

**CURRICULUM VITAE
FORMATIVO E PROFESSIONALE
DI
STEFANIA MARCENARO**

**FORMULATO AI SENSI DEGLI ARTT. 46 E 47 DPR 445/2000 s.m.i.
DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DI CERTIFICAZIONE E DI ATTO DI NOTORIETA'**

La sottoscritta MARCENARO STEFANIA nata il 27/08/1974 a Genova (provincia di Genova) e residente in Via Brenta 30/13, 16147 – Genova, (C.F. MRCSFN74M67D969P) ai sensi di quanto previsto dagli artt. 19, 46 e 47 del D.P.R.445/2000, consapevole delle conseguenze derivanti in caso di rilascio di dichiarazioni false, dichiara sotto la propria responsabilità che tutte le eventuali fotocopie allegate alla domanda di partecipazione al concorso, sono conformi all'originale in suo possesso e che ogni dichiarazione resa risponde a verità, inoltre, consapevole delle sanzioni penali previste dall'art. 76 del D.P.R. 28.12.2000, n. 445 per il caso di dichiarazione mendace e falsità in atti

DICHIARA

1) di essere in possesso dei seguenti titoli di studio:

- **Laurea in SCIENZE BIOLOGICHE, indirizzo Fisiopatologico**, durata del corso n° 5 anni, conseguita presso l'Università degli Studi di Genova – Via Balbi 5, 16126 Genova, in data 02/09/1999. Titolo della tesi: “La suscettibilità alla lisi NK-mediata di melanomi HLA classe I⁺ riflette l'espressione di quantità inadeguate di differenti alleli HLA classe I”. Votazione: **110/110 e Lode**. Relatori: Prof. L. Moretta e Prof. M. Ferro Bardini;

- **DIPLOMA DI SPECIALIZZAZIONE in Patologia Clinica (Indirizzo Tecnico)**, durata del corso n° 5 anni, conseguito presso l'Università degli Studi di Genova in data 21/09/2005. Titolo della tesi: “Ruolo dell'interazione recettore-ligando nella lisi NK-mediata di linee tumorali e leucemie AML e ALL”. Votazione: 50/50. Relatore: Prof. M.C. Mingari;

- **DIPLOMA DI DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**, durata del corso n° 3 anni, conseguito presso l'Università degli Studi di Genova – Via Balbi 5, 16126 Genova, in data 04/03/2010. **Vincitrice della borsa di studio triennale di Ateneo**. Tutore: Prof. L. Moretta. Titolo della tesi: “Attività anti-leucemica dei linfociti NK nel trapianto aploidentico”.

- **DIPLOMA MASTER in NUOVE TECNOLOGIE NEI CONTROLLI DEGLI ALIMENTI**, durata del corso n° 1 anno, conseguito presso Perform – Centro di Formazione Permanente dell'Università degli Studi di Genova, Palazzo Belimbau Piazza della Nunziata 2, 16124 Genova - in data 31/11/2003. Titolo della tesi: “Organizzazione del controllo qualità nella lavorazione del latte”. Votazione: 110/110.

- **Diploma di abilitazione all'esercizio della professione di Biologo** conseguito presso l'Università degli Studi di Genova – Via Balbi 5, 16126 Genova, nella seconda sessione dell'anno 2000 (votazione 134/150)

- **iscrizione all'ALBO NAZIONALE DEI BIOLOGI ITALIANI**, Roma, avvenuta in data 26/02/2009 con il n. 060599;

2) di aver prestato servizio con **RAPPORTO DI DIPENDENZA** presso le seguenti

Amministrazioni/Enti/Società:

_ 16/02/2013 – oggi: **Dirigente Sanitario Biologo**- disciplina Patologia Clinica- presso il Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale dell'**Istituto G. Gaslini**, Via G. Gaslini 5 – 16147 Genova. Ente Pubblico, Istituto Pediatrico I.R.C.C.S. Rapporto a tempo determinato (5 anni) a tempo pieno. Attività svolta: Studio della funzionalità dei linfociti NK nei pazienti con immunodeficienze (HLH, linfocitocitosi emofagocitica familiare FHL MAS, artrite reumatoide) allo scopo di migliorare la diagnosi differenziale e indirizzare il clinico alla terapia più appropriata. Responsabile delle analisi eseguite sui pazienti con sospetta HLH segnalati da colleghi ematologi dell'istituto e di altri centri italiani. Coordinatrice di un gruppo costituito da un tecnico di laboratorio e, per brevi periodi, da studenti del secondo anno di medicina e chirurgia.

_ 01/06/2010 – 14/02/2013: **Direttore Tecnico di Laboratorio Analisi** in qualità di Biologa Specializzata, disciplina Patologia Clinica. Attività svolta presso il Laboratorio Analisi Cliniche afferente allo Studio Radiologico Manara S.a.s. (struttura privata convenzionata con il Servizio Sanitario Nazionale), con sede in Via GB Custo 11R - 16162 Genova. Rapporto a tempo indeterminato con impegno ridotto (28,5 ore/settimana). Rapporto cessato per iniziare contratto a tempo determinato alle dipendenze dell'Istituto G. Gaslini. Attività svolta: direzione del laboratorio analisi; responsabile dei referti rilasciati; esecuzione prelievi venosi; esecuzione analisi ematologiche, biochimiche, siero immunologiche, ormonali e microbiologiche; coordinamento del gruppo costituito da un biologo analista, un medico prelevatore, due amministrativi addetti all'accettazione e alla segreteria.

