

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Oncologia e Patologia Sperimentale  
XXVIII Ciclo

Settore Scientifico Disciplinare: MED/38

Settore Concorsuale: 06/G1

La relazione tra il microbiota intestinale e la Graft versus Host  
Disease nel paziente pediatrico sottoposto a trapianto allogenico  
di cellule staminali emopoietiche

Presentata da: Dott. Daniele Zama

Coordinatore  
Prof. Pier-Luigi Lollini

Relatore  
Prof. Andrea Pession

Esame Finale Anno 2016

## CAPITOLO 1

### **Il Microbiota intestinale nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche: revisione sistematica della letteratura 3**

<i>Introduzione</i>	3
<i>Approccio metodologico alla caratterizzazione del microbiota intestinale</i>	4
<i>Il rapporto tra le difese dell'ospite e il microbiota intestinale</i>	6
La barriera gastrointestinale	6
<i>La relazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota intestinale</i>	7
<i>Il Microbiota intestinale e il trapianto di cellule staminali emopoietiche</i>	11
L'evoluzione del MI durante il TCSE	11
L'impatto clinico del microbiota intestinale nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche	12
GvHD	13
Infezione	15
<i>Prospettive future</i>	16

## CAPITOLO 2

### **La relazione tra il microbiota intestinale e la Graft versus Host Disease nel paziente pediatrico sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche 18**

<i>Introduzione</i>	20
<i>Materiali e Metodi</i>	23
Pazienti	23
16S rRNA gene pyrosequencing, l'analisi bioinformatica e gas cromatografia-spettrometria di massa	24
Statistica generale	24
<i>Risultati</i>	25
Le procedure correlate al trapianto distruggono la diversità, la signature individuale e la produzione di acidi grassi a corta catena del microbiota	25
La signature del microbiota intestinale associata alla GvHD	27
L'ecosistema intestinale pre trapianto nei bambini che sviluppano o no GvHD	28
<i>Discussione</i>	30
<i>Bibliografia</i>	39

# **Il Microbiota intestinale nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche: revisione sistematica della letteratura**

## ***Introduzione***

I microrganismi che vivono in associazione con il corpo umano sono collettivamente chiamati microbiota. Gli esseri umani condividono una stretta relazione simbiotica con ~ 10 - 100 trilioni di microbi che vivono nel loro tratto gastrointestinale. I progressi nelle tecniche biologiche, in particolare l'introduzione del sequenziamento massivo di nuova generazione (NGS), ha permesso di meglio caratterizzare la composizione e la complessità del microbiota intestinale (MI) identificando taxon batteriche che non sono facilmente coltivabili in vitro.<sup>1-3</sup>

Il microbiota svolge un ruolo importante nel mantenimento della salute umana e nella patogenesi di numerose malattie. In particolare il MI si occupa di numerose funzioni all'interno dell'organismo ma tra cui, la raccolta e lo stoccaggio di energia<sup>4</sup>, limita l'accesso degli enteropatogeni al tratto gastrointestinale<sup>5</sup>, e influenza l'immunità dell'ospite, essendo strategico per l'istruzione e la salvaguardia dell'omeostasi del sistema immunitario.<sup>6,7</sup> Considerando lo stretto dialogo tra MI e il sistema immunitario, il ruolo del MI nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche è stato recentemente oggetto di valutazione (TCSE). Nuove conoscenze sono state raggiunte nel corso degli ultimi anni sul ruolo del MI nel recupero immunitario dopo il trapianto e l'insorgenza d'infezioni e graft versus host disease acuta (GvHD).

In questa revisione aggiornata della letteratura abbiamo riassunto le conoscenze sul ruolo del MI nell'omeostasi del sistema immunitario ed in particolare sull'impatto del MI sull'esito TCSE.

## ***Approccio metodologico alla caratterizzazione del microbiota intestinale***

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati nuovi e promettenti approcci coltura-dipendenti per la caratterizzazione del MI, permettendo di aumentare le frazioni coltivabili dell'ecosistema fino al 50%.<sup>8</sup> Tuttavia, è un dato di fatto che, al giorno d'oggi, il metodo di elezione per condurre uno studio sul MI rimane ancora il sequenziamento del DNA microbico estratto da campioni fecali<sup>9</sup>, l'unico approccio che consente di rivelare tutta la complessità biologica dell'ecosistema. Il sequenziamento massivo del DNA microbico è principalmente svolto da tecnologie basate sul sequenziamento di nuova generazione (NGS), essenzialmente le piattaforme 454-pirosequenziamento, Illumina e Ion Torrent NGS. Tutte queste tecnologie fondono basso costo per sequenza con elevato rendimento sequenziamento di frammenti di DNA brevi. Il limite principale di queste piattaforme NGS è la lunghezza corta dei frammenti di DNA sequenziati, che oscilla tra 100 e 400 bp. Tuttavia, le metodologie di sequenziamento di terza generazione stanno emergendo, come la PacBio e Minion, che consentono l'aumento della lunghezza del DNA sequenziato fino a 20kb. La valutazione molecolare del MI umano si basa principalmente su due approcci di NGS del DNA microbico, la sequenza delle regioni V3-V4 del gene 16S rDNA, che permettono di ricostruire la struttura filogenetica dell'ecosistema, e il sequenziamento shotgun metagenoma del DNA batterico, per la caratterizzazione della sua configurazione funzionale in termini di contenuto di geni.

La descrizione della struttura del MI mediante sequenziamento del 16S rDNA comporta una pipeline solida e ben consolidata: l'estrazione del DNA nelle feci, l'amplificazione PCR della regione V3-V4 del 16S rDNA, la preparazione della biblioteca, il sequenziamento del DNA, la bioinformatica e le analisi biostatistica. La piattaforma NGS per sequenziamento del 16S rDNA fornita da Illumina, permette il

multiplex 364 campioni in un unico passaggio al fine di ottenere una copertura di almeno 20.000 letture del campione, sufficiente a identificare la diversità complessiva dell'ecosistema.<sup>10</sup> Al fine di ricavare la composizione del MI attraverso l'analisi della regione 16S rDNA, è generalmente utilizzato l'open source pipeline QIIME.<sup>11</sup> Oltre a fornire la struttura dell'ecosistema MI a diversi livelli filogenetici (da phylum fino al livello di genere), la pipeline QIIME permette di calcolare la diversità interindividuale (alpha-diversità) e la diversità intraindividuale (beta-diversità) dell'ecosistema. Entrambi i parametri sono fattori chiave per descrivere la configurazione dell'ecosistema microbico intestinale, il primo è il fattore più rilevante per definire una disbiosi del MI, che è sempre caratterizzata da una riduzione della diversità dell'ecosistema.<sup>12</sup> Il secondo è un fattore fondamentale per descrivere e quantificare le differenze di composizione complessive tra gruppi di soggetti, come ad esempio in studi caso-controllo che esplorano le deviazioni compositivi MI-associati.

Con il NGS del DNA microbico estratto da campioni fecali è possibile inoltre caratterizzare metagenoma del MI, definito come il contenuto globale del genoma dei microbi del MI. Per la caratterizzazione metagenomica del MI almeno 5 milioni di letture del campionario devono essere fornite, garantendo una copertura sufficiente del metagenoma. I metagenomi sequenziati possono essere valutati da due approcci complementari.<sup>13-16</sup> Il primo coinvolge l'analisi delle sequenze utilizzando MetaVelluto, mentre il secondo si basa sulla mappatura diretta delle letture utilizzando specifici algoritmi SSAHA2 o MetaCB.

Anche se può essere necessario uno sforzo di sequenziamento gigante, la caratterizzazione del MI permette di fornire utili informazioni sulla configurazione funzionale dell'ecosistema, che può essere facilmente tradotta nella propensione metabolica generale. Un'alternativa che rappresenta il modo più economico per

valutare la struttura funzionale del MI è la valutazione metagenomica da PICRUST.<sup>17</sup> Si tratta di un approccio completamente computazionale che sfrutta un database di genomi batterici sequenziati per estrapolare un metagenoma virtuale da dati composizionali basati sulla lettura delle sequenze 16S rDNA. Uno degli obiettivi principali degli studi del MI umani è quello di descrivere le differenze di composizione MI / funzionali tra gruppi di soggetti, come controlli sani vs pazienti. Inoltre, un altro obiettivo generale per gli studi MI è quello di scoprire le associazioni tra i componenti del MI e funzioni e salute dell'ospite, parametri biochimici o fattori ambientali. Questi obiettivi sono generalmente ottenuti con robusti metodi biostatistici che possono essere generalmente valutati in piattaforma R utilizzando i software Vegan e Made4.<sup>18</sup> In particolare, le differenze di struttura tra i gruppi di MI possono essere valutate sulla base di analisi di associazione e di correlazione di Spearman. E' inoltre possibile identificare i microrganismi responsabili di tali differenze applicando test non parametrici per l'analisi della varianza (es. test di Wilcoxon o test di Kruskal-Wallis). Infine, le correlazioni tra la struttura MI e parametri ambientali o di salute sono generalmente valutate dal test di correlazione di Kendall.

## ***Il rapporto tra le difese dell'ospite e il microbiota intestinale***

### **La barriera gastrointestinale**

La barriera gastrointestinale è la più grande superficie del corpo umano in relazione con l'ambiente esterno e in particolare con i batteri commensali. Oltre al ruolo di assorbimento effettuato dagli enterociti, le cellule epiteliali intestinali specializzate (CEI) sono fornite diverse funzioni. Queste cellule interagiscono con i segnali ambientali per la regolamentazione della colonizzazione microbica, per la funzione di barriera e per le risposte immunitarie delle mucose. Infatti, le cellule epiteliali

intestinali, le cellule caliciformi secretorie e le cellule Paneth, attraverso la produzione di uno strato mucoso apicale, la secrezione di proteine antimicrobiche (AMP) e la transitosi di IgA secretorie, controllano il MI e modulano la funzione del sistema immunitario adeso alla mucosa.<sup>19,20</sup> Le proteine antimicrobiche riconoscono caratteristiche altamente conservate ed essenziali della biologia batterica. Ad esempio, gli enterociti producono AMP, come REGIII $\alpha$ , mentre le cellule Paneth secernono defensine, catelicidine e lisozima.<sup>20,21</sup> Tutti questi AMP consentono la regolazione del MI e limitano l'accesso dei batteri intestinali alla superficie della mucosa. Attraverso una stretta collaborazione tra CEI e le plasmacellule presenti nella lamina propria i complessi di IgA vengono trasportati attraverso la barriera epiteliale nel lume intestinale.<sup>22</sup> Questa cooperazione tra cellule B IgA-secerenti e CEI fornisce una componente strategica del sistema immunitario adattativo alla barriera epiteliale per regolare popolazioni batteriche commensali.<sup>23</sup>

