



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

4° Corso di formazione avanzata

Il futuro delle biotecnologie mediche

23 - 27 gennaio 2006, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

4° Corso di formazione avanzata

**Il futuro delle biotecnologie
mediche**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

4° Corso di formazione avanzata

Il futuro delle biotecnologie mediche

23-27 gennaio 2006, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2006  EDIMS
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag. VII
<i>Carlo Bernasconi</i>	

Citometria a flusso: stato dell'arte e prospettive

1. Conoscenze di base	»	3
<i>Giuliano Mazzini</i>		
2. L'analisi del DNA in citometria a flusso nei tumori solidi	»	9
<i>Bianca Rovati, Marco Danova</i>		
3. Analisi dell'immunofenotipo nelle emopatie maligne	»	18
<i>Guido Pagnucco, Raffaella Lo Verso, Vincenza Tortorici, Francesco Gervasi</i>		
4. Utilizzo di tecniche citofluorimetriche per lo studio dell'ontogenesi e differenziazione dei linfociti T e B	»	27
<i>Rita Maccario</i>		
5. Nuove tecniche di separazione cellulare	»	31
<i>Giuliano Mazzini</i>		

Dalla citogenetica alla genetica molecolare

6. Citogenetica convenzionale in oncoematologia	»	41
<i>Nicoletta Testoni</i>		
7. FISH: vantaggi e svantaggi	»	47
<i>Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Silvia Calatroni, Ilaria Giardini, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Irene Dambruoso, Marilena Caresana</i>		
8. Spectral karyotyping, multicolor FISH e comparative genomic hybridization (CGH): vantaggi e limiti	»	58
<i>Cristina Mecucci</i>		
9. Molecular identification of chromosomal translocations in leukemias	»	62
<i>Giovanni Martinelli, Pier Paolo Piccaluga, Michele Malagola, Michela Rondoni, Stefania Paolini, Cristina Papayannidis</i>		

Gene expression profiling e proteomica

10. Necessità della biologia molecolare nella moderna medicina	»	75
<i>Giuseppe Saglio, Stefano Ulisciani</i>		
11. Gene expression profiling: principi e applicazioni in ematologia	»	78
<i>Sergio Ferrari</i>		

12. Proteomica clinica: realtà e prospettive » 85
Giampaolo Merlini
13. Proteomica in oncologia » 87
*L. Bini, L. Bianchi, R. Cianti, D. Perini, A. Armini, M. Verani,
 C. Tani, V. Pallini*
14. Clinical proteomics and biomarker discovery » 99
William Clarke

Manipolazioni cellulari e scopo terapeutico

15. Espansione ex-vivo di cellule staminali emopoietiche » 105
P. Rebutta, L. Lazzari, T. Montemurro, R. Giordano
16. Generazione e caratterizzazione funzionale » 112
 delle cellule dendritiche
Francesco Fagnoni
17. Approcci di terapia cellulare adottiva per sostenere » 121
 la ricostituzione immunologica in pazienti immunocompromessi
Rita Maccario
18. Cellule staminali mesenchimali: caratterizzazione biologica » 128
 e prospettive di applicazione clinica
Carlo Bernasconi
19. Dal laboratorio alla clinica: aspetti normativi » 139
 per una terapia cellulare
Francesco Fagnoni
20. Bone marrow cell transdifferentiation: the controversy » 141
Annarosa Leri, Jan Kajstura, Piero Anversa

Tecnica del *nuclear transfer* (NT) e sue applicazioni

21. La tecnica del *nuclear transfer* (NT) e le sue applicazioni » 147
Carlo Alberto Redi
22. Biotecnologie del *nuclear transfer* e clonazione riproduttiva » 148
Maurizio Zuccotti, Silvia Garagna, Carlo Alberto Redi

Prefazione

Il Corso teorico-pratico di formazione avanzata “Il futuro delle biotecnologie mediche”, organizzato dal Collegio Ghislieri, comporta lo svolgimento di lezioni teoriche al mattino e di esercitazioni pratiche al pomeriggio. La didattica è impostata in modo da prevedere la possibilità di una proficua discussione fra docenti e discenti. Inoltre, la residenzialità di una settimana può essere l’occasione per impostare programmi di studio e possibili collaborazioni future.

Le biotecnologie prese in considerazione sono: la citometria a flusso, la citogenetica e la genetica molecolare, il *gene expression profiling* e la proteomica, le manipolazioni cellulari a scopo terapeutico, la tecnica del *nuclear transfer* e le sue applicazioni. Per ciascuna di queste tecniche durante le lezioni teoriche del mattino vengono fornite le conoscenze di base, le informazioni sulle applicazioni oggi di più frequente impiego, le indicazioni su possibili applicazioni future. Le esercitazioni pratiche del pomeriggio, con partecipazione organizzata in piccoli gruppi, vengono svolte presso strutture particolarmente qualificate: il Laboratorio di Istochimica e Citometria dell’Istituto di Genetica Molecolare del CNR, il Laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare Ematologica dell’IRCCS Policlinico San Matteo, i Laboratori di Biotecnologie e Centro per lo Studio delle Amiloidosi dell’IRCCS Policlinico San Matteo, il Laboratorio di Oncologia Sperimentale della Fondazione Maugeri - IRCCS Clinica del Lavoro, il Laboratorio di Biologia dello Sviluppo dell’Università di Pavia.

Questo corso teorico-pratico si prefigge quindi di fornire ai partecipanti le più aggiornate informazioni sulle biotecnologie prese in esame, per quanto riguarda sia le basi fondamentali dell’impostazione teorica, sia le modalità principali dell’esecuzione tecnica. Inoltre, per completare la visione generale con cui deve essere considerato il futuro di tali metodologie, sono programmate alcune letture magistrali per focalizzare importanti argomenti: “Linfociti memoria e immunità a lungo termine” (Prof. A. Lanzavecchia, Bellinzona), “Necessità della biologia molecolare nella moderna medicina (Prof. G. Saglio, Torino), “*Clinical proteomics and biomarker discovery*” (Prof. W. Clarke, Baltimore), “*Adult stem cells for myocardial regeneration*” (Prof. P. Anversa, Valhalla-New York).

Ringrazio i Colleghi che hanno accolto il mio caloroso invito e rivolgo un benvenuto in Collegio a tutti i partecipanti.

Carlo Bernasconi

Pavia, 23 gennaio 2006

**CITOMETRIA A FLUSSO:
STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE**

Conoscenze di base

Giuliano Mazzini

Istituto di Genetica Molecolare del CNR, Sezione di Istochimica e Citometria, Pavia

Cenni di “strumentazione”

Con il termine di “citometria a flusso” si identifica una metodica di analisi cellulare basata sull’impiego di strumentazione in grado di misurare quantitativamente parametri di varia natura (fisici, citochimici ed immunocitochimici) direttamente da sospensioni cellulari. È una tecnica relativamente recente in quanto, se da una parte la strumentazione è diffusa commercialmente da oltre vent’anni, i primi risultati sperimentali, datano intorno al 1955. Negli anni appunto dal 50 al 70 vi è stata un’intensa attività di ricerca internazionale nel campo dell’analisi cellulare automatizzata. Tale obiettivo venne perseguito attraverso due strade, ovvero con: a) sistemi in grado di analizzare rapidamente i normali preparati strisciati e colorati su vetrino, b) sistemi in grado di analizzare le cellule direttamente in sospensione in un liquido.

La prima ha portato alla realizzazione di strumentazione basata sull’impiego di microscopi equipaggiati con telecamera collegata ad un sistema computerizzato per l’analisi delle immagini (in origine definita anche Citometria Statica).

La seconda ha portato invece alla realizzazione, in un primo tempo della strumentazione per il conteggio cellulare (“Contaglobuli” o Contatori Cellulari ovunque utilizzati routinariamente nei laboratori clinici) e, successivamente, di quella per citometria a flusso (CF).

Schematicamente un citometro a flusso è costituito da un circuito idrico (acqua o soluzioni saline) e da uno di gas (azoto o aria in pressione o depressione a seconda del principio di funzionamento) ai quali è affidato il compito di trasportare ed allineare individualmente le cellule nel punto di misura. Qui le cellule, opportunamente eccitate, emettono impulsi di luce che, tradotti in impulsi elettrici dal rivelatore, sono poi digitalizzati ed analizzati dal sistema di acquisizione dati collegato con il citometro. La strumentazione attuale utilizza computers di varia potenza, collegati con il sistema di acquisizione dati, ovvero direttamente con lo strumento di misura. La maggior parte della strumentazione oggi in commercio utilizza il principio del “flusso laminare” (alcuni strumenti di ultimissima generazione operano anche senza liquido di trascinamento, ovvero per iniezione diretta del campione nel punto di analisi) per fare fluire in modo estremamente preci-

so le cellule nello stesso punto di misura. In pratica la sospensione cellulare da analizzare immediatamente prima del punto di misura, si trova in forma di sottilissima vena liquida all'interno di un'altra molto più grande costituita dal fluido di trasporto. Variando la pressione del liquido di trasporto è possibile variare la sezione della vena liquida del campione. Agendo quindi sia sulla pressione che regola il liquido di trasporto, sia su quella di alimentazione del campione ed anche sulla concentrazione di cellule nel campione stesso, si può ottenere il passaggio sequenziale ed individuale delle cellule nel punto ove verranno eccitate ed analizzate.

Nel punto di misura il passaggio della cellula che intercetta il fascio di luce di eccitazione genera diversi segnali ottici dipendenti dal tipo di sorgente di eccitazione e dai trattamenti che ha subito il campione. Le sorgenti di eccitazione possono essere di due tipi: 1) laser di vario tipo e potenza (oggi anche in versione compatta a "stato solido) in grado di fornire luce monocromatica e coerente, anche di notevole intensità, specialmente in alcune regioni spettrali del visibile; 2) lampade a vapori di mercurio o di xenon che, abbinate ad opportuni filtri, consentono di ottenere luce monocromatica praticamente dall'ultravioletto al rosso. Quando la cellula interseca il fascio di luce incidente, possono verificarsi i seguenti fenomeni: a) diffusione della luce incidente (light scattering), b) assorbimento; c) fluorescenza. Il "light scattering" è un fenomeno relativamente complesso: è originato principalmente da riflessione e rifrazione della luce incidente sulla cellula, nel momento in cui essa attraversa il fascio di luce. Sostanzialmente la sua intensità è funzione delle dimensioni e della forma della cellula, nonché della quantità e struttura dei componenti subcellulari. La sua valutazione fornisce quindi informazioni di tipo morfometrico-strutturale (in termini semiquantitativi). Molti strumenti a flusso consentono di misurare due tipi di "scatter": uno misurato con sensore a 90° (chiamato "side scatter") ed uno a pochi gradi ("forward scatter") rispetto al raggio di eccitazione. Il primo è più strettamente correlabile alle strutture interne alla cellula ed alla morfologia di superficie; il secondo dipende invece principalmente dalle dimensioni della cellula stessa.

Per quanto riguarda l'assorbimento è da precisare che questo non è strettamente quantitativo infatti, essendo il fascio di luce incidente sulla cellula, più grande di questa, la misura non è in accordo con la legge di Lambert Beer. Si ricava comunque un valore di assorbimento approssimato misurando la diminuzione di intensità del raggio dopo che questo ha attraversato la cellula. La scarsa applicabilità pratica di questo parametro ne ha determinato la sua scomparsa nella strumentazione recente.

Fra i parametri misurabili mediante citometria a flusso, la fluorescenza è sicuramente il più importante e largamente utilizzato per la gran parte delle applicazioni. Le cellule del campione in esame vengono trattate con procedimenti sia citochimici (es analisi del contenuto di DNA, proteine totali, ecc) che immuno-citochimici (tutte le marcature di immunofluorescenza sia di superficie che intracellulari) allo scopo di "marcare", con opportuni fluorocromi, i componenti cellulari da determinare quantitativamente. Quando nel punto di misura la cellula interseca il raggio di eccitazione, le molecole del fluorocromo, una volta eccitate,

emettono luce fluorescente di determinata lunghezza d'onda, comunque superiore a quella della luce incidente. Un sistema di filtri provvede ad eliminare la luce di eccitazione dal canale di misura mantenendo invece quella di fluorescenza.

In generale possono essere misurate, con differenti fotomoltiplicatori, varie bande spettrali di fluorescenza, derivanti da altrettanti fluorocromi specificamente legati a componenti cellulari.

È quindi possibile effettuare analisi multiparametriche misurando fluorescenza e "scatter", o più fluorescenze, contemporaneamente dalla stessa cellula. Il numero totale di parametri misurabili dipende ovviamente dalla associazione di metodiche di marcatura utilizzate e altrettanto ovviamente dal tipo di strumento disponibile. Per quanto riguarda quest'ultimo oggi le prestazioni analitiche degli strumenti più sofisticati (e ovviamente più costosi) possono arrivare a oltre 10 parametri.

Per quanto riguarda la citochimica in fluorescenza, i primi metodi utilizzati erano o derivavano direttamente da alcune classiche metodiche citofluorimetriche; successivamente, numerosi altri sono stati sviluppati appositamente per l'impiego in CF. La determinazione del contenuto di DNA ed RNA contemporaneamente sulla stessa cellula, mediante l'impiego di arancio di acridina, è stata fra le prime metodiche impiegate a flusso. Negli anni 70-80 vi è stato un grande apporto metodologico derivante dalla trasformazione della reazione di Feulgen originale in nuove metodiche, basate sullo stesso principio, ma con differenti rivelatori di fluorescenza (i cosiddetti derivati di Schiff fluorescenti). Uno sviluppo notevole alla determinazione quantitativa del DNA è stato introdotto dallo studio e dall'applicazione delle metodiche di intercalazione. Alcuni di questi metodi appositamente messi a punto sono quelli oggi largamente impiegati nelle metodiche a flusso. I derivati fenantridinici bromuro di etidio e ioduro di propidio (IP) presentano caratteristiche particolarmente favorevoli al loro impiego a flusso. Questi quando si trovano in soluzione, sono debolmente fluorescenti mentre diventano notevolmente fluorescenti se intercalati nella struttura degli acidi nucleici. Ne deriva che le sospensioni cellulari in esame possono essere analizzate direttamente nel colorante. Ovviamente è quasi sempre necessario procedere ad un trattamento per eliminare l'RNA che nella conformazione a doppia elica è in grado di interferire nella misura quantitativa del DNA.

Altri fluorocromi utilizzabili sono ad esempio: la cromomicina, che come l'olivomicina e la mitramicina è un antibiotico fluorescente, ed ha affinità specifica per la doppia elica del DNA con preferenza per la coppia di basi G-C; il DAPI invece lega anch'esso specificamente il DNA a doppia elica, ma con preferenza per le coppie di basi A-T. Importante è una "famiglia" di fluorocromi denominati Hoechst che, spettralmente simili al DAPI (ovvero con eccitazione in UV ed emissione bianco-azzurra), possono anche marcare il DNA in condizioni "sopravitali" (HO33342). Ancor più recentemente sono diventati disponibili numerosi altri fluorocromi per il DNA con nomi e sigle fantasiose (per tutti cito il catalogo "Molecular Probes" che merita la citazione in ragione della completezza delle informazioni inclusi gli spettri di eccitazione ed emissione che sono fondamentali per chi vuole "lavorare in fluorescenza" in modo corretto).