_ dichiaro inoltre di aver prestato servizio presso Scuole Statali Superiori, contratto stipulato col **Ministero della Pubblica Istruzione**, in qualità di laureata in scienze biologiche, **insegnante di Scienze** (materia A060):

i) 08/11/07 - 30/06/08 contratto a tempo determinato, 18 ore/settimana, presso l'Istituto Professionale per l'Agricoltura e l'Ambiente "B. Marsano", Via alla Scuola di Agricoltura 9 – 16167 Genova;

ii) 02/03/09 - 28/03/09 contratto a tempo determinato, 18 ore/settimana, presso il Liceo Scientifico L. Da Vinci, Via Arecco 2 – 16122 Genova.

3) di aver prestato servizio con rapporto di lavoro autonomo (co.co.co., borse di studio, stage, frequenza volontaria):

_ 01/03/2001 – 31/12/2003: Ricercatrice Biologa Laureata – disciplina Patologia. **Contratto co. co. co.** a tempo determinato, full-time, stipulato con l'Istituto Pediatrico Ente Pubblico I.R.C.C.S. “**G. Gaslini**” di Genova, L.go G. Gaslini n. 5 – 16147. Attività di ricerca svolta presso il Laboratorio di Immunologia diretto dal Prof. L. Moretta. Progetto di ricerca: Approfondimento dello studio dei recettori di membrana dei linfociti e delle loro alterazioni, allo scopo di progredire nella conoscenza e nella cura di gravi patologie quali le immunodeficienze, le leucemie, le malattie autoimmuni.

_ 01/01/2004 – 31/12/2006: Ricercatrice Biologa Laureata – disciplina Patologia. Vincitrice della **Borsa di Studio triennale FIRC** bandita dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro – **AIRC**, Via Corridoni 7 - 20122 Milano. Borsista full-time con affiliazione “G. Gaslini”. Attività di ricerca svolta presso il Laboratorio S.S. Immunoterapia Cellulare Personalizzata, IST, (Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Ente Pubblico I.R.C.C.S.) L.go R. Benzi, 10 - 16132 Genova, diretto dalla dott.ssa D. Pende,. Titolo del progetto: "Identificazione dei ligandidegli NCR e degli altri recettori o corecettori attivatori espressi dai linfociti Natural Killer". Tutore: Prof. L. Moretta.

_ 01/01/2007 – 31/12/2009: Ricercatrice Biologa Laureata e Specializzata – disciplina Patologia. Borsista dottoranda svolta attività di ricerca presso il Laboratorio di Immunologia dell'IST, L.go R. Benzi, 10 - 16132 Genova, diretto dalla Prof.ssa MC Mingari. Studentessa del corso di **Dottorato in Immunologia Clinica e Sperimentale**, vincitrice della **Borsa di Studio di dottorato triennale di Ateneo**, Università di Genova (DIMES, Via Leon Battista Alberti 2, 16132 Genova). Tutore: Prof. L. Moretta. Progetto di ricerca: “Suscettibilità delle cellule leucemiche alla lisi di linfociti NK del donatore di midollo e del ricevente post-trapianto”.

_ 01/01/2010 – 31/05/2010: Ricercatrice Biologa Laureata e Specializzata – disciplina Patologia. **Contratto co.co.co.** a tempo determinato, full-time, stipulato con l'ente pubblico **IST** di Genova, L.go R. Benzi, 10 - 16132. Attività di ricerca svolta presso il Laboratorio S.S. Immunoterapia Cellulare Personalizzata diretto dalla Dott.ssa D. Pende – articolazione interna della S.C. Immunologia dello stesso istituto diretta dalla Prof. M.C. Mingari. Progetto: Caratterizzazione fenotipica e funzionale (attività anti-leucemica) di linfociti NK alloreattivi nell'ambito dei trapianti aploidentici di cellule staminali emopoietiche. Contratto interrotto per iniziare incarico in veste di Direttore Tecnico di Laboratorio presso lo Studio Radiologico Manara.

_ 13/04/2011 – 15/02/2013. Biologa con **Borsa di Studio ASL3 Genovese**, Via Bertani 4, 16125 Genova, presso il reparto di Oncologia dell'Ospedale Villa Scassi, Corso Scassi 1 –16149 - Genova, diretto dal Dr M. Mencoboni. **Data Manager** di studi clinici sperimentali oncologici di II e III livello, multicentrici, randomizzati, in cieco e doppio cieco per la valutazione di farmaci sperimentali per la cura di tumori polmonari e altri tumori; studi osservazionali di valutazione della pratica clinica. Impegno di 15 ore/settimana.