### ***La relazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota intestinale***

La composizione e i prodotti del MI possono essere considerati un'estensione del sé e avere effetti imprevisti sul sistema immunitario. Ad esempio, due organismi geneticamente identici, es. come topi inbred, possono avere risposte metaboliche ed infiammatorie differenti a seconda della struttura del loro microbiota.<sup>24</sup> In una condizione di relazione mutualistica e di omeostasi immunitaria, i componenti del MI comunicano con l'epitelio intestinale e con il tessuto linfoide sottostante ('batterica-epiteliale crosstalk') favorendo una normale funzione del sistema immunitario.<sup>25</sup> Al contrario, le disbiosi del MI compromettono questa interazione e possono innescare, o

predispone a, diverse malattie infiammatorie, come malattie infiammatorie intestinali, asma, artrite autoimmune, e il diabete.<sup>26-29</sup> Nel lume intestinale si realizza un legame complesso su più livelli tra il sistema immunitario e la microflora. La risposta del sistema immunitario può essere mediata dal riconoscimento di ligandi microbici da parte delle cellule epiteliali intestinali, oppure da una interazione diretta tra le cellule del sistema immunitario e i microrganismi luminali o da una interazione mediata dal riconoscimento dei componenti della cellula microbica, oppure durante l'interazione con i prodotti finali del metabolismo microbico, quali gli acidi grassi a catena corta (SCFA) come acetato, propionato e butirato. L'equilibrio finale tra tutti questi segnali può favorire la tolleranza immunitaria o una risposta immunitario pro-infiammatoria.<sup>30</sup>

CEI fungono da sensori di prima linea per i microbi attraverso il riconoscimento dei ligandi microbici di recettori di riconoscimento indipendenti dall'antigene (PRR). PRR sono recettori trans-membrana o intra-citoplasmatici, che riconoscono specificamente e si legano a ligandi distintivi microbici, noti come pattern molecolari associati ai micorbi (MAMPs), esempi sono il lipopolisaccaride, la flagellina e i peptidoglicani. I PRR più studiati sono i recettori Toll-like (TLR). Oltre a CEI, i TLR sono anche espressi sulle cellule del sistema immunitario innato (macrofagi e cellule dendritiche), sulle cellule del sistema immunitario adattativo (cellule T e B). Le conseguenze funzionali dell'attivazione dei TLR dipendono in larga misura dal tipo di cellula di risposta e dal sito della cellula in cui si verifica il legame. A differenza di agenti patogeni che utilizzano le vie TLR per innescare processi infiammatori, i batteri commensali sfruttano la via TLR per mantenere l'omeostasi intestinale.<sup>31,32</sup> L'attivazione dei TLR induce la secrezione di fattori di citoprotettivi da parte delle CEI, es. TGF $\beta$ , che a sua volta suscita fenotipi tollerogenici sulle cellule dendritiche



DC (DC).<sup>33</sup> Cellule dendritiche attivate tramite i TLR secernono IL-10, che si traduce in una risposta immunitaria dominata dalla presenza di linfociti Treg.

L'epitelio intestinale include CEI specializzate, chiamate cellule microfold (cellule M), che campionano gli antigeni luminali e i microorganismi intatti per presentarli alle DC.<sup>35</sup> Le cellule M sono concentrate nell'epitelio intestinale in diretto contatto con la superficie luminale e che riveste le strutture linfoidi intestinali, comprese le placche di Peyer e i follicoli linfoidi isolati.<sup>36</sup> Inoltre DCs possono anche campionare direttamente i batteri commensali nel lume intestinale, penetrando attraverso la giunzioni presenti tra le cellule epiteliali e successivamente presentando i prodotti batterici presentarli al sistema immunitario intestinale associato all'intestino e deputato a mantenere l'omeostasi immunistica.<sup>37,38</sup> Questo campionamento è mediato dal riconoscimento dei batteri commensali da una vasta gamma di PRR, diversi dal TLR. Un esempio DC-specifico è il recettore chiamato DC-SIGN che riconosce MAMPS sul microbiota. L'attivazione di DC-SIGN è associata al legame con batteri commensali come *Lactobacillus reuteri* e *L. casei*, capaci di guidare la differenziazione delle cellule TH naive in cellule Treg. A loro volta i Treg producono IL-10 e pertanto sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule T in un maniera IL-10 dipendente.<sup>39</sup>

Le specie batteriche comunicano con il sistema immunitario attraverso i loro metaboliti e influenzando la risposta immunitaria.<sup>40</sup> Gli SCFA sono uno degli esempi più chiari di come la dieta e il microbiota si combinano per modulare le risposte immunitarie. Gli SCFA rappresentano i prodotti finali della fermentazione microbica dei polisaccaridi vegetali complessi, che non possono essere digeriti dai soli esseri umani perché i nostri genomi non codificano un repertorio adeguato d'idrolasi.<sup>41</sup>

Specifici sottoinsiemi di batteri appartenenti alle seguenti famiglie di clostridi come la specie del cluster IV, XIVa e XVIII sono in grado di produrre SCFA dalla fermentazione dei polisaccaridi complessi. In particolare, la produzione di SCFA (acetato, propionato, butirrato) da parte di questi batteri favorisce l'espansione e l'attivazione delle cellule T regolatorie del colon (Tregs) e la produzione da parte delle CEI di TGF- $\beta$ .<sup>42,43</sup> In particolare, il butirrato modifica il profilo di produzione di citochine inducendo la secrezione di potenti citochine anti-infiammatorie come IL-10.<sup>44,45</sup> L'acetato favorisce la risoluzione dei processi di infiammazione intestinale attraverso il recettore accoppiato alla proteina G, Gpr43.<sup>46</sup> GPR 43 è espresso sulle cellule Treg del colon, favorendo la loro espansione in risposta alla presenza di alte concentrazioni acetato e conferisce protezione all'epitelio in un modello sperimentale di colite indotta sul trasferimento adottivo di cellule T in riceventi linfopenici.<sup>41</sup> Il rilevamento di energia derivata produzione batterica da parte delle DC è un altro modo per accoppiare informazioni sull'ambiente intestinale e e la risposta immunitaria.<sup>47</sup> I sensori cellulari di risorse energetiche sono regolati da proteine chinasi attivate da AMP, esempio il mammalian target della rapamicina (mTOR). Questo pathway coinvolge entrambi i bracci del sistema immunitario, sia quello innato e che quello adattativo, e induce la generazione di cellule Th17 attraverso la secrezione di citochine IL-6 e IL-23,<sup>48</sup> la maturazione e l'attività delle cellule dendritiche, l'inibizione dello sviluppo Treg, la promozione della differenziazione di Th1, Th2 e Th17 cellule, la regolazione del traffico delle cellule T CD8 +, e l'inibizione della memoria T cellule formation.<sup>47,49</sup>

Inoltre, in modelli specifici di malattie autoimmuni, specifiche specie batteriche sono state associate con la presenza di alcuni sottoinsiemi di cellule T con attività pro-infiammatoria indotti dalle DC in un modo non ancora completamente chiariti. Ad

esempio, in un modello murino di artrite autoimmune, l'introduzione di batteri filamentosi nell'intestino dei topi è associato con l'espansione di Th17 sottoinsieme di CD4 + T cells attraverso un meccanismo ancora non del tutto chiarito.<sup>50</sup>

## ***Il Micorbiota intestinale e il trapianto di cellule staminali emopoietiche***

### **L'evoluzione del MI durante il TCSE**

La struttura del MI prima del trapianto è paragonabile a quella di un individuo sano, in termini di ricchezza e di diversità dell'ecosistema sia negli adulti che nei bambini<sup>51-53</sup>. E' anche efficiente in termini di produzione di SCFA, che rappresentano il biomarcatore più affidabile di una configurazione mutualistica microbiota-ospite.<sup>6</sup> Questa osservazione dimostra l'elevata dinamicità del MI, che è in grado di recuperare la normale struttura prima del TCSE, nonostante i trattamenti ricevuti da questi pazienti in termini di chemioterapia ed antibiotico terapia (Figura 1). Infatti, il TCSE e tutte le procedure associate ad esso (regime di condizionamento, esposizione ad antibiotici, dieta e profilassi antiacido), rappresentano un evento sconvolgente che determina una profonda modificazione della struttura MI e la rottura del suo assetto mutualistico.<sup>51,52</sup> In particolare, durante il periodo di neutropenia, la ricchezza di specie dell'ecosistema intestinale (alfa-diversità) diminuisce di circa il 30% rispetto al pre-TCSE. Il MI subisce una massiccia 'invasione' di nuove specie e <10% delle specie preesistenti è conservata. Queste alterazioni portano ad una perdita della struttura<sup>51</sup> con comparsa di dominazioni da parte di enterococchi o streptococchi in circa i 2/3 dei pazienti.<sup>54</sup> Questa profonda modificazione del MI è accompagnata anche da una perdita nell'abbondanza delle specie associate ad un assetto mutualistico, esempio *Faecalibacterium* e *Ruminococcus*.<sup>51</sup> Fattori specifici associati a specifici mutamenti sono: trattamento con ciprofloxacina orale e antibiotici ad ampio spettro

sistemico. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è che i batteri commensali sono importanti induttori di AMP, come alfa-defensine prodotte dalle cellule Paneth, selettivamente attivi contro i batteri non commensali.<sup>55</sup> Una esposizione prolungata a questi antibiotici, provoca una riduzione marcata di batteri commensali produttori di AMP.<sup>56</sup> Questa riduzione si traduce in una crescita esponenziale di ceppi batterici patogeni come gli enterococchi. Nei pazienti con GvHD intestinale una marcata riduzione della secrezione di  $\alpha$ -defensine, è verosimilmente causata dalla distruzione delle cellule Paneth da parte della risposta allogenica delle cellule T, con conseguente aumento dei ceppi batterici patogeni.<sup>57</sup>

È interessante notare che una piccola percentuale di specie batteriche resiste durante il TCSE ed è conservata durante l'intera indagine longitudinale. Queste specie persistenti potrebbero agire come "fondatori" del processo di ricostruzione dell'ecosistema.<sup>51</sup> Infatti, specie come i Bacteroides, che sono le più rappresentate tra quelle persistenti, sono noti per agire come un serbatoio batterico favorendo la colonizzazione a lungo termine o la ripopolazione dell'intestino dopo la distruzione dell'ecosistema.<sup>58-60</sup> Al contrario, la grande maggioranza dei filotipi osservati durante il TCSE sono di nuova acquisizione ed invadono solo temporaneamente l'ecosistema. Infatti, dopo un periodo di circa 60 a 100 giorni dopo TCSE, l'ecosistema recupera la quantità iniziale di ricchezza, e la struttura normale che si osservava prima del TCSE dimostrando l'elevata dinamicità del MI.

