezza di geni della regione HLA e il forte LD tra i diversi loci, è molto difficile discriminare quale gene sia il vero responsabile. Per poter approfondire il problema, sarebbe opportuno ottenere una mappatura più fine della regione genomica intorno al locus B, usando i risultati pubblicati in.⁴

Acknowledgement. Luisa Foco, Aliaksei Kisialou, Inga Prokopenko, Roberto Zanotti, Stefania Sanna, Orsula Porcu, Caterina Pinna, Giovanna Gazzaniga.

Bibliografia

1. Bitti PP, Murgia BS, Ticca A, Ferrai R, Musu L, Piras ML. Association between the ancestral haplotype A30 B18 DR3 and Multiple Sclerosis in Central Sardinia. *Genetic Epidemiology* 2001;20:271-83.
2. Mander AP. Haplotype analysis in population – based association studies. *The Stata Journal* (2001) 1, Number 1.
3. Mc Cullagh and Nelder, *Generalized Linear Models*. Chapman and Hall, 1989.
4. Traherne A, Horton R, Roberts AN, Miretti MM, Hurles ME, C Stewart A, et al. Genetic Analysis of Completely Sequenced Disease-Associated MHC Haplotypes Identifies Shuffling of Segments in Recent Human History *James PLoS Genetics* Vol. 2, No. 1.

MUTAZIONE PUNTIFORME DE NOVO IN REGIONE HLA-DRB1 IN DONATRICE DI MIDOLLO OSSEO, RECANTE UN NUOVO ALLELE IN REGIONE DRB3

I. Colombini,¹ L. Pecoroni,¹ A. Malagoli,² G. Carella²

¹ *SIMT Azienda Istituti Ospitalieri di Cremona, CD CRO*; ² *Laboratorio di Istocompatibilità del Servizio di Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili di Brescia*

In questa comunicazione breve si descrive come le indagini di routine su una donatrice di CSE del centro donatori CR01 abbiano portato, oltre all'identificazione del nuovo allele DRB3*0220 (HWS10002929-AY958608),¹ al reperimento di una mutazione puntuale nella donatrice stessa in regione DRB1, con conseguente comparsa di un allele DRB1 non riscontrabile nel genotipo HLA dei genitori.

Materialie Metodi. La donatrice attivata dall'IBMDR nel gennaio 2005 per compatibilità con un paziente affetto da LMA e già tipizzata in sierologia per la I classe e in biologia molecolare (PCR-SSP) a bassa risoluzione per la II classe, presentava il seguente assetto HLA: A 2, 3; B 18, 51; DRB1*13, 14; DRB3*02; DQB1*05,06. La tipizzazione molecolare ad alta risoluzione per la II classe mediante PCR-SSP (kit Olerup-SSP, Genovision) e successivo sequenziamento (ABI Prism 310) permettevano di identificare gli alleli DRB1*1320, 1401 e DRB3*0201, 02new. L'individuazione di questo nuovo DRB3*02, ufficialmente nominato DRB3*0220 (HWS10002929-AY958608) nel Marzo 2005, ci ha spinto ad effettuare lo studio familiare in modo da identificare l'aplotipo di appartenenza. La disponibilità dei genitori e dei fratelli ci ha permesso di individuare, a carico della linea paterna, l'aplotipo di interesse: A*02, B*18, Cw*12, DRB1*13, DRB3*0220, DQA1*0103, DQB1*0603. Inaspettatamente però, il padre presentava un DRB1*1301 e non il DRB1*1320 riscontrato nella figlia; la incongruenza del reperto ci ha condotto a ripetere le tipizzazioni e a rivedere le sequenze onde escludere errori di tipo tecnico o strumentale. Confermate le assegnazioni degli alleli ne abbiamo confrontato le sequenze evidenziando che la differenza fra DRB1*1301 e DRB1*1320 è una transversione A→C che risiede in posizione 1 del codone 67 (base 199). Formulata l'ipotesi di una mutazione puntiforme a carico della linea germinale paterna piuttosto che di una mutazione post-zigotica, che condurrebbe ad una situazione di mosaicism, è stata ripetuta, mediante sequenziamento, la tipizzazione DRB1 utilizzando una fonte alternativa di DNA, estratto dall'epitelio buccale. Ottenuta la riconferma della presenza del DRB1*1320, per completezza e ulteriore conferma dell'ipotesi iniziale, l'analisi familiare è stata allargata coinvolgendo anche la seconda generazione (F2), permettendo quindi di verificare l'ereditarietà e la segregazione aplotipica dell'allele mutato (vedi Figura 1).

Risultati e conclusioni. Gli accertamenti eseguiti tipizzando mediante PCR-SSP e SBT, hanno confermato la presenza nel padre dell'aplotipo: A*02, B*18, Cw*12, DRB1*1301,

DRB3*0220, DQA1*0103, DQB1*0603 diventato nella donatrice: A*02, B*18, Cw*12, DRB1*1320, DRB3*0220, DQA1*0103, DQB1*0603 e trasmesso come tale dalla donatrice alla sua progenie. Il fenomeno di mutazione a carico della linea germinale paterna è in linea con l'osservazione che la probabilità di mutazione è più elevata nel genere maschile rispetto al femminile, a causa del maggior numero di divisioni che si verificano nelle cellule germinali.^{2,3} La mutazione osservata è una transversione, evento meno frequente della transizione, ma che più frequentemente dà origine ad un codone che specifica per un aminoacido diverso da quello originario. Nel caso specifico l'aminoacido che si è originato ha dato luogo ad una proteina già descritta e presente nella popolazione, questo perché il codone 67 rappresenta un punto di ipervariabilità all'interno dell'esone 2 del DRB1. Le mutazioni spontanee negli organismi superiori sono alla base della variabilità genetica e rappresentano uno dei fattori essenziali nel processo di evoluzione. In genere però il fenomeno, nei casi in cui non provoca alterazioni fenotipiche evidenti, non è osservabile direttamente sugli individui, in quanto rappresenta un fenomeno di selezione naturale neutrale.^{4,5} Tali mutazioni si osservano quando gli alleli nuovi si sono fissati nella popolazione. L'aver casualmente assistito, nell'ambito del sistema genetico HLA, al momento preciso di questo evento mutazionale dal suo manifestarsi alla sua trasmissione a livello delle generazioni successive è sicuramente circostanza unica e straordinaria.

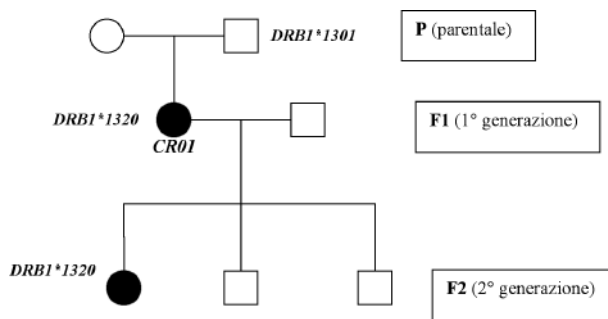


Figura 1. Analisi Familiare della donatrice CR01.

Bibliografia

- Colombini I, Pecoroni L, Malagoli A, Carella G. Identificazione del nuovo allele DRB3*0220 in associazione con l'allele raro DRB1*1320, Volume atti XII congresso Nazionale AIBT.
- Hurst LD, Ellegren H. Sex biases in the mutation rate. *Trends Genet* 1998; 14:446-52.
- Shimmin LC, Chang BH-J, Li W-H. Male driven evolution of DNA sequences. *Nature* 1993; 362:745-7.
- Agrawal AE. Genetic loads under fitness-dependent mutation rates. *Journal of Evolutionary Biology* 2002; 15: 1004-10.
- Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 1968; 217:624-6.

CORRELAZIONE FRA HLA-DRB1*03 E PERIAORTITE CRONICA: UNA IPOTESI DI ORIGINE AUTOIMMUNE

D. Martorana,¹ A. Vaglio,² P. Greco,² A. Zanetti,¹ S. Bardini,¹ G. Moroni,³ C. Salvarani,⁴ C. Buzio,² T.M. Neri,¹ M. Savi¹

¹Laboratorio Immunogenetica, Unità Operativa Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; ²Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; ³Divisione di Nefrologia, Ospedale Policlinico, Milano; ⁴Reparto di Reumatologia, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

La Periaortite Cronica (PC) è una patologia rara che comprende la Fibrosi Retroperitoneale Idiopatica, la Fibrosi Retroperitoneale Perianeurismatica e la sindrome infiammatoria da aneurisma aortico; pazienti affetti da tale patologia mostrano spesso segni clinici e dati di laboratorio tipici di una patologia sistemica autoimmune. Obiettivo di questo lavoro è indagare il ruolo del sistema HLA (Human Leukocyte Antigens) nella Periaortite Cronica.

Materiali e Metodi. In 35 pazienti consecutivi con PC e 350 controlli sani, tutti di razza caucasica e nazionalità italiana, veniva effettuata una tipizzazione a bassa risoluzione per i loci HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 ed una genotipizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide TNF α (-238)A/G e TNF α (-308)A/G situati nel promotore del gene del TNF- α , presente nella regione HLA di classe III. Le frequenze alleliche venivano comparate mediante analisi chi-quadrato, e nei casi in cui la probabilità risultava statisticamente significativa, si applicava la correzione per test multipli di Sidak.

Risultati. la frequenza dell'allele HLA-DRB1*03 risultava più elevata nei pazienti PC che nei controlli (24.28% vs 9.14%, $\chi^2=15.50$, $p=0.000084$, P-corretta=0.0012, odds-ratio=3.187, intervallo di confidenza-95%=1.74-5.83); la frequenza dell'allele HLA-B*08 risultava anch'essa maggiore nei pazienti PC che nei controlli (17.14% vs 6.28%, $\chi^2=11.12$, $p=0.0008$, P-corretta=0.0269, odds-ratio=3.085, intervallo di confidenza-95%=1.54-6.16). La frequenza dell'allele HLA-A*01 era statisticamente differente fra i due gruppi, ($p=0.0463$), ma tale significatività veniva persa dopo correzione per test multipli (P-corretta=0.5088); infine, gli alleli TNF α (-238)A e TNF α (-308)A non risultavano statisticamente significativi ($p=0.512$ e $p=0.445$, rispettivamente). La comparazione degli esami di laboratorio e dei segni clinici tipici di una patologia autoimmune (e.g. Reattanti della fase acuta, sintomi costituzionali) tra i pazienti HLA-DRB1*03-positivi e quelli HLA-DRB1*03-negativi mostravano che il primo gruppo aveva elevati livelli di proteina C-reattiva ($p=0.045$) al tempo di comparsa della patologia, sebbene tale differenza veniva persa dopo correzione per test multipli (P-corretta=0.369).

Conclusioni. Il presente lavoro dimostra che il sistema HLA può rappresentare un fattore di suscettibilità nella genesi della PC. La forte associazione tra PC e HLA-DRB1*03, un allele associato ad un ampio spettro di sindromi autoimmuni (lupus eritematoso sistemico, miastenia grave, diabete mellito di tipo 2 e tiroidite autoimmune), supporta ulteriormente l'ipotesi che la PC può clinicamente manifestarsi come una patologia autoimmune.

Bibliografia

- Vaglio A, Buzio C. Chronic periaortitis: a spectrum of diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:34-40
- Vaglio A, Salvarani C, Buzio C. Retroperitoneal fibrosis. *Lancet*. 2006 Jan 21;367(9506):241-51.
- Vaglio A, Corradi D, Manenti L, Ferretti S, Garini G, Buzio C. Evidence of autoimmunity in chronic periaortitis. A prospective study. *Am J Med* 2003; 114: 454-62.
- Chevet D, Rivalan J, Rebibou JM, Michel F, Guigner F. Idiopathic retroperitoneal fibrosis and HLA antigens. *Nephron* 1996; 73: 495.
- Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345: 340-50.

IL GENE HLA-DRB4*01 COME POSSIBILE FATTORE DI RISCHIO NELLA SINDROME DI CHURG-STRAUSS

D. Martorana,¹ A. Vaglio,² A. Zanetti,¹ C. Grasselli,² C. Morelli,¹ A. Radice,³ R.A. Sinico,³ G. Gregorini,⁴ B. Tumiati,⁵ C. Buzio,² T.M. Neri,¹ M. Savi¹

¹Laboratorio Immunogenetica, Unità Operativa Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; ²Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; ³Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo, Unità Operativa di Immunologia Cli-

nica, Dipartimento Area Medica e Dipartimento di Nefrologia e Immunologia, Milano; 4Divisione di Nefrologia, Spedali Civili, Brescia; 5Dipartimento di Medicina Interna seconda, Ospedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

La sindrome di Churg-Strauss (SCS) è una rara vasculite sistemica necrotizzante, in alcuni casi ANCA-associata, caratterizzata da asma, eosinofilia, ed interessamento di vari organi o apparati quali tratto respiratorio superiore, sistema nervoso periferico, cute, polmone e rene.¹ L'eziopatogenesi è oscura, sebbene in alcune vasculiti siano stati dimostrati alcuni fattori immunogenetici predisponenti; in particolare, il ruolo del MHC (Major Histocompatibility Complex) non è ancora stato chiarito, ma è stato dimostrato che geni della regione HLA (Human Leukocyte Antigen) contribuiscono alla suscettibilità di varie vasculiti (e.g. arterite gigantocellulare, periaortite cronica).^{2,3,4,5}

Materiali e Metodi. In 48 pazienti consecutivi con SCS e 350 controlli sani, tutti di razza caucasica e nazionalità italiana, veniva effettuata una tipizzazione a bassa risoluzione per i loci HLA-A, HLA-B, HLA-DRB ed una genotipizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide TNF α (-238)A/G e TNF α (-308)A/G situati nel promotore del gene del TNF- α , presente nella regione HLA di classe III (tali polimorfismi sono stati dimostrati influenzare l'espressione genica del TNF-alfa in pazienti SCS). Le frequenze alleliche venivano comparate mediante analisi chi-quadrato, e nei casi in cui la probabilità risultava statisticamente significativa, si applicava la correzione per test multipli di Sidak.

Risultati. Relativamente al gene DRB1, la frequenza dell'allele HLA-DRB1*07 risultava superiore nei pazienti con SCS rispetto ai controlli (25.53% vs 13.28%, $\chi^2=9.892$, $p=0.0016$, P-corretta=0.022, odds-ratio=2.238, intervallo di confidenza 95%=1.34-3.73); il gene HLA-DRB4*01, presente solo in soggetti con aplo tipi contenenti gli alleli HLA-DRB1*04, DRB1*07 e DRB1*09, mostrava una frequenza superiore nei pazienti che nei controlli (39.36% vs 20.28%, $\chi^2=17.27$, $p=0.000041$, P-corretta=0.000574, odds-ratio=2.551, intervallo di confidenza 95%=1.63-4.01). Non si evidenziavano differenze statisticamente significative nelle frequenze alleliche dei geni appartenenti ai loci HLA-A ed HLA-B e dei polimorfismi singolo nucleotide del TNF- α .

Conclusioni. Questi risultati mostrano che fattori immunogenetici possono essere coinvolti nella patogenesi della SCS; in particolare, la stretta associazione tra la SCS e il gene DRB4*01 - che codifica per la proteina HLA-DR53- precedentemente riscontrata in patologie quali artrite reumatoide, arterite gigantocellulare, sindrome antifosfolipidica primaria e tiroidite di Hashimoto (3,4,5), testimonia la natura autoimmune-infiammatoria della SCS e fa supporre l'esistenza di meccanismi patogenetici comuni a queste forme.

Bibliografia

1. Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, et al. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum* 52;9:2926-2935.
2. Martorana D, Vaglio A, Greco P, Zanetti A, Moroni G, Salvarani C, et al. Chronic periaortitis and HLA-DRB1*03: another clue to an autoimmune origin. *Arthritis Rheum* 2006;55:126-30.
3. Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, et al. HLA-DRB1*01 association with Henoch-Schönlein purpura in patients from northwest Spain. *J Rheumatol*. 2001 Jun;28:1266-70.
4. Dababneh A, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer A, Thomson W, Ollier W. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica can be differentiated by distinct patterns of HLA class II association. *J Rheumatol* 1998;25:2140-5.
5. Girona E, Yamamoto-Furusko JK, Cutino T, Reyes P, Vargas-Alarcon G, Granados J, Alarcon-Segovia D. HLA-DR6 (possibly DRB1*1301) is associated with susceptibility to Takayasu arteritis in Mexicans. *Heart Vessels*.1996;11:277-80.

ANALISI DEI DATI DEL REGISTRO ITALIANO DI DONATORI DI MIDOLLO OSSEO

S. Rendine, L. Garbarino,¹ N.M. Ferrero, A. Amoroso, N. Sacchi¹

S.C. Immunologia dei Trapianti, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino; ¹S.C. Laboratorio di Istocompatibilità / IBMDR, E. O. Ospedali Galliera, Genova

Il Registro Nazionale Italiano dei Donatori di Midollo Osseo (IBMDR) è una delle 58 strutture che operano, in tutto il mondo, allo scopo di reperire un donatore non consanguineo compatibile per i pazienti in attesa di trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE). Oggi, tali registri rendono disponibili oltre 10.500.000 potenziali donatori di CSE, di cui il 70% indagati per le caratteristiche HLA di I e II classe. Il registro italiano, con i suoi 319.000 iscritti, è la quarta organizzazione mondiale (terza in Europa dopo Inghilterra e Germania) per consistenza numerica. Malgrado ciò esiste ancora un'aliquota di pazienti (il 37% nel 2005), in ricerca presso l'IBMDR, che non riesce a reperire in tempo utile un potenziale donatore sufficientemente compatibile. Emerge di conseguenza la necessità di identificare degli accorgimenti per migliorare la qualità del Registro e rendere più efficiente la ricerca; le strategie più appropriate da adottare possono essere suggerite dall'analisi dei dati attualmente disponibili. Il Registro è composto fondamentalmente da 3 archivi: quello dei donatori, dei riceventi e quello che li mette in relazione durante le procedure di ricerca. Con l'attuale studio ci proponiamo di analizzare i dati IBMDR secondo 2 tipi di valutazioni:

- Le caratteristiche genetiche del Registro;
- Le strategie di reclutamento e di sviluppo del Registro;

In merito al primo punto si eseguirà un'analisi descrittiva in termini qualitativi e quantitativi dei dati relativi ai donatori e ai pazienti con:

- analisi delle frequenze degli alleli HLA A, B, C, DR, DQ - e dei rispettivi aplo tipi - ad alta risoluzione e la frequenza dei fenotipi unici. Queste indagini saranno condotte per l'Italia e per le diverse regioni italiane, mettendole in relazione tra loro e con le altre popolazioni europee;
- confronto delle frequenze HLA (e dei fenotipi unici) tra pazienti e donatori, tra pazienti per diversa malattia di origine, tra pazienti di regioni diverse e diverso grado di probabilità di reperire un donatore.

Dall'analisi dei dati si ritiene possano derivare indicazioni circa le strategie migliori per potenziare il Registro, e cioè, se per migliorarne la qualità si dovranno

- aggiungere nuovi donatori e in quali regioni;
- estendere la tipizzazione dei donatori già presenti nel registro, ad esempio:
 - tipizzando ad alta risoluzione (4 digit) il polimorfismo degli alleli DRB1, o almeno di quelli con maggior numero di varianti alleliche;
 - tipizzando il locus HLA-C
 - tipizzando a 2 digit il locus DRB1 dei donatori già tipizzati per HLA-A,B.