_ 01/07/2010 - 30/06/2011 e 01/08/2011 - 31/07/2012: Ricercatrice Biologa Laureata Specializzata – disciplina Patologia. **Frequentatrice volontaria** part-time (10 ore settimanali) presso il Laboratorio S.S. Immunoterapia Cellulare Personalizzata (IST di Genova).Prosecuzione del progettoiniziato in data 01/01/2010 (vedi sopra).

Dichiara inoltre di aver svolto i seguenti **Stage**:

_ dal 2001 al 2005: di aver svolto 300 ore/anno di tirocinio, durante gli anni di iscrizione alla scuola di Specializzazione in Patologia Clinica, presso il Laboratorio Centrale di Analisi Cliniche e presso il Laboratorio del Centro Trasfusionale dell'Ospedale San Martino di Genova, L.go R. Benzi 10.

_ 2003: di aver svolto 400 ore di tirocinio, dal 26/06/2003 al 31/11/2003, durante il Master in “Nuove tecnologie nei controlli degli alimenti” presso il laboratorio di analisi della Centrale del Latte di Alessandria e Asti, V.le Massobrio 10/12 – 15100 AL, produttrice di latte Alta Qualità, diretto dal Dott. G. Tolomei. Attività svolta: analisi chimico-fisiche e microbiologiche di latte e derivati; pianificazione e applicazione del piano HACCP; tecniche di ispezione e valutazione per Sistemi Qualità (ISO 9001).

4) dichiara inoltre di avere esperienza nelle seguenti **tecniche**:

I) di avere acquisito le seguenti **tecniche di laboratorio** presso i laboratori di ricerca di Immunologia (IST e G. Gaslini):

COLTURE CELLULARI

- _ mantenimento di colture cellulari in vitro in sterilità, procedure eseguite lavorando sotto cappa di biosicurezza di classe II;
- _ coltura di linee cellulari primarie e immortalizzate;
- _ separazione e purificazione cellulare da sangue periferico di cellule mononucleate mediante gradiente di densità (Ficoll); uso di biglie magnetiche e altri metodi immunologici per isolare specifiche sottopopolazioni (kit di separazione in positivo o negativo);
- _ coltura di cloni e popolazioni policlonali di linfociti (Natural Killer e linfociti T);
- _ allestimento di popolazioni linfocitarie attivate;
- _ separazione di monociti da sangue periferico e differenziamento in vitro di cellule dendritiche immature e mature, macrofagi M0, M1 e M2;
- _ generazione di cellule staminali pluripotenti (iPSC) da cellule del sangue periferico o cellule CD34+ e successivo differenziamento a precursori ematopoietici;
- _ produzione di *anticorpi monoclonali* mediante ibridizzazione cellulare;
- _ crioconservazione di materiale cellulare con soluzioni contenenti DMSO a -80°C e in azoto liquido;

CITOFUORIMETRIA: ottima conoscenza della citometria a flusso acquisita con l'utilizzo dei seguenti citofluorimetri a due o tre laser: FACSort, FACScan, FACSCalibur, FACSCanto (BD), Gallios (IL), MACSQuant Analyzer (MiltenyiBiotec). Gestione della manutenzione di base dello strumento e calibrazione. Pianificazione ed esecuzione di complessi immunofenotipi multi-color (8 colori), progettazione della "gating strategy" ottimale per la separazione di sottopopolazioni rare e preziose. Esecuzione d'immunofluorescenze sia dirette che indirette, analisi di marcatori sia di superficie che intracellulari, citoplasmatici e nucleari; uso di anticorpi monoclonali direttamente marcati con fluorocromi di diverso tipo (synthetic small molecules, polymer dyes, tandem dyes), compensazione delle fluorescenze che presentano sovrapposizione dello spettro di emissione; analisi dei dati mediante programmi quali Cell-Quest, Kaluza e FlowJo.

Applicazione della citofluorimetria anche per l'esecuzione di vari esperimenti tra cui citotossicità, proliferazione, apoptosi, produzione di citochine.

CITOTOSSICITÀ

- _ valutazione dell'attività citolitica di linfociti NK contro cellule tumorali e altri targets mediante test di citotossicità basati sul rilascio dell'isotopo γ -emittente ^{51}Cr , o mediante marcatura del target con il colorante fluorescente DiOC18 e valutazione della morte cellulare con Propidio Ioduro al citofluorimetro;
- _ test di degranolazione dei linfociti citotossici in co-cultura col target tumorale, analisi al citofluorimetro per l'espressione in superficie del marcatore CD107a;

BIOLOGIA MOLECOLARE

- _ estrazione del DNA genomico mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen);
- _ lettura della concentrazione del dsDNA allo spettrofotometro;
- _ typing qualitativo di HLA-A, -B e -C con PCR sequence-specific primers (PCR-SSP; Olerup);
- _ elettroforesi su Gel di Agarosio (1,7 % w/v) marcato con Etidio Bromuro (EtBr);
- _ lettura al transilluminatore UV (Chemidoc);

ALTRI TESTS

- _ test di proliferazione cellulare (CFSE) e analisi *alcitofluorimetro*;
- _ analisi della produzione di citochine mediante test immunoenzimatico (ELISA) o al *citofluorimetro* mediante fluorescenza intracitoplasmatica;