### **L'impatto clinico del microbiota intestinale nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche**

E' stato recentemente dimostrato l'impatto del MI sull'outcome del TCSE. In particolare, la diversità della comunità microbica intestinale è un fattore predittivo affidabile di mortalità generale nei pazienti trapiantati. In una coorte di 80 adulti

trapiantati, la diversità intestinale del MI all'attecchimento ha permesso di definire tre gruppi con sopravvivenza generale diversa a tre anni, 36%, 60%, e il 67%, rispettivamente.<sup>53</sup> L'aumento del tasso di mortalità era dovuto a cause legate al trapianto e non ad una ripresa della patologia di base. Questa osservazione suggerisce un legame tra la mancanza di diversità microbica e un rischio aumentato di sviluppare infezioni e/o GvHD.<sup>53</sup>

Inoltre il livello di escrezione urinaria di 3-indoxyl solfato (3-IS), un indicatore indiretto di salute del MI, è stato correlato con il rischio di mortalità trapiantologica.<sup>61</sup> 3-IS è un prodotto del metabolismo del triptofano ed è prodotto da batteri commensali che esprimono triptofanasi, agisce come segnale intercellulare nelle comunità microbiche, modulando la funzione di barriera della mucosa e l'espressione dei geni pro e anti-infiammatori nelle cellule epiteliali intestinali. Bassi livelli di 3-IS, sono stati associati con mortalità più elevata correlata al trapianto e con una sopravvivenza globale 1 anno dopo TCSE ridotta.<sup>61</sup> (Tabella 1)

## **GvHD**

E' stato dimostrato sia nel topo che nell'uomo che la GvHD è associata a importanti cambiamenti nella composizione del MI.<sup>62</sup> In modelli murini, le disbiosi specifiche associate GvHD sono caratterizzate da riduzione della alfa diversità, aumento dei membri degli ordini batterici delle Enterobacteriales (Escherichia, Klebsiella, e Enterobacter specie) delle Lactobacillales (Lactobacillus, specie Enterococcus e Streptococcus) e dalla riduzione di batteri anaerobi obbligati dell'ordine dei Clostridiales (Faecalibacterium, Roseburia, Ruminococcus, Blautia).<sup>57,62,63</sup>

Un modello murino ha inoltre dimostrato che il microbiota, esso stesso essere in grado di modulare la gravità di infiammazione intestinale. Infatti, eliminando Lactobacillales dalla flora batterica intestinale prima del TCSE, è stato dimostrato un aggravamento

del quadro di GvHD, mentre la reintroduzione di specie predominanti di *Lactobacillus* era in grado di determinare una riduzione significativa della GvHD.<sup>62</sup>

Un altro elegante modello murino ha valutato l'esposizione alla ciprofloxacina rispetto alla somministrazione per via orale di *Lactobacillus rhamnosus* GG, prima e dopo il trapianto, identificando nei topi che ricevevano *Lactobacillus rhamnosus* GG un miglioramento della sopravvivenza e una riduzione del rischio di sviluppare GvHD.<sup>64</sup> Questa osservazione indica che l'esposizione agli antibiotici prima del TCSE modifica il rischio di GvHD intestinale e che la reintroduzione mirata di germi può potenzialmente ridurre la gravità di GvHD.

I dati riscontrati nell'uomo, adulti e bambini sono in linea con quelli trovati in modelli murini. In particolare, una diminuzione di *Faecalibacterium* (Clostridiales) e alte percentuali di *Enterococcus* sono state osservate all'esordio di GvHD.<sup>51,52</sup>

Questi ultimi sono microrganismi associati ad un assetto pro-infiammatorio a livello intestinale sia nei topi che nell'uomo, per induzione di IL-1 e IL-6, con conseguente successiva Th1 e Th17 activation.<sup>52</sup> La predominanza di enterococchi, unitamente alla riduzione dei commensali *Faecalibacterium* e Clostridiales, considerati importanti per il mantenimento della tolleranza intestinale, possono favorire il consolidamento di un quadro di infiammazione intestinale.<sup>43,65</sup>

Un'altra osservazione molto interessante è rappresentata dal fatto che la diversità della flora intestinale ed in particolare una percentuale elevata di *Blautia* (Clostridiales) nei giorni successivi al TCSE si associano con una mortalità da GvHD ridotta.<sup>66</sup>

Infine, il nostro gruppo ha dimostrato pazienti con e senza GvHD GvHD hanno una diversa traiettoria temporale di ricostruzione del MI.<sup>51</sup> I soggetti non-GvHD hanno una maggiore abbondanza di membri del phylum Bacteroidetes, noto per la produzione propionato.<sup>63</sup> La produzione di questo SCFA esercita funzioni

immunomodulatorie sistemiche, come la promozione della extratimica di Treg e la loro migrazione intestinale<sup>44</sup>, la stimolazione della emopoiesi di precursori DC con una ridotta capacità di attivare la risposta allergica correlata ai linfociti T helper di tipo 2 cells.<sup>28</sup>

## **Infezioni**

Il condizionamento prima del trapianto determina la distruzione in maniera transitoria dei granulociti e monociti circolanti e aumenta notevolmente la suscettibilità alle infezioni.<sup>67,68</sup> In aggiunta le radiazioni e gli agenti chemioterapici determinano un profondo danno sulle cellule epiteliali dell'intestino, consentendo ai microbi commensali di invadere i tessuti sottostanti e determinando l'invasione del torrente ematico.<sup>69</sup> Di conseguenza, le infezioni batteriche sistemiche sono frequenti durante la prima fase successiva al trapianto.<sup>70</sup> Gli agenti patogeni che rappresentano la causa più frequente sono gli Enterococcus Vancomicina-resistenti (VRE), gli Streptococcus viridians e i batteri aerobi gram-negativi.<sup>71,72</sup> In condizioni normali la flora batterica residente che colonizza l'intestino umano offre resistenza alle infezioni.<sup>73</sup> Recentemente Taur et al. ha caratterizzato longitudinalmente il MI di 94 pazienti sottoposti a TCSE utilizzando 454 pirosequenziamento dei geni 16S rRNA. Nel corso del trapianto sono state osservate variazioni estreme nella flora batterica intestinale e in due terzi dei pazienti è stato documentato o un dominio da parte di enterococchi o di streptococchi, con un cut-off del 30% della popolazione residente per definire il dominio intestinale. Tali profonde modificazioni del MI sono soprattutto correlate al forte rischio di sviluppare infezioni ematiche sia da parte di VRE che da parte di batteri aerobi gram negativi.<sup>54,70,71,74</sup> È interessante osservare che, la dominazione da enterococchi è associata ad un aumentato rischio di batteriemia VRE, mentre il

dominio intestinale da parte di Proteobacteria aumenta il rischio di batteriemia da bacilli aerobi gram-negativi. Il tempo mediano tra l'insorgenza di un dominazione batterica e lo sviluppo di batteriemia in questi pazienti è stato di 7 giorni.<sup>54</sup> Il ruolo degli antibiotici somministrati durante TCSE sulla diversità MI è stata ampiamente valutato. Il metronidazolo è stato associato ad un aumentato rischio di dominazione da enterococchi<sup>75</sup>, mentre i fluorochinoloni proteggono dalla colonizzazione di proteobatteri, riducendo il rischio di infezioni da gram-negativi.<sup>76</sup> Questa scoperta supporta e chiarifica la ragione degli studi che dimostravano che la profilassi con fluorochinoloni in pazienti con neutropenia riduce il rischio da infezioni da gram negativi.<sup>77</sup>

### ***Prospettive future***

L'aumento delle nostre conoscenze sul rapporto tra MI e sistema immunitario apre infinite possibilità diagnostiche e terapeutiche nei pazienti trapiantati. Diverse strategie diagnostiche e terapeutiche possono essere ipotizzati per trasferire dal laboratorio al letto del paziente questa conoscenza.

L'identificazione precoce di pazienti ad alto rischio, con maggiore probabilità di mortalità da trapianto correlata potrebbe aiutare a prevenire o trattare le complicanze potenzialmente letali legate ad una disbiosi del MI. In questo senso la presenza di un biomarcatore veloce in grado di determinare la condizione eubiotica del MI sarebbe uno strumento prezioso. L'utilizzo routinario del sequenziamento del MI non è attualmente praticabile per motivi tecnici, a causa della lunghezza di preparazione dei campioni, amplificazione, sequenziamento e l'analisi. Questi problemi potrebbero essere superati grazie alla recente scoperta che i livelli urinari del 3-IS nel periodo successivo al TCSE rappresentano un valido strumento per valutare la salute



microbiota e di conseguenza individuare ad alto rischio patients.<sup>61</sup> La concentrazione di REG3 $\alpha$  è un biomarcatore valido per GVHD gastrointestinale e permette di valutare la risposta alla terapia.<sup>78</sup>

Potenziati interventi vanno dal trapianto del microbiota intestinale<sup>79-81</sup>, al cambiamento della dieta, all'utilizzo di probiotici, e a terapie antibiotiche mirate sulla composizione del MI.

Inoltre, strategie di manipolazione della struttura del MI potrebbero essere sviluppate con l'obiettivo di favorire un layout mutualistico. Ad esempio, un recente studio ha dimostrato che il MI può rispondere in tempi rapidi ad una dieta composta interamente di prodotti di origine animale o vegetale.<sup>82</sup> In questi studi, il cambiamento della dieta stravolge le differenze inter-individuali del MI e modifica l'espressione genica microbica. Così, è possibile ipotizzare che una dieta ricca di fibre pre-TCSE e possibilmente presto dopo TCSE, possa essere utilizzata per favorire germi produttori di SCFA in grado di modulare il recupero immunologico dopo TCSE. Anche l'utilizzo di probiotici è stato dimostrato essere in grado di modificare la composizione del MI e mediare effetti anti-infiammatori. Allo stato attuale dubbi in merito al loro utilizzo dovuti al rischio di sviluppare infezioni resistenti in pazienti profondamente immunodepressi ne minano il loro utilizzo nella pratica clinica. Il loro uso può comunque rappresentare in futuro un nuovo approccio per la prevenzione della GvHD.

Molto lavoro resta ancora da fare per comprendere meglio il ruolo dei batteri intestinali nella ricostituzione immunitaria dopo il TCSE, ma la crescente consapevolezza dell'importante ruolo rivestito dal MI dovrebbe spianare la strada a nuovi studi sperimentali e clinici, necessari per esplorare i suoi effetti benefici nel TCSE.

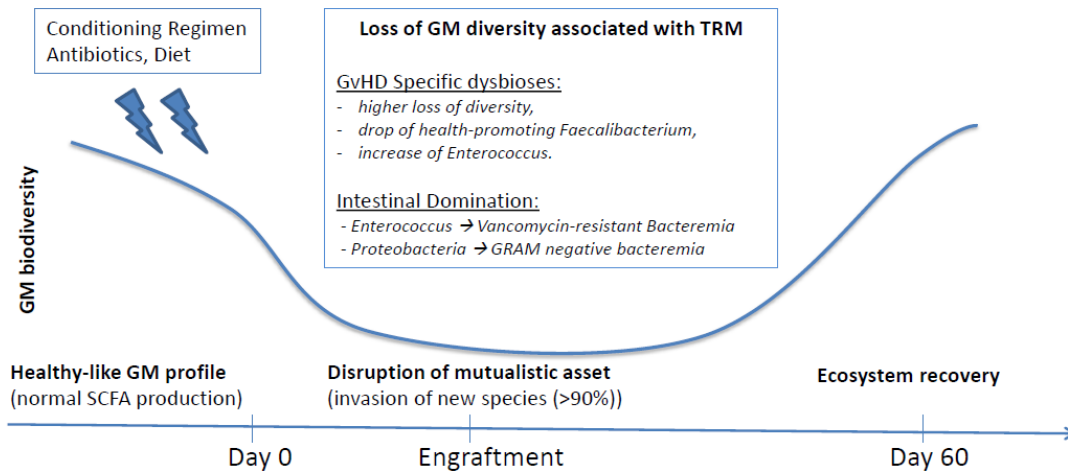


Fig. 1: HSCT procedures temporarily disrupt diversity, individual signature and short-chain fatty acid production of the gut microbiota. HSCT resulted in a profound disturbance of the gut ecosystem that can be measured in the loss of about 30% in average of the pre-HSCT alpha diversity