Per il mese di settembre 2006 ci siamo posti l'obiettivo di fornire una prima descrizione dei dati del Registro relativi all'archivio dei donatori sia in termini quantitativi che di caratterizzazione genetica. La richiesta di valutare i dati del Registro è stata autorizzata dalla Commissione dell'Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) e dalla Consulta dei Registri Regionali dell'IBMDR e di questo intento è stato pure informato il Centro Nazionale Trapianti (CNT). L'ultima valutazione - per la parte di immunogenetica - era stata compiuta alla fine degli anni '90, su un archivio numericamente inferiore e contenente dati meno dettagliati. I risultati di tale studio avevano permesso le seguenti pubblicazioni:

Bibliografia

1. Rendine S, Barbanti M, Sacchi N, Curtoni ES. Genetic analysis of Italian hematologic patients candidates for bone mar-

row transplantation from unrelated donors. Ann Ist Super Sanità 1999;35:35-40.

- Rendine S, Barbanti M, Borelli I, Dall'Omo AM, Roggero S, Sacchi N, Curtoni ES. The Italian Registry of Bone Marrow Donors: genetic structure and recruitment strategy. Ann Ist Super Sanità. 1999;35:21-34.
- Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Curtoni ES. HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis. Tissue Antigens. 1998;52:135-4.

LA PCR-SSP QUALE NUOVA METODICA NELLA TIPIZZAZIONE DEL LOCUS HLA-G

F. Alba,² S. Lai,² B. Casula,¹ M. Serra,² L. Cappai,²
D. Valentini,² C. Carcassi^{1,2}

¹Cattedra di Genetica Medica, Università degli Studi, Cagliari;

²Centro Regionale Trapianti, ASL 8, Cagliari

HLA-G è un gene non-classico localizzato nel Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) umano sul braccio corto del cromosoma 6, telomericamente al locus HLA-A (circa 300 Kb) compreso tra i geni HLA di classe I. Le molecole HLA-G sono generate da un meccanismo di splicing alternativo del trascritto primario del gene e mostrano una funzione specifica nella regolazione della risposta immunitaria. Il locus HLA-G è scarsamente polimorfico, rispetto alle molecole HLA classiche di Classe I; attualmente è caratterizzato da 22 varianti alleliche che codificano per 6 diverse proteine (compresa la più recente specificità HLA-G*0107, descritta successivamente ai risultati riportati in questo lavoro) ed un allele null (HLA-G*0105N) originato da una delezione al codone 130 dell'esone 3. Questo limitato polimorfismo assicura, a livello fetale, che il prodotto genico HLA-G di origine paterna presente sulle cellule del trofoblasto sia simile a quello della madre, in modo che l'espressione di HLA-G in questo sito non induca una allorizzazione materna. Il maggior numero dei siti polimorfici che caratterizzano questi alleli risiede sugli esoni 2, 3, 4 come per la maggior parte dei geni HLA di Classe I.

Scopo dello Studio. Differenti approcci di tipizzazione sono stati di volta in volta utilizzati, alcuni basati sull'analisi conformazionale del prodotto di amplificazione (PCR-SSCP), altri sull'impiego di enzimi di restrizione (PCR-RFLP) o di sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche (PCR-SSOP), anche se la tecnica di elezione è sempre stata il sequenziamento diretto della regione genomica compresa fra l'esone 2 e l'esone 6. L'intento di questo studio era quello di mettere a punto una semplice procedura di tipizzazione del locus HLA-G come quella basata sulla PCR con coppie di primers sequenza-specifici (PCR SSP).

Materiali e Metodi. Abbiamo sviluppato un protocollo basato sull'uso di 10 primer mixes, ognuna delle quali specifica per una sequenza contenente un polimorfismo caratterizzante una o più specificità alleliche (Tabella 1).

Tabella 1. Composizione delle primer mix e delle specificità alleliche riconosciute.

Mix	Sense primer	PCR-SSP Mixes	
		Antisense primer	recognized allelic specificities
1	G2-5'	G2-3' 31 A	0101-0106
2	G2-5'	G2-3' 31 A	0103
3	G2-5'	G2-3' 54 G	0102
4	G2-5'	G2-3' 54 G	0101, 0103-0106
5	G3-5'	G4-3' 110 A	0104
6	G3-5'	G4-3' 110 C	0101-0103, 0105N-0106
7	G3-5'	G4-3' 130 CA	0105N
8	G3-5'	G4-3' 130 CC	0101-0104, 0106
9	G4-5'	G4-3' 258 T	0106
10	G4-5'	G4-3' 258 C	0101-0105N

I primers sono stati disegnati sulla base delle sequenze alleliche pubblicate, e sono in grado di discriminare le seguenti specificità: HLA-G*0101, *0102, *0103, *0104, *0105N, *0106.

Risultati e Conclusioni. Questa metodica offre una serie di notevoli vantaggi: consente di tipizzare il locus HLA-G in alta risoluzione (4 digit), in modo facile e veloce, inoltre i risultati possono essere letti con un sistema di rilevamento rapido ed economico che prevede l'utilizzo dell'elettroforesi su gel di agarosio (vedi fig.1), viene pertanto eliminata la necessità di apparecchiature addizionali, spesso costose, in quanto di facile esecuzione da parte di qualsiasi laboratorio standard di immunogenetica. L'accuratezza e l'efficacia del metodo sono state ulteriormente confermate dal sequenziamento diretto dei campioni testati, in accordo con i protocolli riportati in letteratura.

Bibliografia

- M. Kirszenbaum et al. HLA-G gene Polymorphism Segregation Within CEPH Reference Families. Human Immunology 1997;53, 140-7.
- van der Ven K. et al. HLA-G Polymorphisms and Allele Frequencies in Caucasians. Human Immunology 1998;9:302-12.
- Aldrich C.L. et al. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. Mol Hum Reprod 2001;7:1167-72.

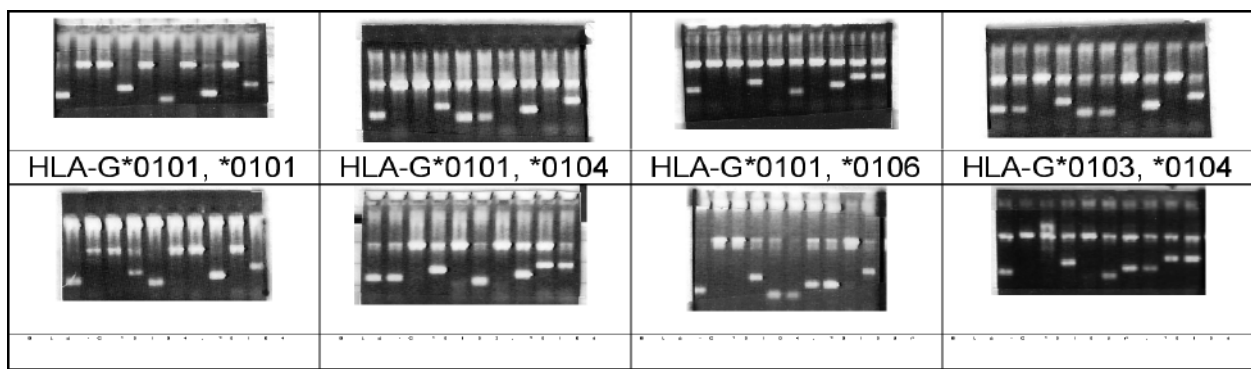


Figura 1. Fotografie dei gel di agarosio concernenti la tipizzazione al locus HLA-G di 8 diversi campioni.

HLA E IPERSENSIBILITÀ ALLA NEVIRAPINA IN PAZIENTI SARDI HIV POSITIVI

R. Littera,¹ C. Carcassi,¹ B. Casula,¹ M. Mulargia,¹ V. Loi,¹ M. Serra,¹ L. Cappai,¹ D. Valentini,¹ A. Masala,² P. Serra,² P. Piano,² F. Ortu,² N. Corso,² G. La Nasa,³ L. Contu,³ P.E. Manconi²

¹*Cattedra di Genetica Medica, Università degli Studi di Cagliari;*

²*Centro di Immunologia Policlinico Universitario, Università degli Studi di Cagliari;*

³*Centro Trapianti di Midollo Osseo, Ospedale R. Binaghi, Azienda USL 8*

La Nevirapina è un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa che viene comunemente utilizzato nel trattamento dei pazienti affetti da infezione da HIV. Circa il 5% dei soggetti trattati con NVP manifesta reazione allergica con comparsa di vari sintomi che possono comprendere: febbre, severe cutaneous adverse reaction (SCAR) e/o tossicità epatica acuta, e/o interessamento multisistemico. Tali complicanze nella maggior parte dei casi, si risolvono con la sospensione del farmaco ma raramente possono essere letali. Recenti studi hanno escluso che la tossicità del farmaco sia correlata al dosaggio, o ad alterazioni enzimatiche del sistema farmaco-metabolico del P450.

Scopo dello Studio. Fra i pazienti HIV infetti afferenti al nostro Centro, abbiamo registrato una incidenza di tossicità acuta da reazione allergica alla nevirapina 4 volte superiore (circa 20%) a quella riportata in altre popolazioni. Tenuto conto della peculiare struttura HLA della popolazione sarda e della osservazione recente di Martin e coll., abbiamo voluto vedere se la maggiore incidenza di HSR alla NVP riscontrata nei pz. sardi fosse legata a particolari antigeni HLA più frequenti nella popolazione sarda che in altri gruppi etnici.

Pazienti, Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 49 soggetti sardi HIV-infetti sottoposti a terapia con NVP, di età compresa tra 18 e 60 anni. I pazienti hanno accettato di partecipare allo studio sottoscrivendo un consenso informato. Nella tabella sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei

pazienti (Tabella 1). Tutti i soggetti, esclusi coloro che hanno sviluppato rapida reazione alla NVP, sono stati trattati per un periodo superiore ai sei mesi. La HSR – NVP è stata valutata con criteri clinici rigorosi come stabilito dall'AIDS Clinical Trial Group (ACTG) Tutti i pazienti trattati con NVP e inclusi nello studio, sono stati tipizzati ai loci HLA-A, -Cw, -B e -DR. Le frequenze alleliche sono state confrontate con quelle di 1101 soggetti sardi non correlati e rappresentativi delle frequenze aplotipiche nella Popolazione Sarda.

Risultati. Dei 49 soggetti studiati, in trattamento con NVP, 13 hanno sviluppato rapidamente HSR – NVP in un periodo compreso tra i 3 – 60 giorni (mediana 12 e 25 giorni rispettivamente per le reazioni cutanee ed epatiche). I due gruppi HSR-NVP e NVP-tolerant sono stati confrontati per l'età, sesso, peso, stato della malattia (CDC), carica virale al momento della terapia, funzionalità epatica, concomitante infezione per HCV e/o HBV. Nessuna delle variabili cliniche considerate è risultata associata significativamente con l'insorgenza della reazione. Esaminando la tipizzazione HLA dei due gruppi, gli antigeni HLA-Cw8, HLA-B14(65), HLA – DR1 sono risultati significativamente più rappresentati nel gruppo di soggetti NVP ipersensibili (Table 2). Il 46% (6/13) dei soggetti ipersensibili (HS) alla NVP possedevano gli antigeni HLA-Cw8 e HLA-B14(65) rispetto al 5% (2/36) del gruppo NVP tolerant ($p=0.002$; $P_c = 0.04$ e $P_c = 0.02$ rispettivamente per HLA-B14(65) e HLA Cw8). I 6 pazienti HS-NVP e i 2 soggetti del gruppo NVP tolerant positivi per L'HLA-Cw8 e HLA-B14(65), presentavano le stesse specificità alleliche Cw*0802 e B*1402.

Conclusioni. Ulteriori studi, aventi una casistica più ampia sono tuttavia necessari per confermare l'associazione tra HSR alla NVP e l'aplotipo HLA-Cw*0802, B*1402. Questi risultati suggeriscono di eseguire la tipizzazione HLA dei pazienti HIV per individuare i soggetti geneticamente predisposti a sviluppare HSR e per i quali va posta particolare attenzione nella scelta della terapia antiretrovirale riducendo così i rischi di tossicità e di HSR talora severe.

Tabella 1.

	NVP-hypersensitive (13 pts)	NVP-tolerant (36 pts)	P	PC	NVP-unexposed (82 pts)	P	PC
Number of examined haplotypes	26	72			164		
Complete haplotype frequency							
HLA A33, Cw8, B14, DR1	2 (7.69%)	2 (2.77%)			0 (0%)	0.03	
Partial haplotype frequency							
HLA A33, Cw8, B14	2 (7.69%)	2 (2.77%)			1 (0.61%)	0.04	
HLA w8, B14, DR1	4 (15.38)	2 (2.77%)	0.03		2 (1.29%)	0.002	0.02
HLA A33, Cw8	2 (7.69%)	2 (2.77%)			1 (0.61%)	0.04	
HLA A33, B14	2 (7.69%)	2 (2.77%)			1 (0.61%)	0.04	
HLA A33, DR12	2 (7.69%)	2 (2.77%)			1 (0.61%)	0.04	
HLA Cw8, B14	6 (23.07%)	2 (2.77%)	0.002	0.02	4 (2.43%)	0.0003	0.003
HLA Cw8, DR1	4 (15.38%)	2 (2.77%)	0.03		2 (1.29%)	0.002	0.02
HLA B14, DR1	4 (15.38%)	2 (2.77%)	0.03		2 (1.29%)	0.002	0.02
Single allele frequency							
HLA A33	2 (7.69%)	2 (2.77%)			6 (3.65%)		
HLA Cw8	6 (23.07%)	2 (2.77%)	0.002	0.02	5 (3.04%)	0.0006	0.007
HLA B14	6 (23.07%)	2 (2.77%)	0.002	0.04	12 (7.31%)	0.01	
HLA DR1	4 (15.38%)	5 (6.94%)			17 (10.36%)		

INFLUENZA DEI GENOTIPI KIR E HLA-C SULL'ESITO DEL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE IN PAZIENTI TALASSEMICI

C. Carcassi,^{1,2} R. Littera,² A. Ventrella,¹ N. Orrù,¹ M. Mulargia,^{1,2} G. Giustolisi,² V. Loi,² R. Boero,^{1,2} F. Alba,² S. Lai,² S. Nesci,³ F. Locatelli,⁴ G. La Nasa⁵

¹Cattedra di Genetica Medica, Università degli Studi, Cagliari; ²Centro Regionale Trapianti, ASL 8, Cagliari; ³Unità TMO, P.O. S. Salvatore, Pesaro; ⁴Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; ⁵Centro TMO, P.O. R. Binaghi, Cagliari

I recettori KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) mediano l'attività dei linfociti NK tramite il riconoscimento di molecole HLA di Classe I. HLA-C è il ligando d'elezione per i KIR inibitori 2DL1, 2DL2 e 2DL3 e per quelli attivatori, 2DS1 e 2DS2. La sostituzione di un residuo amminoacidico nelle posizioni 77 e 80 dell' α -elica di HLA-C permette di dividere le molecole HLA-C in due gruppi (C1 e C2) ciascuno dei quali viene selettivamente riconosciuto da una coppia specifica di KIR attivatori/inibitori. Benchè numerosi studi abbiano indagato sull'impatto dei KIR e dei loro ligandi sull'esito del trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) nella leucemia mieloide e in quella linfoblastica acuta, i risultati permangono controversi. Sicuramente, la grande quantità di variabili che scaturiscono dai regimi di condizionamento e i fattori clinici ed immunologici associati al trapianto nelle malattie oncematologiche, rappresentano il maggior svantaggio. Per tale ragione, il trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) nella talassemia rappresenta un modello di studio ideale.

Scopo dello studio. Scopo di questo studio era quello di valutare l'influenza dei genotipi KIR e HLA-C sull'esito del trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) da non correlato in pazienti affetti da talassemia major. L'obiettivo principale era quello di ridurre il rischio di GvHD e rigetto estendendo i criteri (es. compatibilità HLA per la selezione donatore/ricevente nei candidati al trapianto) al profilo genico KIR.

Pazienti, Materiali e Metodi. Nello studio sono stati inseriti quarantaquattro pazienti talassemici trapiantati da donatore non correlato dal 1993 al 2004. Le caratteristiche dei riceventi sono mostrate nella tabella. Tutte le coppie donatore/ricevente erano identiche per le specificità HLA di classe II, il 91% erano identiche anche al riguardo della classe I. Tre pazienti mostravano differenze al riguardo degli antigeni Cw ma erano identici ai loro donatori per C1 e C2 che sono a loro volta riconosciuti dai KIR corrispondenti. Tutte le coppie donatore/ricevente sono state tipizzate per i 14 loci KIR: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1. La selezione di 28 coppie donatore/ricevente è stata impostata sull'identità molecolare per HLA-A, B, Cw, DRB1 (B3, B4, B5), DQA1 e DQB1. Il regime di condizionamento era lo stesso in tutti i pazienti.

Tabella 1.

N. pazienti	44
Età media	12±6
Sesso	18/26 (40%-60%)
Attecchimento (%)	38 (86%)–6 (14%)
Rigetto (%)	
Deceduti	6 (14%)
Evento infettivo	2 (3%)
GvHD acuta	4 (11%)
GvHD acuta grado II – IV (%)	12 (27%)
GvHD cronica	2 (4%)

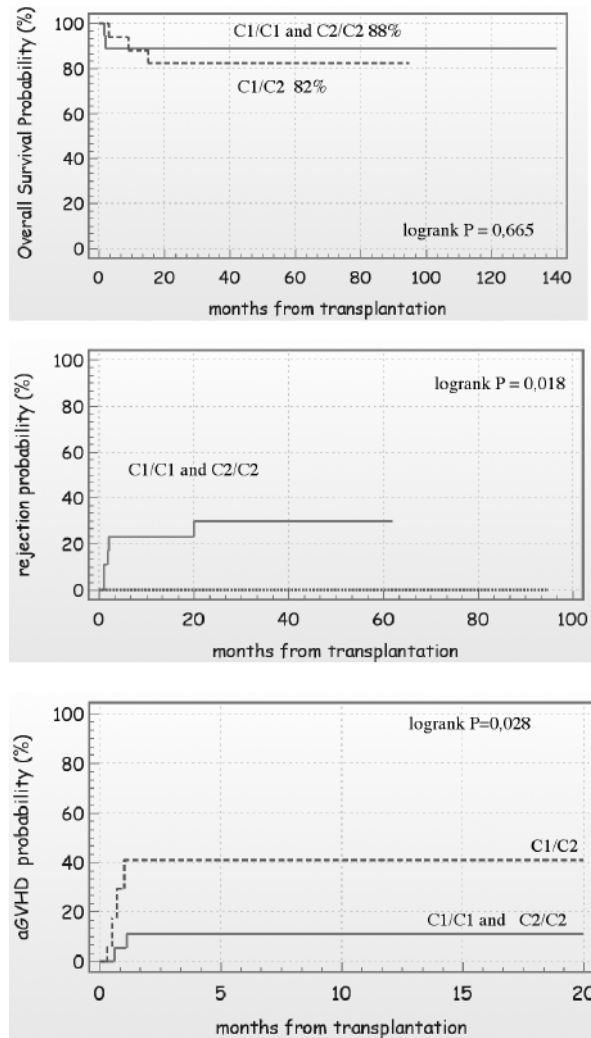


Figura 1.