II) di avere acquisito le seguenti **tecniche di laboratorio per analisi biocliniche** presso il Laboratorio di Analisi Cliniche dello Studio Radiologico Manara:

- _ Test coagulativi (Coagulometro metodo magnetico Amelung);
- _ Chimica Clinica (metodo colorimetrico enzimatico, Global 240, BPC);
- _ Immunometria, dosaggio ormoni, marcatori tumorali, proteine, etc... (ELISA in fluorescenza Vidas, Biomerieux);
- _ Elettroforesi delle proteine sieriche (Selvet24, migrazione su acetato di cellulosa);
- _ Ematologia (contaglobuli metodo impedenziometrico HeCo, RadimDiagnostic);
- _ Microbiologia, identificazione di germi patogeni da materiale biologico (urine, feci, tamponi da materiale biologico vario) mediante coltura su terreni selettivi e valutazione della sensibilità agli antibiotici;
- _ **Esecuzione prelievi venosi.** Esperienza acquisita in seguito al Corso per abilitazione "Prelievi biologici, con particolare riferimento ai prelievi venosi", organizzato da ASB Toscana, delegazione provinciale di Pisa dell'Ordine Nazionale dei Biologi. Pisa 28 e 29 Maggio – 4 e 5 Giugno 2010. (n. 29 ECM) e durante la dipendenza presso il Laboratorio Analisi dello Studio Radiologico Manara (01/06/2010 – 14/02/2013), Via GB Custo 11R - 16162 Genova.
- _ Esecuzione Elettrocardiogramma con telerefertazione;

III) di avere acquisito le seguenti **tecniche di Immunoematologia Trasfusionale** presso il Laboratorio del Centro Trasfusionale dell'Ospedale San Martino di Genova, L.go R. Benzi 10, durante gli anni di iscrizione alla scuola di Specializzazione in Patologia Clinica (Stage):

- tipizzazione AB0,
- ricerca degli anticorpi irregolari,
- prove di compatibilità trasfusionali,
- Type& Screen,
- prova crociata,
- metodi di assorbimento ed eluizione per la caratterizzazione degli anticorpi.

IV) di avere una buona conoscenza della **lingua inglese**, parlata e scritta:

- _ 02/01/2004 – 30/06/2007 lezioni di lingua inglese sostenute da insegnanti madrelingua presso la scuola World Wide School di Genova, Via Roma 8/A;
- _ dal 01/09/2007 seguo lezioni private impartite da insegnante madrelingua americana;

V) di avere buone **conoscenze informatiche**:

sistemi operativi Windows e Mac, dell'uso dei programmi Word, Excel e Power Point. Buone capacità nell'utilizzo della rete Internet e di browser di posta elettronica;

5) di essere **autore/coautore** dei seguenti lavori scientifici (I.F. Impact Factor)(versione di stampa allegata alla domanda):

17) Inhibitory 2B4 contributes to NK cell education and immunological derangements in XLP1 patients.

*Meazza R, Falco M, **Marcenaro S**, Loiacono F, Canevali P, Bellora F, Tuberosa C, Locatelli F, Micalizzi C, Moretta A, Mingari MC, Moretta L, Aricò M, Bottino C, Pende D.*

Eur J Immunol. 2017 I.F.: 4,227

16) Diagnosing XLP1 in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis.

*Meazza R, Tuberosa C, Cetica V, Falco M, Parolini S, Grieve S, Griffiths GM, Sieni E, **Marcenaro S**, Micalizzi C, Montin D, Fagioli F, Moretta A, Mingari MC, Moretta L, Notarangelo LD, Bottino C, Aricò M, Pende D.*

J Allergy Clin Immunol. 2014 IF: 11.476

15) Variations of the UNC13D gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome.

*Aricò M, Boggio E, Cetica V, Melensi M, Orilieri E, Clemente N, Cappellano G, Buttini S, Soluri MF, Comi C, Dufour C, Pende D, Dianzani I, Ellis SR, Pagliano S, **Marcenaro S**, Ramenghi U, Chiocchetti A, Dianzani U.*

PLoS One. 2013 IF: 3.534

14) A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes.

*Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, Vraetz T, Chiang SC, **Marcenaro S**, Meazza R, Bondzio I, Walshe D, Janka G, Lehmborg K, Beutel K, zurStadt U, Binder N, Arico M, Moretta L, Henter JI, Ehl S.*

Blood. 2012 IF: 9.06

13) STXBP2 mutations in children with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 5.

*Cetica V, Santoro A, Gilmour KC, Sieni E, Beutel K, Pende D, **Marcenaro S**, Koch F, Grieve S, Wheeler R, Zhao F, zurStadt U, Griffiths GM, Aricò M.*

J Med Genet. 2010 I.F.: 7,037

12) Combined genotypic and phenotypic killer cell Ig-like receptor analyses reveal KIR2DL3 alleles displaying, unexpected monoclonal antibody reactivity: identification of the amino acid residues critical for staining.

*Falco M, Romeo E, **Marcenaro S**, Martini S, Vitale M, Bottino C, Mingari MC, Moretta L, Moretta A, Pende D.*

J Immunol. 2010 I.F.: 5,745

11) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity.