Ref	Methods of GM analysis	Aim	Main Results
<sup>54</sup>	<p>94 adults</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fecal samples from conditioning regimen to day +35 days after HSCT.</li> <li>- V1-V3 region of the 16S rRNA gene was amplified by means of PCR.</li> </ul> <p>Purified PCR products were sequenced on a 454 GS FLX Titanium platform.</p>	To analyse the risk of bacteremia during HSCT.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Bloodstream infection</b> was detected in 22 (23.4%) patients: 9 were due to VRE, 10 to gram-negative bacteria.</li> <li>● <b>Enterococcal</b> domination (40.4% of pts) increased the risk of VRE bacteremia. Risk factors were leukaemia diagnosis and metronidazole administration.</li> <li>● <b>Proteobacterial</b> domination (12.8% pts) increased the risk of gram-negative bacteremia. Proteobacteria domination was reduced 10-fold by fluoroquinolone administration.</li> </ul>
<sup>53</sup>	<p>80 adults</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fecal samples collected within 7 days following stem cell engraftment.</li> <li>- PCR followed by sequencing for microbiota analysis.</li> </ul>	To analyse the impact of GM diversity on mortality following HSCT	<ul style="list-style-type: none"> <li>● The <b>diversity</b> of the intestinal microbiota at engraftment is an independent predictor of mortality.</li> <li>● Based on overall bacterial diversity, pts were classified in high, intermediate, low diversity groups, which, respectively, correspond to survival at 3 years 36%, 60%, and 67%.</li> </ul>
<sup>52</sup>	<p>31 adults</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fecal samples collected at a min. of 3 time points: before HSCT, during aplastic period, and on days 21 to 28.</li> <li>- NGS of the V3 region of the 16s rRNA gene, PCR of enterococci and analysis of urinary indoxyl sulphate.</li> </ul>	To monitor microbiome shifts in the course of allogeneic HSCT.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● A major loss of bacterial diversity contributed to intestinal inflammation.</li> <li>● Increase in the proportion of <b>enterococci</b> and decrease in commensal bacteria was prominent in patients who developed GI GvHD or suffered from active GI GvHD.</li> </ul>
<sup>66</sup>	<p>115 adults</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fecal samples collected within 4 days of day 12 after T cell-replete HSCT.</li> <li>- 1<sup>st</sup> 64-patient cohort: 454 GS FLX Titanium platfor. - 2<sup>nd</sup> 51-patient cohort: Illumina MiSeq platform to sequence the V4-V5 region of the 16S rRNA gene.</li> </ul>	To evaluate the relationship between GvHD and the fecal bacterial composition after HSCT.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Increased bacterial diversity was associated with reduced GVHD-related mortality.</li> <li>● <b>Blautia</b> abundance was associated with reduced GVHD lethality and improved overall survival. Loss of Blautia was associated with treatment with antibiotics that inhibit anaerobic bacteria and receiving total parenteral nutrition for longer durations.</li> </ul>
<sup>61</sup>	<p>131 adults</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Urinary 3-IS was performed by reversed-phase liquid chromatography– electrospray ionization–tandem MS at the time of HSCT and early thereafter</li> </ul>	To evaluate the correlation of urinary 3-IS levels as predictors of outcome of HSCT	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Low <b>urinary 3-IS levels</b> between days 0 and 10 after HSCT were associated with poor early and long-term outcome because of an increased frequency of lethal complications mostly as a consequence of GI GVHD</li> </ul>
<sup>51</sup>	<p>10 children</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fecal samples collected pre-HSCT and at least three times after HSCT.</li> <li>- V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and subsequently NGS was performed. GC-MS used to determine SCFA production</li> </ul>	To analyse the connection between the process of GM reconstruction GvHD in pediatric patients	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GvHD and non-GvHD subjects had a <b>different temporal trajectory</b> of GM ecosystem recovery after HSCT</li> <li>● Specific dysbiosis associated with GvHD: drop of <i>Faecalibacterium</i> and increase of <i>Enterococcus</i>.</li> <li>● In pre-HSCT samples, non-GvHD pts had higher abundances of mutualists propionate-producing Bacteroidetes, persisting during the HSCT</li> </ul>

## **La relazione tra il microbiota intestinale e la Graft versus Host Disease nel paziente pediatrico sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche**

### ***Introduzione***

Gli esseri umani condividono uno stretto rapporto mutualistico con più di 100 bilioni che vivono nel tratto gastrointestinale, il microbiota intestinale (MI)<sup>13</sup>. Questo immenso ecosistema batterico rappresenta un elemento fondamentale nella comprensione della biologia dell'uomo e un fattore strategico nel mantenimento della salute. Infatti, il MI ha un ruolo chiave nella nutrizione<sup>83</sup>, limita l'accesso e la colonizzazione dei batteri enteropatogeni nell'apparato gastrointestinale<sup>84</sup> ed inoltre favorisce l'educazione e la preservazione dell'omeostasi del sistema immunitario dell'ospite<sup>6,7</sup>.

Molte delle funzioni fisiologiche del MI dipendono dalla produzione di metaboliti, come gli acidi grassi a corta catena (butirrato, acetato, propionato), che sono l'elemento finale della fermentazione dei polisaccaridi complessi nell'intestino. Questi metaboliti controllano la produzione e il deposito di energia da parte dell'ospite<sup>85</sup> e soprattutto regolano la relazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota intestinale<sup>44,86</sup>. Gli acidi grassi a corta catena, tra le loro altre funzioni, stimolano il rilascio di mucina e rinforzano la struttura epiteliale<sup>87,88</sup>.

La mappa del MI mediante il sequenziamento di nuova generazione permette la rilevazione di un immenso livello di diversità di specie ed uno straordinario grado di specificità individuale dell'ecosistema microbico<sup>89</sup>. Infatti ogni soggetto possiede uno specifico sottoinsieme di centinaia di specie delle migliaia che costituiscono il MI. In un soggetto sano la struttura del MI contribuisce attivamente all'omeostasi metabolica

ed immunologica del partner<sup>90</sup> e persiste per anni mostrando il potenziale per modellare molti aspetti delle nostre caratteristiche biologiche<sup>91</sup>.

Numerose circostanze possono modificare la struttura del MI da una configurazione mutualistica, in grado di promuovere la salute, ad una struttura caratterizzata da bassa diversità microbica che si associa all'insorgenza di patologie infiammatorie immunomediate<sup>12</sup>. Le disbiosi intestinali sono, infatti, coinvolte nelle malattie infiammatorie intestinali, nell'allergia e nel diabete di tipo II<sup>26</sup>. Questa osservazione sottolinea ulteriormente l'importanza dell'interazione tra il sistema immunitario e il MI, il quale, se compromesso, favorisce a livello sistemico un processo infiammatorio patologico<sup>7,27,28</sup>.

La graft versus host disease acuta, o malattia contro l'ospite, (aGvHD) è un disturbo immunologico che colpisce molti organi, compresi il tratto gastrointestinale, fegato e pelle,<sup>92</sup> e rappresenta la principale complicanza immuno-mediata del trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE), limitando così il suo utilizzo<sup>93,94</sup>. Alla luce della capacità della flora intestinale di modulare l'immunità sistemica e locale dell'ospite,<sup>27</sup> è stata avanzata l'ipotesi che il mantenimento di un assetto mutualistico della flora intestinale potesse essere un driver strategico per prevenire l'insorgenza di aGvHD<sup>95</sup>. Gli studi pionieristici che hanno esplorato il legame tra GvHD intestinale e i batteri residenti<sup>52,57,62,63,96</sup> hanno riportato l'aumento di batteri opportunistici durante o dopo l'insorgenza aGvHD. Tuttavia, solo due di questi studi sono stati condotti su esseri umani,<sup>52,62</sup> mentre la maggioranza hanno utilizzato modelli murini.<sup>57,63,96</sup> Inoltre, anche se vi è un accordo generale nel riportare un profondo cambiamento del MI negli esseri umani dopo il TCSE,<sup>52,53,57,63,96</sup> nessuna analisi longitudinale è mai stata effettuata, e nessuna informazione è disponibile sull'associazione tra la traiettoria di ricostruzione della flora intestinale dopo trapianto e l'insorgenza di aGvHD.

L'importanza della ricostruzione post-trapianto della flora intestinale è stata inoltre documentata dal recente riscontro che la diversità della flora intestinale all'attecchimento rappresenta un predittore indipendente di mortalità negli adulti sottoposti a TCSE.<sup>53</sup>

Lo scopo di questo studio è pertanto valutare l'eventuale legame tra il processo di ricostruzione del MI dopo TCSE e la comparsa di GVHD acuta in pazienti pediatrici.

## ***Materiali e Metodi***

### **Pazienti**

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Sant'Orsola Malpighi (ref. number 19/2013/U/Tess). 10 pazienti sono stati arruolati dopo aver ottenuto il consenso informato da parte dei genitori. I criteri d'inclusione sono stati: la raccolta di un campione fecale prima del TCSE ed almeno 3 campioni valutabili dopo il TCSE, in maniera da avere una valutazione longitudinale. I criteri di esclusione erano la mancanza dell'ottenimento del consenso informato materiale insufficiente per l'estrazione del DNA batterico. I dati demografici e trapiantologici sono riportati nella tabella 1. Il regime di condizionamento era basato sull'utilizzo del busulfano in tutti i pazienti. Tutti i pazienti erano in una stanza con filtri HEPA e hanno ricevuto misure profilattiche standard per prevenire infezioni, incluso la levofloxacina per la decontaminazione intestinale dall'inizio del regime di condizionamento fino all'attecchimento dei neutrofilo e alla ripresa dell'alimentazione per via orale.<sup>77</sup> Tutti i pazienti hanno ricevuto antibiotici per il trattamento della febbre in corso di neutropenia durante il periodo di studio. In particolare i pazienti con GVHD sono stati hanno avuto la stessa esposizione agli antibiotici rispetto ai pazienti che non hanno presentato GVHD (rispettivamente 11.3 giorni vs per i pazienti senza GVHD e 10.9 giorni per i pazienti con GVHD). Aciclovir e fluconazolo sono stati somministrati per la profilassi antivirale ed antifungina.<sup>97,98</sup> Tutti i pazienti hanno osservato un tempo di digiuno che andava dal giorno del TCSE a quello dell'attecchimento.

Cinque pazienti su 10 hanno presentato GVHD, 4 cutanea (grado I-III) e un pazienti di grado IV (tabella 1), gradata secondo il sistema di Seattle.<sup>99</sup>

## **16S rRNA gene pyrosequencing, l'analisi bioinformatica e gas cromatografia-spettrometria di massa**

Il DNA batterico dai campioni di feci è stato estratto mediante DNeasy Blood and Tissue Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany) come riportato da Salonen et al.<sup>100</sup> La regione V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata utilizzando i 520F e 802R, come nello studio di Centanni et al.<sup>101</sup> Il pyrosequencing degli ampliconi amplificati è stato eseguito in accord al protocollo di sequenziamento GS-FLX Titanium<sup>102</sup> Le reads di sequenziamento sono state analizzate utilizzando le pipeline QIIME.<sup>102</sup> Per l'assegnazione batterica tassonomica è stato utilizzato il classificatore RDP (version 2.2). La diversità alfa è stata analizzata utilizzando Shannon, PD whole tree, Chao1 e la metrica delle specie osservate. Le distanze pesate e non-pesate UniFrac distances sono state utilizzate per l'analisi delle principali coordinate (PCoA), utilizzando il pacchetto R Stats e Vegan. L'analisi degli acidi grassi a corta catena è stata condotta come descritto da Schnorr et al. Mediante l'utilizzo della Gas cromatografia-spettrometria di massa<sup>102</sup> e la concentrazione degli acidi grassi a corta catena è stata espressa in  $\mu\text{mol/g}$  di feci.