Risultati. Dei 44 trapiantati, 6 hanno rigettato, 12 hanno sviluppato GvHD acuta di grado II-IV e sei pazienti sono deceduti. Le frequenze dei geni KIR nei due gruppi di pazienti valutabili erano molto simili e analoghe a quelle trovate nella popolazione di controllo. Al riguardo dell'esito del trapianto, la valutazione dell'attività inibitoria e attivatrice dei KIR nel donatore non ha mostrato differenze statisticamente significative se paragonate a quelle dei pazienti (attecchimento, GvHD acuta o rigetto). Al contrario, le molecole HLA-C dei riceventi possedevano una maggiore influenza sull'esito del trapianto. I pazienti eterozigoti C1/C2 avevano un rischio maggiore di sviluppare GvHD se paragonati agli omozigoti C1/C1 o C2/C2 ($p=0.02$). La frequenza di rigetto era più alta negli omozigoti C1 ($p=0.02$).

Conclusioni. La compatibilità HLA, associata ad una accurata valutazione del profilo genico KIR nelle coppie donatore/ricevente sembrerebbe migliorare l'esito del trapianto riducendo il rischio di GvHD e rigetto. Questo approccio combinato per la selezione delle coppie donatore/ricevente dovrebbe rendere possibile una appropriata modulazione della terapia immunosoppressiva così come la riduzione della comparsa di effetti collaterali. Per tali ragioni, i criteri qui applicati possono essere raccomandati anche se si richiedono ulteriori studi per la conferma dei nostri risultati.

HLA-C: UN CASO DI DISCORDANZA SIEROLOGIA/BIOLOGIA MOLECOLARE

A.M. Mangione, G. Coucourde, E. Andreoletti, A. Coppo, A. Biava, A. Bosetti, G. Camisasca, M.G. Cianci, R. La Torre, C. Monzeglio, R. Mari

S.O.C. Immunematologia e Medicina Trasfusionale, Ospedale S. Andrea, Vercelli

Da alcuni anni è stata rivalutata l'importanza del ruolo delle molecole HLA-C nel trapianto. La tecnica sierologica si è rivelata particolarmente limitata nella tipizzazione dei prodotti dei geni del locus HLA-C per la mancanza e/o la scarsa qualità degli antisieri tipizzanti e per la minore espressione di superficie degli antigeni HLA-C; oggi però, con il DNA-typing, il locus HLA-C risulta essere altamente polimorfico, almeno quanto i loci HLA-A e -B.¹ Per questo motivo, in seguito anche alle indicazioni del Registro Donatori Midollo Osseo Italiano (IBMDR), il Registro Regionale Piemontese ha deciso nel 2003 di includere nel progetto di riqualificazione dei donatori, in corso dal 1998, oltre alla tipizzazione estesa dei loci di classe I e II (ABDR) anche la tipizzazione del locus HLA-C su tutti i nuovi iscritti effettuando (nel biennio 2003-2004) in parallelo la tecnica sierologica e quella molecolare in bassa risoluzione per valutarne l'affidabilità e l'applicabilità in routine.² Fra i nuovi donatori del Centro Donatori VC01 abbiamo riscontrato un caso di discordanza in un campione con tipizzazione sierologica HLA-Cw6,7 e molecolare HLA-Cw*06,*15. La tipizzazione del campione è HLA-A2,30;-B13,73,w4,w6;-Cw*06,*15;-DRB1*04,*07 (confermata anche in un secondo prelievo). Dato il forte linkage disequilibrium fra i loci HLA-B e HLA-C, è stata ipotizzata una possibile associazione del prodotto dell'allele Cw*15, che reagisce con gli antisieri anti-Cw7, con l'antigene B73. Abbiamo quindi deciso di eseguire la tipizzazione molecolare del locus HLA-C e, quando possibile, di ripetere la tipizzazione sierologica dei donatori iscritti al nostro Centro Donatori che presentavano HLA-B73 nel loro fenotipo per verificare una possibile conferma della discrepanza.

Materiali e Metodi. 20 campioni che presentavano nel loro fenotipo l'antigene HLA-B73 (19 donatori di midollo osseo e 1 paziente per studio di associazione HLA-malattia) sono stati tipizzati sierologicamente per i loci HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ utilizzando la tecnica standard di microlinfocitotossità complemento dipendente con vassoi di tipizzazione forniti dal commercio da varie ditte. Il DNA genomico è stato estratto con la tecnica di micro salting out da campioni di sangue periferico prelevato in EDTA. La tipizzazione molecolare del locus HLA-C in bassa risoluzione è stata effettuata con il metodo PCR-SSP con kit che permettono una bassa risoluzione degli alleli HLA-Cw*01,*18 (GenoVision; Dynal). La tipizzazione molecolare in alta risoluzione del gruppo allelico HLA-Cw*15 è stata eseguita con la tecnica PCR-SSP utilizzando un kit con un set di 15 reazioni PCR in grado di identificare le specificità alleliche Cw*1502,*1514 (GenoVision).

Risultati. 19 donatori di CSE iscritti al CD VC01 sono risultati presentare HLA-B73 nel loro fenotipo ed anche una paziente affetta al nostro laboratorio per uno studio di associazione HLA-malattie proprio nella fase di esecuzione delle tipizzazioni che così è stata inserita nel gruppo di studio. Le tipizzazioni sierologiche sono state eseguite tra il 1993 e il 2005 con gli antisieri presenti nei vassoi commerciali di 5 differenti ditte. Reattività sierologica: tutti i 20 campioni sono risultati reattivi con antisieri anti-Cw7 sempre con una forte reattività; 13 campioni hanno mostrato reattività anche con antisieri anti-Cw6 ed in 6 la reattività Cw6 è scomparsa o si è attenuata in tipizzazioni ripetute negli anni seguenti; 12 campioni sono stati tipizzati 2 volte e la reattività Cw7 è stata sempre confermata; in 4 campioni la presenza dell'antigene Cw7 è stata poi confermata dal riscontro del relativo allele molecolare (vedi risultato tipiz. genomica). Tipizzazione genomica: l'allele Cw*15 è stato identificato in tutti i 20 campioni e la tipizzazione in alta risoluzione ha identificato in tutti la presenza dell'allele Cw*1505; l'allele Cw*07 è stato confermato solo in 4 campioni di cui 2 con fenotipo

sierologico omozigote Cw7 e molecolare Cw*07,*15 e 2 con fenotipo sierologico Cw6,7 e molecolare Cw*07,*15.

Conclusioni. Il campione risultato discrepante durante lo studio regionale ha confermato i risultati sierologico e molecolare anche in un secondo prelievo eseguito successivamente al primo, escludendo così la possibilità di un errore di tipizzazione. I 20 campioni hanno reagito con antisieri di differenti ditte commerciali sempre con forte reattività (score 8) in tipizzazioni eseguite tra il 1993 e il 2005 quindi con antisieri non solo di diversa origine ma anche di differente qualità nel tempo. In 13 campioni è stata riscontrata anche una reattività con antisieri anti-Cw6 (in alcuni anche con score 8), la più frequentemente segnalata in letteratura e negli studi degli antisieri commerciali, ed in 6 di questi è scomparsa o si è attenuata alle successive tipizzazioni confermandosi così come una cross-reattività minore dovuta alla condivisione di epitopi comuni e ad una minore purezza degli antisieri. Nei 4 campioni in cui la presenza dell'antigene Cw7 è stata confermata dal riscontro del relativo allele molecolare la reattività specifica dei sieri anti-Cw7 ha coperto la cross-reattività con Cw15, mentre si è manifestata solo quella dei sieri anti-Cw6. Abbiamo considerato tutti gli antigeni presenti nei fenotipi dei campioni studiati per ricostruire il possibile aplotipo interessato. Gli altri antigeni HLA non -C maggiormente rappresentati nei fenotipi di questi campioni sono: HLA-A2 (19 campioni su 20, 3 omozigoti e 16 eterozigoti); HLA-B73 (20 campioni su 20, II° antigene B: nessuno presente in maniera significativa); HLA-DR4 (15 campioni su 20); HLA-DQ2 (14 campioni su 20). Il possibile aplotipo che ne risulta è: HLA-A2;B73;Cw15;DR4;DQ2. I campioni esaminati sono tutti di origine caucasica, non imparentati e prevalentemente originari delle regioni del Nord Italia. Generalmente le discrepanze tra i risultati ottenuti con la tipizzazione sierologica rispetto a quelli ottenuti con la tipizzazione molecolare nella tipizzazione del locus C sono dovute ad antigeni blank sierologici identificati invece in DNA-typing oppure ad errori di assegnazione di sottotipo o di supertipo, come nel nostro caso; oggi però con il DNA-typing è possibile identificare i numerosi antigeni HLA-C definiti blank in sierologia riducendo l'omozigosi fino al 10%.¹ ³ Nelle tabelle di reattività degli antisieri presenti nei vassoi di tipizzazione del commercio utilizzati abbiamo trovato segnalazioni di una possibile reattività Cw15 in sieri anti-Cw6 ma non in sieri anti-Cw7. In letteratura abbiamo trovato nell'HLA Dictionary 2001 e 2004 segnalazioni di reattività in cellule Cw15 positive con sieri anti-Cw2 e anti-Cw6 (allele Cw*1502) e con sieri anti-Cw2 e anti-Cw7 (allele Cw*1505), ed anche con sieri anti-Cw6 (allele Cw*150502) (4) così come l'associazione HLA-B73/Cw15 (allele Cw*150501/B*7301).^{3,5} L'antigene HLA-Cw15 è una proteina lunga 366 aa con peso molecolare di 40863 Da. L'allele HLA-Cw*1505 (variante 016644) si differenzia dagli altri alleli Cw*15 per la sostituzione in posizione 140 di una Fenilalanina al posto di una Leucina. L'allele Cw*1505 presenta 4 varianti alleliche: *150501, *150502, *150503, *150504. L'allele Cw*150501 è lungo 1101 bp e codifica per una proteina lunga 366 aa (EMBL-EBI IMG/HLA Database). La discrepanza riscontrata nel nostro donatore è stata quindi confermata nei campioni studiati: tutti hanno reagito con i sieri anti-Cw7 e in tutti è stato identificato l'allele Cw*1505. L'ipotesi dell'associazione di HLA-Cw15 con HLA B73 è stata così confermata in tutti i 20 campioni. Nel nostro caso la discrepanza riscontrata tra il risultato sierologico e quello molecolare non riguarda un antigene perso in quanto non identificabile sierologicamente (blank), ma un vero e proprio errore di assegnazione dovuto al riconoscimento di Cw15 da parte degli antisieri con specificità Cw7 per una possibile condivisione di sequenza aminoacidica (motif) tra i due antigeni.⁴ Nel nostro studio HLA-B73 risulta quindi essere in linkage disequilibrium con l'allele HLA-Cw*1505 invece che con Cw7 come riportato comunemente nelle tabelle di associazione, in accordo con i dati presenti in letteratura che associano l'allele HLA-Cw*150501 all'allele HLA-B*7301.^{3,5} Questa nostra esperienza conferma la necessità di eseguire lo studio del locus HLA-C utilizzando le tecniche di

biologia molecolare, essendo la tecnica sierologica molto limitata, se non addirittura ingannevole come nel nostro caso, nell'identificare il polimorfismo dei prodotti del locus C, anche se riteniamo rimanga comunque una tecnica informativa dell'espressione e della funzionalità delle molecole HLA.

Bibliografia

1. Lebedeva TV et al. Emerging new alleles suggest high diversity of HLA-C locus. *Tissue Antigens* 2005;65:101-6.
2. Dametto E et al. HLA-Cw* typing in Italian unrelated stem cells donors (UD). Comunicazione, 19th EFI Conference, Istanbul 2005
3. Bunce M et al. High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens* 1997;50:100-1.
4. Sanz L et al. Haplotypic association of two new HLA class I alleles: Cw*15052 and B*0706: evolutionary relationship of HLA-Cw*15 alleles. *Tissue Antigens* 1996;47: 329-32.
5. Vilches C et al. "Cw*1505: a novel HLA-C allele isolated from a B*7301 haplotype. *Immunogenetics* 1994;40: 313.

UTILITÀ DEL TEST CON DITOTREITOLE (DTT) NELLO STUDIO DEI SIERI DI PAZIENTI IN ATTESA DI TRAPIANTO D'ORGANO

L. Praticò, E. Leone, A. Oda, F. Rosati, M. Tacconella, F. Marin, F. Brancatello, R. Chidichimo, R. Conca, A. Amoroso

S.C. *Immunologia dei Trapianti, Ospedale Maggiore S. Giovanni Battista di Torino*

Nel nostro Servizio lo studio per analizzare la presenza di anticorpi anti-HLA nei pazienti in attesa di trapianto d'organo solido viene effettuato tramite la tecnica di micro-linfocitosi complemento-dipendente a lunga incubazione (CDC).

Oltre ai pazienti che possiedono anticorpi anti-HLA di cui si può determinare la specificità, si presentano anche casi in cui i sieri hanno una reattività atipica. In questi casi quindi si ipotizza la presenza di auto-anticorpi (auto-ab) di isotipo IgM, non nocivi ai fini del trapianto, ma che interferiscono sia nella determinazione del PRA (Panel Reactivity Antibody) sia in un eventuale cross-match pre-trapianto. Dal settembre 2004 quindi è stato introdotto un nuovo protocollo che prevede lo studio di questi sieri con DTT per valutare l'eventuale presenza di auto-anticorpi.

Materiali e metodi. Si presentano 3 situazioni in cui si ipotizza la presenza di auto-anticorpi di isotipo IgM:

1) in alcuni sieri si riscontra un PRA maggiore del 10% la cui reattività non consente di definire una precisa specificità anticorpale ed essi risultano negativi nello studio Elisa (che non rileva le IgM).

2) alcuni sieri, esaminati in cross-match, presentano una debole reattività nei confronti dei linfociti T e B del potenziale donatore, soprattutto a 4°C.

3) i sieri di pazienti che non hanno avuto eventi immunizzanti (precedenti trapianti, trasfusioni, gravidanze) risultano positivi.

Nei casi sopra indicati, per confermare la presenza degli auto-anticorpi IgM, si procede allo studio mediante DTT. È noto che tale sostanza rompe i ponti disolfuro delle immunoglobuline e quindi scompare la iniziale reattività, se dovuta effettivamente ad anticorpi di tipo IgM. Tali sieri vengono cimentati contro un pannello di linfociti totali, non trattati e trattati con DTT: a seguito di ciò, se sono presenti delle IgM, la reattività riscontrata contro i linfociti non trattati scompare quando i sieri sono cimentati contro i linfociti trattati con DTT. Per distinguere se le IgM individuate siano auto-anticorpi oppure allo-IgM anti-HLA, si esegue un auto-crossmatch, in cui i sieri del paziente, già positivi contro il pannello, vengono cimentati con i propri linfociti T e B, sia non trattati che trattati con DTT, alle temperature di incubazione di 4 e 22°C. I sieri utilizzati nell'auto-crossmatch vengono sempre studiati in Elisa per confermare la loro

reattività, poiché questa metodica non è in grado di rilevare le IgM, quindi lo studio risulta sempre negativo.

Risultati e discussione. Se il risultato dell'auto-crossmatch – prima e dopo il trattamento con DTT – risulta:

1) pos/neg, la positività riscontrata nei sieri del paziente è dovuta alla presenza di auto-Ab, che non sono deleteri ai fini del trapianto. In questo caso ogni cross-match pre-trapianto verrà effettuato in doppio, con e senza DTT, e se esso risulterà negativo dopo trattamento con DTT il paziente potrà essere trapiantato;

2) neg/neg, la positività riscontrata nei sieri del paziente con altre cellule è dovuta ad allo-Ab anti-HLA di tipo IgM, nocivi a i fini di un trapianto; la determinazione della specificità viene effettuata tramite la tecnica CDC ed i cross-match pre-trapianto non includeranno l'uso del DTT.

Può anche succedere che vi sia presenza contemporanea di anticorpi anti-HLA di isotipo IgG e IgM; questi ultimi interferiscono con la determinazione della specificità delle IgG, quindi lo studio dei sieri viene effettuato con la tecnica CDC in doppio, con e senza DTT, per poter caratterizzare gli anticorpi di isotipo IgG.

La procedura presenta nel complesso dei vantaggi:

1) viene favorito il trapianto a pazienti che con cross-match positivo i quali non sarebbero altrimenti trapiantati.

2) in caso di presenza contemporanea di auto-anticorpi IgM e alloanticorpi IgG, la scomparsa dei primi può permettere di definire meglio la specificità anti-HLA che non si riusciva ad evidenziare a causa dell'interferenza delle IgM.

Grazie all'adozione di questa procedura, esaminando 283 pazienti che erano in lista attiva per trapianto renale, ne sono stati individuati 30 (11%) con auto-Ab, tra cui quattro affetti da LES e tre da sindrome di Berger. Di questi:

- 11 (37%) sono stati trapiantati nel nostro Centro, e di essi 10 (91%) al momento conservano ancora un trapianto funzionante;

- 3 (10%) sono stati trapiantati fuori regione, al momento i trapianti sono tutti funzionanti;

- 8 (27%) risultano ancora in lista;

- 8 (27%) non sono più disponibili al trapianto.

Conclusioni. La nostra esperienza - ed i dati in letteratura (1-3) - mostrano come gli auto-Ab di tipo IgM siano ininfluenti ai fini del buon esito del trapianto, questa strategia risulta quindi fondamentale per non precludere il trapianto a pazienti che presentano cross-match positivo ma non dovuto ad anticorpi anti-HLA.

Bibliografia

1. Ponticelli C, Moroni G. Renal transplantation in lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:95-8.
2. Moroni G, Tantardini F, Gallelli B et al. The long-term prognosis of renal transplantation in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2005;45:903-11.
3. Kliem V, Haubitz M, Ehlerding G et al. Outcome of kidney transplantation in patients with systemic autoimmune diseases. *Transplant Proc* 1997;29:957-8.

INFLUENZA DEL SISTEMA HLA NELLA TERAPIA CON ALPHA-INTERFERON DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

M.P. Perrone, F. Giona,¹ L. Laurenti, S. Guida, W. Barberi,¹ G. Tomei,¹ L. Recchia, V. Valle, G. Girelli

UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC_r) è un disordine mieloproliferativo, caratterizzato dalla presenza del cromosoma Philadelphia (Ph), derivante dalla traslocazione reciproca di segmenti di DNA tra i cromosomi 9 e 22. La traslocazione dà origine ad un oncogene bcr-abl che produce una proteina di fusione, più frequentemente p210, meno frequentemente p190. Recentemente, è stato dimostrato che i peptidi prodotti dalla

proteina di fusione sono immunogeni. Studi sperimentali-1-2 che utilizzano peptidi sintetici di bcr-abl hanno rilevato la capacità di specifici peptidi di legarsi agli antigeni di I e II classe suggerendo un coinvolgimento delle molecole HLA nell'outcome della malattia e nella risposta terapeutica al trattamento con α -interferon. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'eventuale influenza degli antigeni HLA sulla risposta terapeutica all' α -interferon (IFN- α) dei pazienti di età ≤ 20 anni affetti da LMC e trattati con IFN- α .