*Pende D, **Marcenaro S**, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A.*

Blood. 2009 I. F.: 10.896

10) Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease.

***Marcenaro S**, Gallo F, Martini S, Santoro A, Griffiths GM, Aricó M, Moretta L, Pende D.*

Blood. 2006 I. F.: 10.370

9) Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction.

*Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, **Marcenaro S**, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Moretta L, Moretta A, Bottino C.*

Blood. 2006 I. F.: 10.370

8) A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin.

*Trambas C, Gallo F, Pende D, **Marcenaro S**, Moretta L, De Fusco C, Santoro A, Notarangelo L, Arico M, Griffiths GM.*

Blood. 2005 I. F.: 10.131

7) PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis.

*Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, **Marcenaro S**, Rivera P, Spaggiari GM, Dondero A, Carnemolla B, Reymond N, Mingari MC, Lopez M, Moretta L, Moretta A.*

MolImmunol. 2005 I. F.: 4.307

6) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112).

*Pende D, Spaggiari GM, **Marcenaro S**, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, Moretta L.*

Blood. 2005 I. F.: 10.131

5) Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice.

*Lozupone F, Pende D, Burgio VL, Castelli C, Spada M, Venditti M, Luciani F, Lugini L, Federici C, Ramoni C, Rivoltini L, Parmiani G, Belardelli F, Rivera P, **Marcenaro S**, Moretta L, Fais S.*

Cancer Res. 2004 Jan 1;64(1):378-85. I. F.: 7.690

4) Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule.

*Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, **Marcenaro S**, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A.*

J Exp Med. 2003 I. F.: 15.302

3) Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity.

*Pende D, Rivera P, **Marcenaro S**, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A.*

Cancer Res. 2002 I. F.: 8.318

2) NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46.

*Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, **Marcenaro S**, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L, Poggi A.*

Eur J Immunol. 2001 I. F.: 4.990

1) Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin.

*Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, **Marcenaro S**, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, Moretta L.*

Eur J Immunol. 2001 I. F.: 4.990

6) dichiara di aver partecipato ai seguenti, congressi e seminari in qualità di **RELATORE**

- 03/04/2013 Istiocitosi Emofagocitica: Un “challenge” per il clinico ed il laboratorista. Relatori: Cetti Micalizzi e Stefania Marcenaro. Seminario organizzato dalla Direzione Scientifica dell’Istituto G. Gaslini e svolto nello stesso.
- **FOCIS 2009 (Federation of Clinical Immunology Societies) San Francisco, California, USA, 11-14 Giugno 2009. Abstract selezionato per presentazione orale: ALLOREACTIVE NK CELLS EXERT ANTI-LEUKEMIA ACTIVITY IN HAPLO-HSCT TO PEDIATRIC PATIENTS: REVISED ROLE OF ACTIVATING AND INHIBITORY KIR.** Autori: *S. Marcenaro, S. Martini, M. Falco, M.E. Bernardo, F. Locatelli, A. Moretta, L. Moretta and D. Pende.*

Questo lavoro è stato inoltre selezionato per una presentazione, sia **orale che poster**, al corso annesso al congresso “Trainee Satellite Symposium – Immunotherapy” tenutosi il 14 giugno 2009. Il poster ha ottenuto il premio “Poster of Distinction FOCIS 2009”.

8) dichiara inoltre che i seguenti ABSTRACTS, selezionati in occasione degli specifici congressi, sono stati presentati dalla sottoscritta, e che i testi riportati sono conformi alle edizioni originali:

st Joint meeting of European National Societies of Immunology under the auspices of EFIS 16th European Congress of Immunology – ECI, Parigi, Francia
6-9 Settembre, 2006

EXPRESSION OF THE DNAM-1 LIGANDS, NECTIN-2 AND PVR, ON DENDRITIC CELLS: RELEVANCE FOR NK/DC INTERACTION

S. Marcenaro¹, R. Castriconi², P. Romagnani³, GM Spaggiari¹, A. Dondero², S. Martini⁴, L. Moretta², A. Moretta², C. Bottino¹, D. Pende⁴

(1) ,Istituto G. Gaslini, Italy. (2) , DIMES, University of Genova, Italy. (3) ,Center for Research, Transfer and High Education DENOthe, University of Florence, Italy. (4) ,Istituto Nazionale per la ricerca sul Cancro, Genova, Italy.

DNAM-1 is a surface molecule that transduces activating signals resulting in enhancement of cytotoxicity by human NK cells. The DNAM-1 specific ligands PVR and Nectin-2 are highly expressed in different tumor cell lines. Accordingly, a role of DNAM-1/ligands interactions have been demonstrated in the NK-mediated lysis of different tumors including *ex-vivo* derived leukemias and neuroblastoma cells. In this study we demonstrate the involvement of DNAM-1 triggering receptor and its ligands PVR and Nectin-2 in Natural Killer (NK) cell-mediated lysis of dendritic cells (DC). The surface expression of both ligands was upregulated in DC as compared to monocytes. In particular, Nectin-2 expression was upregulated on iDC and reached maximal surface density in mDC, while upregulation of PVR was confined to mDC. This occurred when DC maturation was induced by different stimuli including LPS, Poly I:C, flagellin and CD40L. Remarkably, in cytolytic assays, DNAM-1 cooperated with NKp30 in the NK-mediated killing of both immature and mature DC and the degree of contribution of DNAM-1 appeared to correlate with the surface densities of its specific ligands PVR and Nectin-2. This DNAM-1/ligand interaction was documented by using both normal activated NK cells and NK92 cells, a particularly suitable NK cell line.