## **Statistica generale**

Le differenze significative sono state valutate mediante Mann–Whitney U test. Quando appropriato i paired test sono stati utilizzati. Il confronto tra  $\alpha$ - e  $\beta$ -diversità dei gruppi è stato eseguito mediante Wilcoxon signed-rank test.

La correlazione di Kendall è stata calcolata utilizzando la funzione cor.test (R package Stats). I valori di P sono stati corretti per comparazioni multiple utilizzando il metodo Benjamini–Hochberg; il riscontro false discovery rate (FDR)  $<0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.



## ***Risultati***

### **Le procedure correlate al trapianto distruggono la diversità, la signature individuale e la produzione di acidi grassi a corta catena del microbiota**

I profili filogenetici basati sul 16S rRNA di un totale di 53 campioni di feci stool samples, con un minimo di 4 time-point per soggetto sono stati analizzati mediante 454 pyrosequencing della regione ipervariabile V4. Le reads sono state raggruppate in 6895 unità tassonomiche operazionali (OTU) con un 97% di identità. Al fine di valutare l'impatto complessivo del trapianto e di tutte le relative procedure sul microbiota intestinale, abbiamo studiato la ricchezza e la diversità dell'ecosistema nel campione pre-trapianto, nei primi campioni post-trapianto disponibili (circa corrispondente all'attecchimento) e negli ultimi campioni disponibili (come punto di riferimento di recupero completo).

Il TCSE ha determinato una profonda alterazione dell'ecosistema intestinale che può essere misurata in una perdita del 30% in media della alfa diversità pre-TCSE secondo l'indice Chao1 (rapporto medio post-TCSE/pre-TCSE 0.68, FDR-corrected paired Mann-Whitney U test  $P = 0.0078$ ). Al contrario, confrontando la diversità alfa dei campioni pre-trapianto con gli ultimi campioni disponibili per ogni soggetto, è evidente che l'ecosistema recupera l'iniziale quantità di diversità (rapporto medio 0,94; Figura 1a). Il valore medio di distanze UniFrac ponderata tra i campioni di pre-trapianto era significativamente inferiore a quella ottenuta tra campioni post-trapianto ( $P < 0.001$ ), dimostrando un aumento dell'alfa diversità del MI inter-soggetto dopo il trapianto.

D'altra parte, gli ultimi campioni disponibili hanno mostrato un livello comparabile di diversità tra i soggetti rispetto ai campioni pre-trapianto, suggerendo un progressivo recupero dell'ecosistema (Figura 1b). Per quantificare l'effetto di questo evento sconvolgente sull'architettura dell'ecosistema, abbiamo quantificato la perdita e

successivo recupero di OTU. Il TCSE è stato associato ad una perdita della signature individuale della composizione della flora intestinale dato che i campioni degli stessi soggetti non si raggruppavano insieme in analisi multivariata.

Infatti, solo  $8,3 \pm 4,9\%$  della OTU nei campioni pre-trapiantati sono stati conservati nei campioni post-trapianto, per lo più assegnato alla phyla Firmicutes (66,7%) e Bacteroidetes (27,5%).

Una piccola percentuale di OTU era sotto il limite di rilevabilità nei campioni post-trapianto, ma è 'riapparso' negli ultimi campioni disponibili ( $5,9 \pm 4,7\%$ ); di nuovo, queste sequenze sono state assegnate principalmente ai Firmicutes (73,6%). L'  $89,3 \pm 4,6\%$  della OTU nei campioni successivi al trapiantato era nuovo e transitorio (cioè non rilevabile nell' ultimo campione disponibile di ciascun paziente). Il microbiota fecale dell'ultimo campione disponibile di ciascun soggetto era composto per l'  $86,1 \pm 9,7\%$  di OTU che non erano presenti nei campioni pre-trapianto sia nei pazienti con GvHD che nei pazienti senza GvHD.

Per ottenere un'indicazione del mantenimento o della interruzione della funzionalità dell'ecosistema intestinale, abbiamo quantificato il contenuto di acidi grassi a catena corta in campioni fecali. La quantità fecale di acidi grassi a catena corta è diminuito del 76% dopo il trapianto sia in soggetti con GvHD che in quelli senza GvHD (media rapporto post-trapianto/pre-trapianto 0,23, FDRcorrected accoppiato Mann-Whitney U test;  $P = 0,016$ ). L'acetato e il butirato si sono ridotti rispettivamente del 64% e del 77%, (rapporto medio post-trapianto/pre-trapianto 0,17 e 0,16, rispettivamente; FDR corretta accoppiato Mann-Whitney U test  $P = 0,023$  e 0,011, rispettivamente). La concentrazione del propionato è risultata essere la più ridotta, con una perdita media dell'86% nel primo campione post-trapianto rispetto alla pre-trapianto (rapporto medio post-trapianto/pre-trapianto 0,14, FDR-corretto accoppiato Mann-Whitney U

test,  $P = 0,018$ ). Confrontando la quantità di acidi grassi a catena corta nei campioni pre-trapianto con gli ultimi campioni disponibili per ciascun soggetto, il microbiota intestinale sembra recuperare la funzionalità iniziale sia in termini totali di acidi grassi a catena corta (rapporto 1.23 dire; abbinato Mann Whitney test  $P = 0.73$ ) che di produzione di propionato (rapporto medio 1,09; appaiati Mann-Whitney U test  $P = 0.82$ ).

### **La signature del microbiota intestinale associata alla GvHD**

Al fine di evidenziare le peculiarità del processo di ricostruzione post-trapianto della flora intestinale nei soggetti con e senza GvHD, le traiettorie temporali del MI sono state costruite e confrontate. Con questo obiettivo, i campioni sono stati raggruppati in quattro intervalli di tempo: pre-trapianto; 0-35 giorni dopo il trapianto (intervallo in cui si è verificato l'attecchimento e, nel nostro studio, la diagnosi della aGvHD); 35-65 giorni dopo il trapianto; e >65 giorni dopo il trapianto (Figura 2). L'analisi PCoA delle distanze UniFrac ponderate (Figura 3a) ha dimostrato che i campioni dei soggetti con GvHD presi nell'intervallo di tempo compreso tra 0 e 35 giorni dopo il trapianto, si sono raggruppati nella parte destra del grafico PCoA ( $P < 0.05$ ), mostrando che l'insorgenza della GvHD è associata a valori superiori sull'asse  $pCO_2^{35}$  (Figura 3b). I campioni dei pazienti con GvHD, prelevati entro l'intervallo di 0-35 giorni, mostrano valori significativamente più elevati di  $pCO_2$  rispetto a tutti gli altri campioni ( $P < 0.05$ ). È interessante notare che,  $pCO_2$  era correlata positivamente ( $P < 0.05$ ) per i membri del genere *Enterococcus* e *Clostridiales* non assegnati, mentre *Faecalibacterium* e *Ruminococcus* hanno mostrato una correlazione negativa con  $pCO_2$  ( $P < 0.05$ ). Questo suggerisce che la GvHD coinvolge la crescita eccessiva di *Enterococcus* e *Clostridiales* e una corrispondente diminuzione di *Faecalibacterium* e *Ruminococcus*. A conferma di questi risultati, i membri del

genere *Enterococcus* sono stati trovati in concentrazione significativamente più alta nei campioni dei pazienti con GvHD, nel periodo compreso tra 0 e 35 giorni dopo il trapianto, rispetto alla concentrazione trovata nei pazienti senza GvHD (mediana 1,9% per aGvHD, 0,01% per nonGvHD;  $p = 0,016$ ); l'abbondanza di *Enterococcus* era significativamente superiore anche nei campioni pre-trapianto dei soggetti con GvHD (mediana 0,03%,  $p = 0,05$ ), confermando l'associazione con la diagnosi GvHD. Una tendenza opposta è stata trovata per il *Faecalibacterium*, germe con riconosciute proprietà immunomodulatorie, (valori mediani: pre-trapianto del 12,5%, 0-35 giorni 0,5%;  $p = 0,06$ ). Per capire meglio la capacità della GvHD di influenzare la struttura complessiva del microbiota, a livello di phylum, sono inoltre state valutate le dinamiche temporali della flora intestinale nei pazienti con e senza GvHD. Sono emerse diverse tendenze per i due più abbondanti phyla nell'ecosistema intestinale: Firmicutes e Bacteroidetes. I soggetti con GvHD hanno mostrato un calo della concentrazione dei Firmicutes dopo il trapianto, e poi hanno recuperato una elevata concentrazione di Firmicutes pari a quella iniziale; tale tendenza distintiva non è stata osservata invece nei soggetti senza aGvHD (Figura 4a). In maniera più interessante, i campioni dei soggetti con GvHD mostravano una concentrazione inferiore dei membri delle Bacteroidetes in tutti gli intervalli di tempo considerati rispetto ai soggetti senza GvHD, e la differenza è risultata significativa nei campioni pre-trapianto (mediana 0,11% per GvHD, 14,8% per i non-GvHD;  $P=0.05$ ) (Figura 4b).

### **L'ecosistema intestinale pre trapianto nei bambini che sviluppano o no GvHD**

L'osservazione delle differenze nella composizione pre-trapianto del microbiota intestinale dei pazienti con GvHD rispetto a quelli senza soggetti non aGvHD, caratterizzata da una maggiore abbondanza relativa di Bacteroidetes (Figura 4b), ci ha portato ad esplorare la possibilità che la flora intestinale dei bambini che

non sviluppano GvHD abbia delle peculiarità fin dalla fase pre-TCSE. Infatti, l'ecosistema intestinale dei soggetti GvHD presentava una diversità ed una ricchezza di specie inferiori nei campioni pre-trapianto rispetto a quella dei soggetti non GvHD. I campioni pre-trapianto dei pazienti con GvHD hanno mostrato inoltre una minore concentrazione di due importanti membri del phylum Bacteroidetes, rispetto ai campioni pre-trapianto dei pazienti senza GvHD: Bacteroides (mediana 6,6% per i non-aGvHD pazienti, 0,1% per i pazienti GvHD;  $P = 0.05$ ) e Parabacteroides (mediana 1,8% per i pazienti non-GvHD, 0% per i pazienti aGvHD;  $P=0.06$ ). Inoltre le concentrazioni relative di Bacteroides e Parabacteroides nei campioni pre-trapianto sono risultati significativamente correlate alla quantità di propionato ( $P<0.03$ ).