Applicazioni della citometria a flusso

Come è già stato accennato la nascita della strumentazione è stata certamente stimolata dalle esigenze di determinazione quantitativa del DNA, cui già negli anni 50-60 si attribuiva grande interesse, per studi di proliferazione cellulare, soprattutto ovviamente per le ricadute di questa, nel campo delle problematiche oncologiche.

Di fatto le cose negli anni successivi andarono in modo diverso. È certamente vero che le prime applicazioni della CF furono in effetti mirate al DNA ma il successivo avvento delle emergenti tecniche di immunofluorescenza e la contemporanea disponibilità degli anticorpi monoclonali orientarono in modo completamente differente lo sviluppo della CF negli anni ottanta. Fu la vera e propria esplosione delle tecniche di immunofenotipizzazione a condizionare la grandissima diffusione della strumentazione che divenne poi rapidamente tecnica routinaria in molti laboratori clinici. Il successo (anche commerciale dei costruttori) fu proprio largamente condizionato da questa specifica applicazione ovvero dall'assetto recettoriale della superficie cellulare (e segnatamente di quella dei linfociti). Diremmo oggi che la CF è tecnica analitica di elezione, ancorché insostituibile, per queste problematiche analitiche che si sono poi ulteriormente specializzate nei vari campi di applicazione: dallo studio dell'immunodeficienza (AIDS) all'oncoematologia alla trapiantologia e caratterizzazione di cellule staminali fino alle attuali terapie cellulari. Di immunofenotipo e di applicazioni cliniche altri autorevoli amici e colleghi avranno l'opportunità di illustrare la situazione attuale e le problematiche ancora aperte, nonché le ulteriori prospettive di impiego.

Prima di iniziare il capitolo specifico dell'analisi del DNA (argomento che ha visto impegnata l'attività del mio laboratorio di questi ultimi vent'anni), per dovere di completezza didattica, mi corre l'obbligo di ricordare che in questi ultimi anni le tecniche di CF stanno incontrando grandi consensi in campi "non clinici": quali ad esempio quelli dell'analisi di alghe e batteri, per problematiche di idrobiologia di acque sia marine che interne. Analogamente la CF sta diventando importante in settori quali il controllo biologico ambientale, il monitoraggio dei processi di fermentazione dei depuratori ed il controllo biologico delle acque reflue. Ancora sulla base di analisi microbiologiche, cito lo sviluppo in campo industriale, per il controllo automatizzato di vari processi fermentativi nel settore agro-alimentare.

Il contenuto di DNA e la proliferazione cellulare

Come già accennato, una parte significativa delle applicazioni della CF si basa sulla determinazione del contenuto di DNA. Questo tipo di analisi è infatti alla base di molte ricerche inerenti la proliferazione cellulare sia normale che neoplastica. Il risultato di questa analisi è rappresentato dall'istogramma dei contenuti di DNA delle cellule analizzate.

Da questo si possono ottenere due differenti informazioni:

- a) presenza di anomalie del contenuto di DNA (aneuploidia citometrica);
- b) alterata distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. Se si tiene conto che in un tessuto proliferante ogni cellula ha un contenuto di DNA differen-

te e comunque prevedibile, a seconda della fase del ciclo cellulare in cui si trova, e che le cellule normali hanno contenuto di DNA basale euploide (2c), (dipendente dal tipo e dal numero di cromosomi propri di ogni specie), mentre le cellule neoplastiche hanno spesso contenuto aneuploide, risulta evidente l'importanza della CF del DNA nel campo della proliferazione cellulare e della patologia neoplastica. Tuttavia ancora oggi esistono alcune difficoltà interpretative dei risultati, soprattutto nel caso di analisi di tumori solidi, sia per quanto riguarda gli aspetti relativi alle anomalie di contenuto sia per gli studi di proliferazione. Tenendo presente che la replicazione cellulare è schematizzata nel concetto di ciclo cellulare possiamo suddividere la vita della cellula in tre fasi: G1, S e G2M, dove S è la fase in cui il DNA è sintetizzato. In realtà molte cellule (nei tessuti normalmente proliferanti e soprattutto nei tumori) si trovano in una situazione quiescente denominata G0 ed entrano in ciclo, appunto attraverso la fase G1, solo in seguito a determinati "stimoli proliferativi". Se i metodi di colorazione ed i citofluorimetri fossero perfetti, si otterrebbero delle curve di distribuzione (istogrammi di DNA) altrettanto perfette, ed in questo caso sarebbe semplice identificare le singole fasi quantitativamente. Sfortunatamente le procedure (sia di colorazione che di analisi) sono intrinsecamente non-perfette e quindi si ottengono distribuzioni di DNA in cui le varie frazioni teoriche G0/1, S e G2M sono fra loro più o meno sovrapposte. Risulta quindi difficile calcolare in modo semplice e preciso qual'è la reale percentuale di cellule nelle sopramenzionate fasi del ciclo cellulare. Da qui la necessità di disporre di più o meno sofisticati algoritmi di calcolo che siano in grado di analizzare automaticamente le curve di distribuzione del DNA per fornire i numeri di cui sopra. Tutti gli strumenti oggi disponibili commercialmente sono equipaggiati con programmi di calcolo dedicati ed altri "software" di elaborazione sono disponibili in rete. Con il tipo di risultati ottenibili nella citometria a flusso, dove il coefficiente di variazione della misura del DNA ($CV = \text{deviazione standard di G1} / \text{media}$) oscilla tra il 2-10%, è matematicamente difficile separare la fase S dai picchi G1 e G2M. La difficoltà cresce all'aumentare del CV. Sono stati elaborati diversi modelli matematici nel tentativo di misurare separatamente le diverse fasi.

Molti modelli si sono dimostrati adatti nel caso di cellule in accrescimento asincrono, specialmente quando il CV è dell'ordine del 2-4%. Al contrario questi metodi possono portare a compiere grossolani errori di valutazione numerica quando si prendono in esame distribuzioni "perturbate" del DNA, con un elevato numero di cellule nella prima o nell'ultima parte della fase S. Le difficoltà che si sono incontrate nella determinazione del valore reale della fase S hanno portato a ricercare nuove soluzioni per poter ottenere un dato più significativo.

Fra le soluzioni proposte una delle più importanti riguarda l'analisi biparametrica DNA/Bromodesossipuridina (BrdU).

La BrdU, quale analogo della timidina viene incorporata dalle cellule proliferanti. Questa sostanza oltre che "in vitro" può essere somministrata a pazienti "in vivo" ed essere quindi utilizzata direttamente a livello clinico. (Marco Danova ne fu pioniere nell'utilizzarla a Pavia ed alla sua relazione rimando per più approfondite nozioni) Fino a qualche anno fa l'unico approccio disponibile per valuta-

re l'indice di marcatura era la timidina triziata ($^3\text{H}+\text{Tth}$) associata alla autoradiografia. Oggi con le restrizioni all'uso dei composti radiomarcati queste tecniche sono praticamente scomparse.

Recentemente lo sviluppo di un anticorpo monoclonale anti-BrdU ha offerto l'opportunità di valutare "in vivo" la cinetica proliferativa anche in tumori umani. La procedura è rapida e consente di determinare oltre al labelling index (LI), ovvero la frazione di cellule in S, realmente proliferanti, rispetto alle cellule totali, anche altri parametri cinetici fondamentali quali il tempo di sintesi (T_s) e il tempo potenziale di raddoppiamento della massa neoplastica (T_{pot}).

Questi sono parametri che consentono di ottenere informazioni sulla reale dinamica della proliferazione cellulare. Anche se, come per l'analisi del DNA a singolo parametro, la metodica è più facilmente applicabile ai tumori ematologici, trova ormai ampio impiego anche per lo studio della cinetica proliferativa dei tumori solidi.

Molti lavori di vari gruppi di studio (fra cui appunto quelli nostri di Pavia) testimoniano la valenza di questi studi che comunque, per ragioni etiche, sono stati circoscritti solo a determinati pazienti oncologici. Nonostante la diffusione dell'analisi del DNA da un lato e delle metodiche con BrdU dall'altro, molto rimane da fare per migliorare la significatività clinica di questi dati. La complessità biologica della neoplasia richiede infatti sempre più la necessità di utilizzare più parametri contemporaneamente, per selezionare le cellule "interessanti", sulla base di parametri fenotipici che sappiano mirare sempre più specificamente alla cellula tumorale.

E, ancora a livello metodologico, è importante sottolineare che un altro "cambio di indirizzo" importante della citometria, per la caratterizzazione delle patologie neoplastiche, è lo studio della "morte cellulare" correlato ai dati classici di proliferazione. In questo senso oggi in molti laboratori, accanto all'analisi del DNA, è diventata routine la marcatura e quindi l'analisi delle cellule apoptotiche. La ricerca metodologica sta facendo in questi anni per l'apoptosi quello che vent'anni addietro si faceva per il DNA, ovvero la continua messa a punto di nuova metodologia, per studiare in dettaglio questo tipo di morte cellulare. È infatti grazie all'analisi multiparametrica, in grado di fornire informazioni sia sulla proliferazione che sulla morte cellulare, che sono basati i più moderni studi di nuovi farmaci e la conoscenza della loro reale efficacia verso le cellule tumorali.

Bibliografia

1. "Flow Cytometry and Sorting", M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L. Mendelson. Wiley-Liss 1991.
2. "Practical Flow Cytometry", H.M. Shapiro. Alan R. Liss, Inc 1988.
3. "Flow cytometry: Instrumentation and data analysis". VAN DILLA M.A, DEAN P.N, LAERUM O.D, MELAMED M.R. Academic Press, London; 1985.
4. "Citometria a flusso: applicazioni cliniche dell'analisi del DNA in Oncologia". Collana "I manuali delle scuole"; MAZZINI G., DANOVA M Manuale Ph.D.08. Ed. Scuola Superiore Oncologia e Scienze biomediche. Genova, 1995.
5. "Citometria a Flusso". Manuale GIC della Società Italiana di Citometria (2002).

L'analisi del DNA in citometria a flusso nei tumori solidi

Bianca Rovati, Marco Danova

Divisione di Oncologia Medica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

La citometria a flusso è una tecnica di misura complessa, a cui afferiscono utenti con un diverso background scientifico. Essa rappresenta ormai uno strumento di indagine corrente in numerosi campi di applicazione, che vanno dalla biologia di base alla diagnostica clinica, dall'ematologia all'oncologia e all'immunologia, dalla biologia vegetale alle scienze dell'ambiente.

Gli sforzi dell'industria citometrica, sono oggi rivolti essenzialmente all'automazione e all'integrazione laboratoristica: accensione, spegnimento e funzioni di allineamento automatiche, preparazione autonoma dei campioni per incrementare la velocità e rendere la tecnologia più accessibile a qualsivoglia utente, adottando ad esempio, nuovi fluorocromi e metodiche innovative di screening al fine di estendere l'applicazione anche all'ambito dei proteomi. Inoltre, software avanzati, collegamento in rete di più strumenti, comprensivi di sistemi diagnostici e analitici consentono di coniugare la tecnologia della microfluidica con quella delle immagini.

Storicamente, l'analisi del contenuto di DNA ha suscitato particolare interesse nei citometristi sia nel campo della ricerca di base che in quello delle potenziali applicazioni cliniche in campo oncologico.

Di seguito vengono tratteggiati alcuni dei più importanti aspetti tecnico-metodologici relativi a questo tipo di analisi citofluorimetrica e, alla luce dei dati oggi disponibili, vengono brevemente riassunti i dati circa le sue possibili applicazioni cliniche in oncologia. Ulteriori approfondimenti e informazioni pratiche relative alla tematica trattata possono essere reperite sul sito Internet della Società Italiana di Citometria, GIC: <http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/>

Generalità sull'analisi del DNA

Per misurare il DNA in citometria a flusso, è necessario per prima cosa colorare ossia farlo reagire con una sostanza fluorescente (fluorocromo).

I fluorocromi per il DNA sono diversi da quelli usati per coniugare gli anticorpi, ed evidenziano una maggiore fluorescenza quando sono diretti verso le loro molecole target. Il legame DNA-colorante non è così forte come il legame antigene –

anticorpo e di conseguenza, il fluorocromo coniugato è in equilibrio con quello libero in soluzione.

Pertanto, cambiamenti della concentrazione del colorante o della diluizione del campione, per esempio, possono influenzare l'intensità di fluorescenza del DNA a causa del mutamento dell'equilibrio interno. Per queste ragioni, l'allestimento dei campioni di DNA, non prevede lavaggi per rimuovere il colorante non legato, onde evitare di alterare l'equilibrio della reazione stessa. Fortunatamente i coloranti non legati sono scarsamente fluorescenti, quindi la fluorescenza di "fondo" (background) è molto ridotta.

Il DNA, normalmente, viene identificato mediante fluorocromi che vanno ad intercalarsi tra le basi che costituiscono la doppia elica degli acidi nucleici.

La caratteristica fondamentale dei coloranti per il DNA è che essi si legano stechiometricamente, ovvero la media del numero di molecole di fluorocromo legate al DNA, è equivalente al numero di molecole di DNA presente. Di conseguenza, la quantità di luce emessa, è proporzionale alla quantità di colorante legato. Da qui si ricava la misura del contenuto di DNA.

Generalmente i coloranti per il DNA appartengono ad una famiglia di composti chimici conosciuti come fenantridine (ioduro di propidio e bromuro di etidio). Il loro spettro di eccitazione è nell'ultravioletto o nel blue e quello di emissione nel rosso.

Nella Tabella 1 sono riportate le proprietà di alcuni dei coloranti usati più comunemente per l'analisi del DNA (1).

Tabella 1

Colorante	Eccitazione	Emissione
Propidio Ioduro	536 nm (488 nm. laser)	623 nm
DAPI	359 nm (UV / laser)	461 nm
DRAQ5	650 nm (488 nm o 633nm .laser)	680 nm
Hoescht	346 nm (UV / laser)	460 nm

Terminologia

Per effettuare la misura del DNA è necessario fondamentalmente acquisire familiarità con alcuni termini impiegati comunemente nel corso dell'analisi stessa.

