

## Linee di Ricerca

Il Laboratorio è focalizzato su varie tematiche di immunologia cellulare e molecolare con importanti risvolti applicativi nel campo della terapia dei tumori, delle immunodeficienze e delle malattie autoimmuni.

### **Studio della risposta immunitaria in pazienti immunodeficienti.**

Analizziamo i meccanismi molecolari alla base di alcune forme di immunodeficienza congenita. Attualmente sono oggetto di studio: 1) Il deficit di adesione leucocitaria di tipo 1 (LAD1), un'immunodeficienza caratterizzata da mutazioni diverse a carico del gene che codifica per CD18, e quadro clinico caratterizzato da infezioni ricorrenti soprattutto a carico di cute e mucose; 2) la Linfoistocitosi emofagocitica familiare (FHL), malattia geneticamente eterogenea caratterizzata da diminuita capacità delle cellule citotossiche di uccidere cellule infettate da virus e tumorali (in particolare leucemie e linfomi), produzione eccessiva di citochine proinfiammatorie e iperattivazione macrofagica. Abbiamo caratterizzato la funzione delle cellule NK nei pazienti affetti, messo a punto test diagnostici utili per la diagnosi dei deficit immunologici come ad esempio il test di mancata degranulazione (test del CD107a). Sono in corso studi sui linfociti NK derivati da casi con difetti ancora non noti, nel tentativo di individuare nuove mutazioni responsabili di immunodeficienza.

### **Identificazione di nuovi marcatori tumorali e analisi dell'attività anti-tumorale dei linfociti Natural Killer**

Nel corso dell'ultimo decennio numerosi e differenti approcci sperimentali hanno consolidato il concetto che le cellule Natural Killer (NK) possono rappresentare un'arma aggiuntiva nella lotta contro i tumori. In particolare le cellule NK attivate da citochine sono in grado di uccidere cellule neoplastiche isolate da pazienti e ciò ha dato un forte impulso alla pianificazione di modelli terapeutici innovativi basati sull'utilizzo delle cellule NK in pazienti neoplastici. Nel laboratorio si analizza l'efficacia della risposta NK contro vari tumori sia in un sistema autologo che allogeneo. Sono attualmente oggetto di studio vari tumori pediatrici e dell'adulto quali neuroblastoma, medulloblastoma, glioblastoma, leucemie e linfomi. Particolare attenzione è rivolta alla risposta NK contro le cellule staminali del cancro, considerate la sottopopolazione tumorale responsabile dell'insorgenza e del mantenimento della neoplasia. Nel corso degli studi vengono inoltre identificati nuovi marcatori tumorali potenzialmente utili per la diagnosi, la prognosi e la terapia.

### **Ruolo e funzioni delle cellule NK nel trapianto di cellule staminali o di midollo osseo**

L'identificazione dei vari recettori delle cellule NK e della loro funzione attivatoria o inibitoria ha fornito le basi per importanti studi clinici focalizzati sulla terapia delle leucemie acute nell'adulto e nel bambino. La presenza di cellule NK "alloreattive" nel trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) da donatore aploidentico (aplo-TCSE) ha notevolmente migliorato la prognosi dei pazienti leucemici. Nel paziente trapiantato le cellule NK alloreattive sono in grado di prevenire le ricadute leucemiche grazie ad un'efficace attività antileucemica (GvL), il rigetto del trapianto e la Graft versus Host Disease (GvHD) grazie all'eliminazione rispettivamente delle cellule T e DC del paziente. Nel laboratorio analizziamo dal punto di vista fenotipico e genotipico le cellule NK di potenziali donatori di CSE in modo da selezionare sulla base

dell'attività antileucemica NK-mediata il donatore ottimale per il trapianto. Seguiamo inoltre a vari tempi dal trapianto la ricostituzione delle cellule emopoietiche nel paziente valutando in particolare la percentuale delle cellule NK alloreattive, la loro funzione anti-leucemica e correlando i dati con il quadro clinico e la prognosi. Inoltre, sono in corso prove per la purificazione di cellule NK per uso clinico. Cellule NK alloreattive attivate in vitro con citochine potranno essere utilizzate per approcci immunoterapeutici finalizzati a contrastare eventuali recidive leucemiche.