Inoltre, i campioni pre-trapianto dei soggetti che non hanno sviluppato GvHD presentavano valori significativamente più elevati di propionato (mediana 0,49 vs 0,26 mmol/g;  $p = 0.06$ ) e di acidi grassi a catena corta totali (mediana 3.9 vs 2.7 mmol/g;  $P = 0,1$ ), mentre i valori più elevati di acetato e butirrato erano tutt'altro che significativi (mediana 3,0 vs. 1,8 mmol/g;  $P = 0,28$  per l'acetato; mediana 0,34 vs 0,49 mmol/g;  $P=0,41$  per il butirrato). È interessante notare che i Bacteroides erano il genere più rappresentato tra le OTU conservate dalla fase pre-trapianto all'ultimo campione a disposizione di ciascun soggetto (20%), e le OTU assegnate a questo si sono conservate o sono 'riapparse' in quattro dei cinque soggetti senza GvHD (33 OTU in totale), mentre solo in due soggetti con GvHD (12 Otus in totale).

## ***Discussione***

Il nostro studio ha evidenziato che, nei pazienti pediatrici sottoposti a TCSE e a tutte le procedure correlate ad esso, come ad esempio l'uso in profilassi della levofloxacina, si osserva un profondo stravolgimento dell'ecosistema batterico intestinale e una perturbazione del suo patrimonio mutualistico.

Prima del trapianto la flora intestinale dei soggetti arruolati presentava un profilo paragonabile a quello di un soggetto pediatrico sano, sia in termini di struttura, che nella produzione degli acidi grassi a corta catena.<sup>1,2,41</sup> Dopo il trapianto, invece abbiamo assistito ad un cambiamento rilevante dell'ecosistema intestinale, caratterizzato da una massiccia 'invasione' di nuove specie e dalla conservazione di <10% delle specie preesistenti.

Questo grado di variazione dell'ecosistema supera ampiamente il normale grado di variabilità temporale della flora intestinale, che comporta la variazione di circa il 40% delle specie totali in un periodo di 5 anni.<sup>91</sup>

Questo profondo cambiamento del microbiota dopo il TCSE è stato caratterizzato da una riduzione della concentrazione di specie in grado di promuovere la salute, come ad esempio il *Faecalibacterium* e il *Ruminococcus*, e da una conseguente ridotta produzione di acidi grassi a corta catena.

Inoltre la struttura individuale del MI di ogni soggetto viene persa nel corso del TCSE, e la flora batterica osservata nei campioni dello stesso soggetto non è più simile rispetto a quella trovata nei campioni di pazienti differenti. La grande maggioranza dei filotipi osservati come nuova acquisizione dopo il TCSE invade solo temporaneamente l'ecosistema e viene successivamente sostituita durante la fase di ricostruzione dell'ecosistema. Questo processo è rispecchiato dal temporaneo aumento della diversità inter-individuale della flora intestinale dopo il trapianto. Tutte

queste osservazioni suggeriscono che il TCSE favorisce un'invasione temporanea di microrganismi alloctoni nell'intestino. Dopo circa due mesi dal giorno del trapianto, l'ecosistema recupera sia la ricchezza iniziale che la capacità metabolica.

È interessante anche notare che una piccola percentuale di specie batteriche resiste allo stravolgimento della flora legato alle procedure del trapianto. Queste specie sono conservate durante il periodo di osservazione oppure la loro concentrazione si riduce sotto il limite di rilevazione, come conseguenza dello sconvolgimento dell'ecosistema, e 'riappare' successivamente. Queste specie persistenti potrebbero agire come "fondatori" in grado di ricostruire un ecosistema sano una volta che le condizioni lo consentono. Infatti, le specie *Bacteroides*, che sono le più rappresentate tra quelle persistenti, sono note per agire come un serbatoio batterico in grado di mantenere la colonizzazione a lungo termine o ripopolare l'intestino dopo una distruzione dell'ecosistema.<sup>58-60</sup>

In questo studio abbiamo inoltre dimostrato che i pazienti con e senza GvHD presentano una diversa traiettoria temporale di ricostruzione del MI dopo il trapianto. In particolare, l'esordio di GvHD è associato alla presenza di disbiosi specifiche dell'ecosistema intestinale nel primo mese dopo il trapianto. Queste disbiosi sono caratterizzate da un calo dell'abbondanza dei *Faecalibacterium* e da alte concentrazioni di *Enterococcus*, dato confermato anche negli adulti da Holler et al.<sup>52</sup> I campioni dei pazienti con GvHD mostravano inoltre una elevata concentrazione di sequenze non assegnate, dato che potrebbe essere indicativo di una maggiore invasione dell'ecosistema da parte di batteri opportunisti sconosciuti. Ancora più interessante è il dato che i pazienti con e senza GvHD possiedono anche una diversa composizione pre-trapianto della flora intestinale. I soggetti che non sviluppano GvHD hanno una flora intestinale pre-TCSE caratterizzata da una

maggior abbondanza di membri del phylum Bacteroidetes, in particolare Parabacteroides e Bacteroides. Questa struttura della flora intestinale si proietta successivamente caratterizzando un percorso distintivo di ricostruzione post-trapianto del microbioma.

È interessante notare che i Bacteroidetes sono noti per la produzione di propionato dalle fibre introdotte con la dieta<sup>59</sup> e che, in questo studio, la loro concentrazione pre-trapianto era correlata con la concentrazione fecale di propionato. Questo prodotto della flora intestinale ha la capacità di esercitare funzioni immunomodulatorie a livello sistemico, come la promozione della produzione extratimica delle cellule T e la loro migrazione nell'intestino,<sup>44</sup> nonché l'aumento della produzione emopoietica di precursori di cellule dendritiche con bassa affinità per i linfociti T helper-2 allergia-correlati.<sup>28-103</sup>

I limiti di questo studio sono stati legati alla difficoltà di arruolamento di bambini affetti da patologia oncologica e soprattutto il rispetto dei time-point temporali previsti dallo studio per l'ottenimento dei campioni. Pertanto considerando il numero di soggetti arruolati, questo studio può essere considerato uno studio pilota.

Tuttavia, il nostro studio indica, con la necessaria prudenza dovuta ad uno studio pilota, che la struttura della flora intestinale può rappresentare un possibile fattore coinvolto nella GvHD.<sup>104</sup> Infatti è possibile ipotizzare che una configurazione della flora intestinale pre-trapianto ricca in Bacteroidetes, produttori di propionato, possa favorire una traiettoria mutualistica di recupero dell'ecosistema dopo il trapianto. In questa maniera il MI potrebbe influenzare positivamente l'omeostasi del sistema immunitario a livello sistemico, grazie alle capacità immunomodulatorie del propionato stesso, ed in ultima analisi riducendo il rischio di GvHD. In questo scenario, potrebbe essere importante cercare strategie per manipolare la struttura della

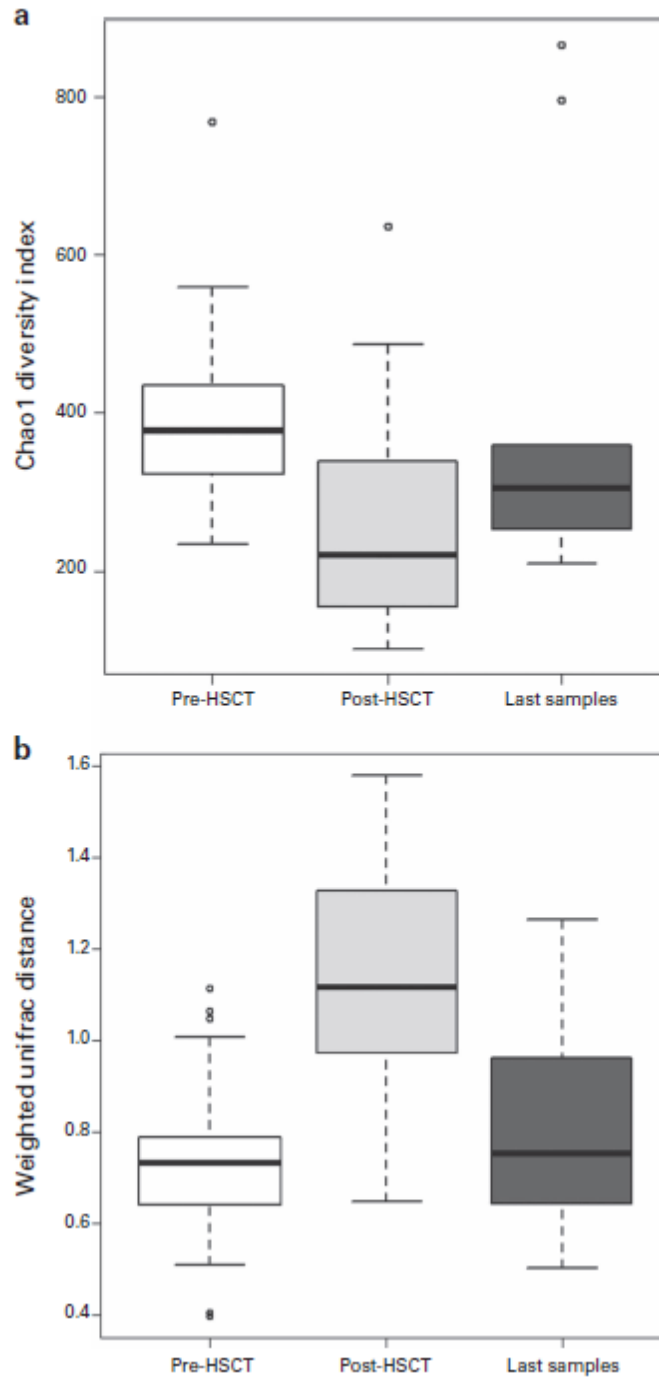


flora intestinale pre-trapianto. Per esempio, una dieta ricca di fibre potrebbe essere utilizzata per favorire la crescita di gruppi batterici produttori di acidi grassi a corta catena, come i membri Bacteroidetes, che potrebbero a loro volta essere coinvolti nella modulazione del recupero immunologico dopo trapianto e, possibilmente, riducendo il rischio di sviluppare GvHD.

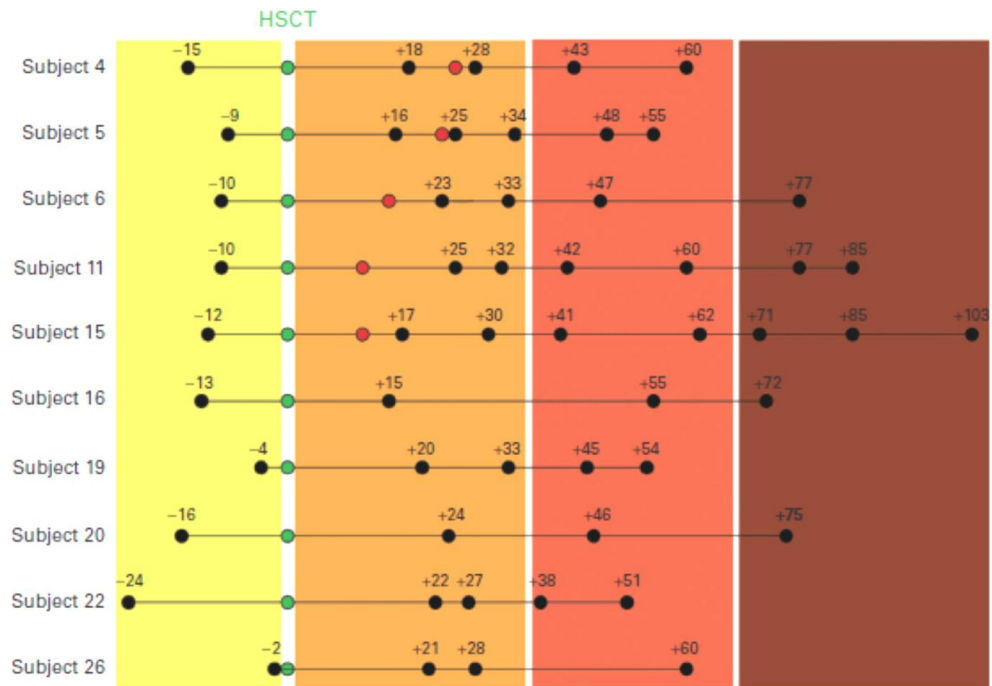
**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche ed anagrafiche dei soggetti arruolati.