Materiali e Metodi. Dal gennaio 1989 a settembre 2001 abbiamo trattato con IFN-A 24 pazienti (13 maschi e 11 femmine, con età mediana alla diagnosi di 13 anni) affetti da LMCr Ph+, che non disponevano di un donatore familiare HLA compatibile. L'IFN- α è stato somministrato sottocute alla dose di 1 MU/mq/die per la prima settimana e progressivamente incrementato fino alla dose massima di 9/MU/die. La dose terapeutica è poi stata modulata in base alla tolleranza e alla risposta ematologica. La risposta citogenetica è stata valutata, in tutti i pazienti, a intervalli prestabiliti. Sono stati definiti rispondenti quei pazienti che hanno ottenuto la riduzione di almeno l'1% di metafasi Ph+; rispondenti completi quei pazienti che hanno presentato la scomparsa del Ph+ in tutte le metafasi analizzate; mentre è stata definita risposta assente la persistenza del 100% di cellule Ph+. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tipizzazione HLA di classe I, solo loci A e B, con tecnica di microlinfocitotossicità in accordo con il National Institute of Health - USA. Gli alleli di classe II, limitatamente al locus DR, sono stati tipizzati con metodiche molecolari mediante la reazione polimerasica a catena con primer a sequenza allele-specifica (PCR-SSP). I pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi A (rispondenti) e B (non rispondenti) a seconda della risposta citogenetica alla terapia con IFN-A. Inoltre è stato considerato un terzo gruppo di controllo definito C costituito da 50 donatori volontari di midollo osseo arruolati consecutivamente. La frequenza degli alleli HLA dei pazienti appartenenti al gruppo A è stata comparata con quella del gruppo B, e quella di entrambi i gruppi con il gruppo C mediante il Test esatto di Fisher.

Risultati. Dei 24 pazienti, 15 (62,5%) sono risultati rispondenti al trattamento con IFN-A, e inclusi nel gruppo A, di questi 7 hanno ottenuto risposta citogenetica completa (29,16%); 7 sono risultati non rispondenti e inclusi nel gruppo B e 2 non valutabili. Le frequenze alleliche ottenute dalla tipizzazione HLA dei 15 pazienti rispondenti (gruppo A) e dei 7 pazienti non rispondenti (gruppo B) sono state comparate tra di loro (A vs B) e separatamente con il gruppo C dei 50 donatori di midollo osseo (A vs C, B vs C). Dal confronto del gruppo A versus C si è riscontrata un'umentata frequenza dell'allele A*02 (4/7 vs 27/50 $p=0.01$) e un piccolo aumento di frequenza dell'allele A*25 ai limiti della significatività statistica (2/15 vs 0/50 $p=0.05$). L'allele DRB1*11 è stato trovato significativamente aumentato nel gruppo A rispetto al gruppo B (10/15 vs 0/7 $p=0.004$) e significativamente diminuito nel gruppo B versus C (0/7 vs 34/50, $p=0.0009$). Il DRB1*14 appare lievemente aumentato nel gruppo B versus C (3/7 vs 5/50 $p=0.04$). Nulla di significativo è stato trovato a carico degli altri loci.

Conclusioni. Il nostro studio ha evidenziato un significativo aumento dell'allele DRB1*11 nel gruppo A versus B (10/15 vs 0/7 $p=0.004$), suggerendo un ruolo importante dell'allele DRB1*11 nella risposta alla terapia con IFN- α . Tale ipotesi è supportata anche dal fatto che i pazienti non rispondenti mostrano una significativa diminuzione di tale allele se confrontati con la popolazione di controllo (0/7 vs 34/50, $p=0.0009$). I risultati da noi ottenuti non concordano con quanto riportato da Cortes et al.3, che ha associato il fenotipo B27 con la risposta al trattamento con IFN- α . Recentemente è stato dimostrato che i peptidi sintetici derivanti dalla proteina di fusione bcr-abl sono immunogeni e in grado di stimolare la produzione dei T linfociti CD4+ e CD8+. Gli antigeni HLA di classe I (A3, A11, B8 e B44)² hanno la capacità di legare il peptide b3a2 e di stimolare *in vitro* una risposta citotossica, analogamente, gli antigeni di classe II (DR1, DR2, DR4 e DR11)^{1,4} sono in grado di indur-

re una risposta HLA ristretta dei linfociti CD4+ verso tale peptide. Ciò supporta l'ipotesi che le cellule della LMCr sono in grado di presentare nel contesto delle molecole HLA di II classe, con un naturale processo, i peptidi endogeni delle proteine di fusione bcr-abl ai linfociti T CD4+ stimolando una risposta anticorpale che sarà proporzionata all'abilità che le molecole HLA hanno nel presentare il peptide stesso. Noi ipotizziamo che il DRB1*11, incrementato nei pazienti rispondenti, sia abile, come già dimostrato *in vitro*, nel presentare i peptidi della proteina di fusione bcr-abl ai linfociti CD4+ e questo effetto è aumentato dalla terapia con IFN- α , la cui azione è quella di potenziare la risposta immune. L'antigene A2³, riportato in letteratura associato ad una minore sopravvivenza, nella nostra esperienza risulta aumentato nella popolazione dei non rispondenti rispetto ai normali (4/7 vs 27/50 $p=0.01$) ma non risulta essere associato a una minore sopravvivenza. Si può concludere che esiste un'associazione tra alcuni antigeni HLA e la risposta terapeutica al IFN- α , ma sono necessari ulteriori e più ampi studi per comprendere il significato clinico e il ruolo biologico di queste associazioni

Bibliografia

1. Pawelec G, Max H, Halder T, et al. BCR/ABL leukaemia oncogene fusion peptides selectively bind to certain HLA-DR alleles and can be recognized by T cells found at low frequency in the repertoire of normal donors. *Blood* 1996; 88:2118-24.
2. Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, et al. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996; 87: 3587-92.
3. Cortes J, Fayad L, Kantarjian H et al. Association of HLA phenotype and response to interferon-alpha in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 455-42.
4. Fatman Savran Oguz, Sevgi Kalayoglu, A. Sarper Diler et al.: HLA System affects the age-at-onset in Chronic Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology* 2003; 73:256-62.

LA REVISIONE DEL RECETTORE IN LINFOCITI T UMANI: ASPETTI FISIOLGICI E PATOLOGICI

E. Lantelme,¹ P. Porcedda,¹ V. Turinetto,¹ S. Mantovani,² A. Amoroso,³ M. De Marchi,¹ C. Giachino¹

¹Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino; ²IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia; ³Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università degli Studi di Torino

Il processo di ricombinazione V(D)J, mediato da una ricombinazione sito-specifica i cui elementi meglio definiti sono le proteine RAG-1 e RAG-2, è stato lungamente considerato un evento limitato alle fasi precoci della maturazione linfocitaria all'interno degli organi linfoidi primari. Ma è stato recentemente dimostrato un fenomeno di revisione del recettore che è mediato da riarrangiamenti V(D)J secondari. Questo avviene in vivo nel sangue periferico in linfociti T con fenotipo variante CD4+CD3low e dipende dalla riespressione dei geni RAG (Lantelme et al, 2000a). Un aspetto interessante è che il numero dei linfociti T varianti che va incontro a revisione del recettore risulta aumentato di 10 volte nel sangue periferico di pazienti con sindromi da instabilità genomica quali AT e NBS (Lantelme et al., 2000b), e di 2 volte nel sangue periferico degli eterozigoti AT (Lantelme et al., 2003). I presunti ruoli fisiologici del fenomeno di revisione del recettore, quali la diversificazione del repertorio T periferico e il recupero di cellule con un difetto nell'espressione del recettore per l'antigene, risulterebbero particolarmente importanti per questi pazienti, che mancano totalmente del compartimento naive di linfociti T (Lantelme et al., 2003). D'altra parte, la riattivazione della ricombinazione V(D)J in linfociti T maturi può rappresentare un rischio per la cellula, in particolare quello di traslocazioni cromosomiche secondarie alla produzione di rotture della doppia elica del DNA (DSB) mediate dalle proteine RAG-1 e RAG-2. Indubbiamente, i pazienti AT

presentano una aumentata frequenza di traslocazioni a carico dei cromosomi 7 e 14, nei quali mappano i geni del recettore per l'antigene, e una spiccata predisposizione a sviluppare leucemie e linfomi a carico dei linfociti T.

Allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari che mediano la revisione del recettore e i suoi potenziali ruoli patologici, abbiamo da un lato messo a punto un metodo per indurre riarrangiamenti secondari *in vitro*, e dall'altro analizzato se le rotture della doppia elica del DNA che tipicamente accompagnano una ricombinazione V(D)J vengono segnalate in modo difettivo nei linfociti di pazienti AT e NBS. Infine, abbiamo valutato l'induzione di apoptosi in linfociti T maturi che presentano rotture del DNA non riparate.

Materiali e Metodi. 1) Induzione di riarrangiamenti secondari *in vitro*. Cloni di linfociti T maturi, i cui recettori per l'antigene sono stati caratterizzati molecularmente, vengono attivati *in vitro* con un anticorpo anti-CD3 e con IL-7, in presenza o in assenza di un superantigene (SEB) in grado di riconoscere la catena V β espressa. A 8 giorni dal trattamento i cloni sono stati caratterizzati fenotipicamente con i tetrametri specifici e un pannello di anticorpi anti-V β . L'espressione dei geni RAG è stata analizzata a 24-48-72 h tramite RT-PCR-oligotyping e la presenza delle proteine RAG mediante western blot e immunofluorescenza. Per verificare la presenza di intermedi di ricombinazione, prova dell'avvenuta revisione del recettore, è stato utilizzato un approccio di LM-PCR. 2) Fosforilazione dell'istone H2AX e segnalazione delle DSB. Uno degli eventi più precoci nella risposta alle DSB è la fosforilazione della coda C terminale dell'istone H2AX a livello della ser139, che è principalmente mediata da ATM. Mediante FACS e microscopia confocale abbiamo analizzato lo stato di fosforilazione di H2AX in cellule T isolate dal sangue e in linee T in coltura, sia di donatori sani che di pazienti AT e NBS, dopo trattamenti che inducano DSB. A nostra conoscenza, il nostro è il primo tentativo di caratterizzare la fosforilazione di H2AX in questo tipo di cellule. 3) Induzione di apoptosi in linfociti T contenenti DSB. L'apoptosi dopo trattamento con una sostanza genotossica che causa DSB non riparabili (ActD) è stata valutata al FACS mediante doppie colorazioni utilizzando Ioduro di Propidio e un anticorpo anti-Annexina V, oppure un anticorpo specifico per caspasi-3 attivata. Conferma che la morte cellulare indotta da ActD fosse apoptotica è venuta dall'utilizzo di inibitori delle caspasi. Come prova formale che la via apoptotica indotta da ActD fosse ATM-mediata abbiamo usato caffeina alla concentrazione di 10 mM per bloccare l'attività di ATM in cellule T normali.

Risultati e Conclusioni. Abbiamo dimostrato che il trattamento di cloni T con anti-CD3 e IL-7 è in grado di indurre riarrangiamenti V(D)J secondari (Lantelme *et al.*, manoscritto in preparazione). La stimolazione con anti-CD3 induce una internalizzazione del TCR, che mima il fenotipo CD3low dei linfociti T varianti descritti in vivo, mentre IL-7 è una citochina importante per il rimodellamento cromatinico dei loci del TCR (Schlüssel *et al.*, 2000), e probabilmente favorisce il riarrangiamento. È stato possibile dimostrare, nelle cellule trattate, l'espressione dei geni RAG-1 e RAG-2 e la formazione di intermedi di ricombinazione. Inoltre, sottoponendo il clone ad una pressione selettiva mediante l'utilizzo di un superantigene che induce apoptosi delle cellule con il TCR originario, è possibile evidenziare la comparsa di cellule con un nuovo recettore sulla superficie cellulare. Stiamo attualmente cercando di caratterizzare il pathway molecolare indotto dal trattamento che porta la cellula alla decisione di effettuare un nuovo riarrangiamento. Questo modello *in vitro* di induzione di riarrangiamenti secondari sarà molto utile per chiarire alcuni aspetti della fisiologia della revisione del recettore nell'uomo, così come gli eventuali rischi patologici. Abbiamo inoltre dimostrato, in seguito a stimoli genotossici che inducono rotture della doppia elica simili a quelle che accompagnano una ricombinazione V(D)J (2 Gy di radiazione ionizzante), che mentre i linfociti T quiescenti da donatore sano sono in grado di sopravvivere dopo aver completamente riparato le rotture della doppia elica indotte dal trattamento, i linfo-

citi dei pazienti AT sopravvivono in presenza di rotture non riparate, che vengono evidenziate come foci di istone H2AX fosforilato. Questo dimostra un difetto del riparo delle rotture della doppia elica del DNA indotte da radiazione nei linfociti T dei pazienti AT (Porcedda *et al.*, 2006). Infine, abbiamo osservato che in seguito a trattamento con ActD, che induce rotture non riparabili, i linfociti T dei donatori sani muoiono attivando un programma apoptotico ATM-, NBS1- e p53-dipendente. Al contrario, i linfociti dei pazienti AT e NBS risultano resistenti a questo processo apoptotico, nonostante accumulino un danno al DNA paragonabile alle cellule sane (Porcedda *et al.*, 2006). Conseguenza comune di questi due difetti genetici nella risposta alle rotture della doppia elica del DNA è la tolleranza da parte dei linfociti T dei pazienti nei confronti di rotture non riparate. Vorremmo suggerire che questa tolleranza rappresenti un importante contributo al rischio oncogenico di pazienti con sindromi da instabilità genomica, in particolare alla luce dell'aumentato numero di riarrangiamenti V(D)J secondari da noi descritto.

Bibliografia

- Lantelme et al, J. Immunol 2000a, 164:3455.
Lantelme et al., Eur. J. Immunol 2000b, 30:1520.
Lantelme et al., Lab. Invest 2003, 83:1467.
Porcedda et al., DNA Repair 2006, doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.002.
Schlüssel et al, J. Exp. Med 2000, 191:1045

IMMUNIZZAZIONE CONTRO L'ANTIGENE SUBTIPICO HLA-A24 E HLA-DR13 A SEGUITO DEL TRAPIANTO DI RENE

L. Praticò-Barbato,¹ G. Mazzola,¹ M.E. Fasano,¹ A. Oda,¹ E. Leone,¹ F. Rosati,¹ R. Conca,¹ R. Giraudi,¹ A. Piazza,¹ A. Amoroso^{1,2}

¹U.O.A.D.U. Servizio di Immunologia dei Trapianti, Ospedale S. Giovanni Battista, Torino; ²Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino; ³Istituto CNR per i trapianti d'organo e immunocitologia, Sezione di Roma

Presso il Servizio di Immunologia Dei Trapianti di Torino, i pazienti in attesa di trapianto renale sono tipizzati con tecnica sierologica per i loci HLA-A e B, con tecnica genomica a due digit per il locus HLA-DR e la compatibilità richiesta per il trapianto si ferma a livello del supertipo sierologico. Il presente lavoro mostra un caso in cui una paziente, a seguito di un trapianto di rene, si sia immunizzata contro l'antigene del donatore che era diverso a livello di sottotipo.

Pazienti e metodi. Il cross-match e l'analisi degli anticorpi anti-HLA nel siero sono effettuati con la tecnica della citotossicità complemento dipendente. La tipizzazione genomica dei pazienti in attesa di trapianto di organo solido è effettuata di routine con tecnica SSO a bassa risoluzione. Per questo caso in particolare è stata inoltre applicata la tecnica genomica ad alta risoluzione, avvenuta con metodica SBT per quanto riguarda l'analisi dei geni HLA-A e DRB. È stato inoltre approfondito lo studio di un siero della paziente mediante tecnica citofluorimetrica, kit FlowPRA Class I Single Antigen fornito dalla Ditta One-Lambda. La paziente è una donna di 54 anni che nel marzo 1994 ha ricevuto un trapianto di rene da cadavere da un donatore di 53 anni. La tipizzazione HLA della paziente era: A2, A24; B50, B51; DR7, DR3; la tipizzazione HLA del donatore era: A2, A24; B50, B51; DR7. Non era stata riscontrata nella paziente, prima del trapianto, la presenza di anticorpi anti-HLA preformati e il cross-match pre-trapianto è risultato negativo. Il trapianto è fallito dopo 4.5 anni.

Risultati e discussione. Nei sieri post-trapianto della paziente sono stati evidenziati con tecnica CDC anticorpi anti HLA-A24, riconfermati, solo di recente, con tecnica Elisa che è stata introdotta nei nostri laboratori a partire dal 2004. La presenza dell'anticorpo anti HLA-A24 poteva sembrare una incongruenza, vista la condivisione dell'antigene HLA-A24. La tipizzazione HLA genomica in alta risoluzione ha successivamente evidenziato

l'allele HLA-A*240301 nel paziente e A*240201 nel donatore. L'antigene espresso dal donatore, sebbene differente per 2 soli residui aminoacidici rispetto a quello della paziente (a livello dell'esone 3 i codoni 166-167 codificano per acido aspartico e una glicina nel caso di A*240201, mentre per un acido glutammico e un triptofano nell'A*240301), ha evocato una forte risposta immunitaria umorale. Infatti l'analisi del siero post-trapianto avvenuto in citofluorimetria ha evidenziato proprio un anticorpo anti-HLA-A2402. A quattro mesi dal trapianto la paziente mostrava un aumento di creatinina a 3.6 mg/dL e la biopsia renale ha evidenziato un danno renale di fibrosi diffusa e danno vascolare, che poteva essere conseguenza di un rigetto, tant'è che è stata aumentata la terapia immunosoppressiva (da duplice terapia con steroide e Ciclosporina a triplice terapia con aggiunta di azatioprina). Nel corso dei quattro anni di durata del trapianto sono state segnalate ripetute infezioni da CMV che sono state le cause più evidenti del progressivo deterioramento della funzione renale.

Conclusioni. Nel caso qui riportato si evidenzia come, anche quando è presente una completa compatibilità donatore/ricevente, la diversità di struttura di due antigeni HLA anche per pochi residui aminoacidici, è in grado di evocare una risposta immunitaria da parte del ricevente. Ciò potrebbe essere la causa del danno renale di tipo cronico riscontrato con la biopsia a soli 4 mesi dal trapianto e che col tempo, anche se con l'aggravante di numerose infezioni, può aver causato la perdita dell'organo in quattro anni. I risultati qui riportati dimostrano come, sebbene per il trapianto di rene non possano essere valutate le compatibilità a livello del 4° digit, l'uso delle più moderne metodiche per l'analisi dei sieri risultino indispensabili per una precisa caratterizzazione degli anticorpi presenti nel paziente. Si hanno così più informazioni per meglio focalizzare la terapia immunosoppressiva e per cercare di evitare il fallimento del trapianto; in caso di trapianti successivi, inoltre, sarebbe possibile effettuare un'accurata scelta del donatore più idoneo anche nel caso in cui il ricevente avesse degli anticorpi diretti contro gli antigeni HLA condivisi (a livello di supertipo ma non a livello di sottotipo) col donatore.

Bibliografia

1. Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, VanBuskirk A, et al., Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II: evidence from trans-vivo DTH and alloantibody analysis, *Hum Immunol.* 2000;61:1395-402.