Ciclo cellulare

Il ciclo cellulare, è generalmente suddiviso dai citometristi in 3 componenti la fase G0-G1, la fase S e la fase G2M. Nel linguaggio corrente G0 è la fase in cui la cellula è quiescente; G1 è la fase in cui la cellula è attivata a proliferare prima di dar inizio alla sintesi vera e propria. In entrambe le fasi la cellula ha contenuto di DNA diploide (2n) e queste non sono distinguibili l'una dall'altra mediante la sola colorazione del DNA ed una sua analisi monoparametrica. La fase S è quella in cui avviene la sintesi delle proteine e dove il contenuto di DNA rad-

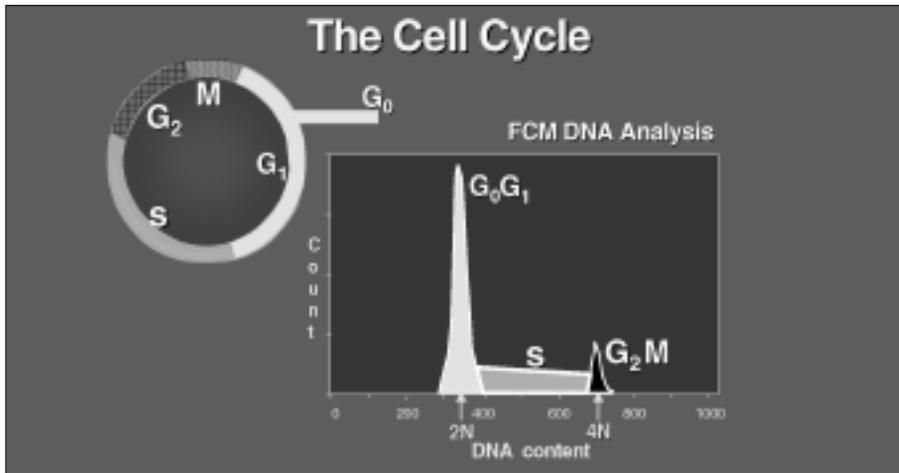


Fig. 1

doppia. Le fasi G₂-M hanno contenuto di DNA tetraploide (4n), precisamente appena prima e durante la mitosi rispettivamente. Anche queste due fasi non sono distinguibili l'una dall'altra citometricamente con analisi monoparametrica.

L'istogramma derivante da una analisi a singolo parametro, evidenzia l'intensità fluorescenza in scala lineare sull'asse x e il numero di eventi sull'asse y (Figura 1).

Ploidia citofluorimetrica

Per la misura del contenuto di DNA si sceglie il parametro lineare per la fluorescenza; questo permette di determinare la lettura del valore del cosiddetto DNA index, calcolato come rapporto tra il canale medio del picco G₀-G₁ della popolazione in esame e il canale medio del picco G₀-G₁ di un campione a contenuto di DNA diploide, utilizzato come standard

Il citometrista suole definire i differenti gradi di ploidia cellulare nel modo seguente:

- 1) Diploide: numero normale (euploide) di cromosomi;
- 2) Aploide: la metà del numero normale di cromosomi, o 1n; questo è anche il numero di cromosomi del gamete o cellula germinale (es. spermatozoo).
Anche questo numero è caratteristico della specie di appartenenza.
- 3) Iperdiploide: maggiore rispetto al numero normale 2n di cromosomi;
- 4) Ipodiploide: minore al numero normale 2n di cromosomi;
- 5) Tetraploide: doppio rispetto al numero normale 2n di cromosomi, o 4n;
- 6) Aneuploide: anomalo rispetto al numero normale 2n di cromosomi.

Preparazione dei campioni

In citometria a flusso, per ottenere misure di DNA apprezzabili e quindi potenzialmente utilizzabili anche sul piano clinico, occorre seguire scrupolosamente alcune regole generali.

Sospensione cellulare

Certi tipi di cellule si prestano naturalmente all'analisi citometrica, trovandosi già all'origine in una sospensione cellulare (es. cellule del sangue). Tuttavia, questo non preclude affatto l'uso del citometro per misurare il DNA in cellule provenienti da tessuti solidi; in questi casi, la procedura di allestimento dei campioni necessita di metodologie particolari e di tempi più lunghi.

Per preparare una sospensione cellulare a partire da un tessuto solido, generalmente si adotta uno dei seguenti metodi: a) disaggregazione meccanica (eventualmente automatizzata); b) digestione enzimatica. Entrambi i metodi comportano vantaggi e svantaggi.

Il metodo di disaggregazione meccanica è di solito più rapido, ma essendo piuttosto energico, tende a non conservare gli antigeni di membrana. Tuttavia, con le tecniche meccaniche, si può lavorare a freddo, quindi si preservano meglio i campioni di tessuto, mentre le metodiche enzimatiche prevedono di lavorare a 37 °C, anche per diverse ore. Per contro le cellule isolate possono essere danneggiate dalla disaggregazione meccanica. Quindi, quest'ultima si utilizza di solito sul tessuto in toto, dal momento che la digestione enzimatica potrebbe trascurare parti di tessuto contenenti cellule di potenziale interesse.

Colorazione del DNA

Nella scelta del colorante, è fondamentale la ricerca dello spettro di eccitazione e di emissione più adeguato, poter contare su un citometro che possieda un laser adeguato ad eccitare il fluorocromo e filtri altrettanto adatti per identificare l'emissione spettrale del fluorocromo stesso. La maggior parte degli strumenti comunemente impiegati e anche alcuni "cell sorters", generalmente non possiedono laser con la possibilità di lettura nell'ultravioletto (UV); pertanto in questi casi, si riduce la gamma dei fluorocromi disponibili per la colorazione del DNA.

Permeabilizzazione cellulare

Poiché la maggior parte del DNA è localizzato nel nucleo cellulare, è necessario permeabilizzare la membrana affinché il colorante penetri all'interno del nucleo. Questo può essere effettuato in vari modi e con diversi gradi di severità, dipendente dal prodotto finale che si desidera ottenere. I trattamenti in genere necessitano di aggiungere detergenti cellulari (saponina, Triton X-100, Nonidet), o alcoli (etanolo, metanolo).

Permeabilizzando la membrana cellulare per es. con saponina (2) a bassa concentrazione, è consentita la misura del DNA conservando inalterati gli antigeni di membrana; l'uso del Triton X-100, per contro, può alterare la membrana cellulare e il citoplasma, lasciando i nuclei nudi, ma fornisce picchi più stretti, ovvero una risoluzione maggiore. Anche la permeabilizzazione con alcoli è una tecnica comunemente usata, in particolare, quando occorre effettuare la misura degli antigeni nucleari in concomitanza con l'analisi del DNA. Attualmente alcuni coloranti sono in grado di penetrare all'interno della cellula senza necessità di permeabilizzare la membrana (DRAQ5, Hoescht) (3).

Stabilizzazione del DNA

Introducendo detergenti o alcoli, si può provocare la perdita di antigeni e una più rapida degradazione del DNA. L'inserimento di un fissativo (es. acetone o formaldeide) serve a stabilizzare le cellule. La fissazione, in alcuni casi, può condurre al cambiamento conformazionale delle proteine e alla condensazione del DNA, riducendo l'intensità di fluorescenza sia degli antigeni che del DNA stesso (4).

Discriminazione dei "doppietti"

Un problema che deve essere affrontato quando si effettua l'analisi del DNA, soprattutto nel caso dei tumori solidi, è l'esclusione di raggruppamenti di cellule (clumps). Due cellule unite insieme vengono registrate dal citometro come un singolo evento, denominato "doppietto". Se ciascuna di queste due cellule è diploide ($2n$), vista come un evento unico diventa tetraploide ($4n$). In altre parole, si verifica un incremento di DNA come se si trattasse di una cellula tetraploide (G0G1) o come una cellula normale in procinto di dividersi (G2M). Inoltre, per generare ulteriore confusione, si potrebbero trovare anche raggruppamenti di tre o più cellule unite insieme.

Il problema dei doppietti si può risolvere impiegando un gate di discriminazione basato su caratteristiche di intensità, ampiezza e area di fluorescenza. L'intensità di fluorescenza è la massima raggiunta dal colorante usato per il DNA, nel momento in cui la cellula è attraversata dal raggio laser. Queste caratteristiche sono differenti per una cellula in procinto di dividersi rispetto a quelle di due cellule unite insieme. Una cellula indivisa possiede una membrana e un citoplasma unico, quindi è attraversata da un raggio laser più velocemente rispetto a due cellule unite. In altre parole, possiede un'ampiezza di segnale più piccola e un'altezza maggiore, ma la medesima area. Infine le cellule in divisione hanno il DNA contenuto in un solo nucleo e di conseguenza emettono un segnale di fluorescenza più intenso, paragonato a quello di due cellule unite. Quindi, i doppietti che hanno due nuclei separati dal citoplasma, emettono un segnale di minore intensità, ma più prolungato nel tempo. Questo viene registrato come più ampio e più basso, ma con la medesima area. Queste differenze possono essere visualizzate con istogrammi di FL2-area vs FL2 ampiezza o FL2-area vs FL2 altezza, creando un gate che escluda i doppietti dai campioni analizzati, sia che si tratti di cellule diploidi che aneuploidi.

Set up dello strumento

Il setup strumentale varia a seconda del tipo di strumentazione in uso, vi sono tuttavia alcuni principi generali da osservare.

- 1) Scegliere il canale lineare più appropriato per il colorante del DNA.
- 2) Fissare la soglia di lettura sul canale che testa il fluorocromo del DNA; (parametri soglia come light scatter, non sono abitualmente molto usati nel caso del DNA).
- 3) Selezionare i parametri adeguati a discriminare i doppietti.
- 4) Delineare un gate per escludere i doppietti ed applicarlo a tutti gli istogrammi di misura del profilo del DNA stesso.

- 5) Verificare che il contenitore dello sheath sia a pieno carico, per assicurare una maggiore stabilità di flusso.
- 6) Accertarsi che il citometro sia stato accuratamente pulito; un flusso turbolento può determinare un incremento di coefficiente di variazione (CV). Per CV, si intende, la deviazione standard di una serie di valori divisi per le medie dei valori stessi. Indica in pratica l'ampiezza di un istogramma di picco.
- 7) Assegnare una velocità di flusso bassa e diluire le cellule alla concentrazione più appropriata per la soluzione colorante del DNA.
- 8) Ottimizzare la performance dello strumento mediante allineamento con sfere calibrate.

Standardizzazione

Con l'allineamento quotidiano e mettendo in atto procedure standard deputate al controllo di qualità, la maggior parte degli strumenti dovrebbe essere in grado di fornire una misura del DNA apprezzabile. I campioni cellulari provenienti da neoplasie solide (caratterizzate notoriamente da elevata eterogeneità) contengono di norma anche cellule diploidi che possono essere adottate come standards interni. In caso di linee cellulari aneuploidi, occorre associarle a campioni di cellule diploidi note, onde facilitare la determinazione del DNA index (5-6).

Analisi e trasmissione dei risultati

Sono stati fatti diversi sforzi per standardizzare la produzione dei dati citometrici relativi al DNA, sia nel caso di reports per uso clinico che di risultati di ricerca impiegati per lavori scientifici (7-12). Alcune linee-guida generali sono le seguenti.

- 1) Determinare la ploidia cellulare e il DNA index della ploidia di tutte le popolazioni presenti nel campione in esame.
- 2) Riferire il CV del picco medio G0G1. Generalmente è soddisfacente quando è inferiore a 3; maggiore di 8 è considerato scarso.
- 3) Nel caso in cui si misuri la fase S, ossia la frazione SPF di un campione diploide, occorre specificare se la stessa è stata misurata su sangue in toto, includendo anche cellule normali o soltanto su cellule tumorali, identificate con un anticorpo tumore specifico.
- 4) Stilare un breve commento, se necessario, accludendo ogni altra informazione utile per l'interpretazione del risultato (es. numero di cellule testate inadeguato, CV elevato, % di background, cospicua presenza di aggregati e debris).

Applicazioni cliniche dell'analisi citofluorimetrica del DNA nei tumori solidi

L'analisi del contenuto del DNA cellulare in citometria a flusso, proposta originariamente per lo studio del ciclo cellulare, è stata ampiamente utilizzata negli ultimi 25 anni, principalmente per la valutazione di due parametri, ploidia citofluorimetrica e percentuale di cellule in fase S e della loro eventuale anomalia in molti tumori umani.

I possibili impieghi della metodica in ambito clinico erano originariamente rivolti alla caratterizzazione di tali anomalie allo scopo di evidenziare differenze tra tessuti normali e neoplastici, tra lesioni precancerose o cosiddette "borderline" e lesioni neoplastiche. Successivamente gli sforzi sono stati rivolti a cercare di ottenere un parametro prognostico aggiuntivo e su base individualizzata sulla evoluzione clinica di patologie preneoplastiche, sul decorso di lesioni neoplastiche apparentemente simili dal punto di vista della stadiazione anatomo-patologica e clinico-radiologica e sulla risposta alle terapie impiegate.

Numerosissimi studi sono stati condotti negli ultimi anni sia su materiale fresco o congelato, sia su materiale di archivio incluso in paraffina in una grande varietà di tumori solidi umani, ma l'utilità clinica delle informazioni emerse è ancora oggi controversa.

Se si analizza la vasta letteratura sull'argomento, si evince la discordanza esistente tra vari autori sul valore prognostico della metodica nell'ambito dello stesso tipo di tumore e la estrema eterogeneità degli studi per quanto riguarda il numero di casi riportati, il tipo di campione analizzato e la interpretazione dei dati.

Le ragioni di tali discordanze vanno inoltre ricercate sia nella elevata eterogeneità biologica dei tumori solidi sia nel gran numero di variabili insite nella metodica della citometria a flusso, non adeguatamente standardizzate, soprattutto nei primi anni di applicazione clinica, in cui sull'onda dell'entusiasmo di ottenere in maniera relativamente semplice un parametro prognostico aggiuntivo, l'analisi citometrica del DNA è stata trasferita dalla ricerca di base alla clinica in maniera non sufficientemente ragionata.

Indice di DNA (DNA index, DI)

Questo parametro citometrico, ottenuto dal rapporto tra il contenuto modale di DNA in G1 della sottopopolazione cellulare aneuploide e quello della popolazione diploide, è stato uno dei primi ad essere preso in considerazione e, nella maggior parte dei tumori, un DI uguale a 1.00 sembra correlare con una migliore prognosi. In molti dei tumori più frequenti, però la sopravvivenza dei pazienti con tumore diploide, rispetto a quello con tumore aneuploide è relativamente modesta e non statisticamente significativa. È questo ad esempio il caso dei tumori della mammella e del polmone, in cui esistono peraltro alcune evidenze che DI inferiori ad 1.00 (ipodiploidi) o superiori a 2.00 (ipertetraploidi) possono individuare dei sottogruppi con prognosi più sfavorevole. I tumori con queste caratteristiche rappresentano comunque una minoranza ed i dati attualmente disponibili in letteratura non sono sufficienti a stabilire il reale valore di tali osservazioni.

Riguardo all'adenocarcinoma gastrico sono pochi i lavori pubblicati e anch'essi discordanti sul valore prognostico della ploidia citometrica.

Nel carcinoma del colon-retto lo stadio di malattia è quasi sempre risultato di importanza prognostica maggiore rispetto alla ploidia citometrica, la quale può rivestire un ruolo solo se valutata all'interno di un singolo stadio (B e C secondo Dukes) o prospetticamente nell'ambito di studi clinici randomizzati multicentrici. Le neoplasie dell'apparato urinario sono quelle in cui maggiormente si sono

affermati i parametri citometrici dal punto di vista prognostico, della storia naturale e predittivo della risposta ai trattamenti.