Subject	Sex/age	Diagnosis	Donor Type	Stem cell source	Conditioning regimen	aGvHD prophylaxis	TNC/Kg	Engraftment (day)			Localization	aGvHD		Outcome
								PMN	PLT	Grade		Day	Therapy	
4	F/12	AML	MUD	BM	BU+EDX L-PAM	ATG-CSA-MTX	4.2 × 10 <sup>8</sup>	+13	+20	I	Skin	+25	Steroid	ANED 2 years
5	M/10	ALL	MFD	BM	BU+TT+EDX	CSA	2.9 × 10 <sup>8</sup>	+12	+17	III	Skin	+23	Steroid-PHEC	ANED 2 years +1/12
6	M/2	BDA	MMUD	BM	BU+TT FLUDARA	ATG-CSA-MTX	10 × 10 <sup>8</sup>	+15	+16	II	Skin	+15	Steroid	ANED 2 years +2/12
11	M/9	ALL	MUD	BM	BU+TT+EDX	ATG-CSA-MTX	3.4 × 10 <sup>8</sup>	+15	+27	II	Skin	+11	Steroid	Dead from relapse
15	M/8	ALL	MFD	BM	BU+ TT+EDX	CSA	5.8 × 10 <sup>8</sup>	+12	+17	IV	Skin, gastrointestinal tract	+11	Steroid-PHEC Infliximab	ANED 1 year +6/12
16	M/16	ALL	MFD	BM	BU+TT+EDX	CSA	4.6 × 10 <sup>8</sup>	+11	+30					ANED 1 year +6/12
19	F/10	ALL	MUD	BM	BU+TT+EDX	ATG-CSA-MTX	7.1 × 10 <sup>8</sup>	+34	+35					ANED 1 year +3/12
20	M/7	ALL	MUD	BM	BU+TT+EDX	ATG-CSA-MTX	4.8 × 10 <sup>8</sup>	+12	+15					ANED 1 year+4/12
22	M/2	BDA	MUD	BM	BU+TT +FLUDARA	ATG-CSA-MTX	9.9 × 10 <sup>8</sup>	+13	+14					ANED 1 year +3/12
26	M/8	AML	MUD	BM	BU+EDX+L-PAM	ATG-CSA-MTX	7.2 × 10 <sup>8</sup>	+12	+21					ANED 1 year +9/12

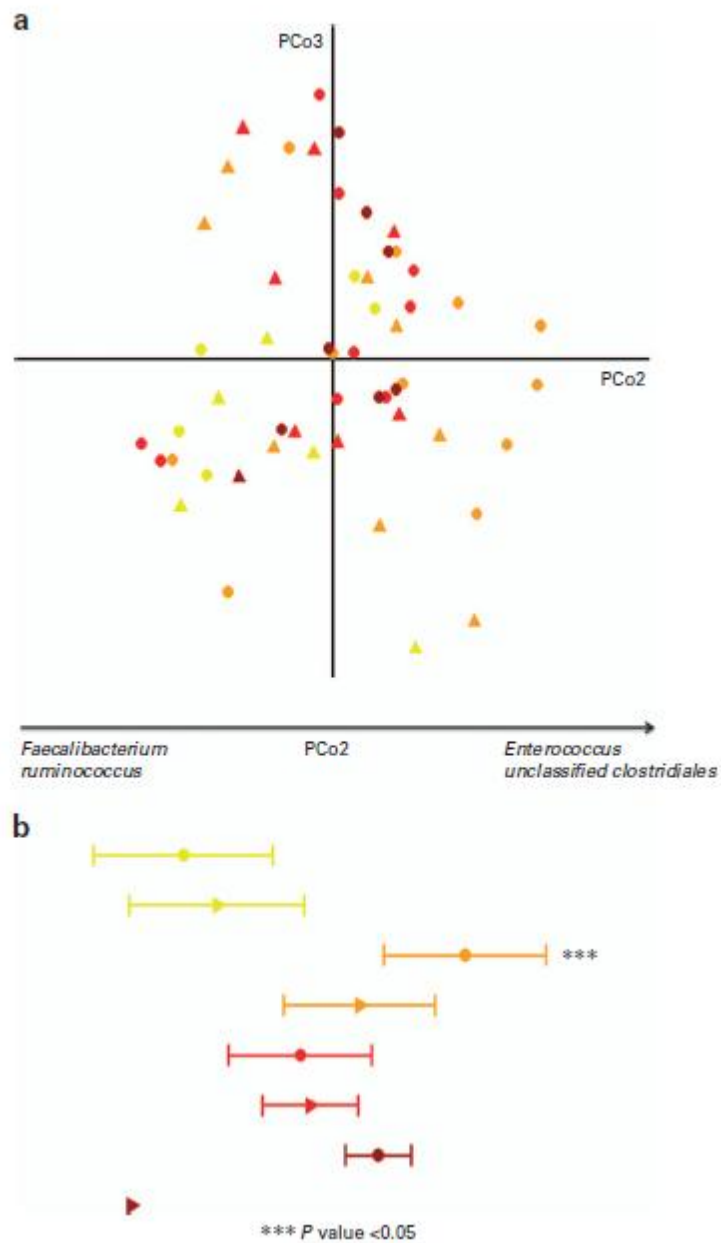
Abbreviations: aGvHD = acute GvHD; ANED = alive no evidence of disease; ATG = anti-thymocyte globulin; BDA = Blackfan-Diamond anemia, without malignancy; EDX = cyclophosphamide; F = female; Fludara = fludarabine; L-PAM = melphalan; M = male; MFD = match family donor; MUD = match unrelated donor; MMUD = mismatch unrelated donor; PHEC = extracorporeal photopheresis; PLT = platelets; TNC = total nucleated cells; TT = thiotepa.



**Figura 1.** Andamento della diversità e della variabilità dell'ecosistema intestinale. La diversità della flora intestinale, espresso come indice Chao1 (a), e come variabilità tra i soggetti (beta-diversità), espressa come distanza Unifrac non ponderata (b), sono state riportate come grafici a barre per i campioni pre-trapianto (bianco), il primo campione disponibile dopo trapianto (grigio chiaro) e gli ultimi campioni disponibili (come punto di riferimento per il recupero di ciascun paziente) (grigio scuro).



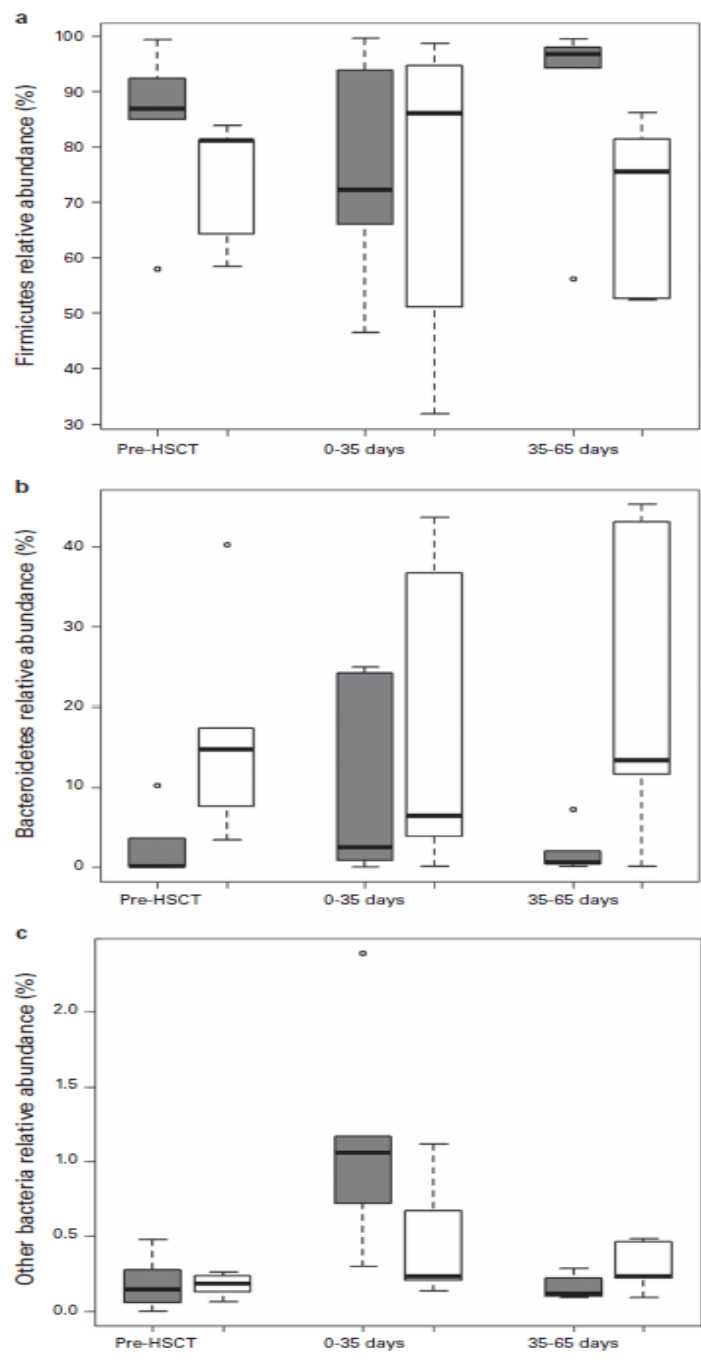
**Figura 2.** Schematizzazione del tempo di campionamento per ogni soggetto arruolato. Il giorno del trapianto (punti verdi), la diagnosi di GvHD (punti rossi) e la raccolta del campione fecale (punti neri) sono tracciati su una linea temporale, con la distanza dal trapianto espresso in giorni. Quattro intervalli di tempo sono stati definiti al fine favorire le analisi statistiche: campioni di pre-trapianto (giallo), 0-35 giorni dopo trapianto (arancione), 35-65 giorni dopo il trapianto (rosso), e >65 giorni dopo il trapianto (rosso scuro).



**Figura 3.** La struttura del MI nei pazienti con GvHD.

PCoA basata sulle distanze UniFrac calibrate del MI (a); campioni prelevati prima del trapianto (giallo), tra 0 e 35 giorni dopo il trapianto (arancione), tra 35 e 65 giorni dopo il trapianto (arancione), e >65 giorni dopo il trapianto (rosso scuro), sia per i pazienti con GvHD (cerchi) che senza GvHD (triangles). Il secondo e terzo componenti principali (pCO2 e pCO3) sono stati mostrati.