PROTOCOLLO PER IL TRAPIANTO DEI PAZIENTI IPERIMMUNI: L'ESPERIENZA AIRT DALL'OTTOBRE 2004 AL FEBBRAIO 2006

L. Praticò-Barbato,¹ A. Buscaroli,² B. Favoino,³ V. Fossombroni,⁴ P. Zanelli,⁵ R. Conca,¹ S. Roggero¹

¹S.C. Immunologia dei Trapianti D.U., Ospedale San Giovanni, Torino; ²Dipartimento di Nefrologia, Unità Trapianto di Rene, Ospedale S.Orsola, Bologna; ³U.O. Patologia Clinica, 2° Sezione di Tipizzazione Tissutale, A.O. Policlinico, Bari; ⁴Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Genetica Medica, A.O.U. Ospedale Careggi, Firenze; ⁵Unità di Genetica Medica, Clinica Universitaria, Parma

L'Associazione Interregionale Trapianti (AIRT), che comprende le regioni italiane del Piemonte, Emilia Romagna, Toscana e Puglia, dall'ottobre 2004 ha stilato una lista comune a tutte e quattro le regioni dedicata a pazienti renali iperimmuni e creato un software di selezione del ricevente più idoneo al fine di favorire questi pazienti che rimangono per molti anni in lista d'attesa.

Materiali e metodi. Sono stati inclusi i pazienti che avevano almeno due sieri con CDC-PRA maggiore o uguale all'80%. I sieri storici di questi pazienti vengono esaminati con metodica Elisa o Citofluorimetria per accertare la presenza di anticorpi anti-HLA di classe IgG. Inoltre viene eseguito sia lo studio del PRA con DTT sia l'auto-cross-match, per escludere la presenza

di auto-anticorpi.

Il trapianto può essere effettuato nelle seguenti condizioni:

- iso-gruppo AB0;
- 5/6 compatibilità HLA donatore/ricevente e identità al DR (sei in caso non sia nota la tipizzazione HLA dei donatori precedenti);
- esclusione dei mismatch dei trapianti precedenti e delle specificità anticorpali rilevate almeno tre volte con la tecnica CDC, Elisa o Citofluorimetria;
- cross-match negativo sia con i linfociti T che B, effettuato su un siero recente e almeno due sieri storici.
- tempo di ischemia fredda non superiore a 24 ore.

La tipizzazione HLA di Classe I dei riceventi è effettuata mediante la tecnica sierologica (CDC) e genomica a bassa risoluzione (SSO) mentre la tipizzazione di Classe I dei donatori è eseguita con tecnica genomica a bassa risoluzione. La tipizzazione HLA di Classe II di entrambi donatori e riceventi viene invece effettuata con tecnica genomica a bassa risoluzione. Il cross-match, eseguito con tecnica CDC o citofluorimetria, include l'impiego di almeno due sieri del paziente (uno storico ed uno recente) e deve essere negativo sia con i linfociti T che B. Qualora il cross-match risultasse positivo, il rene verrà trapiantato ad un ricevente non iperimmune dello stesso Centro, per evitare un lungo periodo di ischemia fredda. Solo in questo caso però, la regione ricevente, dovrà "restituire" il rene con simili caratteristiche per gruppo ed età.

Risultati. Dall'ottobre 2004 al Febbraio 2006 i pazienti iperimmuni inclusi in questa lista sono stati 128 (4%) sul totale dei 3300 pazienti renali in lista nelle 4 regioni, ed i donatori idonei esaminati dal programma è stato 158/349 (45%).

Tre pazienti iperimmuni sono stati trapiantati con reni provenienti da diverse regioni, quindi la lista comune è risultata essere decisiva. Cinque altri pazienti sono stati selezionati ma non trapiantati perché:

- 3 a causa di cross-match positivo
- 1 per non idoneità clinica
- 1 ha rifiutato il trapianto

I dati clinici aggiornati al Maggio 2006 confermano il buon andamento del trapianto con livelli di creatinina pari a 1.1 mg/dL, 1.1 mg/dL e 1.5 mg/dL.

Conclusioni. I risultati preliminari sono incoraggianti: i pazienti iperimmuni hanno avuto infatti delle opportunità in più per essere selezionati per un trapianto e, nel periodo di quasi un anno e mezzo, tre pazienti sono stati trapiantati. In alternativa, essi sarebbero costretti ad una lunga attesa o potrebbero addirittura non essere mai trapiantati. I trapianti effettuati con questo programma hanno, al momento, un buon andamento clinico. In futuro si prevede di modificare alcuni criteri di selezione dei donatori per facilitare maggiormente l'assegnazione del rene. In particolare, si vorrebbe ridurre il livello di compatibilità donatore/ricevente e selezionare donatori con gruppo AB0 compatibile invece che con iso-gruppo AB0.

ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE CD38 e CD157 IN CELLULE CORNEALI

F. Sizzano,¹ I. Durelli,^{2,3} R. Lusso,^{2,3} S. Deaglio,² F. Genzano Besso,⁴ A.L. Horenstein^{2,3}

¹Immunologia dei Trapianti, ²Laboratorio di Immunogenetica, Dip. Di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino; ³Centro di Ricerche in Medicina Sperimentale (CeRMS), ⁴Banca delle Cornee della Regione Piemonte, Az. Osp. S. Giovanni Battista di Torino

La cornea rappresenta una barriera che protegge i tessuti interni dell'occhio dall'ambiente esterno (microrganismi, agenti chimici e fisici) ed agisce come la lente principale del diottero oculare che con il cristallino converge la luce sul piano retinico. Nella cornea si riconoscono principalmente 5 strati: epitelio, membrana di Bowman, stroma, membrana di Descemet ed endotelio. Le cellule epiteliali proteggono gli strati più interni, mantengono il film lacrimale adeso alla superficie oculare ed assorbono l'ossigeno ed altre sostanze contenute nel film stesso. Lo

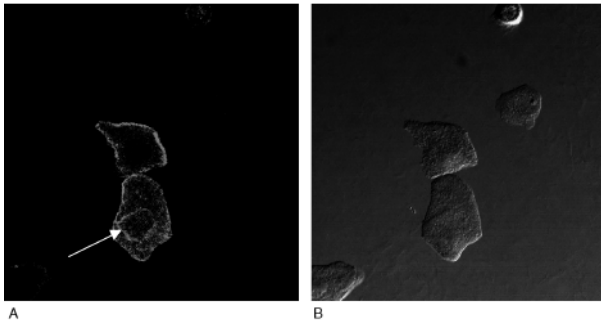


Figura 1. Immunomarcatura per il CD 38. A. La positività all'anticorpo anti-CD 38 si riscontra prevalentemente a livello della membrana plasmatica delle cellule epiteliali corneali, sebbene sia possibile evidenziare l'immunomarcatura a livello citoplasmatico e probabilmente sulla membrana nucleare (freccia). B. La stessa immagine acquisita in trasmissione al contrasto interferenziale.

stroma è composto principalmente da acqua e proteine prodotte dai cheratociti e rappresenta la principale struttura trasparente della cornea. L'endotelio corneale è uno strato monocellulare che regola la quantità di acqua che può raggiungere lo stroma e risulta estremamente importante per la trasparenza dell'intera cornea. Trovandosi a così stretto contatto con l'ambiente esterno, le cellule corneali possono essere soggette a fattori tossici fisici (quali le radiazioni UV), chimici oppure ad insulti di tipo meccanico (corpi estranei, polveri). In generale, una cellula danneggiata rilascia in modo massivo Nicotinamide-Adenil-Dinucleotide (NAD⁺), coenzima redox fondamentale nel metabolismo cellulare che può rappresentare il substrato di ectoenzimi quali il CD38 e del suo analogo CD157. Il CD38 è una molecola di membrana ampiamente studiata e descritta in diversi tipi cellulari (cellule ematopoietiche, neuroni, cellule pancreatiche). Oltre alla funzione di recettore per l'adesione e la migrazione leucocitaria, il CD38 possiede attività enzimatica convertendo il NAD⁺ in molecole quali l'Adenosin-difosfato ribosio (ADPR) e l'ADPR ciclico che hanno funzione di secondi messaggeri mobilizzanti il calcio. Ipotizzando per il CD38 e il CD157 una funzione di *sensori* extracellulari di NAD⁺ (e quindi di possibile danno cellulare), lo scopo di questo lavoro è valutare l'espressione dei due ectoenzimi da parte delle cellule corneali (epitelio, stroma) mediante metodiche di immunofluorescenza indiretta e di *western blot*.

Materiali e Metodi. Cellule: sono state utilizzate 10 cornee non idonee al trapianto (bassa conta endoteliale, lesioni stromali). Le cellule epiteliali sono state sottoposte ad isolamento meccanico, mentre le cellule stromali sono state isolate mediante incubazione con collagenasi IV (3-4 ore con agitazioni periodiche). Le cellule sono state mantenute in terreno DMEM completo di siero fetale al 10%, penicillina e streptomina. Anticorpi monoclonali: sono stati utilizzati gli anticorpi murini anti-CD38 umano (clone IB4; isotipo IgG2a) e anti-CD157 umano (clone SY; isotipo IgG1) prodotti dal Laboratorio di Immunogenetica dell'Università di Torino (Prof. F. Malavasi). Gli anticorpi sono stati prodotti da linee cellulari murine coltivate in bioreattori e conseguentemente purificati per ottenere un risultato *clinical grade* applicabile sia nella ricerca di base che in quella traslazionale in ambito clinico. Immunofluorescenza indiretta: Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 2% a 4° C od a temperatura ambiente. Il legame non specifico degli anticorpi è stato prevenuto mediante incubazione in PBS/BSA 1%. Le cellule sono state incubate con gli anticorpi monoclonali anti-CD38, anti-CD157 e anti-HLA I per 2 ore. In seguito a lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate per 1 ora e 30 minuti con anticorpo secondario anti-IgG di topo (frammento F(ab')₂) prodotto in montone e coniugato con il fluoroforo Alexa 488. I controlli negativi erano rappresentati dalle cellule incubate con IgG non specifiche dello stesso isotipo dei cloni IB4 e SY oppure con

l'anticorpo secondario. I preparati sono stati analizzati in microscopia confocale utilizzando i microscopi Olympus FV500 e Leica TCS SP2. *Western Blot*: in seguito a lisi cellulare e corsa elettroforetica in condizioni riducenti, i campioni sono stati trasferiti su membrana di PVDF. La membrana è stata bloccata con il reagente BLOTTO (Biorad) ed incubata con l'anticorpo anti-CD38 (clone IB4). In seguito a tre lavaggi in tampone TBS-Tween, la membrana è stata incubata con un anticorpo secondario coniugato all'enzima perossidasi. La presenza di proteine legate agli anticorpi è stata evidenziata in chemiluminescenza con il kit ECL (Perkin Elmer). Saggio di degradazione del NAD⁺: Le cellule epiteliali sono state incubate con β-NAD per 1 ora a 37°C. L'attività NADasica è stata valutata nei surmatanti mediante cromatografia liquida ad alta pressione a fase inversa (RP-HPLC) e la diminuzione della concentrazione del NAD⁺ e della comparsa dei prodotti di reazione è stata rivelata mediante assorbimento UV a 254 nm.

Risultati e Conclusioni. Le cellule epiteliali corneali (percentuale variabile tra il 40-60%) sono risultate immunopositive sia per il CD38 che per il CD157. Le immagini confocali mostrano l'immunomarcatura localizzata prevalentemente a livello della membrana plasmatica, sebbene in alcune cellule si sia riscontrata immunoreattività a livello citoplasmatico e, per il CD38, sulla membrana nucleare (Figura 1). Il dato di immunomarcatura per il CD38 e il CD157 deve essere confermato sulle cellule stromali. I risultati del *Western Blot* per le cellule epiteliali suggeriscono la presenza della banda caratteristica del CD38 a circa 45 kDa (normalmente presente utilizzando la linea di cellule monocitarie THP-1 CD38+) e anche le prove preliminari di degradazione mostrano un consumo di NAD⁺, verosimilmente riconducibile all'attività NADasica di enzimi quali il CD38 poiché sono visualizzabili in HPLC i picchi caratteristici dei prodotti. I nostri risultati suggeriscono che le molecole CD38 e CD157 siano espresse da una percentuale variabile di cellule epiteliali corneali. Sono comunque in corso ulteriori esperimenti per confermare il dato (RT-PCR, *Western Blot* e saggi di degradazione enzimatica del NAD⁺). L'espressione riscontrata a livello delle cellule corneali può indurre a ipotizzare che il CD38 ed il CD157 possano rappresentare dei *sensori molecolari* per il danno cellulare. Successivamente al legame con il NAD⁺ rilasciato in seguito a lesione cellulare, la cascata di secondi messaggeri che si risolve nel rilascio di calcio a livello citoplasmatico può indurre una modificazione nella fisiologia della cornea. Lo studio e la caratterizzazione funzionale dei due ectoenzimi sui tessuti corneali potrebbe rivelarsi importante per la comprensione degli eventi sottesi al danno e al recupero funzionale in ambito fisiologico od in situazioni cliniche quali il trapianto.

Bibliografia

- Askey P, White TA, Thompson M, Chini EN. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; in press.
Koch-Nolte F, Adriouch S, Bannas P, Krebs C, Scheuplein F, Seman M, Haag F. ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Annals of Medicine* 2006; 38:188-99.

STUDIO COMPARATIVO TRA METODICHE FUNZIONALI: ELISpot E CTL-p A CONFRONTO

F. Sizzano, A. Amoroso

Immunologia dei Trapianti, Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino

Il test che misura la frequenza di precursori di linfociti T citotossici del donatore specifici per le cellule del ricevente (CTL-p f), è stato utilizzato nel nostro laboratorio nell'ambito del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) tra consanguinei HLA-identici. Sebbene predittiva di complicanze post-trapianto (GvHD acuta, GvHD cronica) la metodica non è più in

uso a causa della difficoltà operativa (elevato numero di cellule, uso di radionuclidi). Recentemente sono state introdotte nuove tecniche molto sensibili per la valutazione dell'alloreattività *in vitro*, fra queste l'Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay (ELISpot) che permette di evidenziare la produzione di citochine da parte di una singola cellula (visualizzata come *spot*) in seguito a stimolo di vario genere (antigeni solubili, cellule allogeniche). In questo studio sono descritte le tappe dello sviluppo della tecnica ELISpot per valutare l'alloreattività tra cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di donatori sani utilizzate come *responder* (R) e *stimulator* (S) al fine dell'applicazione in campo trapiantologico. Inoltre, è presentato il confronto dei risultati ottenuti tramite la metodica ELISpot con quelli del test CTL-p in dieci coppie di donatori a differente grado di identità per HLA.

Materiali e Metodi. ELISpot: l'alloreattività è definita come frequenza di cellule R che producono interferon-gamma (IFN- γ producing cells; pc). In breve, le PBMC del R sono state coltivate in triplicato in piastre a 96 pozzetti in diluizione limite con dosi fisse di S PBMC irradiate. Dopo 30 ore d'incubazione a 37° (in alcuni esperimenti 54, 78, 102, 126 ore) le cellule sono state trasferite in piastre ELISpot sulle quali era adsorbito l'anticorpo di cattura anti-IFN- γ per 18 ore. Gli *spots* sono stati rivelati tramite anticorpo secondario biotinilato, streptavidina-perossidasi e cromogeno. Le piastre sono state analizzate mediante un lettore automatico. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI addizionato di siero fetale bovino (FCS) oppure in terreno RPMI completo di siero umano AB. I controlli negativi erano rappresentati da sole cellule R e da sole cellule S irradiate. I controlli dell'effetto dell'irradiamento sulla produzione di citochina erano rappresentati dalle cellule R irradiate co-coltivate con le cellule S irradiate e dalle cellule S irradiate stimolate da fitoemoagglutinina (PHA). La PHA è stata inoltre utilizzata come controllo della capacità di produrre citochine da parte delle cellule R. Sono stati effettuati esperimenti di *blocking* con anticorpi anti-HLA di classe I e II per valutare il contributo delle popolazioni linfocitarie nell'alloreazione. CTL-p: le cellule R sono state coltivate in diluizione limite con dosi fisse di S PBMC irradiate in terreno RPMI addizionato di siero AB. Le cellule S irradiate coltivate senza cellule R rappresentavano il controllo negativo. Sono stati inoltre effettuati un controllo autologo (cellule R+cellule R irradiate) e un controllo positivo (cellule R+cellule S differenti per HLA) negli esperimenti che prevedevano la co-coltura di PBMC di coppie HLA-identiche. Al 3° giorno, Interleuchina-2 è stata aggiunta alla coltura e al 7° giorno l'attività citotossica è stata valutata in seguito ad incorporazione di Cr-51 in blasti ottenuti mediante stimolazione delle cellule S con anticorpo OKT3. La quantità di Cr-51 nei surnatanti è stata valutata mediante un contatore di radiazioni beta. I pozzetti sono stati considerati positivi quando il valore superava di 3 deviazioni standard la media del valore dei controlli negativi e le frequenze di CTL-p sono state calcolate mediante un programma statistico.