### **Interazione tra cellule del sistema immunitario e cellule staminali mesenchimali (MSC)**

I risultati ottenuti negli ultimi anni dalla ricerca di base e traslazionale e dall'analisi retrospettiva di dati clinici hanno generato l'ipotesi del possibile utilizzo delle cellule staminali mesenchimali (MSC) in nuove terapie adottive, atte a migliorare l'esito del trapianto di cellule staminali emopoietiche in pazienti leucemici. Le MSC avrebbero un'attività immunoregolatoria utile nel prevenire la GvHD e nel promuovere l'attecchimento del trapianto. Stiamo studiando gli effetti delle MSC sulla ricostituzione delle cellule emopoietiche nel ricevente. In particolare, analizziamo gli effetti delle MSC sullo sviluppo, la maturazione e la funzione delle cellule NK, sottopopolazione linfocitaria che sembra giocare un ruolo cruciale nel trapianto. L'interazione tra MSC e cellule NK, qualora usate in combinazione in nuove strategie terapeutiche, potrebbe portare a un'alterazione delle proprietà funzionali NK, a discapito dell'azione benefica sull'esito del trapianto.

### **Ruolo degli agenti infettivi nella patogenesi delle malattie autoimmuni.**

Le malattie autoimmuni nel loro insieme costituiscono un gruppo di patologie sempre più frequenti che colpiscono prevalentemente soggetti giovani e bambini. Nonostante i numerosi progressi fatti nella comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base delle malattie autoimmuni esistono tuttora molti aspetti da chiarire per quanto riguarda l'eziopatogenesi di queste condizioni morbose. E' infatti noto che su un background genetico predisponente si aggiungono dei fattori ambientali che funzionano da innesco per la malattia. Fra questi fattori gli agenti infettivi sono da sempre considerati una delle cause scatenanti più probabili. Il nostro laboratorio si interessa di analizzare il rapporto fra infezioni croniche, soprattutto virali, e malattie autoimmuni con particolare attenzione per le patologie ad insorgenza pediatrica (malattia celiaca, diabete di tipo I etc). Utilizzando approcci combinati di biologia molecolare e di proteomica è stato possibile individuare ad esempio un nesso causale fra l'infezione da Cytomegalovirus e la sclerodermia, e tra l'infezione da rotavirus e la malattia celiaca. Nel corso dei nostri studi vengono inoltre identificati una serie di autoantigeni specifici per ciascuna condizione morbosa studiata, che rappresentano degli utili markers da utilizzare per la diagnosi e il follow up di malattia.

### **Immunità cellulare specifica per patogeni opportunisti: sviluppo e applicazione di metodi di diagnosi e terapia dell'ospite immunocompromesso**

Pazienti riceventi trapianti di cellule staminali o organi, pazienti trattati con chemioterapia per tumori o patologie autoimmuni, pazienti con AIDS presentano un grave deficit immunitario dovuto alla perdita di linfociti T. Essi sono suscettibili a infezioni gravi e spesso mortali causate da virus (es. citomegalovirus, EBV, adenovirus) o da miceti (es. aspergillo). E' possibile ricostituire la loro immunocompetenza somministrando

linfociti T autologhi o allogenici espansi in vitro. Stiamo selezionando linfociti T specifici per i patogeni più frequenti al fine di mettere in atto terapie di immunoricostituzione adottiva in questi pazienti. Per produrre cellule ad uso terapeutico è necessario utilizzare strutture particolarmente attrezzate e monitorate (GMP, good manufacturing procedure), attualmente in via di sviluppo presso l'Istituto. Accanto all'approccio terapeutico, stiamo mettendo a punto metodi miniaturizzati di diagnosi della immunità cellulare, particolarmente adatti ai pazienti pediatrici. Possiamo quindi usare campioni ematici ridotti per effettuare profili di immunocompetenza cellulare a diversi patogeni rilevanti. Inoltre questi sistemi sono applicati ad uno studio in corso per lo sviluppo di un vaccino a DNA diretto contro HIV.