Nei tumori superficiali e transizionali della vescica, il DI viene utilmente impiegato per valutare il decorso clinico, specialmente nelle forme di grado 2, la cui evoluzione verso il tumore infiltrante è molto variabile. È stata osservata una più elevata percentuale di progressione nei tumori con DI aneuploide e multiclonali. Nei tumori della prostata, che come è noto possono presentare un decorso clinico molto diverso la diploidia è risultata un fattore prognostico molto favorevole e predittivo di risposta alla terapia ormonale e, forse anche alla radioterapia.

Fase S citofluorimetrica

I dati pubblicati in letteratura sull'utilità clinica della determinazione della percentuale di cellule in fase S sono a favore dell'importanza prognostica di tale parametro in diversi tumori solidi.

Soprattutto nel carcinoma della mammella una elevata percentuale di cellule in tale fase del ciclo è correlata con un aumento del rischio di ricaduta e di morte sia nelle pazienti con linfonodi negativi che positivi.

Comunque, è soprattutto nei casi con negatività linfonodale che la percentuale di cellule in fase S, si è rivelata utile nella pianificazione del trattamento aggiuntivo a quello chirurgico, dal momento che le pazienti con linfonodi positivi vengono trattate con chemioterapia adiuvante indipendentemente da altri fattori prognostici.

Nel carcinoma del colon-retto la percentuale di cellule in fase S potrebbe essere soprattutto utilizzata negli stadi B, in assenza di altri fattori istopatologici di rischio, per selezionare i pazienti da sottoporre a chemioterapia adiuvante, che non viene ancora impiegata routinariamente in tale stadio.

Purtroppo, diversi fattori tecnici ed interpretativi influenzano la determinazione della percentuale di cellule in fase S in citometria a flusso ed è probabilmente per questo motivo che nella maggior parte dei tumori solidi tale parametro non viene oggi utilizzato per la pianificazione terapeutica.

Per una corretta stima del contenuto di DNA cellulare e della percentuale di cellule in fase S rivestono importanza cruciale la valutazione della eterogeneità intratumorale mediante campionamento multiplo e la standardizzazione di tutte le variabili insite nella metodica della citometria a flusso.

Valutazioni conclusive sul valore prognostico e/o predittivo di risposta alle terapie dei parametri citometrici nei pazienti con neoplasie solide potranno emergere solo da studi clinici controllati e prospettici in cui tali parametri siano stati inclusi fra i criteri di stratificazione dei pazienti per l'assegnazione ai diversi bracci di trattamento.

Bibliografia

1. Givan AL. Flow Cytometry: first principles. 2nd ed. New York: Wiley, John & Sons, Inc, 2001.
2. Rigg KM, Shenton BK, Murray IA, Givan AL, Taylor RMR, Leonard TWJ.

- A flow cytometric technique for simultaneous analysis of human mononuclear cell surface antigens and DNA. *J Immunol Methods*, 123: 177, 1989.
3. Ormerod MG, editor. *Flow cytometry*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
 4. Larsen JK. Measurement of cytoplasmic and nuclear antigens. In: Ormerod MG. *Flow cytometry*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
 5. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 14: 472, 1993.
 6. Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Anal Cell Path*, 17: 103, 1998.
 7. Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, Melamed M, Zarbo RJ, Witzig TE et al. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 14: 486, 1993.
 8. Duque RE, Andreeff M, Braylan RC, Diamond LW, Peiper SC. Consensus review of the clinical utility in neoplastic hematopathology, *Cytometry*, 14: 492, 1993.
 9. Hedley DW, Shankey TV, Wheelless LL. DNA cytometry consensus conference. *Cytometry*, 14: 471, 1993.
 10. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry*, 14: 482, 1993.
 11. Shankley TV, Kallioniemi OP, Koslowski JM, Lieber JL, Mayall BH, Miller G, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer. *Cytometry*, 14: 497, 1993.
 12. Wheelless LL, Badalament RA, deVere White RW, Fradet Y, Tribukait B. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. *Cytometry*, 14: 478, 1993.

Analisi dell'immunofenotipo nelle emopatie maligne

Guido Pagnucco, Raffaella Lo Verso, Vincenza Tortorici, Francesco Gervasi

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Oncologia, ARNAS Civico, Palermo

Sebbene lo studio morfologico delle cellule emopoietiche resti fondamentale nella pratica clinica ematologica e possa essere sufficiente per stabilire la diagnosi della grande maggioranza delle neoplasie ematologiche, spesso anche tra esperti esistono in quest'ambito discrepanze di valutazione dovute alla soggettività di questo tipo di analisi. Con l'impiego estensivo di metodiche immunologiche, citogenetiche e di biologia molecolare si sono acquisite in questi ultimi anni nuove informazioni biologiche di cui tener conto per migliorare la precisione diagnostica, la riproducibilità e l'utilità clinica delle classificazioni delle neoplasie ematologiche. In particolare l'analisi dell'immunofenotipo si è dimostrata di grande utilità per rispondere a una serie di quesiti specifici che frequentemente si pongono nella pratica clinica corrente: (1) riconoscimento di una linfocitosi come disordine linfoproliferativo cronico della linea linfocitaria T o B; (2) diagnosi differenziale tra leucemia acuta linfoblastica (LAL) e mieloblastica (LAM); (3) identificazione di sottogruppi fenotipici di leucemia acuta linfoblastica a differente prognosi; (4) diagnosi di leucemia mieloide acuta di tipo M0, M6 e M7 (classificazione FAB); (5) associazione di una componente monoclonale ad una neoplasia ematologica; (6) presenza di malattia residua in campioni apparentemente in remissione completa morfologica (1).

Negli ultimi dieci anni la citometria a flusso multiparametrica è evoluta da promettente nuova tecnologia a indispensabile mezzo per la diagnosi e la caratterizzazione immunologica delle neoplasie ematologiche, e il valore clinico dell'impiego dell'analisi del fenotipo immunologico per la classificazione, la stratificazione prognostica e il monitoraggio della malattia residua nelle emopatie maligne è ormai riconosciuto (1-3). Importanti progressi tecnologici nella citometria a flusso e la disponibilità di ampie serie di anticorpi monoclonali diretti sia contro antigeni di superficie che intracellulari rendono oggi possibile la specifica identificazione, enumerazione e caratterizzazione immunofenotipica delle cellule delle neoplasie ematologiche (1-9).

Caratterizzazione immunofenotipica e fenotipi aberranti

Classicamente si ritiene che le cellule delle differenti neoplasie ematologiche presentino fenotipi composti ben distinti e relativamente stabili, con espressione

selettiva di determinanti antigenici in stretta relazione con linea di origine, livello maturativo, stato di attivazione e proliferazione di precursori e cellule mature della linfopoiesi e mielopoiesi normale, rappresentando pertanto espansioni clonali di cellule bloccate a vari stadi della differenziazione (10).

Sebbene questa ipotesi dell'arresto maturativo sia stata largamente confermata dall'identificazione di sottopopolazioni cellulari normali con fenotipo corrispondente a quello delle diverse varietà di leucemie e di linfomi, va tuttavia sottolineato come le cellule neoplastiche esprimano frequentemente fenotipi aberranti, definiti da iperespressioni antigeniche, asincronismi maturativi e cross-linearità, che si ritiene riflettano in qualche misura l'anomalia genetica alla base della trasformazione patologica. Rientrano in quest'ambito la riportata esistenza di associazioni tra fenotipo *common* (CD10+, cIg-, sIg-) e iperdiploidia nella LAL, tra espressione di CD19, e meno frequentemente di CD56, e di t(8;21) nella LAM con maturazione (M2 FAB), tra espressione di CD2 e t(15;17) nella LAM HLADR-, e tra espressione di CD2 e anomalie del cromosoma 16 nella LAM M4Eo (11-14). Una attenta analisi della letteratura relativa a queste associazioni rivela tuttavia come tali anomalie fenotipiche, sebbene riportate con maggior frequenza in determinate neoplasie ematologiche, non possano essere considerate individualmente specifiche. Ciò soprattutto in relazione alla variabilità delle metodiche e dei reagenti utilizzati, del *set-up* e della calibrazione degli strumenti, alla soggettività introdotta durante l'analisi e l'interpretazione dei risultati, e per di più in un contesto in cui la morfologia continui ad essere lo standard di riferimento per la caratterizzazione immunofenotipica delle neoplasie ematologiche (15-17).

Un sostanziale progresso in questo campo è stato raggiunto con la definizione dei *pattern* normali della differenziazione mieloide, B e T cellulare nel midollo osseo, utilizzando la citometria a flusso multiparametrica, combinazioni di almeno tre anticorpi e metodiche sensibili di acquisizione dei dati ("*live gate*") (5, 18-21). Con tale approccio è stato possibile ottenere una dettagliata informazione sui differenti *subsets* cellulari presenti nel midollo osseo normale che possono sfuggire con i metodi di analisi convenzionale, individuando per ognuno *dot-plot* riproducibili, con sagome dei percorsi differenziativi cellulari normali e relativi "spazi vuoti", che possono essere facilmente utilizzati per l'identificazione di sottopopolazioni cellulari neoplastiche sia alla diagnosi che nel *follow-up*.

Questo approccio innovativo viene attualmente utilizzato da diversi gruppi per definire nuovi protocolli per la diagnosi immunofenotipica delle neoplasie ematologiche mediante citometria a flusso multiparametrica e nuovi criteri per l'interpretazione e il resoconto dei dati, basandosi su due regole principali: (1) definizione dei *pattern* fenotipici normali relativi a multiple espressioni antigeniche di una determinato linea cellulare in tutti i diversi tipi di campioni utilizzati per la diagnosi; (2) analisi dei *pattern* fenotipici neoplastici nello spazio multidimensionale creato dalla combinazione del *light scatter* e delle multiple espressioni fenotipiche esaminate in riferimento ai *patterns* fenotipici normali. Tale metodologia ha consentito di dimostrare un'incidenza particolarmente elevata di fenotipi aberranti in tutte le diverse neoplasie ematologiche: 90% delle leucemie acute

linfoblastiche, 75% delle leucemie acute mieloidi, 90% delle sindromi mielodisplastiche, 80% dei disordini linfoproliferativi cronici, 90% dei mielomi e delle gammopatie monoclonali di significato indeterminato (18-26).

Strategie di gating

Per le ragioni sopra riportate la strategia di identificazione in citometria a flusso di cellule patologiche deve oggi essere basata sull'impiego di citogrammi multidimensionali, che associno parametri fisici e un antigene utilizzato come tracciante immunologico per valutare contemporaneamente tutte le popolazioni cellulari presenti nel campione, consentendo con l'impiego di *marker* addizionali una precisa discriminazione tra cellule sane e loro controparti neoplastiche lungo tutto il percorso maturativo analizzato.

CD45/SSC gating

Utilizzando il *CD45/SSC gating* le diverse popolazioni del midollo osseo o del sangue periferico possono essere identificate sulla base dell'intensità di espressione del *CD45* verso il *side scatter* (*SSC*) (parametro misurante la complessità interna cellulare), in quanto il *commitment* comporta un graduale aumento di espressione del *CD45* e modificazioni del *side scatter*, rendendo possibile, mediante l'analisi combinata dei due parametri, la discriminazione degli elementi maturi dai progenitori staminali e facilitando l'analisi dei blasti leucemici anche se presenti con bassa frequenza (27, 28).

Tale strategia si è dimostrata superiore a quella convenzionale basata su parametri morfologici, *forward scatter* (*FSC*) (parametro correlato alle dimensioni cellulari) e *side scatter*, nella quantificazione e caratterizzazione fenotipica dei blasti leucemici delle leucemie mieloidi acute e delle mielodisplasie, mostrando anche una maggiore sensibilità nell'individuare la malattia minima residua dopo terapia (29, 30).

Solo raramente l'espressione di una singola molecola, individuata nei blasti leucemici con l'impiego di un anticorpo monoclonale specifico in citometria a flusso o in immunocitochimica, si è dimostrata predittiva di uno specifico sottotipo genetico di LAM: (1) la proteina chimerica codificata dal gene di fusione *CBF β /SMMHC* nell'inversione pericentrica del cromosoma 16 e nella *t(16;16)*, caratteristicamente associate ad una LAM a citotipo M4 con alterazioni degli eosinofili; (2) la proteina chimerica codificata dal gene di fusione *PML/RAR α* nella *t(15;17)*, osservata nei pazienti con LAM a citotipo M3; (3) l'omologo umano dell'*NG2*, una molecola aberrante di condroitinsolfato individuabile in citometria a flusso con l'anticorpo monoclonale 7.1, nelle traslocazioni del gene *MLL*, mappato alla banda 11q23, spesso associate forme esprimenti marcatori immunofenotipici sia mieloidi che linfoidi (31-33). Viceversa l'impiego del *CD45/SSC gating* ha consentito lo studio delle correlazioni tra multiple espressioni antigeniche e genotipo, rendendo possibile la definizione di *pattern* fenotipici aberranti specifici, mediante analisi simultanea multivariata del livello di espressione di più antigeni, scarsamente predittivi se valutati individualmente

(25, 34-36). Con tale approccio in uno studio condotto su 111 pazienti affetti da LAM è stato possibile dimostrare che la combinazione di tre variabili fenotipiche (numero di popolazioni blastiche, *pattern* di espressione CD34/CD15 e di CD13) consentiva di selezionare con elevata sensibilità (100%) e specificità (99%) i casi di LAM con riarrangiamento PML/RAR α (34). Un altro esempio di correlazione tra *pattern* fenotipici complessi aberranti, definiti con l'impiego del CD45/SSC *gating*, e genotipo, è costituito dalla associazione di iperespressione del CD34, espressione *dim* del CD19 e/o del CD56 e espressione asincrona del CD15, ripetutamente riportata in letteratura per la LAM con t(8;21) e gene chimerico AML1/ETO (25, 29, 35, 36).

Nelle mielodisplasie, oltre alla individuazione di anomalie immunofenotipiche correlate alla dismielopoiesi con il CD45/SSC *gating* e l'impiego addizionale di coppie o triplette di antigeni particolarmente informative per la valutazione degli stadi maturativi della differenziazione mieloide, monocitica e eritroide, stanno assumendo rilievo clinico, sia ai fini diagnostici che a quelli prognostici, la quantificazione e il *subsetting* immunologici della quota blastica nel midollo osseo (23, 24, 26, 30, 37, 38). La presenza di *pattern* atipici significativi di dismielopoiesi si è dimostrata particolarmente utile nel distinguere dall'anemia aplastica, in pazienti in cui l'analisi morfologica non risultava sufficiente nell'evidenziare la displasia mieloide, le forme di sindrome mielodisplastica con ipoplasia midollare (23). Inoltre la dimostrazione della presenza di popolazioni cellulari caratterizzate da espressioni fenotipiche aberranti (cellule staminali e precursori CD34+/CD15+/HLADR-, iperespressione di CD33 sui neutrofili, CD45*dim* monocitario, neutrofili HLADR+, granulociti e monociti CD56+), e asincronismi maturativi (mieloide: CD11b/CD16, CD13/CD16, CD66b/CD33; monocitico: CD16/CD13, HLADR/CD11b, CD33/CD14), è stata utilizzata per definire uno *scoring system* citometrico delle mielodisplasie, risultato inversamente correlato alla conta leucocitaria e dei neutrofili, direttamente correlato all'IPSS e in grado di predire in modo indipendente sopravvivenza e recidiva in una serie di 115 pazienti con MDS sottoposti a trapianto di midollo allogenico (37). Per quanto riguarda la quantificazione e la caratterizzazione della quota blastica sono stati documentati: (1) un incremento, rispetto a controlli normali, dei progenitori midollari CD34+, con riduzione dei progenitori più immaturi CD34+/CD38- e incremento della popolazione mielomonocitica *committed* CD34+/CD33+; (2) un incremento comune alle diverse MDS di precursori mieloidi *committed* (CD34+/CD38+/HLADR+/CD13+/CD33+) ma più immaturi di quelli delle LAM *de novo*, per la più elevata incidenza di negatività alla reazione citochimica delle mieloperossidasi; (3) il valore prognostico negativo indipendente dell'espressione di CD7 (26, 30).