Risultati e Conclusioni. Effetto-dose delle radiazioni e rapporto R/S: in esperimenti preliminari in una coppia di individui HLA-*mismatched*, abbiamo voluto valutare l'effetto di dosi crescenti di radiazioni (30, 45, 60 Gray) sulla secrezione di IFN- γ da parte delle cellule S, per ottenere una reazione il più possibile unidirezionale (citochine prodotte principalmente da cellule R). I risultati mostrano che dosi crescenti inibiscono la produzione di IFN- γ dalle cellule S ma ne diminuiscono la capacità di stimolazione. Un compromesso tra stimolazione ottimale (elevato numero di spots) e unidirezionalità (spots principalmente da cellule R) è stato ottenuto irradiando le cellule S a 30 Gy e variando il rapporto di concentrazione tra R e S (da 1:1 a 4:1 nella prima diluizione; $2 \times 10^5/50 \times 10^5$ cellule). Con questo accorgimento il contributo di IFN- γ secreto dalle cellule S risulta ridotto, poiché il numero di spots correla linearmente ($R=0.99$) con il numero di cellule R seminate. Tempi d'incubazione: è stata paragonata la reattività tra coppie a diverso grado di HLA dopo due giorni di coltura. Si sono apprezzate elevate frequenze di IFN- γ

pc tra individui HLA-*mismatched* ($100 \text{ spots}/2 \times 10^5$ cellule R) ed assenza di alloreattività tra consanguinei HLA-identici (la frequenza CTL-p è risultata bassa in questa coppia) e gemelli monozigoti. Incrementando i tempi di stimolazione in coltura (54, 78, 102, 126 ore) nella coppia di consanguinei HLA-identici, si è evidenziato un aumento del numero degli spots, sebbene si sia riscontrato un progressivo aumento nel numero di IFN- γ pc nei pozzetti dedicati al controllo negativo dal 3° giorno di coltura. È stato quindi riallestito l'esperimento paragonando i risultati della coltura in RPMI/FCS (utilizzato fino a questo momento) con quelli di una coltura in RPMI/AB in 2 coppie di consanguinei HLA-identici. In entrambe le coppie, analogamente agli esperimenti precedenti, si è riscontrato un aumento nel numero di IFN- γ pc nei controlli negativi in RPMI/FCS dopo il terzo giorno di coltura, mentre ciò non si è verificato nella condizione RPMI/AB. I replicati R/S in questa condizione al 6° giorno di coltura mostravano un basso numero di IFN- γ pc ($1-3 \text{ IFN-}\gamma \text{ pc}/2 \times 10^5$ cellule R). IFN- γ pc e CTL-p-f in 10 coppie R/S a differente grado d'identità per HLA: utilizzando RPMI/siero AB in coltura, 4 coppie HLA-*mismatched*, 4 coppie di consanguinei HLA-identici e 2 coppie di gemelli monozigoti sono state analizzate mediante ELISpot e CTL-p. In ELISpot, le cellule R/S HLA-*mismatched* sono state incubate per un totale di 48h, mentre le cellule R/S HLA-identiche sono state incubate per un totale di 144 h. I risultati mostrano elevate frequenze di IFN- γ pc tra le coppie HLA-*mismatched* (media delle 4 coppie: $74+37/2 \times 10^5$ cellule R). L'introduzione degli anticorpi bloccanti anti-HLA I e II (esperimento condotto in 2 coppie HLA-*mismatched*) mostra una drastica riduzione dell'alloreattività tra cellule R e S (circa il 90% nel caso dell' incubazione delle cellule S con entrambi gli anticorpi). Nelle coppie di consanguinei HLA-identici e tra i gemelli monozigoti sono state riscontrate basse frequenze di IFN- γ pc (media: $1,3+1,1/2 \times 10^5$ e $0,8+0,05/2 \times 10^5$ cellule R rispettivamente). Analogamente, elevate frequenze di CTL-p sono state ritrovate nelle coppie HLA-*mismatched* (media delle 4 coppie: 1 CTL-p/ $2,2 \times 10^4$ cellule R) mentre basse frequenze nei consanguinei HLA-identici (media delle 4 coppie: 1 CTL-p/ 2×10^5 cellule R) e nei gemelli monozigoti (1 CTL-p/ $4,8 \times 10^5$ cellule R). In questa esperienza abbiamo valutato l'alloreattività tra cellule R/S isolate da donatori sani compatibili o incompatibili per HLA mediante la metodica ELISpot e paragonato i risultati ottenuti con il test CTL-p. I nostri risultati in ELISpot mostrano che dosi crescenti di raggi γ inibiscono la secrezione di IFN- γ dalle cellule S ma ne diminuiscono la capacità stimolatoria. Un compromesso per ottenere una reazione unidirezionale è stato trovato variando il rapporto delle cellule R/S. La possibilità di valutare la reazione immunitaria principalmente delle cellule R, può rappresentare un modello migliore di risposta delle cellule T in seguito a trapianto d'organo solido o TCSE. Utilizzando questi parametri, sono state allestite colture di PBMC R/S a differente grado d'identità per HLA a differenti tempi d'incubazione. I risultati in ELISpot mostrano che dopo il 3° giorno, le colture in RPMI/FCS presentano un aumento progressivo ed aspecifico di IFN- γ pc a differenza delle colture in RPMI/siero AB umano. Al fine di evitare produzione aspecifica di IFN- γ , probabilmente dovuta a fattori mitogenici contenuti nel siero fetale, gli esperimenti successivi condotti sulle coppie R/S a differente grado d'identità per HLA sono stati allestiti utilizzando siero umano AB. I risultati mostrano un'elevata frequenza di IFN- γ pc e di CTL-p nelle coppie HLA-*mismatched* rispetto alle coppie HLA-identiche ed ai gemelli monozigoti. Ciò risulta importante nello studio dell'alloreattività scatenata da ipotetiche differenze per antigeni minori d'istocompatibilità in coppie genotipicamente identiche per HLA. L'assenza degli antigeni (A2, B7) che legano più frequentemente i peptidi *minori* in 3 delle 4 coppie studiate può rappresentare una spiegazione della debole reazione immunitaria osservata (ELISpot: da 0 a $1,3/2 \times 10^5$ IFN- γ pc; CTL-p: da 1 CTL-p/ $3,4 \times 10^5$ cellule a 1 CTL-p/ $1,6 \times 10^5$ cellule). Solamente una coppia HLA-A2 positiva mostrava frequenze di IFN- γ pc più elevate ($3/2 \times 10^5$ cellule) e di CTL-p (1 CTL-p/ $9,8 \times 10^4$ cellule): è possibile ipotizzare che ciò possa essere dovuto a cellule R speci-

che per antigeni minori ristretti da HLA-A2. La frequenza CTL-p nelle coppie HLA-*mismatched* è risultata più bassa rispetto alla frequenza di IFN- γ pc. Ciò potrebbe essere dovuto al contributo di differenti popolazioni linfocitarie nell'allorizzazione. Infatti, mentre nel test CTL-p è valutabile solamente la risposta citotossica, il risultato del test ELISpot potrebbe essere rappresentato dalla somma dei contributi di popolazioni T helper/citotossiche producenti IFN- γ . In effetti, l'utilizzo alternato oppure combinato degli anticorpi anti-HLA di classe I e II diminuisce parzialmente o pressoché totalmente il numero di IFN- γ pc, facendo supporre un contributo nella secrezione di IFN- γ da parte di entrambe le sottopopolazioni linfocitarie CD4 e CD8. In conclusione, l'ELISpot può essere considerato un nuovo metodo per valutare l'allorattività tra cellule R/S, ed i risultati possono essere paragonati al test CTL-p. La reazione unidirezionale può essere *mimata* variando il rapporto R/S poiché l'aumento delle dosi di radiazioni diminuisce la capacità stimolatoria delle cellule S. Inoltre, l'uso di FCS può determinare una secrezione aspecifica di citochina ed è quindi consigliabile operare con siero AB umano. L'ELISpot può essere utilizzato per cellule R/S HLA-*mismatched* con breve incubazione (2 giorni) o tra R/S HLA-identici con incubazioni più lunghe, sebbene basse frequenze di cellule R, paragonabili a quelle valutate con il test CTL-p, potrebbero essere attese.

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI DEL GENE PER L'IL-1 β ED INSORGENZA DI TUMORI IN PAZIENTI LONG-SURVIVORS TRAPIANTATI DI RENE

E. Dametto,¹ M. Ubaldi de Capei,² M.E. Fasano,¹ I.B. Romero,² D. Povero,² A. Amoroso²

¹ S.C. Immunologia dei Trapianti, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino; ² Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università degli Studi di Torino

In un precedente lavoro, abbiamo dimostrato che la sopravvivenza del trapianto a lungo termine (superiore a 10 anni), in riceventi di rene *mismatched* per HLA di classe I ma matched per HLA di classe II con il rispettivo donatore, era correlata con i genotipi -1082GG dell'IL-10 e -33 CC dell'IL-4 (Ubaldi de Capei *et al.*, 2004). L'analisi degli stessi polimorfismi all'interno di un gruppo di pazienti in cui il trapianto era fallito prima di dieci anni, al contrario, non ha evidenziato alcuna associazione significativa (dati non pubblicati). La base di partenza per questo nuovo studio è stata l'osservazione, riportata anche in letteratura, che pazienti trapiantati di rene presentano, rispetto alla popolazione generale, un rischio di sviluppare un tumore di tre-quattro volte superiore. Inoltre, tale rischio aumenta vertiginosamente (fino a cento volte) per alcuni tipi di tumore, in particolare carcinomi della pelle, quali il carcinoma a cellule squamose (SCC), il carcinoma a cellule basali (BCC) e la malattia di Bowen. Questa alta incidenza è da attribuirsi al trattamento immunosoppressivo che deve essere mantenuto per prevenire e/o trattare episodi di rigetto ed infezioni (Adami *et al.*, 2003; Andrés, 2005). I tumori rappresentano, purtroppo, un'importante causa di mortalità, soprattutto nei *long-term survivors*, dovuta al loro decorso piuttosto aggressivo, con metastasi, e perché possono recidivare dopo resezione (Carneiro *et al.*, 2005; Moosa *et al.*, 2005). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare se polimorfismi di un singolo nucleotide (SNPs) all'interno di differenti geni codificanti per citochine, che possono influire sui livelli di produzione della corrispondente proteina, correlano con la suscettibilità a sviluppare un tumore in pazienti trapiantati di rene.

Materiali e Metodi. Abbiamo considerato retrospettivamente 697 pazienti sottoposti a trapianto presso il Centro Trapianto Rene di Torino, da novembre 1981 a giugno 1999. Tra questi, alcuni erano deceduti o non erano più rintracciabili; inoltre, sono stati scartati tutti i pazienti i cui DNA non erano disponibili e dai quali non è stato possibile ottenere un nuovo prelievo di sangue. Per il nostro studio, abbiamo infine reclutato 251 pazienti complessivamente, il cui DNA era già presente nella

nostra DNAteca o che si sono resi disponibili ad effettuare un nuovo prelievo di sangue per una estrazione *de novo*. Di questi, 109 erano pazienti *long-survivors* (LS - trapianto funzionante dopo 10 anni) e 142 erano pazienti *short-survivors* (SS - trapianto fallito prima di 10 anni); entrambi i sottogruppi includevano sia pazienti senza tumore che pazienti affetti da un tumore (della pelle, prevalentemente, ma anche linfomi, sarcoma di Kaposi, carcinoma epatico, etc.) insorto dopo il trapianto, come schematizzato nella Tabella 1. Il DNA genomico è stato isolato da sangue periferico raccolto in EDTA, utilizzando la metodica del *micro salting-out* modificata per piccoli volumi (1-2 ml di sangue) (Miller *et al.*, 1988).

Tabella 1. Pazienti reclutati per lo studio.

	No tumore	Tumore		Totale
		Tumore della pelle	Altro	
Pazienti LS	85	14	10	109
Pazienti SS	113	10	19	142

Tabella 2. Distribuzione dei genotipi alle posizioni -511 e +3962 del gene dell'IL1, nei differenti sottogruppi di pazienti.

	-511IL1 β			+3962IL1 β			
	genotype (%)			genotype (%)			
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
LS+ cancer	50	50	0	29	54	16	p=0.038
LS no cancer	48	39	13	58	35	7	
	p=0.049						
LS + cancer	50	50	0	29	54	16	p=0.05
SS+ cancer	28	48	24	59	38	3	
	p=0.006						

La genotipizzazione di 22 polimorfismi all'interno di 13 geni codificanti per citochine [IL1 α (T/C -889), IL1 β (C/T -511, T/C +3962), IL12 (C/A -1188), IFN γ (A/T UTR 5644), TGF β (C/T codon 10, G/C codon 25), TNF α (G/A -308, G/A -238), IL2 (T/G -330, G/T +166), IL4 (T/G -1098, T/C -590, T/C -33), IL6 (G/C -174, G/A nt565), IL10 (G/A -1082, C/T -819, C/A -592), IL1R (C/T pst1 1970), IL1RA (T/C mspa1 11100), IL4RA (G/A -1902)] è stata eseguita con metodica PCR-SSP, utilizzando i *Cytokine Typing Trays* forniti dall'Università di Heidelberg, Germania.

Risultati. Sono state calcolate le frequenze genotipiche di ciascun polimorfismo (dati non mostrati), ed è stato effettuato un confronto tra le loro distribuzioni nei differenti sottogruppi. La sola differenza è emersa in corrispondenza delle posizioni -511 e +3962 del gene dell'IL-1 β (Tabella 2), dove i genotipi TT e CC, rispettivamente, erano significativamente più bassi nei pazienti LS con tumore rispetto a quelli senza tumore (0% vs 13%, $p=0.049$; 29% vs 58%, $p=0.038$), con un conseguente aumento dei genotipi CT (50% vs 39%; 54% vs 35%, rispettivamente). Al contrario nessuna differenza è emersa nei pazienti SS con e senza tumore (dati non mostrati). Ovviamente, la stessa differenza era presente quando i pazienti LS con tumore venivano confrontati con i pazienti SS con tumore (0% vs 24%, $p=0.006$ e 29% vs 59%, $p=0.05$, rispettivamente) (Tabella 2). Infine, considerando l'elevata percentuale (45%) di pazienti affetti da un tumore della pelle (LS+SS, n=24) rispetto a quelli affetti da un altro tipo di tumore (n=29), abbiamo valutato e confrontato le varie distribuzioni genotipiche anche in questi due sottogruppi.

pi, ma non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa (dati non mostrati).

Conclusioni. L'IL1 β è una citochina proinfiammatoria dai molteplici effetti biologici. E' ormai dimostrato il suo coinvolgimento in diverse patologie di natura infiammatoria, come l'artrite reumatoide e le malattie infiammatorie croniche intestinali (Bioque *et al.*, 1995; Cantagrel *et al.*, 1999), così come nella crescita tumorale: essa può, infatti, promuovere l'angiogenesi in seguito all'incremento di prostaglandina E2 e VEGF, up-regolando COX-2 ed inducendo la NO sintasi (Ben-Av *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 2001). In particolare, molti studi dimostrano una correlazione con il tumore gastrico. I risultati preliminari del nostro studio sembrano dimostrare che pazienti long-survivors trapiantati di rene sono più suscettibili a sviluppare un tumore se non posseggono i genotipi -511IL1 β TT e +3962IL β CC. Purtroppo, i dati di letteratura riguardanti il ruolo dei polimorfismi del gene dell'IL1 β e la loro associazione con l'insorgenza di un tumore sono ancora controversi: alcuni sostengono che IL1 β -511T/-31C sia un aplotipo di rischio perché associato con elevati livelli di produzione della citochina, mentre altri dimostrano esattamente il contrario, riportando che alti livelli di IL1 β nel plasma sono associati con l'aplotipo -511C/-31T (El-Omar *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004). Per spiegare queste discrepanze, alcuni autori hanno ipotizzato che l'espressione genica sia differenzialmente regolata in popolazioni diverse od in organi differenti. Vi è, al contrario, una certa concordanza nel sostenere che l'allele T in +3962IL β sia associato ad un' aumentata secrezione della proteina. In attesa che la letteratura si arricchisca di nuovi studi volti a chiarire il significato dei suddetti polimorfismi, noi ci proponiamo di confermare i nostri risultati in un gruppo di pazienti più esteso.

VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI INTERLEUCHINA-6 DA PARTE DI CORNEE IN CULTURA D'ORGANO

F. Genzano Besso,^{1,2} P. Santoro,¹ M. Boetto,¹ L. D'angelo,¹ F. Sizzano,² S. Roggero,^{1,2} A. Amoroso²

¹ Banca delle Cornee della Regione Piemonte, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino, ² Immunologia dei Trapianti, A.S.O. San Giovanni Battista, Torino

In uno studio precedente, abbiamo rilevato che le cornee in coltura d'organo producono interleuchina 6 (IL-6) e che la concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura aumenta nel corso della coltura d'organo. Abbiamo inoltre osservato che sia il valore assoluto che l'incremento relativo della concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura è diverso per tessuti provenienti da donatori differenti. In questo studio abbiamo voluto rilevare se vi è correlazione tra concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura delle cornee e alcune caratteristiche biologiche e cliniche delle cornee stesse.

Materiale e Metodi. Abbiamo valutato la concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura di 77 cornee provenienti da 46 donatori, presenti in coltura d'organo presso la Banca delle Cornee della Regione Piemonte tra marzo e aprile 2006. Le determinazioni sono state eseguite su campioni di terreno di coltura delle cornee, prelevati dopo sette giorni dall'inizio della coltura d'organo. Per misurare la concentrazione di IL-6 abbiamo utilizzato un test di tipo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dispensando 100 μ L del terreno di coltura diluito 1:75 in piastre da 96 pozzetti rivestiti con un anticorpo anti IL-6. I reagenti di rivelazione comprendevano un anticorpo secondario biotinilato, avidina perossidasi, substrato cromogeno. Il controllo negativo utilizzato è stato terreno di coltura mantenuto nelle stesse condizioni della coltura d'organo. Tutte le cornee per le quali è stata determinata la concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura sono state valutate microscopicamente dopo un tempo medio di coltura di venti giorni.

Risultati e Conclusioni. Nei campioni analizzati non è stato possibile trovare una correlazione tra la concentrazione di IL-6 e le caratteristiche cliniche del tessuto, quali l'intervallo morte-pre-

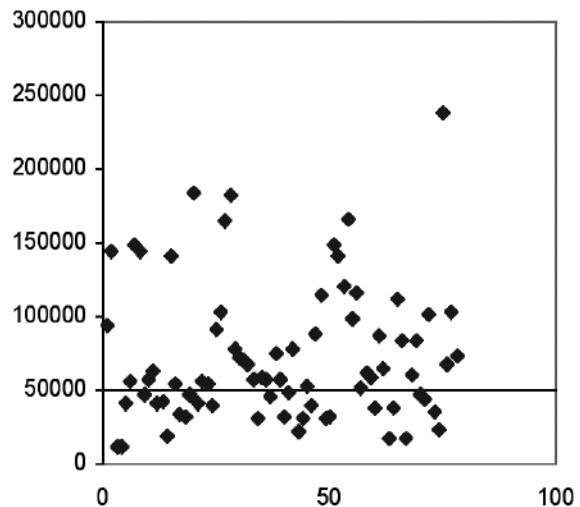


Figura 1. Distribuzione della concentrazione di IL-6 nei campioni analizzati.

lievo, l'età del donatore e la causa di morte.

L'analisi dei dati (Figura 1) ci ha però permesso di correlare la concentrazione di IL-6 con alcune caratteristiche biologiche.

39 delle 77 cornee analizzate (51%) all'analisi microscopica sono risultate non idonee per intervento perforante di trapianto di cornea (PKP) al termine della coltura.

La causa della non idoneità rientrava in una delle seguenti alterazioni biologiche:

- 1) elevata perdita di cellule endoteliali;
- 2) alterazioni dello stroma;
- 3) pieghe della membrana di Descemet.

33 di queste 39 cornee (85%) al settimo giorno di coltura mostravano una concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura superiore a 50000 pg/mL (Tabella 1).

Tabella 1.

	[IL-6] < 50000 pg/mL	[IL-6] > 5000
Alterazioni biologiche	6	33
Non alterazioni biologiche	23	15

Tra le 38 cornee che non mostravano alterazioni biologiche, solo 15 (40%) mostravano una concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura superiore a 50000 pg/mL. L'analisi statistica indica una differenza significativa (Fisher's test: $p < 0.0001$) - per la produzione di IL-6 dopo sette giorni di coltura - tra il gruppo di cornee che presentavano alterazioni morfologiche all'esame microscopico e quello che non mostrava sofferenza tissutale.

I dati ottenuti ci permettono quindi di evidenziare che:

- 1) la concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura non è correlabile con le caratteristiche cliniche della cornea, quali l'intervallo morte-prelievo, l'età del donatore e la causa di morte;
- 2) la concentrazione è correlabile con alcune caratteristiche biologiche delle cornee: Infatti, i terreni di coltura contenenti cornee valutate in seguito ad analisi microscopica non idonee per PKP, dopo sette giorni di coltura contenevano in una elevata percentuale (85%) alti livelli di IL-6 (>50000 pg/mL). La determinazione della concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura dopo sette giorni, potrebbe quindi essere molto utile per ottimizzare il tempo di coltura delle cornee. Infatti, lo scopo della coltura d'organo è duplice: da un lato permette di verificare l'eventuale contaminazione da parte di batteri e miceti delle cor-

nee da utilizzarsi a scopo di trapianto, dall'altro permette di conservare le cornee per un periodo variabile da una a quattro settimane. La possibilità di avere sempre tessuti corneali disponibili per trapianto è estremamente utile in quanto permette di programmare gli interventi di innesto e, soprattutto, consente di avere sempre cornee disponibili per gli interventi con carattere di urgenza. Inoltre coltura consente, in alcuni casi, di recuperare danni biologici evidenziabili nel tessuto al momento della prima osservazione dopo il prelievo. In altri casi, però, la coltura protratta per un lungo periodo può portare a un danno biologico per il tessuto corneale, che può renderlo non idoneo per PKP. La determinazione della concentrazione di IL-6 nel terreno di coltura dopo sette giorni potrebbe così aiutarci a decidere per un periodo più o meno lungo di coltura d'organo e consentirci di recuperare una maggior percentuale di tessuti idonei e quindi utilizzabili per intervento PKP.