To analyze whether the DNAM-1 ligands are expressed *in vivo* by DC localized in human secondary lymphoid organs, human lymph nodes were analyzed by immunohistochemistry

using anti-Nectin-2- and anti-PVR-specific mAbs. Scattered cells reacting with anti-Nectin-2 mAb showed a stellate morphology and were localized in the parafollicular T-cell areas of all lymph nodes analyzed. Nectin-2⁺ cells surrounded the high endothelial venules (HEV), not only in the inner cortex, but also in the interfollicular areas of the outer cortex, extending to closely beneath the marginal sinus. Anti-PVR mAb showed a similar pattern, although with weaker intensity. By laser confocal microscopy, most cells expressing PVR and Nectin-2 were identified as DCs on the basis of classical morphologic features and their co-staining with mAb to MR and CD11c. Other positive cells were represented by endothelial cells, while T and B lymphocytes were negative.

“10th Meeting of the Society for Natural Immunity” Cambridge, UK
11-14 Aprile 2007

EXPRESSION OF THE DNAM-1 LIGANDS ON DENDRITIC CELLS (DC): RELEVANCE FOR NK-DC INTERACTION.

¹S. Marcenaro, ¹R. Castriconi, ²P. Romagnani, ³GM Spaggiari, ¹A. Dondero, ⁴S. Martini, ¹L. Moretta, ¹A. Moretta, ³C. Bottino, ⁴D. Pende.

¹DIMES, V. L.B. Alberti 2, GENOVA, 16132, Italy; ²Center for Research, Transfer and High Education DENOthe, Viale Morgagni 85, FIRENZE, 50139, Italy; ³Istituto G. Gaslini, L.go G. Gaslini 5, GENOVA, 16147, Italy; ⁴Istituto Scientifico Tumori c/o CBA, L.go R. Benzi 10, GENOVA, 16132, Italy.

DNAM-1, a triggering receptor of human NK cells, specifically recognizes PVR and Nectin-2, molecules which are over-expressed in different tumor cells. Here we demonstrate the involvement of DNAM-1 and its ligands in NK cell-mediated lysis of DC. Compared to monocytes, Nectin-2 surface expression was upregulated on iDC and reached maximal surface density in mDC, while upregulation of PVR was confined to mDC. In cytolytic assays, DNAM-1 cooperated with NKp30 in the NK-mediated killing of both iDC and mDC and the degree of contribution of DNAM-1 appeared to correlate with the surface densities of its specific ligands. To analyze whether the DNAM-1 ligands are expressed *in vivo* by DC, human lymph nodes were analyzed by immunohistochemistry. Scattered Nectin-2⁺ cells showed a stellate morphology and were localized in the parafollicular T-cell areas. They surrounded the high endothelial venules (HEV) in the inner cortex and in the interfollicular areas of the outer cortex. PVR⁺ cells showed a similar pattern. By laser confocal microscopy, most cells expressing PVR and Nectin-2 were identified as DCs on the basis of classical morphologic features and their co-staining with mAb to MR and CD11c.

National Conference SIICA (Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology) Trieste
6 - 9 Giugno 2007

ABSTRACT 1

DEFECTIVE CD107a SURFACE EXPRESSION HERALDS MUNC13-4 DEFECT AND DISCRIMINATES BETWEEN GENETIC SUBTYPES OF FAMILIAL HEMOPHAGOCYTIC LYMPHOHISTIOCYTOSIS (FHL).

^{1,5}S. Marcenaro, F. ²Gallo, ³S. Martini, ⁴A. Santoro, ²G.M. Griffiths, ⁴M. Aricò, ^{1,5}L. Moretta, ³D. Pende.

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale DIMES, Università di Genova, Italy; ²Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, United Kingdom; ³Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy; ⁴Onco Ematologia Pediatrica, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo, Italy; ⁵Istituto G. Gaslini, Genova, Italy.

Hemophagocytic lymphohistiocytosis is a rare, heterogeneous fatal disease of early infancy characterized by hyperinflammatory syndrome and a typical infiltration of lymphocytes and histiocytes with hemophagocytosis in bone marrow and other tissue.