Le coordinate pCO2 per ciascun gruppo di campioni sono state indicate (B), utilizzando lo stesso codice colore. E' stata infine indicata la significatività delle differenze tra le coordinate pCO2 dei campioni prelevati nell'intervallo 0-35 giorni dopo il trapianto dei pazienti con GvHD e tutti gli altri gruppi



**Figura 4.** Dinamica temporale a livello di phylum del MI. Sono stati realizzati grafici a barre che mostrano l'abbondanza relativa di Firmicutes (a), Bacteroidetes (b) ed i batteri non assegnati (c) in tre intervalli di tempo (pre-trapianto, 0-35 giorni e 35 -65 giorni dopo trapianto) per i pazienti con (grigio) e senza GvHD (bianco).

## **Bibliografia**

1. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–8 (2005).
2. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L. & Relman, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6, e280 (2008).
3. Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D. & Knight, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35, e120 (2007).
4. Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* 15, 374–381 (2014).
5. Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Bäckhed, P. J., Samuel, B. S., et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–9 (2006).
6. Lee, Y. K. & Mazmanian, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330, 1768–73 (2010).
7. Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., et al. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J. Gastroenterol.* 20, 908–22 (2014).
8. Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G., et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6252–7 (2011).
9. Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* 159, 789–799 (2014).
10. Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–4 (2012).

11. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6 (2010).
12. Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turrone, S. & Brigidi, P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol.* 2
13. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R. & Gordon, J. I. The human microbiome project. *Nature* 449, 804–10 (2007).
14. Wixon, J. & Kell, D. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes—KEGG. *Yeast* 1, 48–55 (2000).
15. Liu, J., Wang, H., Yang, H., Zhang, Y., Wang, J., Zhao, F., et al. Composition-based classification of short metagenomic sequences elucidates the landscapes of taxonomic and functional enrichment of microorganisms. *Nucleic Acids Res.* 41, e3 (2013).
16. Davenport, C. F. & Tümmler, B. Advances in computational analysis of metagenome sequences. *Environ. Microbiol.* 15, 1–5 (2013).
17. Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814–21 (2013).
18. Culhane, A. C., Thioulouse, J., Perrière, G. & Higgins, D. G. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 21, 2789–90 (2005).
19. Kim, Y. S. & Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–30 (2010).
20. Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–16 (2012).
21. Bevins, C. L. & Salzman, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–68 (2011).
22. Johansen, F.-E. & Kaetzel, C. S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4, 598–602 (2011).



23. Shulzhenko, N., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., Gavrilova, O., et al. Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat. Med.* 17, 1585–1593 (2011).
24. Maslowski, K. M. & Mackay, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12, 5–9 (2011).
25. Brown, E. M., Sadarangani, M. & Finlay, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* 14, 660–7 (2013).
26. Neish, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136, 65–80 (2009).
27. Tilg, H. & Moschen, A. R. Mechanisms behind the link between obesity and gastrointestinal cancers. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 599–610 (2014).
28. Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–66 (2014).
29. Wu, H.-J., Ivanov, I. I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 32, 815–27 (2010).
30. Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function.
31. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–41 (2004).
32. Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 332, 974–7 (2011).
33. Zeuthen, L. H., Fink, L. N. & Frokiaer, H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123, 197–208 (2008).
34. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., et al. A functionally specialized population of mucosal

- CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–64 (2007).
35. Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–77 (2013).
  36. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–41 (2003).
  37. Hapfelmeier, S., Müller, A. J., Stecher, B., Kaiser, P., Barthel, M., Endt, K., et al. Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *J. Exp. Med.* 205, 437–50 (2008).
  38. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361–7 (2001).
  39. Smits, H. H., Engering, A., Kleij, D. van der, Jong, E. C. de, Schipper, K., Capel, T. M. M. van, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 1260–7 (2005).
  40. Nastasi, C., Candela, M., Bonefeld, C. M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci. Rep.* 5, 16148 (2015).
  41. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate
  42. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337–41 (2011).
  43. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232–6 (2013).
  44. Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Vecken, J. Van Der, Liu, H., et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455 (2013).

45. Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R. & Lin, J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr. Res.* 61, 37–41 (2007).
46. Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–6 (2009).
47. Thomson, A. W., Turnquist, H. R. & Raimondi, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 324–37 (2009).
48. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455, 808–12 (2008).
49. Araki, K., Youngblood, B. & Ahmed, R. The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol. Rev.* 235, 234–43 (2010).
50. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485–98 (2009).
51. Biagi, E., Zama, D., Nastasi, C., Consolandi, C., Fiori, J., Rampelli, S., et al. Gut microbiota trajectory in pediatric patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 1–7 (2015).doi:10.1038/bmt.2015.16
52. Holler, E., Butzhammer, P., Schmid, K., Hundsrucker, C., Koestler, J., Peter, K., et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 640–645 (2014).
53. Taur, Y., Jenq, R. R., Perales, M.-A., Littmann, E. R., Morjaria, S., Ling, L., et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2014).doi:10.1182/blood-2014-02-554725
54. Taur, Y., Xavier, J. B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gobourne, A., et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 55, 905–14 (2012).

55. Arias, C. A. & Murray, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 266–78 (2012).
56. Kinnebrew, M. A., Ubeda, C., Zenewicz, L. A., Smith, N., Flavell, R. A. & Pamer, E. G. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection. *J. Infect. Dis.* 201, 534–43 (2010).
57. Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood* 120, 223–31 (2012).
58. Lee, S. M., Donaldson, G. P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K. & Mazmanian, S. K. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature* 501, 426–9 (2013).
59. Fischbach, M. A. & Sonnenburg, J. L. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe* 10, 336–47 (2011).
60. Zwieler, J., Lassi, C., Hippe, B., Pointner, A., Switzeny, O. J., Remely, M., et al. Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* 6, e28654 (2011).
61. Weber, D., Oefner, P. J., Hiergeist, a., Koestler, J., Gessner, a., Weber, M., et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after ASCT reflect a disrupted mic
62. Jenq, R. R., Ubeda, C., Taur, Y., Menezes, C. C., Khanin, R., Dudakov, J. a, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 209, 903–11 (2012).
63. Heimesaat, M. M., Nogai, A., Bereswill, S., Plickert, R., Fischer, A., Loddenkemper, C., et al. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* 59, 1079–87 (2010).
64. Gerbitz, A., Schultz, M., Wilke, A., Linde, H. J., Schölmerich, J., Andreesen, R., et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: Let them eat yogurt. *Blood* 103, 4365–4367 (2004).
65. Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–50 (2013).

66. Jenq, R. R., Taur, Y., Devlin, S. M., Ponce, D. M., Goldberg, J. D., Ahr, K. F., et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 1373–1383 (2015).
67. Junghanss, C., Marr, K. A., Carter, R. A., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Maloney, D. G., et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 8, 512–20 (2002).
68. Blijlevens, N. M., Donnelly, J. P. & Pauw, B. E. De Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant.* 25, 1269–78 (2000).
69. Vliet, M. J. van, Harmsen, H. J. M., Bont, E. S. J. M. de & Tissing, W. J. E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog.* 6, e1000879 (2010).
70. Castagnola, E., Bagnasco, F., Bandettini, R., Caviglia, I., Morreale, G., Lanino, E., et al. Role of acute graft-versus-host disease in the risk of bacteremia and invasive fungal disease after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in children. Results from a single-center observational study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 1068–73 (2014).
71. Almyroudis, N. G., Fuller, A., Jakubowski, A., Sepkowitz, K., Jaffe, D., Small, T. N., et al. Pre- and post-engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 7, 11–7 (2005).
72. Weinstock, D. M., Conlon, M., Iovino, C., Aubrey, T., Gudiol, C., Riedel, E., et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 615–21 (2007).
73. Stiefel, U. & Donskey, C. J. The Role of the Intestinal Tract As a Source for Transmission of Nosocomial Pathogens. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6, 420–425 (2004).
74. Kamboj, M., Chung, D., Seo, S. K., Pamer, E. G., Sepkowitz, K. A., Jakubowski, A. A., et al. The changing epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell

- transplant (HSCT) recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 1576–81 (2010).
75. Donskey, C. J., Chowdhry, T. K., Hecker, M. T., Huyen, C. K., Hanrahan, J. A., Hujer, A. M., et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N. Engl. J. Med.* 343, 1925–32 (2000).
76. Pultz, N. J., Stiefel, U., Subramanian, S., Helfand, M. S. & Donskey, C. J. Mechanisms by which anaerobic microbiota inhibit the establishment in mice of intestinal colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J. Infect. Dis.* 191, 949–56 (2005).
77. Bucaneve, G., Micozzi, A., Menichetti, F., Martino, P., Dionisi, M. S., Martinelli, G., et al. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 353, 977–87 (2005).
78. Ferrara, J. L. M., Harris, A. C., Greenson, J. K., Braun, T. M., Holler, E., Teshima, T., et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118, 6702–8 (2011).
79. Khoruts, A., Dicksved, J., Jansson, J. K. & Sadowsky, M. J. Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* 44, 354–60
80. Castro, C. G. de, Ganc, A. J., Ganc, R. L., Petrolli, M. S. & Hamerschlack, N. Fecal microbiota transplant after hematopoietic SCT: report of a successful case. *Bone Marrow Transplant.* 50, 145 (2015).
81. Neemann, K., Eichele, D. D., Smith, P. W., Bociak, R., Akhtari, M. & Freifeld, A. Fecal microbiota transplantation for fulminant *Clostridium difficile* infection in an allogeneic stem cell transplant patient. *Transpl. Infect. Dis.* 14, E161–5 (2012).
82. David, L. a, Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–63 (2014).
83. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15718–15723.
84. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336: 1262–1267.

85. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 397–403.
86. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011; 469: 543–547.
87. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, Gendler SJ, Velcich A, Lundberg JO et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G327–G333.
88. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65.
89. Candela M, Biagi E, Turrone S, Maccaferri S, Figini P, Brigidi P. Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol* 2013; 9: 1–7.
90. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL et al. The long term stability of the human gut microbiota. *Science* 2013; 341: 1237439.
91. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550–1561.
92. Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of haematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl* 2010, 87–105.
93. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 443–458.
94. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 401–404.
95. Tawara I, Liu C, Tamaki H, Toubai T, Sun Y, Evers R et al. Influence of donor microbiota on the severity of experimental graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19: 164–168.

96. Saral R, Burns WH, Laskin OL, Santos GW, Lietman PS. Acyclovir prophylaxis of herpes-simplex-virus infections. *N Engl J Med* 1981; 305: 63–67.
97. Goodman J, Winston DJ, Greenfield RA, Chandrasekar PH, Fox B, Kaizer H et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1992; 326: 845–851.
98. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18: 295–304.
99. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA et al. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods* 2010; 81: 127–134.
100. Centanni M, Turrone S, Consolandi C, Rampelli S, Peano C, Severgnini M et al. The enterocyte-associated intestinal microbiota of breast-fed infants and adults responds differently to a TNF- $\alpha$ -mediated pro-inflammatory stimulus. *PLoS ONE* 2013; 8: e81762.
101. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 2014; 5: 3654.
102. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489: 242–249.
103. Dignan FL, Potter MN, Ethell ME, Taylor M, Lewis L, Brennan J et al. High readmission rates are associated with a significant economic burden and poor outcome in patients with grade III/IV acute GvHD. *Clin Transplant* 2013; 27: E56–E63.