INDIVIDUAZIONE DI CHIMERISMO MATERNO NEL SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA SCID

P.I. Monaco,¹ G. Ozzella,¹ P. Giustiniani,² E. Calcagni,³ C. Cortini,³ A. Aureli,¹ E. Poggi,¹ M.R. Pinto,² P. Rossi,² M. Caniglia,² A. Piazza,² D. Adorno¹

¹Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per i Trapianti d'Organo Roma, L'Aquila, ²IRC Ospedale Bambino Gesù-Roma, ³Università degli Studi Tor Vergata, Roma

L'immunodeficienza severa combinata (SCID) è caratterizzata da un'alterazione dello sviluppo dei linfociti che si esprime con un difetto di maturazione dei linfociti T e con un'alterata funzionalità dei linfociti T e B.¹ Nel sangue periferico di diversi pazienti affetti da SCID è stata osservata la contaminazione di linfociti T materni derivante dal passaggio transplacentare di sangue materno sia nell'ultimo periodo prenatale che durante il parto. E' stata inoltre evidenziata un'incapacità da parte dei soggetti affetti da SCID di riconoscere e di rigettare tali cellule di origine materna. Pertanto i linfociti materni possono sopravvivere a lungo nel sistema circolatorio dei bambini affetti da SCID e possono causare una severa e spesso fatale graft-vs-host disease (GVHD).² Per tali pazienti l'unica forma di trattamento attualmente efficace è rappresentata dal trapianto di cellule staminali emopoietiche. La presenza dei linfociti T materni può essere identificata attraverso l'analisi del cariotipo dei cromosomi sessuali in pazienti di sesso maschile² oppure attraverso la tipizzazione molecolare HLA a bassa o alta risoluzione degli alleli di classe I e II.³ Scopo del nostro lavoro è stato quello di identificare gli alleli HLA dei bambini malati di SCID che, a causa della grave leucopenia presentata e della possibile presenza di chimerismo materno, risultano di difficile identificazione.

Materiali e metodi. Sono giunti alla nostra osservazione, per la ricerca di un donatore familiare di cellule staminali emopoietiche, tre pazienti pediatriche di età compresa tra 4 mesi e un anno (pazienti C.F.M. R.P. M.G.) che presentavano un quadro di immunità cellulare e umorale e una sintomatologia tali da portare ad una diagnosi di SCID iper B. Le prime indagini genetiche eseguite hanno evidenziato mutazioni di tipo *common γ chain* e *jack 3* confermando per tutti e tre i pazienti la diagnosi di SCID anche se con manifestazioni di esordio diverse. Nei pazienti C.F.M. e R.P. erano presenti anche evidenti segni di GVHD. Sui campioni di sangue periferico dei tre pazienti e dei loro familiari è stata eseguita la tipizzazione HLA di classe I e II. Per i pazienti, data la grave leucopenia presentata, è stata eseguita su sangue periferico la tipizzazione molecolare con metodiche di PCR-SSP sia per la classe I che per la classe II. Per i familiari è stata eseguita la tipizzazione sierologica di classe I utilizzando metodiche di linfocitossicità complemento mediata e di classe II con metodiche genomiche di PCR-SSP. Per i pazienti C.F.M. e R.P. che presentavano GVHD è stato necessario eseguire l'estrazione del DNA da cellule somatiche. Nel paziente C.F.M. è stata eseguita l'estrazione del DNA dal bulbo capillifero. La ripetizione della tipizzazione HLA è avvenuta mediante metodiche di sequenziamento diretto (SBT) a causa della scarsità di DNA ottenuto. Nel paziente R.P. la tipizzazione è stata ripetuta su DNA estratto da un frammento di cute con metodiche di PCR-SSP.

Risultati. Nei pazienti C.F.M. e R.P. che manifestavano segni di GVHD la tipizzazione HLA eseguita sui campioni di DNA estratto da sangue periferico dei pazienti e dei loro familiari ha permesso di individuare contaminazione di linfociti materni. L'analisi degli alleli HLA di classe I di tali pazienti ha permesso di evidenziare la presenza di tre alleli diversi per i loci A, B e C, come riportato nella Tabella 1.

La conferma dei risultati è stata ottenuta mediante ripetizione delle tipizzazioni su nuovi campioni. L'analisi familiare ha consentito di stabilire che nei bambini C.F.M. e R.P. erano presenti entrambi gli alleli di origine materna. Sui campioni di sangue dei pazienti è stata, inoltre, eseguita l'analisi dei cromosomi sessuali con metodica FISH la quale ha ulteriormente confermato la presenza di una popolazione a mosaico con una percentuale di cellule XX di origine materna del 41% (C.F.M.) e del 16% (R.P.). Per definire la tipizzazione HLA dei pazienti è stato necessario estrarre il DNA da cellule somatiche e ripetere la tipizzazione che ha portato ai risultati indicati nella Tabella 2. Nel caso del paziente C.F.M. l'esigua quantità di DNA ottenuta inizialmente non ha consentito di tipizzare neanche con metodiche di SBT il locus C. In alternativa è stato tipizzato il DNA estratto da cellule provenienti da spazzolatura delle gengive che per la presenza nella saliva di un'alta percentuale di cellule del sangue ha evidenziato il chimerismo materno. Al

Tabella 1. Tipizzazione PCR-SSP HLA di classe I.

Pazienti	Tipo di prelievo	Locus A*	Locus B*	Locus Cw*
Paziente 1	Sangue periferico	24, 25, 32	18, 35, 51	04, 12, 16
Paziente 2	Sangue periferico	01, 29, 32	08, 44, 50	06, 07, 16

Tabella 2. Tipizzazione HLA.

Pazienti	Tipo di prelievo	Tecnica di tipizzazione	Locus A*	Locus B*	Locus Cw*	Locus DRB1	Locus DRB3/4/5	Locus DQB1
Paziente C.F.M.	Bulbo capillifero	SBT	240201, 3202	1801, 3502		110401, 140401		
Paziente R.P.	Frammento di cute	PCR-SSP low/high resolution	29, 32	44, 50	06, 16	0701	B4*010101	0202

contrario nel paziente R.P. il DNA ottenuto dal frammento di cute privo di inquinamento da cellule T materne, ha permesso di ottenere la tipizzazione HLA del bambino. La tipizzazione genomica eseguita su sangue periferico della paziente M.G. che non mostrava né chimerismo materno e né segni di GVHD ha permesso l'identificazione degli alleli HLA.

Conclusioni. Il nostro studio ha evidenziato che la tipizzazione molecolare HLA eseguita su DNA estratto da sangue periferico di pazienti affetti da SCID non sempre consente di definire l'assetto HLA del paziente a causa della persistenza di cellule T materne nel sangue periferico del bambino che spesso si associa a GVHD. La tipizzazione HLA eseguita su DNA somatico rappresenta invece lo strumento idoneo per definire l'HLA di bambini affetti da SCID. I bulbi capilliferi rappresentano una delle migliori fonti non invasive per ottenere DNA somatico, ma la resa non risulta essere sempre ottimale e spesso non si hanno a disposizione tali bulbi a causa della chemioterapia praticata a scopo terapeutico. L'alternativa rappresentata dal brushing gengivale non porta a risultati attendibili a causa della presenza nella saliva di cellule ematiche. Risulta ottimale la tipizzazione genomica eseguita su un frammento di cute privo di cellule ematiche, come nel caso del nostro paziente R.P. sebbene sia da sottolineare che il prelievo della cute è un metodo più invasivo. L'analisi della tipizzazione HLA così ottenuta ci ha permesso di individuare il miglior donatore familiare e di avviare il paziente al trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Bibliografia

1. Rosen FS, Cooper MD, Wedgewood RJP. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995; 333: 431-40.
2. Cederbaum SD, Niwayama G, Stiehm ER, Neerhout RC, Ammann A.J, Berman W. Combined immunodeficiency manifested by Litterer Siew-Syndrome. *Lancet* 1972 1: 958.
3. Rosenstock RJ, Goldblum RM, Sharp J. Development of immune function and graft-vs-host (GVH) after intrauterine T lymphocyte engraftment in severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin Res* 1981 29:887A.

RISPOSTA ANTICORPALE ANTI-HLA E TRATTAMENTO CON IFN- α : CASE REPORT

C. Cervelli, G. Fontecchio, M.A. Fioroni, R. Azzarone, C. Battistoni, C. Mazzotta,² I. Parzanese¹ F. Papola

Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale ASL n°4 L'Aquila; ¹Centro Regionale Trapianti Regione Abruzzo, Regione Molise; ²Unità Operativa Trapianti ASL n°4, Università degli Studi L'Aquila

M.L. di anni 44, con tipizzazione HLA- A24,-/B51,-/DR11; nel gennaio 1996 viene sottoposta a trapiantato di rene da un donatore cadavere con tipizzazione HLA A2,29/B51,44/DR11,- presso un centro europeo. Dopo circa un mese, rientra in dialisi e contrae una infezione da HCV. Malgrado le condizioni cliniche la paziente affronta con successo, nel 2002, una gravidanza. La determinazione degli anticorpi anti-HLA, eseguita periodicamente in citofluorimetria a flusso mediante *FlowPRA Screening Test* dal periodo successivo al parto fino a circa tre anni dopo, ha rivelato bassi livelli anticorpali, con una percentuale di PRA oscillante tra 10%-20%, con specificità anti-A2, -A29 e -B45 (*Class I Single Antigen Antibody Detection*). Nel 2004, inizia la terapia con interferon- α (IFN- α) per il trattamento dell'infezione da HCV; trascorsi 8-10 mesi dall'inizio della somministrazione di (IFN- α), i test citofluorimetrici per la ricerca degli anticorpi anti-HLA classe I e II mettono in evidenza un marcato incremento del PRA (67-75%) accompagnato da presenza di anticorpi anti-HLA-A2, -A29, -B44, nonché da comparsa delle specificità anti-Bw6 ed anti-DR53. Lo sviluppo di anti-Bw6 può ricondursi ad una sensibilizzazione nei confronti degli antigeni HLA del coniuge della paziente (A1,24; B18,39; DR11,15) non evidenziabili precedentemente, mentre la produzione di anti-DR53 è stata

causata probabilmente da trasfusioni che la paziente ha ricevuto in passato. L'interruzione della somministrazione di IFN- α ha comportato una significativa riduzione del PRA (47%), come evidenziato in un siero successivo giunto alla nostra osservazione alcuni mesi dopo la fine del trattamento. Il caso proposto rivaluta l'ipotesi di una importante azione stimolante la risposta immunitaria cellulo-mediata da parte di IFN- α , in accordo con taluni dati di letteratura che documentano un incremento nel rischio di rigetto acuto di rene dopo terapia con il farmaco. I meccanismi patogenetici alla base della stimolazione della produzione di alloanticorpi indotta da IFN- α non sono ancora ben comprese, ma potrebbero ricondursi a *upregulation* di specifiche citochine come l'IL-15 in grado di indurre attivazione ed espansione clonale di cellule T della memoria in soggetti *responders* alla terapia antivirale, e una stimolazione della risposta TH1 IL-2-mediata.

RISPOSTA ANTICORPALE EPITOPO-SPECIFICA DOPO TRAPIANTO RENALE

C. Cervelli, M.A. Fioroni, G. Fontecchio, R. Azzarone, C. Battistoni, F. Pisani,² D. Maccarone,¹ F. Papola

Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale ASL n°4 L'Aquila, ¹Centro Regionale Trapianti Regione Abruzzo, Regione Molise; ²Unità Operativa Trapianti ASL n°4, Università degli Studi L'Aquila

Nel laboratorio del Centro di Immunologia e Tipizzazione Tissutale di L'Aquila (Italia) viene routinariamente eseguita la ricerca di anticorpi anti-HLA pre- e post-trapianto mediante citofluorimetria a flusso utilizzando il test *FlowPRA*. Nel corso dello studio delle specificità mediante *Single Antigen HLA Class II Antibody Detection*, è stata recentemente evidenziata la presenza di anticorpi specifici anti-DRB1*1101 in due pazienti, di sesso maschile, sottoposti a trapianto di rene, con fenotipo DR11: il paziente 1 mostrava il fenotipo HLA DR4-DR11, trapiantato con un rene DR2 - DR4, il paziente 2 mostrava il fenotipo HLA DR17 - DR11 trapiantato con un rene DR17 - DR13. Ad una successiva analisi PCR-SSP DRB1*11 ad alta risoluzione, entrambi i riceventi risultavano possedere l'allele DRB1*1104, mentre le biglie utilizzate per la determinazione anticorpale erano rivestite dalla variante allelica DRB1*1101. Tale riscontro impone talune considerazioni. In prima istanza, entrambi i pazienti mostravano una sensibilizzazione allele specifica; essendo noto che l'unica differenza tra i due sottotipi DRB1*11 risiede nel dimorfismo Gly86(*1101)/Val86(*1104), localizzato in corrispondenza del sito di legame per l'antigene e pertanto essenziale nella selezione e presentazione del peptide, si evidenzia come una singola sostituzione aminoacidica, soprattutto in una posizione critica, sia sufficiente a stimolare la risposta immunitaria epitopo-specifica. In secondo luogo, il test citofluorimetrico impiegato, pur essendo dotato di elevata specificità e sensibilità, consentendo di identificare, infatti, anticorpi epitopo-specifici, mostra tuttavia dei limiti dipendenti dalla completezza del pannello di antigeni utilizzato, poiché atto a definire, in tal caso, IgG anti-HLA dirette contro l'allele DRB1*1101 ma non contro altri alleli del DRB1*11. Tale situazione si riproporre anche per altri alleli HLA di classe I e II.

POSSIBILE COINVOLGIMENTO DEI GENI AGER ED HFE NELLA PREDISPOSIZIONE ALLA MALATTIA DI ALZHEIMER

C Graziano,¹ A Lo Conte,¹ B Nacmias,² B Porfirio^{1,3}

¹Unità di Genetica Umana, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università degli Studi di Firenze; ² Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli Studi di Firenze, ³ Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

Per i geni presenti nella regione HLA è stato ipotizzato da tempo un ruolo nella predisposizione alla malattia di Alzheimer, a causa del coinvolgimento di fattori immunitari e infiammatori nella patogenesi di questa condizione. La possibile correlazione fra la presenza dell'allele HLA-A2 e la suscettibilità all'Alzheimer è stata analizzata in numerosi studi, ma con risultati contrastanti.¹ È possibile che l'allele A2 non sia implicato direttamente nella suscettibilità, ma che sia in linkage disequilibrium con altri geni presenti nella regione HLA. Tra questi, due candidati sono HFE ed AGER. Mutazioni di HFE sono responsabili della forma classica di emocromatosi ereditaria, condizione determinata da sovraccarico di ferro. In pazienti con Alzheimer è stato riscontrato spesso un incremento di ferro, soprattutto a livello dell'ippocampo e corteccia parietale. Lavori che hanno analizzato le alterazioni più comuni di HFE nell'Alzheimer hanno mostrato risultati discordanti; in alcuni studi, la presenza dell'allele H63D correlava più che con l'insorgenza della malattia con un'età di esordio più precoce.^{2,3} Il gene AGER è stato identificato come recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE). Gli AGE sono addotti non enzimatici di proteine, lipidi ed acidi nucleici e sono presenti nelle placche senili e nei grovigli neurofibrillari dei pazienti con Alzheimer. AGER può legare gli AGE ma anche la β -amiloide, determinando un feedback positivo che genera l'attivazione della microglia, che a sua volta innesca processi infiammatori che aumentano l'espressione di AGER; sembra quindi che AGER metta in relazione la β -amiloide con i processi infiammatori che partecipano alla progressione dell'Alzheimer.⁴ Sono stati descritti alcuni polimorfismi nella regione 5' di AGER che hanno un effetto sull'aumento di trascrizione del gene.⁵ In base agli aplotipi determinati da questi polimorfismi, è possibile discriminare delle ipotetiche classi di trascrizione del gene (bassa, media e alta). *Materiali e Metodi.* Le mutazioni C282Y ed H63D del gene HFE sono state analizzate mediante PCR e taglio enzimatico (con AfaI e MboI rispettivamente) in 53 individui affetti da malattia di Alzheimer e in 44 individui normali, confrontabili per età e sesso. Negli stessi individui affetti, ed in un gruppo di 68 individui di controllo, è stata analizzata mediante sequenziamento diretto la regione 5' del gene AGER. In questa regione sono presenti i 3 polimorfismi (2 SNP e una delezione di 63 paia di basi) associati alla trascrizione del gene. I pazienti selezionati nel nostro studio non hanno familiarità per malattia di Alzheimer ma sono stati scelti in base all'età di esordio precoce (<66 anni). *Risultati e Conclusioni.* La distribuzione delle frequenze sia aplotipiche che genotipiche dei polimorfismi analizzati nel promotore del gene AGER non hanno mostrato differenze statisticamente significative fra i malati ed il gruppo di controllo; anche la stratificazione dei dati in relazione alla presunta classe di espressione genica non è risultata significativa. La mutazione C282Y non è presente nella nostra casistica. La frequenza della variante H63D non mostra differenze statisticamente significative tra casi e controlli. I casi e i controlli erano stati in precedenza tipizzati per APOE e, come già ampiamente dimostrato in letteratura, l'allele $\epsilon 4$ è sovrarappresentato nei pazienti (47.2% contro il 10.3% nei controlli). I dati sono stati stratificati per saggiare le possibili interazioni tra l'allele $\epsilon 4$ di APOE e i due geni analizzati. Il risultato più interessante è che il caratteristico eccesso dell'allele $\epsilon 4$ appare limitato ai pazienti H63 wild type, mentre la significatività statistica si perde in presenza dell'allele 63D, suggerendo che in questi soggetti possano determinarsi le condizioni di insorgenza della malattia anche in assenza di $\epsilon 4$ (vedi Tabella 1 e 2).

Tabella 1. Prevalenza dell'allele $\epsilon 4$ del gene APOE nei 34 pazienti AD e nei 26 controlli in cui non è presente la variante 63D del gene HFE.

	HFE 63D assente			
	Pazienti		Controlli	
	n.	%	n.	%
$\epsilon 4$ presente	18	52,9	4	15,4
$\epsilon 4$ assente	16	47,1	22	84,6

χ^2 8,95; p 0,0028 (p. 0,0168).

Tabella 2. Prevalenza dell'allele $\epsilon 4$ del gene APOE nei 17 pazienti AD e negli 11 controlli in cui è presente la variante 63D del gene HFE.

	HFE 63D assente			
	Pazienti		Controlli	
	n.	%	n.	%
$\epsilon 4$ presente	5	29,4	2	18,2
$\epsilon 4$ assente	12	70,6	9	81,8

Test esatto di Fisher a due code, p 0,6683 ns.

Anche nei soggetti con varianti genotipiche AGER associate ad alta espressione sembra perdersi l'associazione con l'allele $\epsilon 4$ (Vedi Tabella 3 e 4).

Tabella 3. Prevalenza dell'allele $\epsilon 4$ del gene APOE nei 38 pazienti AD e nei 45 controlli in cui sono presenti i genotipi AGER associati ad espressione genica media o bassa.