CD19⁺/SSC *gating*

L'analisi mediante CD19⁺/SSC *gating* della sequenza di espressione antigenica delle cellule B CD19⁺ del midollo osseo di adulto ha consentito di evidenziare che le popolazioni di precursori B mostrano *pattern* maturativi costanti sia per quanto riguarda le caratteristiche fenotipiche che in termini di distribuzione rela-

tiva (19). La dimostrazione di anomalie in questi *pattern* può costituire un mezzo utile per monitorare la malattia minima residua in pazienti con LAL a fenotipo B in remissione completa morfologica, in quanto la persistenza di cellule leucemiche residue può indurre anomalie nel compartimento midollare dei precursori B (39). Questa ipotesi è stata confermata dallo studio di 180 campioni di midollo ottenuti da 45 pazienti con LAL a fenotipo B in remissione completa morfologica, dimostrando che un significativo incremento di due sottopopolazioni cellulari immature (CD34+/CD19+ e CD20-/CD19+) o un'alterata differenziazione B midollare esplorata con la combinazione CD19/CD10/CD20 risultavano predittivi di un più elevato tasso di recidiva e di una inferiore sopravvivenza (20). Tale approccio basato sull'analisi della differenziazione B linfocitaria normale del midollo osseo può presentare vantaggi, rispetto all'analisi tradizionale della malattia minima residua delle LAL a fenotipo B, in termini di semplicità, costi e applicabilità, in quanto non condizionata dalla ricerca estensiva di fenotipi leucemici aberranti.

Applicando questa metodologia all'analisi delle correlazioni fenotipo-genotipo è stato inoltre possibile identificare *pattern* fenotipici aberranti specifici della LAL pediatrica con t(12;21)(p13;q22) e gene chimerico TEL/AML1 e della LAL BCR/ABL+ dell'adulto (40-42). Mentre in uno studio (40) la presenza del riarangiamento TEL/AML1 poteva essere prevista dalla negatività o dalla debole espressione di CD9 e CD20, nell'altro⁴¹ il *pattern* fenotipico peculiare dei blasti CD19+ risultava caratterizzato da distribuzione bimodale di CD34, iperespressione di HLADR e di CD10, espressione *dim* di CD20 e espressione debole o assente di CD135 e CD45, ed era grado di identificare i casi con t(12;21) con una sensibilità dell'86% e una specificità del 100%. La LAL BCR/ABL+ mostrava costantemente una omogenea espressione di CD10 e di CD34, una bassa ed eterogenea espressione di CD38 ed espressione aberrante di CD13 (42).

Il possibile valore dell'espressione del CD79b ai fini dello studio della malattia minima residua è stato valutato nella LLC-B, essendo tale antigene assente o debolmente espresso dalle cellule leucemiche e potendo pertanto essere operativamente considerato come espressione fenotipica neoplastica utilizzabile per distinguerle dalle cellule B normali (43). La differente intensità di espressione di tale antigene nelle cellule normali e leucemiche è stata analizzata usando il CD19+/SSC *gating* e le seguenti triplici marcature: CD5/CD79b/CD19 e CD22/CD79b/CD19 per il sangue periferico e CD19/CD79b/CD45 per il midollo osseo. In esperimenti di diluizione la soglia di sensibilità raggiunta è stata paragonabile a quella ottenuta con la PCR.

CD7+/SSC *gating*

La caratterizzazione delle sottopopolazioni di cellule T nel midollo osseo normale usando cinque diverse triplici marcature basate sul CD7+/SSC *gating* ha consentito la definizione di "spazi vuoti" nei *dot-plot* multidimensionali di ciascuna delle combinazioni studiate, in modo del tutto analogo a quanto fatto per i progenitori B (44). I blasti leucemici di tutti i 65 casi di LAL-T analizzati sono risultati evidenziabili in tali spazi vuoti consentendone la facile discriminazione dai

precursori T normali. La combinazione di antigeni più informativa è risultata la marcatura TdT/CD7/cyCD3, che ha evidenziato la presenza di aberrazioni fenotipiche nel 91% dei casi. Tale metodologia rappresenta un importante contributo per l'analisi standardizzata della malattia minima residua, in quanto blasti leucemici che persistono o ricompaiono negli "spazi vuoti" di ciascuna combinazione possono essere facilmente identificati nei campioni di midollo osseo durante o dopo la terapia.

CD38^{bright}/SSC gating

L'analisi immunofenotipica multiparametrica del fenotipo immunologico delle plasmacellule consente di discriminare le cellule normali da quelle neoplastiche. L'intensa reattività per CD38 e Sydecin-1 (CD138) congiunte alla ridotta espressione di CD45 rappresentano i migliori marcatori utilizzabili per l'identificazione delle plasmacellule.⁴⁵ Inoltre è possibile distinguere le plasmacellule mielomatose da quelle normali in base alla differente espressione di CD19 e CD56, essendo queste ultime CD19+/CD56- e quelle neoplastiche prevalentemente CD19-/CD56+ (18, 45). Tale differente espressione è stata utilizzata ai fini della diagnosi differenziale tra gammopatia di significato indeterminato (MGUS) e mieloma multiplo (MM) utilizzando la tripla marcatura CD38/CD56/CD19 e una metodologia di acquisizione e di analisi in cui venivano acquisiti e studiati per l'espressione relativa di CD19 e di CD56 gli eventi inclusi nel "live gate" della frazione CD38^{bright} (18). Nelle MGUS con tale metodologia erano individuabili due popolazioni plasmacellulari chiaramente distinte: una CD19+/CD56- come le plasmacellule normali policlonali e l'altra CD19-/CD56+ corrispondente alla plasmacellule clonali. Inoltre all'analisi multivariata il numero di plasmacellule residue policlonali risultava il singolo parametro in grado di discriminare i casi di MGUS e di MM, anche considerando soltanto i casi di MM in stadio I.

Bibliografia

1. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*, 90: 2863-2892, 1997.
2. Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. *Cytometry*, 30: 249-263, 1997.
3. Bené MC, Bernier M, Castoldi G, et al. On behalf of EGIL, European Group on Immunological Classification of Leukemias. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica*, 84: 1024-1034, 1999.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia*, 10: 877-895, 1996.
5. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Data analysis and interpretation. *Cytometry*, 30: 236-244, 1997.

6. Ruiz Arguelles A, Duque RE, Orfao A. Report on the first Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry*, 34: 39-42, 1998.
7. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ et al. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: Results of an international consensus meeting. *Cytometry*, 46: 23-27, 2001.
8. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*, 86: 675-692, 2001.
9. Pagnucco G, Vanelli L, Gervasi F. Multidimensional flow cytometry immunophenotyping of hematologic malignancy. *Ann NY Acad Sci*, 963: 313-321, 2002.
10. Van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In *Leukemia*. ES Henderson, TA Lister, MF Greaves, Eds.: 83-130. Saunders. Philadelphia, PE, 1996.
11. Pui CH, Williams DL, Roberson PK et al. Correlation of karyotype and Immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 6: 56-61, 1988.
12. Reading CL, Estey EH, Huh YO et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 81: 3083-3090, 1993.
13. Claxton DF, Reading CL, Nagarajan L et al. Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 80: 582-586, 1992.
14. Adriaansen HJ, te Boekhorst PAW, Hagemeyer AM et al. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood*, 81: 3043-3051, 1993.
15. Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterisation of Leukaemias. *Leukemia*, 9: 373-385, 1995.
16. Stelzer GT, Marti G, Hurley A et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Standardization of laboratory procedures. *Cytometry* 30: 214-230, 1997.
17. Stewart CC, Behm FG, Carey JL et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Selection of antibody combinations. *Cytometry*, 30: 231-235, 1997.
18. Ocqueteau M, Orfao A, Almedia J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*, 152: 1655-1665, 1998.
19. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MV, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia*, 13: 419-427, 1999.

20. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol*, 104: 695-705, 1999.
21. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P et al. BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia*, 14: 816-825, 2000.
22. San Miguel JF, Gonzales M, Orfao A. Minimal residual disease in acute myeloid malignancies. In *Textbook of Malignant Hematology*. L Degos, F Herman, D Linch, B Lowenberg, Eds.: 871-891. Martin Dunitz. London, 1998.
23. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*, 98: 979-987, 2001.
24. Maynadié M, Picard F, Husson B et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 100: 2349-2356, 2002.
25. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*, 16: 1233-1258, 2002.
26. Del Canizo MC, Fernandez E, Lopez A et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 88: 402-407, 2003.
27. Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann NY Acad Sci*, 677: 265-280, 1993.
28. Borowitz MJ, Guenter KL, Shults KE et al. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis: Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*, 100: 534-540, 1993.
29. Ito S, Ishida Y, Murai K et al. Flow cytometric analysis of aberrant antigen expression of blasts using CD45 blast gating for minimal residual disease in acute leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 25: 205-211, 2001.
30. Ogata K, Nakamura K, Yokose N et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 100: 3887-3896, 2002.
31. Viswanatha DS, Chen I, Liu PP et al. Characterization and use of an antibody detecting the CBFbeta-SMMHC fusion protein in inv(16) t(16 ;16)-associated acute myeloid leukemias. *Blood*, 91: 1882-1890, 1998.
32. Dyck JA, Warrel RP, Evans RM et al. Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by immunohistochemical localization of PML/RAR-alpha protein. *Blood*, 86: 862-867, 1995.
33. Behm FG, Smith FO, Raimondi SC et al. Human homologue of the rat chondroitin sulphate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL rearrangements. *Blood*, 87: 1134-1139, 1996.
34. Orfao A, Chillon MC, Bortolucci AM et al. The flow cytometric pattern of

- CD34, CD15, and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica*, 84: 405-412, 1999.
35. Ferrara F, Di Noto R, Annunziata M et al. Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 102: 444-448, 1998.
 36. Garcia Vela JA, Martin M, Delgado I et al. Acute myeloid leukemia M2 and t(8;21)(q22;q22) with an unusual phenotype: Myeloperoxidase (+), CD13 (-), CD14 (-), and CD33 (-). *Ann Hematol*, 78: 237-240, 1999.
 37. Wells DA, Benesch M, Loken MR et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102: 394-403, 2003.
 38. Kussick SJ, Wood BL. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med*, 127: 1140-1147, 2003.
 39. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica*, 83: 1069-1075, 1998.
 40. Borowitz MJ, Rubniz J, Nash M et al. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*, 12: 1764-1770, 1998.
 41. De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: Correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia*, 14: 1225-1231, 2000.
 42. Tabernero MD, Bortoluci AM, Alaejos I et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia*, 15: 406-414, 2001.
 43. Garcia Vela JA, Delgado I, Benito L et al. CD79b expression in B cell chronic lymphocytic leukemia: Its implication for minimal residual disease detection. *Leukemia*, 13: 1501-1505, 1999.
 44. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P et al. BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia*, 14: 816-825, 2000.
 45. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cell in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*, 97: 46-55, 1997.

Utilizzo di tecniche citofluorimetriche per lo studio dell'ontogenesi e differenziazione dei linfociti T e B

Rita Maccario

Laboratorio di Ricerca "Immunologia dei Trapianti", Oncematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il sistema immunitario inizia a svilupparsi fin dai primi mesi di vita fetale e continua la sua maturazione per tutta la vita dell'individuo, stimolato da esperienze antigeniche endogene ed esogene. I linfociti T e B, grazie all'espressione di strutture recettoriali (*T cell receptor*, TCR e *B cell receptor*, BCR) capaci di riconoscere e discriminare in modo molto fine milioni di sequenze peptidiche diverse, sono responsabili delle risposte immunologiche antigene-specifiche. L'esperienza antigenica è un importante fattore di maturazione per T e B linfociti; i linfociti T e B della memoria immunologica, infatti, rispondono più prontamente ed efficacemente, rispetto ai linfociti *naive* all'incontro con lo specifico antigene (1-3). I linfociti T *naive*, nella loro opera di pattugliamento dell'organismo, circolano verso gli organi linfoidei secondari, principalmente linfonodi; quando il TCR riconosce il suo specifico antigene presentato dalle cellule dendritiche, il linfocita T *naive* si attiva, prolifera vigorosamente, differenzia a cellula effettrice che, a sua volta, può migrare ai tessuti infiammati o alle zone del linfonodo occupate dai linfociti B, dove svolge funzione *helper* della maturazione e differenziazione dei linfociti B a plasmacellule secernente anticorpi. I linfociti T effettori sono destinati a morire, una volta svolta la propria funzione, tuttavia una quota dei linfociti T *naive* stimolati dall'incontro con l'antigene, differenzia e persiste in circolo con la funzione cellula della memoria, capace di garantire protezione in caso di successivo incontro con lo stesso antigene. Le cellule T della memoria possono essere distinte in due diverse popolazioni: (i) *central memory*, migrano ai linfonodi, attivano le cellule dendritiche e sono responsabili della memoria a lungo termine; (ii) *effector memory*, migrano ai tessuti infiammati e garantiscono funzione effettrice immediata (4,5).

La memoria immunologica del compartimento anticorpo-dipendente è regolata da meccanismi simili a quelli sopra descritti per le cellule T, i linfociti B della memoria residenti nei linfonodi sono stati, infatti, assimilati ai linfociti T *central memory* e le plasmacellule a lunga vita del midollo osseo ai linfociti T *effector memory* (5,6).

Il corretto sviluppo del sistema immunitario necessita, oltre alla maturazione di popolazioni linfocitarie *naive*, effettrici e memoria, anche della differenziazione di cellule con funzione “regolatrice” in senso soppressivo della risposta immunologica diretta contro gli autoantigeni e capaci di spegnere, con meccanismo di *feedback*, l’eccesso d’attivazione pro-infiammatoria indotta dalla stimolazione antigenica che può causare danno tissutale. L’eccesso di funzione soppressiva può, a sua volta, essere di grave danno per l’organismo, soprattutto in caso d’inibizione dell’immunosorveglianza anti-tumore. Negli ultimi anni, lo studio dei meccanismi di sviluppo e d’azione di sottopopolazioni linfocitarie T, dotate di funzione “regolatrice” in senso soppressivo (*Treg*) ha avuto uno straordinario impulso in moltissimi settori della medicina (7).