NK cells from patients with FHL due to *PRF1* (FHL2) or *Munc13-4* (FHL3) mutations were tested in various functional assays. Here, we report on the surface CD107a expression as a novel rapid tool for identification of patients with Munc13-4 defect. Upon target interaction, FHL3 NK cells displayed low levels of surface CD107a staining revealing the defect in degranulation, in contrast to normal controls or FHL2 NK cells. B-EBV cell lines and dendritic cell targets reveal the Munc13-4 defect while highly susceptible tumor targets were partially lysed by FHL3 NK cells. Perforin-deficient NK cells were completely devoid of any ability to lyse target cells. Cytokine production induced by mAb-crosslinking of triggering receptors was comparable in patients and normal controls. However, when cytokine production was induced by co-culture with 721.221 B-EBV cells, FHL NK cells resulted high producers, whereas control cells were almost ineffective. This could reflect survival versus elimination of B-EBV cells i.e. the source of NK cell stimulation, in patients vs healthy controls, thus mimicking the pathophysiological scenario of FHL.

ABSTRACT 2

EXPRESSION OF THE DNAM-1 LIGANDS ON DENDRITIC CELLS (DC): RELEVANCE FOR NK-DC INTERACTION.

^{1,3}S. Marcenaro, ¹R. Castriconi, ²P. Romagnani, ³GM Spaggiari, ¹A. Dondero, ⁴S. Martini, ^{1,3}L. Moretta, ¹A. Moretta, ³C. Bottino, ⁴D. Pende.

¹DIMES, GENOVA, Italy; ²Center for Research, Transfer and High Education DENOthe, FIRENZE, Italy; ³Istituto G. Gaslini, GENOVA, Italy; ⁴Istituto Scientifico Tumori, GENOVA, Italy.

DNAM-1, a triggering receptor of human NK cells, specifically recognizes PVR and Nectin-2, molecules which are over-expressed in different tumor cells. Here we demonstrate the involvement of DNAM-1 and its ligands in NK cell-mediated lysis of DC. Compared to monocytes, Nectin-2 surface expression was upregulated on iDC and reached maximal surface density in mDC, while upregulation of PVR was confined to mDC. This occurred when DC maturation was induced by different stimuli including LPS, Poly I:C, flagellin and CD40L. In cytolytic assays, DNAM-1 cooperated with NKp30 in the NK-mediated killing of both iDC and mDC and the degree of contribution of DNAM-1 appeared to correlate with the surface densities of its specific ligands. This DNAM-1/ligand interaction was documented by using both normal activated NK cells and NK92 cells, a particularly suitable NK cell line.

To analyze whether the DNAM-1 ligands are expressed *in vivo* by DC, human lymph nodes were analyzed by immunohistochemistry. Scattered Nectin-2⁺ cells showed a stellate morphology and were localized in the parafollicular T-cell areas. They surrounded the high endothelial venules (HEV) in the inner cortex and in the interfollicular areas of the outer cortex. PVR⁺ cells showed a similar pattern. By laser confocal microscopy, most cells expressing PVR and Nectin-2 were identified as DCs on the basis of classical morphologic features and their co-staining with mAb to MR and CD11c. Other positive cells were represented by endothelial cells,

while T and B lymphocytes were negative.

2nd Conference Innate Immunity and Pathogenesis of Rheumatic Diseases, Genova Italia,
6-8 Maggio 2009

Alloreactive NK cells exert anti-leukemia activity in haplo-HSCT to pediatric patients: revised role of activating and inhibitory KIR.

Stefania Marcenaro¹, Stefania Martini², Michela Falco³, Maria Ester Bernardo⁴, Franco Locatelli⁴, Alessandro Moretta¹, Lorenzo Moretta^{1,3,5} and Daniela Pende².

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, University of Genoa, Genoa, Italy; ²Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy; ³Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy; ⁴Oncoematologia Pediatrica Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, University of Pavia, Pavia, Italy; ⁵Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, University of Genoa, Genoa, Italy.

We evaluated pediatric patients with leukemia receiving haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT) from KIR ligand-mismatched donors. KIR genotype analysis of all the donors together with phenotypic analyses of NK cells, using new mAb combinations able to discriminate between inhibitory and activating form of the various KIRs, allowed to identify the alloreactive subset in the donor and in the recipient post-HSCT. These alloreactive NK cells expressed KIR specific for the KIR ligand-mismatch and activating KIR (if present), while they didn't express all inhibitory KIR specific for the patient HLA alleles and NKG2A. In most transplanted patients we showed that donor-derived alloreactive NK cells were generated in variable amounts and maintained even at late time intervals after transplantation. Notably, also the anti-leukemia activity was preserved. Donor-derived KIR2DL1⁺ NK cells isolated from the recipient were able to kill C1/C1 target cells, including patient leukemia blasts. KIR2DL2/3⁺ NK cells displayed only poor alloreactivity against leukemic cells carrying HLA alleles belonging to the C2 specificity. This was due to recognition of C2 by KIR2DL2/3, as revealed by receptor blocking experiments and by binding assays of soluble KIR to HLA-C transfectants. Remarkably, C2/C2 leukemia blasts were killed by KIR2DL2/3⁺ (or by NKG2A⁺) NK cells that co-expressed KIR2DS1. This could be explained by the ability of KIR2DS1 to directly recognize C2 on leukemia cells. A role for the KIR2DS2 activating receptor in leukemic cell lysis could not be established. These results may have important clinical implications for selection of optimal donors in haplo-HSCT.