	AGER 1/1, 1/2, 1/3, 1/4			
	Pazienti		Controlli	
	n.	%	n.	%
$\epsilon 4$ presente	16	42,1	4	8,9
$\epsilon 4$ assente	22	57,9	41	91,1

χ^2 12,43; p 0,0004 (p. 0,0024).

Tabella 4. Prevalenza dell'allele $\epsilon 4$ del gene APOE nei 12 pazienti AD e nei 13 controlli in cui sono presenti i genotipi AGER associati ad espressione genica elevata.

	HFE 63D assente			
	Pazienti		Controlli	
	n.	%	n.	%
$\epsilon 4$ presente	7	58,3	2	15,4
$\epsilon 4$ assente	5	41,7	11	84,6

Test esatto di Fisher a due code, p 0,04 (p. 0,24ns).

In conclusione, anche se molto preliminari, i nostri dati sembrano indicare che in assenza del più importante fattore genetico di suscettibilità per la malattia di Alzheimer (l'allele $\epsilon 4$ di APOE) varianti genetiche di HFE ed AGER rappresentino determinanti importanti nello sviluppo della patologia.

Bibliografia

- Bertram L, Tanzi RE. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Human Molecular Genetics*. 2004; 13:135-41.

2. Sampietro M, Caputo L, Casatta A, Meregalli M, Pellagatti A, Tagliabue J, et al. The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22:563-8.
3. Candore G, Licastro F, Chiappelli M, Franceschi C, Lio D, Rita Balistreri C, et al. Association between the HFE mutations and unsuccessful ageing: a study in Alzheimer's disease patients from Northern Italy. *Mech Ageing Dev* 2003; 124:525-8.
4. Stuchbury G, Munch G. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. *J Neural Transm*. 2005; 112:429-53.
5. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001; 50:1505-11.

STUDIO RETROSPETTIVO SUL RUOLO DELLA TIPIZZAZIONE HLA PER ANTIGENI DI CLASSE II NELL'ALGORITMO DIAGNOSTICO PER LO STUDIO DELLA MALATTIA CELIACA

C. De Filippo,¹ S. Pigni,¹ P. Pettini,¹ M. Mottes,¹ G. Donelli,¹ E. Piantanida,² M.S. Scotta,² A. Pagani¹

¹Servizio di Immunematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Sant'Antonio Abate di Gallarate; ²Divisione di Pediatria, Azienda Ospedaliera Sant'Antonio Abate di Gallarate

La malattia celiaca è una sindrome da malassorbimento causata da una intolleranza nella dieta al glutine. La malattia si manifesta con gli aspetti di un processo infiammatorio cronico della mucosa dell'intestino tenue, più marcato a livello prossimale. Questa condizione si risolve in un progressivo appiattimento dei villi intestinali che può arrivare fino alla completa scomparsa, evento questo che corrisponde, sotto l'aspetto funzionale, ad una progressiva ed ingravescente situazione di malassorbimento. Il glutine è un complesso proteico presente nel frumento, nella segale, nell'orzo ed anche in alcune specie di avena. In realtà l'intolleranza non è tanto nei confronti del glutine come tale, ma, piuttosto, di una sua frazione, la gliadina, proteina basica solubile in alcool, dalla quale dopo digestione con pepsina e tripsina, si forma una frazione molto tossica, chiamata frazione III di Fraser. Sotto l'aspetto patogenetico è una complessa malattia multifattoriale dove la nota tossicità della gliadina si manifesta soltanto se un terreno genetico predisponente ed eventi immunologici concorrenti cooperano insieme a determinare la complessa sequenza di accadimenti fisiopatologici che traducono la comparsa di manifestazioni cliniche conseguenti della malattia. L'occorrenza nella popolazione della intolleranza al glutine è descritta solitamente con una tipica configurazione ad iceberg, dove la popolazione sana occupa la parte più larga e sommersa della piramide e i soggetti con malattia clinicamente manifesta la punta emergente. La porzione intermedia dell'iceberg, parte sommersa e parte emergente, è occupata da soggetti con malattia celiaca silente o latente. Si ammette che nel mondo occidentale soltanto 1 su 5/10 celiaci giungano attualmente alla diagnosi. Il rapporto è notevolmente più alto nei paesi africani. L'ipotesi di un terreno genetico è oggi avallata da una enorme mole di dati attestanti la ricorrenza familiare della malattia e da studi che attestano la pressoché costante associazione con antigeni codificati dal sistema HLA di classe II, nel locus DQB1, identificati come DQ2 (90% dei celiaci) e DQ8 (rimanente 10%). Gli assetti molecolari sono altrettanto costanti: etreodimeri DQB1*0201/DQA1*0501, DQB1*0202/DQA1*0201, DQB1*0302/DQA1*0301, o anche DQB1*0301/DQA1*0505. La ricorrenza dell'associazione con gli antigeni HLA DQ2/DQ8 è tale da far ritenere che l'espressione di questi antigeni nei cluster linfocitari T giochi un ruolo patogenetico diretto nel determinismo della malattia. L'allontanamento del glutine dalla dieta determina non solo un miglioramento del quadro biotico e clinico, ma tende anche a prevenire le complicanze che devono essere sempre sospettate se il paziente non raggiunge il benessere nonostante la dieta.

Metodi. In accordo alla maggior parte dei protocolli diagnostici oggi in uso per lo studio della malattia celiaca, anche nella Divisione di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera di Gallarate si adotta uno schema che prevede l'inserimento dei pazienti in un doppio braccio di screening:

1. Soggetti con elevata evidenza di sintomatologia clinica
 - La biopsia del tratto prossimale dell'intestino tenue viene associata in prima istanza agli esami sierologici: anticorpi anti-endomisio (EMA IgA), anti-transglutaminasi (tTG IgA) e anti-gliadina (AGA IgG + IgA).
 - Se la sierologia è positiva e il danno istologico è evidente si pone diagnosi definitiva di celiachia e viene tralasciata la ricerca dei markers genetici.
 - Se il danno istologico non è diagnostico viene eseguita la tipizzazione HLA:
 - Se la tipizzazione HLA per HLADQ2 e/o DQ8 è positiva si fa diagnosi di celiachia latente. Il paziente non viene messo a dieta priva di glutine ed è inserito in un follow-up clinico, sierologico ed endoscopico.

2. Soggetti con sospetto clinico e/o presenza di marcatori sierologici aspecifici (AGA) confermati nel tempo e familiari asintomatici o paucisintomatici di pazienti già diagnosticati come celiaci

- Se tutti i test sierologici risultano negativi e/o aspecifici (AGA) la diagnosi di celiachia viene sospesa e il paziente entra in un follow-up clinico
- Se tutti o alcuni test sierologici risultano positivi si prosegue con la ricerca dei markers genetici:
 - Se la tipizzazione HLA per HLADQ2 e/o DQ8 è positiva, alla comparsa di positività per i marcatori sierologici EMA e tTG, si effettuerà l'esame istologico del tratto prossimale dell'intestino per conferma del sospetto diagnostico.
 - Se la tipizzazione HLA per HLADQ2 e/o DQ8 è negativa viene effettuato un follow-up clinico.

Per la tipizzazione HLA si è adottata la metodica sierologica classica (citotossicità complemento-dipendente) sia in funzione del carattere di screening diagnostico, sia per il consolidato uso nel nostro laboratorio; la tipizzazione in biologia molecolare, attualmente implementata, verrà gradualmente estesa a tutti i pazienti.

Risultati. Dalla metà del 2003 all'aprile del 2006 sono stati esaminati per la tipizzazione HLA di classe II 178 campioni di sangue afferenti dalla Divisione di Pediatria, tutti provenienti da soggetti con scarsa evidenza di sintomatologia clinica o con stimate di familiarità per celiachia. Di questi, 122 (68%) sono risultati portatori di almeno uno degli antigeni HLA di classe II DQ2 o DQ8 e 56 negativi i marker genetici di celiachia. In 24 pazienti (19% dei soggetti esaminati), dei 122 positivi, è stata posta la diagnosi definitiva di celiachia, confermata dalla presenza dei markers sierologici e dalla positività della biopsia intestinale; i rimanenti 98 sono seguiti nel tempo, in assenza di terapia dietetica senza glutine, in un follow-up clinico e sierologico. I 24 soggetti risultati positivi sono o parenti di celiaci o soggetti già diagnosticati con celiachia latente. I 98 in corso di follow-up sono familiari di celiaci con sintomatologia incompleta o pazienti con markers aspecifici (AGA IgG+IgA positivi). Per 2 dei 56 soggetti con assenza di stimate genetiche di celiachia, familiari di celiaci o soggetti paucisintomatici, è stata posta la diagnosi definitiva di celiachia, confermata dalla presenza dei markers sierologici e, soprattutto, dall'evidenza del danno istologico. L'associazione malattia celiaca e HLA DQ2 o DQ8 nella nostra statistica non risulta quindi del 100%. L'altissima percentuale di soggetti con fenotipo HLA DQ2/DQ8 nella casistica in discussione, ben superiore a quella registrata in una popolazione del territorio gallaratese selezionata casualmente (16%), è connessa con ogni evidenza alla elevata presenza consanguinea di celiaci nella popolazione pediatrica studiata per lo screening.

Discussione. Colpisce in questa indagine retrospettiva l'elevata frequenza di aplotipi predisponenti per celiachia nella popolazione di controllo (soggetti paucisintomatici con diagnosi non confermata o familiari di pazienti già diagnosticati come celiaci).

ci); questo dato risulta viziato verosimilmente dall'alta incidenza in questo gruppo di consanguinei di soggetti con diagnosi definita o con celiachia latente. Il valore predittivo della ricerca degli alplotipi HLA-DQ2 e/o DQ8 apre una questione di notevole rilevanza circa l'epoca di comparsa dei segni clinici ed istologici di malattia, che la maggior parte delle osservazioni più recenti tendono a spostare sempre più nella terza o quarta decade della vita. Si pone pertanto l'obbligo per questi soggetti di una osservazione clinica costante durante gli anni o i decenni successivi. Per quanto da diversi autori si enfatizza la circostanza che la tipizzazione genetica HLA possa rappresentare il test di screening di primo livello per i soggetti a rischio, al fine di operare una valutazione preliminare tra quelli che necessitano della valutazione sierologica e/o dell'indagine bioptica, l'indagine retrospettiva effettuata nel Nostro Centro conferma la sostanziale validità dell'iter diagnostico attuato che privilegia ancora la biopsia del tratto prossimale dell'intestino e i markers sierologici di celiachia, ma che trova un valido supporto nella tipizzazione HLA di classe II. Questa risulta soprattutto utile in tutti quei soggetti nei quali la diagnosi rimane incerta, per la presenza di marcatori sierologici negativi o non completamente definiti e/o per quadri istologici della mucosa intestinale border-line (minima infiltrazione linfocitaria della sottomucosa intestinale, con assenza di quadri di atrofia della mucosa); per questi appare ragionevole la necessità di rinviare la diagnosi definitiva nel tempo. Rimane indubbio che l'inclusione della indagine genetica nell'iter diagnostico di celiachia riduce il numero dei soggetti da sottoporre a biopsia intestinale, consentendo una riduzione dei costi in termini economici, oltre, naturalmente, a diminuire il disagio per il paziente in accertamento.

L'ANALISI DEGLI ALLELI HLA PAZIENTE-SPECIFICI E' UN INDICATORE SENSIBILE DI RECIDIVA DOPO TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE T-DEPLETO PER MALATTIE EMATOLOGICHE AD ALTO RISCHIO

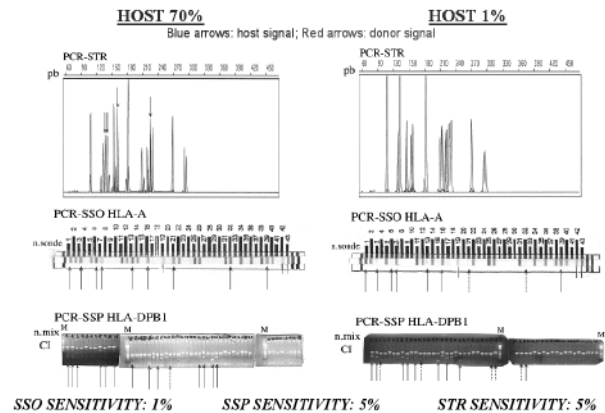
B. Mazzi,¹ T.D. Clerici,² A. Galli,¹ M. Zanussi,³ F. Ciceri,² K. Fleischhauer¹

¹Unità di Immunologia Molecolare dei Trapianti, ²Ematologia e Unità di Trapianto di Midollo Osseo, ³Laboratorio di Biologia Molecolare Clinica, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Introduzione. Lo studio del chimerismo ematopoietico, dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cell Transplantation- HSCT) T-depleto in pazienti affetti da malattie ematologiche ad alto rischio, è un utile indicatore di malattia residua minima in grado di individuare precocemente una recidiva di malattia.^{1,2} Questo consente di attuare tempestivamente strategie immunologiche volte ad impedire la franca recidiva di malattia.^{3,4} Ad oggi il metodo standard per lo studio del chimerismo ematopoietico è l'analisi mediante PCR degli short tandem repeats (STR), la cui sensibilità si attesta sul 5%.⁵ Allo scopo di incrementare la sensibilità nello studio del chimerismo ematopoietico abbiamo ricercato un marcatore alternativo.

Materiali e metodi. Nell'ambito dell'HSCT allogenico abbiamo sviluppato un metodo semiquantitativo basato sullo studio genomico delle molecole HLA presenti all'interno della coppia donatore-ricevente (marcatori informativi HLA paziente-specifici e donatore-specifici) mediante PCR-SSO (Reverse Sequence-Specific Oligonucleotides - Dynal ReliSSO™) per i loci HLA-A, B, C, DRB, DQB1, e PCR-SSP (Sequence-Specific-Primers - Olerup SSP™) per il locus HLA-DPB1. Tale metodica HLA è stata quindi applicata sistematicamente, in parallelo all'analisi STR, ad una casistica consecutiva di 47 trapianti da donatore alternativo (25 aplo, 18 MUD, 3 familiari-mismatch, 1 da sangue cordonale) per l'analisi del chimerismo ematopoietico su campioni di sangue midollare.

Risultati. Allo scopo di testare la sensibilità dei metodi HLA (SSO/SSP) e di determinare dei range semiquantitativi per l'analisi del chimerismo, abbiamo sviluppato una curva standard per ciascuno dei metodi HLA. Tali curve sono state validate per con-



Results 1. Standard curve HLA method (SSO, SSP) Semiquantitative Assay.

Concordance HLA-STR: high degree

- 80.3% SSO-STR
- 76% SSP-STR

Discordance HLA-STR:

- HLA positive (<100% donor) with STR negative (100% donor):
 - SSO: 15.3% of the total events
 - SSP: 16% of the total events
 - Of these: events predictive for relapse, rejection or stable mixed chimerism are:
 - SSO: 28.6%
 - SSP: 12.5%
- HLA negative (100% donor) with STR positive (<100% donor):
 - 3%: none predictives for clinical events

Sensitivity for prediction of relapse, rejection or stable mixed chimerism is higher for HLA (in particular SSO) than STR

Results 2. Concordance/Discordance HLA-STR. Follow-up of patients after allogeneic HSCT (n-235 samples).

		STR	SSO	SSP
SENSITIVITY	TP / (TP+FN)	50%	64%	50%
POSITIVE PREDICTIVE VALUE	TP / (TP+FP)	39%	56%	16%

- Relapse prediction on 12 total relapses
 - 75% predicted by SSO
 - 75% predicted by SSP
 - 50% predicted by STR
- Median time of relapse prediction:
 - 56 days for SSO, 51 days for SSP, 42 days for STR

Results 3. HC and relapse prediction.

fronto con la metodica standard quantitativa STR ed hanno consentito di stabilire dei range discreti per l'interpretazione dello stato di chimerismo. Il confronto con metodica STR ha dimostrato una maggiore sensibilità delle metodiche HLA: sensibilità SSO 1%, SSP 5%. Nell'analisi del chimerismo ematopoietico nel follow-up post HSCT, il numero totale dei campioni di sangue midollare analizzati con le tre metodiche è stato di 235; il follow-up mediano dell'analisi del chimerismo è stato di 179 giorni. La concordanza con il metodo STR era paragonabile per l'SSO (80.3%) e per l'SSP (76%). Le discordanze erano principalmente dovute a risultati negativi (assenza di segnale del paziente) in STR in presenza di risultati positivi (presenza di segnale del paziente) in SSO (15.3%) o in SSP (16%). Di questi eventi, il 28.6% e il 12.5% rispettivamente per SSO e SSP erano predittivi per recidiva di malattia. Il valore predittivo positivo di reci-

No. patients: 44
Age, y (range): 48 (17-67)
No. transplantations: 47
Diagnosis -no(%): AML 17 (38.7), ALL 3 (6.8), biph.acute leukemia 1 (2.3), CML 2 (4.5), CLL 2 (4.5), MDS 3 (6.8), NHL 7 (15.9), HD 1 (2.3), MM 2 (4.5), SAA 1 (2.3), granulocytic sarcoma 1 (2.3), renal cell cancer 3 (6.8), prostate cancer 1 (2.3)
Disease status at transplantation -no.(%): complete remission 20 (42.6); refractory/ persistent disease 27 (57.4)
Stem cell donor -no.(%): haploidentical 25 (53.2); matched unrelated donor (MUD) 18 (38.3); family-mismatched 3 (6.4); cord blood 1 (2.1)
Conditioning regimen -no.(%): myeloablative 24 (51.1); non myeloablative 23 (48.9)
Stem cell source -no.(%): peripheral blood 40 (85.1); bone marrow 6 (12.8); cord blood 1 (2.1)
CD34+ infused: >5x10 ⁶ /kg; haploidentical: 11x10 ⁶ /kg
GvHD prophylaxis: ATG+CSA+MTX; haploidentical ATG+CD34+ selection Sex-mismatch -no.(%): 20 (42.5)

diva di malattia era significativamente più alto per l'SSO (56%) rispetto all'SSP (16%) e all'STR (39%). La metodica SSO ha inoltre dimostrato una maggiore sensibilità (64%) nell'individuare la recidiva di malattia rispetto all'STR (50%) e all'SSP (50%).

Conclusioni. Lo studio del chimerismo ematopoietico basato sugli alleli HLA paziente-specifici e donatore-specifici è un metodo sensibile e facilmente applicabile. In particolare l'analisi degli alleli HLA paziente-specifici con metodica SSO ha una maggiore sensibilità e una maggiore specificità rispetto alla metodica SSP e, elemento rilevante, rispetto alla metodica STR per la predizione precoce di recidiva di malattia dopo HSCT T-depleto HLA-mismatch in malattie ematologiche ad alto rischio. Lo studio del chimerismo ematopoietico mediante metodica SSO rappresenta dunque uno strumento utile per l'attuazione precoce di una strategia di immunoterapia in uno stato di malattia residua minima, allo scopo di massimizzare l'efficacia nella prevenzione della recidiva di malattia.

Bibliografia

1. JH Antin, R Childs, AH Filipovich, S Giralt, S Mackinnon, T Spitzer et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001;7:473-85.
2. F Khan, A Agarwal, S Agrawal. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation* 2004;34:1-12.
3. P Bader, H Kreyenberg, W Hoelle, G Dueckers, B Kremens, D Dilloo, et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:815-21.
4. R Zeiser, A Spyridonidis, R Wasch, G Ihorst, C Grulich, H Bertz et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005;19:814-8
5. C Thiede, T Lion. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia* 2001;15:303-6.