Il costante miglioramento delle raffinate tecniche di citofluorimetria a flusso ha facilitato enormemente l’indagine sullo sviluppo delle sottopopolazioni linfocitarie, in condizioni sia fisiologiche sia patologiche. Con questa tecnologia è possibile, ad esempio, (a) identificare un determinato stato differenziativo o d’attivazione della cellula, valutando contemporaneamente molte molecole di superficie o intracellulari sulla stessa cellula, (b) identificare citochine prodotte dalle singole cellule, (c) isolare (*cell-sorting*), anche a livello di singola cellula, sottopopolazioni linfocitarie per coltivarle *in vitro* o caratterizzarle ulteriormente.

I primi marcatori che hanno permesso di discriminare i linfociti T *naive* da quelli memoria sono isoforme della molecola CD45, in particolare si è osservato che, sia per i linfociti T CD4+ sia per quelli CD8+, l’isoforma CD45RA, accompagnata dall’antigene CD62L (L-selettina che indirizza *homing* nel linfonodo), è espressa dai linfociti T *naive*, mentre l’isoforma CD45RO dalle cellule T memoria (8). La definizione di linfociti T, *central* o *effector memory*, introdotta in seguito con il lavoro di Sallusto e coll. (4), si basa sull’espressione della molecola CCR7 (recettore di chemochine che indirizza il linfocita al linfonodo) su T *central memory* (T CD45RO+/CCR7+) e *naive* (T CD45RA+/CCR7+) e sull’assenza di questa molecola su T *effector memory* (T CD45RO+/CCR7neg). La possibilità, mediante citofluorimetria a flusso e opportuna combinazione di anticorpi monoclonali, di evidenziare lo stadio differenziativo dei linfociti T e alcune delle loro capacità funzionali (es. produzione di citochine) è di grande aiuto nello studio della ricostituzione immunologica del compartimento T dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE), in quanto consente di valutare la durata e l’evoluzione dello stato d’immunodeficienza secondaria al trapianto che può essere eseguito con diverse modalità - es. T- e B-depletato anziché non manipolato - e con diverse fonti di CSE - es. da midollo osseo, da CSE del sangue periferico o del cordone ombelicale (9-11).

La valutazione della distribuzione delle sottopopolazioni T memoria e *naive* è importante anche in ambito di immunoterapia cellulare con linee policlonali o monoclonali di linfociti T cresciuti in coltura *in vitro* (12). È noto, infatti, che la possibilità d’efficacia di un protocollo d’immunoterapia cellulare adottiva, somministrato a pazienti immunocompromessi per prevenire o curare gravi infezioni opportunistiche o la recidiva di malattia neoplastica, dipende in larga misura dalla capacità delle cellule infuse sia di proliferare attivamente e svolgere in modo effi-

cace e rapido la loro funzione effettrice (*effector memory*) sia di mantenere la memoria immunologica a lungo termine (*central memory*).

I Treg, sono identificabili, principalmente mediante la coespressione di CD4 e CD25 (catena α del recettore dell'interleuchina-2) e dalla concomitante presenza di altri marcatori di membrana o intracellulari, quali il fattore di trascrizione e la molecola CTLA-4 che interagendo con i suoi ligandi (CD80 e CD86) trasmette un segnale negativo ai linfociti T, spegnendone l'attivazione. Negli ultimi anni, moltissime ricerche sono state dedicate allo studio dei meccanismi d'azione dei Treg, alle migliori strategie per distinguerli da popolazioni di linfociti T convenzionali attivati, per isolarli, espanderli ed utilizzarli per manipolare la risposta immunologica in ambito di trapianti o di reazioni autoimmunitarie (7).

La distinzione dei vari stadi di differenziazione dei linfociti B è, per alcuni aspetti, ancora controversa e si basa oltre che sull'espressione differenziata in membrana delle varie classi di immunoglobuline (Ig) anche sulla presenza o assenza dell'antigene CD27+ (6,13). In particolare, i linfociti B *naive* sono caratterizzati dal fenotipo IgM+/IgD+/CD27neg, i linfociti B denominati "IgM memory" sono IgM+/IgD+/CD27+, mentre i linfociti memoria convenzionali non esprimono IgM/IgD, ma altre classi di Ig (IgG, IgA, IgE) e sono CD27+ (6,13-15). I linfociti B "IgM memory" differenziano principalmente nella milza, sono responsabili della produzione d'anticorpi naturali e dello sviluppo di risposta anticorpale verso batteri capsulati, in particolare *Streptococcus pneumoniae* (16). I linfociti B migrano dal midollo osseo agli organi linfatici secondari allo stato transizionale, uno stato intermedio di maturazione antigeno-indipendente, caratterizzato dall'espressione peculiare di un insieme di marcatori, tra cui CD38, CD24, CD10, ABCB1-transporter ecc ecc. Quando il linfocita B matura allo stadio di plasmablasto e poi di plasmacellula, perde gradualmente l'espressione di Ig di superficie e di alcuni antigeni B-specifici che lo avevano caratterizzato, ad esempio il CD20, ma è riconoscibile per l'espressione di CD27, CD38 e CD126 (6).

Lo studio della distribuzione delle varie sottopopolazioni di linfociti B è di considerevole utilità, non solo per la definizione precisa di alcune forme di immunodeficienza primitiva che colpiscono l'immunità anticorpo-dipendente, ma, ad esempio, anche per la valutazione della ricostituzione immunologica post-trapianto di CSE, finalizzata ad identificare il momento più idoneo per sottoporre i pazienti trapiantati ad un ciclo di richiamo delle vaccinazioni (17).

Bibliografia

1. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272: 60-66, 1996.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-252, 1998.
3. Mackay CR. Homing of naïve, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 5: 423-427, 1993.
4. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of

- memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401: 708-712, 1999.
5. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature Rev Immunol*, 2: 982-987, 2002.
 6. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298: 2199-2202, 2002.
 7. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22: 531-62, 2004.
 9. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverly PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 360: 264-265, 1992.
 10. Parkman R, Weinberg KI. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. *Immunol Rev*, 157: 73-78, 1997.
 11. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, Giraldo E, Busca A, Montagna D, Miniero R, Comoli P, Giorgiani G, Zecca M, Pagani S, Locatelli F. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*, 29: 371-379, 2001.
 12. Montagna D, F Locatelli, Moretta A, Lisini D, Previderè C, Grignani P, DeStefano P, Georgiani G, Montini E, Pagani S, Maccario R. T lymphocytes of recipient origin may contribute to the recovery of specific immune response towards viruses and fungi in children undergoing cord blood transplantation. *Blood*, 103: 4322-4329, 2004.
 13. Burgio GR e Locatelli F. *Le Risorse cellulari della vita*. Ed. Utet Scienze Mediche, 11-13, 2005.
 14. Klein U, Rajewski K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M +IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatic mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 188: 1679-1689, 1998.
 15. Carsetti R, Rosado M, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*, 197: 179-191, 2004
 16. Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminate human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*, 35: 3433-3441, 2005.
 17. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med*, 197: 939-945, 2003.
 18. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C, Maccario R, Lenta E, Olivieri M, Giebel S, DeStefano P, Rossi F, Giorgiani G, Amendola G, Telli S, Marconi M. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol*, 33: 480-486, 2005.

Nuove tecniche di separazione cellulare

Giuliano Mazzini

Istituto di Genetica Molecolare del CNR, Sezione di Istochimica e Citometria, Pavia

L'analisi di grandi numeri di cellule ha da anni trovato nella citometria a flusso la strumentazione di elezione che consente in tempi brevissimi e con elevato valore statistico di ottenere informazioni molto dettagliate sia di contenuti quantitativi sia di caratteristiche morfo-funzionali. Sulla base di questi risultati analitici alcuni strumenti possono essere oltre che "analizzatori" anche "separatori" in grado cioè di separare fisicamente in contenitori differenti due o più popolazioni distinte appunto da differenti proprietà biologiche (evidenziate ad esempio attraverso specifiche reazioni di marcature immunofluorescenti).

Separazione mediante tecniche di citometria a flusso

Le tecniche di citometria a flusso (CF) sono ormai considerate insostituibili in molte problematiche biomediche basate sull'analisi cellulare. Fra tutte la fenotipizzazione linfocitaria è sicuramente quella più strettamente legata a questa strategia analitica. Tuttavia anche la CF ha subito ed è tuttora coinvolta e soggetta a significative evoluzioni sia tecnologiche che applicative. Basti pensare al "sorting" convenzionale elettrostatico nato più o meno con la CF ed ora profondamente modificato per limitare i danni che il campo elettrico provoca alla vitalità delle cellule sortate. È infatti noto che la "separazione fisica" delle cellule (ovvero la deflessione delle particelle liquide che le contengono) era tradizionalmente originata da elevate differenze di potenziale (dell'ordine delle decine di Kvolts) con effetti (anche letali a volte) sulle cellule che avevano subito la deflessione, cioè proprio quelle sortate "attivamente". Per ovviare a questi inconvenienti i "sorter citometrici" di ultima generazione utilizzano principi diversi dall'elettrostatico, nell'intento di indurre meno stress elettromeccanici alla popolazione sortata.

Una importante considerazione riguarda inoltre il numero delle cellule da analizzare: la CF nasce per analizzare grandi numeri di cellule (decine di migliaia), in alternativa ai metodi di osservazione e conteggio attraverso il microscopio, (conteggi manuali mediante camera di Burker) che sono certamente lenti, noiosi e laboriosi. Oggi molte delle applicazioni cliniche sono basate sul conteggio preciso di pochi elementi cellulari (conta assoluta ad esempio dei linfociti CD4+ nelle immunodeficienze o delle cellule CD34+ nelle problematiche di trapiantologia),

se non addirittura alla ricerca e numerazione di elementi contaminanti o comunque presenti a frequenza molto bassa, (eventi rari) nei vari liquidi biologici.

Separazione immunomagnetica

Ancora a proposito di “sorting”, fondamentale è stato il contributo della separazione basata su microparticelle ferromagnetiche che consentono una grandissima versatilità applicativa. La strumentazione commercialmente disponibile (e la relativa metodologia di separazione), ad oggi, è totalmente dedicata alle problematiche cliniche basate rispettivamente sull'arricchimento o sulla deplezione cellulare. La prima tecnica consente di ottenere una frazione arricchita degli elementi cellulari di interesse, (es CD34+ da donatore, da trasfondere in paziente o da espandere in vitro) mentre la seconda consente invece di eliminare elementi cellulari indesiderati (es. CD14+ prima di procedere alla conta dei CD4+). In entrambi i casi le cellule, “separate” grazie al campo magnetico, rimangono legate ad un supporto (colonne “disposable” macro o micro) che viene eliminato nel caso della deplezione (infatti contiene le cellule indesiderate) e dal quale invece devono essere “eluite” (con resa più o meno elevata) le cellule di interesse, nel caso opposto.

A questo secondo caso appartengono anche le problematiche analitiche basate sulla cattura e/o conteggio di elementi cellulari rari (8). Questi infatti una volta catturati devono essere recuperati per controllo/conteggio microscopico, o per successive analisi di biologia molecolare (1,9). Ancora da sottolineare è il fatto che il rendimento finale di tale processo di conta dipende sia dalla efficienza della fase di cattura sulla colonna sia dalla efficienza di rilascio dalla colonna alla soluzione di raccolta. È evidente quindi che per problematiche riguardanti la separazione di eventi rari (dove sono coinvolte poche migliaia di cellule) questo tipo di separazione magnetica, ancorché di grande interesse, si sta rivelando a volte poco efficace (2,3,7,10). Da qui l'esigenza di sviluppare nuovi sistemi di cattura e conta, sempre basati sul principio della separazione magnetica, che non richiedano però colonne da eluire al termine della separazione.

Nuove prospettive metodologiche

Nei laboratori IGM-CNR Sez Istoch/Citometria sono in corso da due anni ricerche di sviluppo tecnologico e metodologico mirate alla realizzazione di dispositivi di separazione e conta cellulare finalizzati a portare le cellule separate direttamente su un “supporto” (tipo vetrino) da microscopia per essere direttamente contate e/o analizzate con metodiche immunocitochimiche (5, 6).

Recentemente tali ricerche hanno portato alla realizzazione pratica di un dispositivo (micro count) per separazione immunomagnetica di elementi cellulari presenti a bassa frequenza in liquidi biologici. Il sistema è stato sviluppato per trattare microvolumi di campione (50 μ l) che potrà contenere un numero di cellule (da separare “positivamente”) intorno a 100-200 elementi. A fine procedimento le cellule separate rimangono adese alla superficie di un vetrino coprioggetto, in



Fig. 1

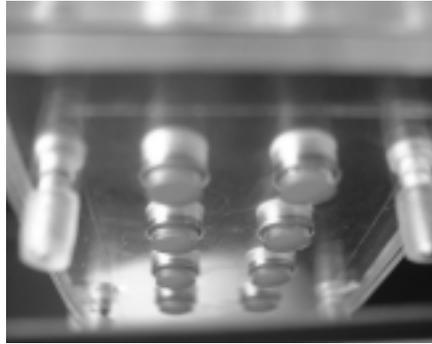


Fig. 2

aree predefinite, per una immediata osservazione/conta al microscopio. Il sistema realizzato è composto da una matrice di otto pozzetti (per la gestione ad es. di quattro campioni e dei rispettivi controlli (Fig 1).

La "Cella di separazione" è costituita da un "sandwich" di tre elementi: 1) il blocco separatore, 2) il supporto che raccoglie le cellule separate e 3) la matrice dei pozzetti.

1) *Blocco separatore.* È costituito da una lastrina di plexiglass che incorpora una matrice di otto mini-calamite di materiale super paramagnetico (neodimio) che ha il compito di esercitare un forte campo magnetico necessario per la separazione.

2) *Supporto di raccolta delle cellule separate.* Il supporto è costituito da un normale vetrino coprioggetto da microscopia (20x40 mm) che diventa "fondo" dei pozzetti destinati ad ospitare il campione (o i campioni) da analizzare.

3) *Matrice dei pozzetti.* È anch'essa costituita da una piastrina di plexiglass forata in corrispondenza delle posizioni dei magneti della lastrina sottostante.

I tre elementi montati a sandwich realizzano un sistema multipozzetto. Una volta riempiti i pozzetti il sistema viene capovolto a realizzare una situazione simile a quella nota come "goccia pendente" (Fig. 2).

Metodologia di separazione

Il prototipo di cella di separazione realizzato è stato testato sulla problematica di cattura e conteggio semi-automatizzata dei linfociti CD4+ in pazienti immunodepressi. Come metodica di riferimento è stata utilizzata la citometria a flusso che è in questo campo la tecnica più accreditata. Le ricerche sono tuttora in corso ma i primi risultati testimoniano la validità di questo approccio analitico. Per la marcatura specifica è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale (Anti-CD4 MicroBeads- Miltenyi Biotec 130-050-201).