2nd European Congress of Immunology, Berlin Germany
13-16 Settembre 2009

NEW TOOLS FOR A RAPID DIAGNOSIS OF IMMUNODEFICIENCIES WITH CYTOLYTIC DEFECTS AND SEARCH FOR NEW GENE RELATED DISEASE.

Stefania Marcenaro¹, Stefania Martini², Valentina Cetica³, Sam Grieve⁴, Gillian Griffiths⁴, Maurizio Aricò³, Lorenzo Moretta^{1,5,6} and Daniela Pende².

¹DIMES, University of Genoa, Genoa, Italy; ²Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy; ³Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Florence, Italy; ⁴Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge, UK; ⁵Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy; ⁶Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, University of Genoa, Genoa, Italy.

Objectives: Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare, heterogeneous fatal disease of early infancy. The primary form (FHL) has a genetic origin; disease-causing mutations encode for perforin (*PRF1*, FHL2), Munc13-4 (*UNC13D*, FHL3), and syntaxin-11 (*STX11*, FHL4). Our aim was to set appropriate assays to discriminate between the different genetic subtypes, applying our expertise on NK cells to underline the cytotoxic defects typical of these patients. **Methods:** Intracytoplasmic staining of freshly derived NK cells with anti-perforin mAb allows to detect a possible lack of this protein, typical of FHL2 patients. We optimized the CD107a assay, which we first demonstrated to be a potent tool to detect defects in degranulation. Chromium-release assays were performed to reveal certain cytolytic defects. Production of cytokines was tested. Western blot could assess the protein expression of Munc13-4 and perforin in selected cases. Genetic analyses were performed. **Results:** A defect of CD107a expression on the NK cell surface after co-culture with K562 target cells heralds a defect of Munc13-4 protein and direct analysis of *UNC13D* gene in search of mutations. Defective CD107a only in resting but not in activated NK cells can address to syntaxin-11 defect. A dysfunction of 2B4 receptor which exerts inhibitory instead of activating function, typical of XLP, can be assessed by an appropriate redirected killing assay using anti-2B4 mAb; this allows to direct analysis of *SAP* gene. Western blot analyses in selected cases can further demonstrate defects of Munc13-4, perforin and *SAP* protein expression. Cytokine production can be tested upon stimulation of triggering receptors or after co-culture with appropriate target cells. Excessive pro-inflammatory cytokine production is typical in these patients and play a role in the pathogenesis of the disease. Finally, a major effort is the identification of cases with a clear familial origin, characterized by a well defined cytotoxic defect without any association to a known mutated gene in order to possibly find novel gene(s) implicated in the disease. **Conclusions:** We can address to a particular gene analysis searching for mutations. These researches will greatly impact in the diagnosis and care of patients with immunodeficiency with defects of cytolytic activity.

FOCIS 2009 (Federation of Clinical Immunology Societies) San Francisco, California, USA

11-14 Giugno 2009

ALLOREACTIVE NK CELLS EXERT ANTI-LEUKEMIA ACTIVITY IN HAPLO-HSCT TO PEDIATRIC PATIENTS: REVISED ROLE OF ACTIVATING AND INHIBITORY KIR.

Stefania Marcenaro¹, Stefania Martini², Michela Falco³, Maria Ester Bernardo⁴, Franco Locatelli⁴, Alessandro Moretta¹, Lorenzo Moretta^{1,3,5} and Daniela Pende².

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, University of Genoa, Genoa, Italy; ²Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy; ³Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy; ⁴Oncoematologia Pediatrica Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, University of Pavia, Pavia, Italy; ⁵Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, University of Genoa, Genoa, Italy.

We evaluated pediatric patients with leukemia receiving haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT) from KIR ligand-mismatched donors. KIR genotype analysis of all the donors together with phenotypic analyses of NK cells, using new mAb combinations able to discriminate between inhibitory and activating form of the various KIRs, allowed to identify the alloreactive subset in the donor and in the recipient post-HSCT. These alloreactive NK cells expressed KIR specific for the KIR ligand-mismatch and activating KIR (if present), while they didn't express all inhibitory KIR specific for the patient HLA alleles and NKG2A. In most transplanted patients we showed that donor-derived alloreactive NK cells were generated in variable amounts and maintained even at late time intervals after transplantation. Notably, also the anti-leukemia activity was preserved. Donor-derived KIR2DL1⁺ NK cells isolated from the

recipient were able to kill C1/C1 target cells, including patient leukemia blasts. KIR2DL2/3⁺ NK cells displayed only poor alloreactivity against leukemic cells carrying HLA alleles belonging to the C2 specificity. This was due to recognition of C2 by KIR2DL2/3, as revealed by receptor blocking experiments and by binding assays of soluble KIR to HLA-C transfectants. Remarkably, C2/C2 leukemia blasts were killed by KIR2DL2/3⁺ (or by NKG2A⁺) NK cells that co-expressed KIR2DS1. This could be explained by the ability of KIR2DS1 to directly recognize C2 on leukemia cells. A role for the KIR2DS2 activating receptor in leukemic cell lysis could not be established. These results may have important clinical implications for selection of optimal donors in haplo-HSCT.

Genova, 23/04/2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Stefania Marcenaro', with a long horizontal flourish extending to the right.

Stefania Marcenaro