Un nuovo programma di ricerca mira invece alla identificazione, cattura e conta di cellule epiteliali sia nel sangue periferico che nel midollo osseo. La concentrazione delle cellule di interesse in questi liquidi è molto bassa, ma considerando la necessità di dover lavorare su arricchimento di bianchi (con o senza separazione

delle mononucleate) il numero di cellule attese potrebbe essere appunto nell'ordine delle centinaia.

Sono in corso ricerche preliminari per verificare con quali anticorpi specifici sarà più opportuno eseguire la cattura delle cellule epiteliali, ed in fase iniziale, si prevede di lavorare su un modello che consenta di emulare la situazione "in vivo". A questo scopo verrà sfruttata l'esperienza precedentemente acquisita nel trattamento della linea epiteliale DHDK12TRb. Con questa potranno essere "costruiti" campioni artificiali di sangue (umano o animale) appositamente contaminato con aliquote note di cellule epiteliali. Con questi campioni artificiali che emulano la situazione "in vivo" sarà più facile testare i reagenti più idonei alla cattura e separazione delle cellule epiteliali.

Gli otto pozzetti della camera saranno utilizzati in coppia: campione e controllo (anche per diluizioni crescenti del campione es. 10,100,500,1000).

Procedimento:

- I pozzetti sono riempiti con 50 μ l di campione.
- La camera viene mantenuta in questa posizione per 5' e quindi viene capovolta e mantenuta tale per altri 25'.
- La camera viene messa a contatto con acqua (in una vaschetta) in modo da consentire alle cellule, sedimentate sul menisco inferiore del campione nei pozzetti, di "diffondere" nella vaschetta.
- La camera viene quindi posta su carta assorbente per asciugare i pozzetti e capovolta per essere completamente asciugata con aria calda in stufa a 37 °C.
- Dopo pochi minuti la camera "smontata" è pronta per essere "trattata" come un normale vetrino da microscopia: per fissazione (etanolo), colorazione (ioduro di propidio) ed infine per osservazione al microscopio.

Osservazione e conteggio al microscopio (a fluorescenza)

La camera può essere osservata direttamente al microscopio a fluorescenza (4), dopo aggiunta di 20 μ l di ioduro di propidio (1 μ g/ml in acqua) in ciascun pozzetto. Il vetrino della camera può anche essere smontato dalla matrice dei pozzetti e, dopo la colorazione, montato capovolto su un vetrino portaoggetti. L'osservazione ed il conteggio si effettuano con gli obiettivi a basso ingrandimento 4x e 10x.

Attualmente il vetrino recuperato dalla camera di separazione viene osservato tramite microscopia a fluorescenza convenzionale con osservazione (e conta manuale delle cellule) in luce di eccitazione verde (ottimale) o blu. È in fase di sviluppo avanzato un nuovo microscopio "compatto" provvisto di sorgente di eccitazione a stato solido e sistema CCD di memorizzazione delle immagini per conteggio semi-automatizzato via PC dedicato (Fig. 3).

Risultati attesi

L'osservazione dei vetrini ottenuti dal procedimento di separazione immunomagnetica nei pozzetti permette di individuare (a 4x) le varie aree che corrispondo-



Fig. 3

no ai fondi dei pozzetti. Nei pozzetti caricati con i campioni positivi si troveranno le cellule specificamente catturate dai reagenti specifici (anticorpi monoclonali) mentre nei corrispondenti pozzetti di controllo si noterà l'eventuale presenza di cellule non specificamente separate.

Ulteriori sviluppi del progetto

Il sistema di separazione fin qui descritto è mirato al trattamento di separazione di microvolumi di campioni con finalità di conta assoluta di elementi cellulari presenti in bassa frequenza. In questo progetto mirato alla ricerca, conteggio e caratterizzazione (immunocitochimica e/o conferma attraverso procedimenti di biologia molecolare sulle cellule separate) si rende necessario adeguare la tecnologia di cattura e separazione attraverso un nuovo tipo di "cella" appositamente progettata (Fig.4).

Come si può vedere si tratta di una normale "camera di coltura" a sei pozzetti al di sotto della quale una piastra che contiene speciali magneti ad alta densità provvede a generare il campo magnetico "puntiforme" necessario ad attirare le cellule. Al solito queste saranno state precedentemente trattate con reagenti specifici mirati a legare ad esse micro-particelle magnetiche. La specificità di questo dispositivo per le finalità del progetto consiste nella capacità di separazione (e/o arricchimento) degli elementi cellulari cercati utilizzando anche grandi

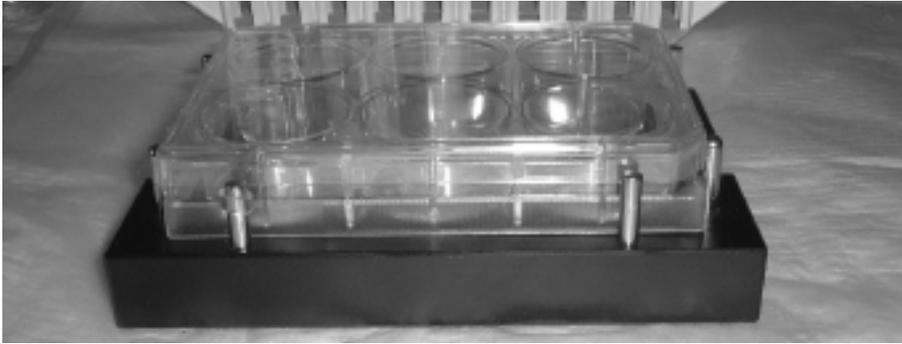


Fig. 4

volumi di campione (fino a 2ml). Ancora, le cellule specificamente catturate in questi pozzetti potranno essere destinate direttamente al conteggio (come descritto precedentemente nel sistema “micro-count”) semplicemente ponendo al fondo dei pozzetti un vetrino coprioggetto su cui “poggeranno” le cellule separate. Il vetrino potrà quindi essere trattato, colorato, ecc come precedentemente descritto. Nei pozzetti senza vetrino saranno invece recuperate le cellule (al termine della separazione) dopo aver aspirato quelle indesiderate (che rimangono in agitazione per tutta la durata del procedimento di separazione). La frazione di cellule recuperata sarà quindi disponibile per ogni ulteriore caratterizzazione immunocitochimica così come per ogni parallela indagine di biologia molecolare. Se la quantità di cellule recuperate dovesse essere consistente (dell’ordine delle migliaia di elementi) questa frazione di campione potrà essere normalmente analizzata come “frazione arricchita” mediante citometria a flusso. Una ultima nota riguarda la possibilità di separare le cellule in condizioni di sterilità se futuri sviluppi di progetto richiedessero la necessità di espandere in vitro la sottopopolazione separata.

Bibliografia

1. Choesmel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thiery JP, Blin N. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res*, 6: 556-570, 2004.
2. Flatmark K, Bjornland K, Johannessen HO, Hegstad E, Rosales R, Harklau L, Solhaug JH, Faye RS, Soreide O, Fodstad Ø. Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 8: 444-449, 2002.
3. Matsunami K, Nakamura T, Oguma H, Kitamura Y, Takasaki K. Detection of bone marrow micrometastasis in gastric cancer patients by immunomagnetic separation. *Ann Surg Oncol*, 10(2): 171-175, 2003.
4. Mazzini G, Ferrari C, Baraldo M, Mazzini M, Angelini M. Improvements in

- fluorescence microscopy allowed by high power light emitting diodes. FOR-MATEX Microscopy Series, 2: 2004.
5. Mazzini G, Ferrari C, Baraldo N, Angelini M, Riva F, Farina A, Calligaro A. Rare cells immuno-trapped on specific activated membranes can be easily counted and analyzed by microscopy. Proceedings of the 20th National Conference of the Italian Society of Cytometry, Spoleto, 6-10 ottobre 2003.
 6. Mazzini G, Ferrari C, Rovati B, Ferrari S, Danova M, Baraldo N, Angelini M. Magnetic cells trapping on microscope slide allows a simple visual counting of "rare" events. Proceedings of the 20th National Conference of the Italian Society of Cytometry, Spoleto, 6-10 ottobre 2003.
 7. Pantel K, Cote RJ, Fodstad Ø. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 91: 1113-24, 1999.
 8. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin. Cancer Res*, 5: 1830-1836, 1999.
 9. Woelfle U, Breit E, Pantel K. Influence of immunomagnetic enrichment on gene expression of tumor cells. *J Trans Med*, 2005, in press.
 10. Zhang XW, Yang HY, Fang P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J. Gastroenterol*, 1(3): 436-438, 2005.

**DALLA CITOGENETICA
ALLA GENETICA MOLECOLARE**

Citogenetica convenzionale in oncoematologia

Nicoletta Testoni

Istituto di Ematologia e Oncologia Medica, Policlinico Sant'Orsola, Bologna

La citogenetica, negli ultimi anni, ha assunto un ruolo di primaria importanza nel determinare le basi biologiche delle sindromi oncoematologiche attraverso l'identificazione di anomalie ricorrenti e la conseguente e precisa localizzazione dei rispettivi breakpoints. Le alterazioni citogenetiche osservate in oncoematologia sono clonali, quindi derivate da una singola cellula, sono acquisite e sono limitate alla popolazione neoplastica. Le alterazioni cromosomiche possono essere numeriche o strutturali, bilanciate o non bilanciate.

La caratterizzazione dei geni coinvolti in patologie oncoematologiche ha evidenziato il loro frequente e diretto o indiretto coinvolgimento nello sviluppo e nella omeostasi delle cellule ematopoietiche normali. Inoltre è stato ampiamente descritto che proteine anomale, prodotte da geni di fusione, creati da specifiche traslocazioni o inversioni possono alterare la proliferazione, la differenziazione o la morte programmata (apoptosi) dei precursori dell'emopoiesi.

Sono comunque identificate continuamente ulteriori e nuove anomalie citogenetiche, sebbene molte siano osservate solo in pochi pazienti (anomalie rare). L'importanza di identificare nuove alterazioni risiede nella capacità di poter identificare nuovi geni che possano giocare un ruolo strategico nella leucemogenesi. La citogenetica è ormai pratica comune e riveste un ruolo importante nella diagnosi e nella prognosi delle patologie oncoematologiche. Gli ultimi 30 anni hanno visto la scoperta di un grande numero di alterazioni cromosomiche ricorrenti. Mitelman (1) ha raccolto circa 110 traslocazioni bilanciate nelle leucemie e nei linfomi. La maggior parte delle più comuni è stata associata a caratteristiche laboratoristiche e cliniche e successivamente utilizzate come marker diagnostico e prognostico e, di conseguenza, come guida al clinico per la scelta dei trattamenti terapeutici.

Infatti, specifiche alterazioni citogenetiche e le loro controparti molecolari sono state incluse nelle recenti classificazioni WHO (2) e insieme alle caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e cliniche sono utilizzate per definire distinte entità. È stato già ripetutamente dimostrato come l'analisi citogenetica effettuata alla diagnosi sia tra i più importanti fattori prognostici indipendenti nelle sindro-

mi mielo e linfoproliferative acute (3). Lo studio è pertanto mandatorio per analizzare l'outcome di molti trials clinici e usato per stratificare i pazienti per differenti tipi di terapia. In anni più recenti il ruolo prognostico è stato dimostrato anche in numerose e ulteriori patologie quali, ad esempio, la leucemia linfatica cronica (LLC) e il mieloma multiplo (MM). Una precisa caratterizzazione citogenetica e molecolare di ogni prelievo patologico diventa quindi sempre più importante per una terapia specifica.

Alcune alterazioni citogenetiche possono essere identificate più facilmente in Southern blot o in RT-PCR, mentre altre sono identificabili solo in citogenetica convenzionale.

Oltre ad alterazioni bilanciate, sono state identificate un elevato numero di acquisizioni e di delezioni coinvolte nelle patologie onco-ematologiche che sono, però, ancora quasi del tutto sconosciute da punto di vista molecolare; diventa importante quindi capire quali geni sono coinvolti nel processo multistep della trasformazione maligna per una maggiore conoscenza della biologia tumorale. Esempi sono: la delezione 9p che avviene solitamente a livello dalla banda p21 e coinvolge p16 (CDNK2) e la delezione p53 che è importante nei tumori solidi ma poco definita nelle leucemie. Comunque i geni target della maggior parte delle comuni delezioni osservate in oncematologia (5q-,6q-,7q-,11q-,20q-) sono ancora sconosciuti. In questi casi la maggior parte delle informazioni sono state ottenute per il momento da studi effettuati in citogenetica convenzionale coadiuvati da studi in FISH.

La caratterizzazione citogenetica e, successivamente, molecolare ha aperto poi la strada al disegno di protocolli basati sull'utilizzazione di nuovi agenti terapeutici mirati verso specifiche alterazioni citogenetiche. La conoscenza del meccanismo oncogenetico e le alterazioni a livello molecolare che questo determina, con attivazione o repressione di geni, e con alterazione delle vie di trasduzione del segnale, è fondamentale per capire il meccanismo di insorgenza delle patologie oncoematologiche e quindi individuare il trattamento terapeutico mirato alla lesione genetica. Con l'ulteriore conoscenza delle alterazioni in funzione dei geni e delle proteine coinvolti, sarà possibile identificare le cellule con tali riarrangiamenti e risparmiare le cellule normali del paziente. Quindi una terapia che colpisce le alterazioni genetiche delle cellule maligne è il traguardo che merita uno studio sempre più attivo. Infatti la conoscenza di specifici riarrangiamenti cromosomici ha permesso di mettere a punto farmaci che hanno come target l'alterazione molecolare coinvolta nell'insorgenza della malattia. Esempi di questi farmaci sono l'acido all-trans retinoico (ATRA) per la leucemia acuta promielocitica, caratterizzata dalla traslocazione t(15;17) che coinvolge i geni PML e RAR- α (recettore dell'ac. Retinoico) e un altro farmaco "intelligente", l'Imatinib o STI571 o Glivec (inibitore della tirosinchinasi bcr/abl) che sopprime la proliferazione delle cellule che portano il riarrangiamento bcr/abl prodotto dalla traslocazione (9;22), anomalia marker della leucemia mieloide cronica (LMC) e presente in circa il 25% delle leucemie acute linfoblastiche (LAL) dell'adulto.

L'identificazione di alterazioni genetiche, in ogni fase della malattia può permettere quindi una terapia target molecolare specifica. Per cui la conoscenza delle

funzioni alterate deve portare alla capacità di sviluppare terapie genotipiche specifiche.

Inoltre nuove tecnologie (mFISH, SKY, CGH) sono state introdotte per coadiuvare l'analisi citogenetica in maniera sempre più precisa e vengono utilizzate per identificare riarrangiamenti non evidenziabili con indagini standard.

Quindi l'analisi citogenetica è diventata un'indagine indispensabile nella maggioranza delle patologie oncoematologiche.

La LMC è stata la prima patologia studiata e conosciuta dal punto di vista citogenetico, ed a cui è stata associata una specifica anomalia citogenetica, il cromosoma di Philadelphia (Ph) dal nome della città in cui venne descritto per la prima volta nel 1961 (4). Questo particolare cromosoma origina da una traslocazione bilanciata: $t(9;22)(q34;q11)$ presente nel 95% dei casi di LMC ed è quindi il marker della patologia. In circa il 10% dei casi si osservano traslocazioni varianti che coinvolgono ulteriori cromosomi oltre ai cromosomi 9 e 22. Comunque la traslocazione porta sempre alla formazione di un gene chimerico tra i geni BCR e ABL, che viene trascritto in un mRNA di 8,5 Kb ed è tradotto in una proteina di 210 kilodalton (p210), che presenta un'attività tirosinchinasica aumentata e ricopre un ruolo centrale nella patogenesi della LMC. Per la diagnosi di LMC, quindi, sono indispensabili sia lo studio citogenetico sia la valutazione molecolare con cui è possibile evidenziare la presenza di gene chimerico anche nei rari casi di LMC Ph-. Abbiamo già ricordato come l'Imatinib Mesilato (o STI-571 o Glivec) sia un inibitore tirosin-chinasi che induce blocco della crescita e apoptosi in cellule emopoietiche BCR/ABL riarrangiate. Questo farmaco sta producendo ottimi risultati nel trattamento di pazienti con LMC, in termini di risposta ematologica e citogenetica. Nonostante ciò, alcuni aspetti citogenetici rimangono ancora da chiarire. Nel 10-15% dei casi di LMC sono presenti delezioni che coinvolgono la sequenza di fusione reciproca ABL/BCR sul cromosoma 9 derivativo. I pazienti con tali delezioni sembrano non presentare differenze nelle caratteristiche clinico-laboratoristiche ma sembrano essere associati ad una prognosi sfavorevole, almeno per quanto riguarda quelli trattati con interferone o sottoposti a trapianto di midollo. È possibile che delezioni di geni "limitrofi" ad ABL (forse durante la traslocazione stessa) possano comportare la perdita di eterozigotità in alcuni loci, importanti per la progressione della malattia e/o per la risposta agli inibitori delle tirosinchinasi. I primi dati sono ancora limitati e discordanti sulla possibilità dell'Imatinib di superare l'impatto prognosticamente sfavorevole. In circa il 7-8% dei casi alla diagnosi il cromosoma Ph può essere associato alla presenza di ulteriori alterazioni cariotipiche. Alcune di queste alterazioni addizionali sono più frequenti (vie evolutive maggiori), ad esempio: duplicazione del cromosoma Ph, trisomia 8 e isocromosoma 17; altre sono più rare. Tali eventi possono rappresentare meccanismi di resistenza alla terapia e la loro presenza diventa più frequente in progressione, quindi in fase accelerata e in crisi blastica. Inoltre, in pazienti in trattamento con Imatinib è stata osservata l'insorgenza di alterazioni citogenetiche clonali nella popolazione cellulare Ph- ma non è ancora chiara la loro incidenza, eziologia e prognosi (5). L'imatinib potrebbe avere un effetto diretto sulla comparsa di tali anomalie. I cloni Ph- potrebbero rappresentare lo

sviluppo di una nuova complicazione leucemica, sia essa una mielodisplasia o una leucemia acuta, o rappresentare una nuova manifestazione della patologia originale, o un fenomeno più benigno, forse transitorio. Esiste poi una serie di condizioni cliniche eterogenee, identificate come sindromi mieloproliferative croniche Philadelphia negative. Solo una minima parte di casi (circa il 15%) si presenta con traslocazioni cromosomiche reciproche acquisite ponendo le basi per un'indagine molecolare più approfondita: sono state descritte traslocazioni cromosomiche di geni di fusione di tirosinchinasi, la maggior parte coinvolgenti i recettori FGFR1, PDGFRA o PDGFRB.

Nelle leucemie acute mieloidi (LAM) sono state descritte circa 200 diverse alterazioni strutturali e numeriche che risultano essere ricorrenti (3). La frequenza di alterazioni cromosomiche è generalmente inferiore negli adulti rispetto alle casistiche pediatriche (53-60% vs. 68-85%). Molti studi di singole istituzioni o di studi multicentrici, hanno confermato che il cariotipo costituisce un fattore prognostico indipendente determinante in termini di remissione completa, remissione libera da malattia, rischio di ricaduta e sopravvivenza (6). Da grandi studi multicentrici è nata l'assegnazione dei pazienti entro uno dei 3 gruppi di rischio: favorevole, intermedio o sfavorevole basata sulla caratterizzazione citogenetica alla diagnosi. L'inquadramento dei pazienti varia leggermente a seconda dei criteri adottati dai gruppi cooperativi. In questa classificazione è universalmente riconosciuta l'appartenenza al gruppo favorevole dei pazienti con $\text{inv}(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ e $t(8;21)(q22;q22)$. Mentre la prognosi dei pazienti con $\text{inv}(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$, monosomia 7 e cariotipo complesso è considerata sfavorevole. Altri tipi di alterazioni quali le anomalie bilanciate che coinvolgono la banda 11q23 invece vengono inserite a seconda di studi diversi in gruppi diversi: intermedio e sfavorevole.

Inoltre è da sottolineare la stretta associazione di particolari alterazioni strutturali con particolari sottotipi citologici. Esempi tra tutti la $t(15;17)$ e l' $\text{inv}(16)$. La traslocazione $t(15;17)(q22;q21)$ è associata clinicamente alla leucemia acuta promielocitica (M3 secondo la classificazione FAB) ed è una dei migliori esempi di perfetta correlazione tra citotipo di LAM e una alterazione citogenetica. Dà origine alla fusione del gene PML (sul cromosoma 15q22) con il gene RAR?? (sul cromosoma 17q21).

L' $\text{inv}(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ si presenta associata a LAM con citotipo M4 con eosinofilia. In entrambi i riarrangiamenti sono coinvolti i geni MYH11 (myosin heavy chain) situato sulla banda 16p13 e CBF β (core binding factor β) situato sulla banda 16q22.

Nel 30-60% dei pazienti con mielodisplasie (MDS) "de novo" e nell'80-90% con MDS secondaria sono osservabili alterazioni cromosomiche di tipo clonale che rivestono un indiscusso ruolo prognostico (7). Le principali aberrazioni sono simili a quelle delle LAM. Le MDS "de novo" tendono a presentarsi prevalentemente con anomalie singole, in contrasto le MDS secondarie presentano alterazioni multiple. Nell'ampio spettro di alterazioni delle MDS merita particolare attenzione la delezione 5q, frequente nelle persone anziane di sesso femminile. L'anomalia è il risultato di delezioni interstiziali di lunghezza variabile che inte-

ressano geni coinvolti nella proliferazione e differenziazione del sistema emopoietico tra cui i geni per le interleuchine, il gene CSF1R, il gene EGR1, il gene IRF1. Si associa, come singola anomalia, ad una MDS con prognosi favorevole con bassa frequenza di evoluzione in leucemia.

La frequenza dei cariotipi alterati nelle LAL risulta più alta negli adulti rispetto alle casistiche pediatriche: 64-85% vs 60-69% (8). Le LAL iperdiploidi con più di 50 cromosomi si associano ad una prognosi sfavorevole, a differenza della t(4;11) e della t(9;22), che è anche l'alterazione ricorrente più comune di tali patologie nell'adulto.

Accanto a patologie ampiamente studiate dal punto di vista citogenetico, esistono patologie in cui l'analisi in citogenetica convenzionale è stata limitata da problemi metodologici, tra cui essenzialmente la scarsa proliferazione del clone neoplastico. Infatti nel MM e nella LLC solo la citogenetica molecolare (FISH) ha potuto riempire i vuoti conoscitivi ed ha permesso l'identificazione di specifiche alterazioni citogenetiche con un significativo ruolo prognostico. Nel MM La frequenza delle alterazioni citogenetiche, riscontrate con la metodica tradizionale, varia dal 30-40% nei pazienti alla diagnosi, fino ad un 35-60% in pazienti trattati o in progressione; mentre la FISH permette di rilevare alterazioni numeriche e/o strutturali nell'80-95% dei pazienti, indipendentemente dallo stadio della malattia. Inoltre, il MM è spesso caratterizzato da un cariotipo complesso, con numerose alterazioni strutturali, numeriche e presenza di cloni anomali multipli. Ciò rende ancora più problematica l'indagine citogenetica e perciò, in molti casi, le alterazioni possono essere non ben caratterizzate. Evento frequente (30-40% dei casi) è l'alterazione a livello della banda cromosomica 14q32: locus del gene IgH. La più ricorrente coinvolge il gene della ciclina D1 al locus 11q13. Inoltre sono state osservate traslocazioni citogeneticamente silenti, evidenziabili solamente in FISH: t(6;14)(p25;q32) che coinvolge l'oncogene IRF4/MUM1 (interferon regulatory factor 4/multiple myeloma oncogene); t(4;14)(p16;q32) che coinvolge l'oncogene FGFR3 (fibroblast growth factor 3) e sembra essere l'alterazione con l'impatto prognostico più sfavorevole (insieme alla del 17p) e t(14;16)(q32;q23) che coinvolge l'oncogene c-maf (9). Di rilevante importanza prognostica, è la totale o parziale delezione del cromosoma 13. Spesso il cariotipo è iperdiploide con trisomie frequenti dei cromosomi 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 19 e 21. Anche la ploidia è un fattore prognostico di forte impatto nei MM alla diagnosi.

Lo sviluppo degli studi di citogenetica coadiuvati dalla FISH ha consentito l'identificazione di anomalie strettamente correlate alla prognosi e alla risposta terapeutica anche nella LLC (10). È infatti ormai acquisito che mentre la delezione del cromosoma 13 è associata ad una più lunga sopravvivenza mediana, la delezione 11q comporta una prognosi più infausta. La delezione 17p, con relativa anomalia della p53, si associa a resistenza a quasi tutti gli approcci terapeutici comunemente impiegati nel trattamento della patologia. La maggioranza di tali alterazioni si associa infine a caratteristiche cito-morfologiche specifiche.

L'analisi citogenetica deve essere, pertanto, alla base della diagnosi e del trattamento dei pazienti oncoematologici e deve essere strettamente integrata dalla FISH, dalle nuove metodologie di citogenetica molecolare e di biologia moleco-

lare. Comunque la citogenetica convenzionale mantiene ancora un ruolo di primaria importanza per l'eventuale identificazione di pazienti con particolari alterazioni già conosciute o di nuova definizione che possono trarre beneficio da una terapia molecularmente mirata.

Bibliografia

1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F editors. Mitelman database of chromosome aberrations in cancer, 2003.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization. Classification of tumours – IARC. Press; Lyon, 2001.
3. Mrozeck K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemias – Blood Reviews, 18: 115-136, 2004.
4. O'Brien S, Thall PF, Siciliano MJ. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. Baillière's Clinical Haematology, 10: 259-276, 1997.
5. Terre C, Eclache V, Rousselot et al on behalf of France Intergroupe pour la Leucemie Myeloide Cronique - Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. Leukemia, 18: 1340-1346, 2004.
6. Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetic on outcome in AML. Analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. Blood, 92: 2322-33, 1998.
7. Greenberg P, Cox C, Le Beau M et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood, 89: 2079-88, 1997.
8. Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J et al. Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. Br J Haematol, 96: 601-610, 1997.
9. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A et al. Clinical implication of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32) and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. Blood, 106: 2837-2840, 2005.
10. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 343: 1910-6, 2000.

FISH: vantaggi e svantaggi

*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,
Silvia Calatroni, Ilaria Giardini, Barbara Rocca,
Rita Zappatore, Irene Dambruoso, Marilena Caresana*

Dipartimento di Scienze Ematologiche, Pneumologiche, Cardiovascolari, Mediche e Chirurgiche,
Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Negli anni '70 lo sviluppo delle tecniche di bandeggio determinò una prima rivoluzione in campo citogenetico, permettendo un'accurata definizione dei cromosomi e delle loro anomalie. Da allora l'applicazione del bandeggio cromosomico ha avuto un ruolo fondamentale nel farci comprendere le alterazioni geniche presenti sia nella patologia costituzionale che in quella acquisita. In campo oncoematologico lo studio del cariotipo ha enormemente accresciuto le nostre conoscenze riguardanti il ruolo svolto dall'alterazione cromosomica nella trasformazione neoplastica e ha individuato regioni cromosomiche poi rivelatesi sedi di geni cruciali per l'emopoiesi. L'analisi cromosomica è così divenuta assolutamente necessaria per un corretto inquadramento diagnostico e per una accurata stratificazione prognostica dei pazienti, specie quelli con leucemia acuta e sindrome mielodisplastica. Il maggior limite della citogenetica convenzionale è però costituito dal fatto che la cellula in studio deve essere in mitosi per poter essere compiutamente analizzata. Inoltre, nonostante l'avvento delle metodiche ad alta risoluzione, l'analisi citogenetica convenzionale individua riarrangiamenti cromosomici solo quando questi interessano più di 3 megabasi (Mb) di DNA e non sono di tipo complesso. Infatti, in quest'ultimo caso la definizione dell'anomalia strutturale risulta difficile con un bandeggio di tipo monocromatico. Il superamento di questi importanti limiti è avvenuto grazie all'introduzione alla fine degli anni '80 della "Fluorescence *in situ* hybridization" (FISH), metodica che ha rappresentato una seconda rivoluzione in campo citogenetico. La FISH sfrutta la capacità di una sonda di DNA marcata con un fluorocromo di legarsi in modo specifico ad una sequenza bersaglio di DNA complementare, che può essere costituita da cromosomi metafasici, nuclei interfasici, fibre cromatiniche o DNA "microarrays". In tal modo non è più necessario che la cellula in studio sia in mitosi. La FISH condotta su cellule in interfase ("Interphase FISH", i FISH) è stata la metodica che ha prodotto i maggiori risultati nella diagnostica oncoematologica. Infatti essa da un lato permette di ottenere importanti informazioni nei pazienti con popolazione neoplastica a basso indice mitotico, come ad esempio quella della leucemia linfatica cronica (LLC), dall'altro consente di stabilire una

simultanea correlazione tra anomalia cromosomica e tipo di cellula analizzata, definita in base alle sue caratteristiche morfologiche e fenotipiche. L'impiego di sonde che colorano l'intero cromosoma ("whole chromosome painting probes") ha poi permesso di identificare in modo inequivocabile i cromosomi coinvolti in anomalie strutturali complesse, mentre lo sviluppo dello "Human Genome Project" ha prodotto una serie di sonde "single-locus" (locus specifiche). Queste ultime non solo hanno avuto un importante impatto sui protocolli di "gene mapping", ma hanno anche consentito di definire più correttamente i punti di rottura di una traslocazione cromosomica e di una delezione specificamente associate ad un particolare sottotipo di malattia onco-ematologica. Il successivo clonaggio di questi punti di rottura ha poi permesso di produrre sonde utili per una rapida identificazione delle diverse anomalie strutturali in ambito diagnostico. Riportiamo qui di seguito riportiamo gli importanti contributi forniti dalla metodica in onco-ematologia e i suoi limiti.

Vantaggi della FISH

Analisi di popolazioni cellulari a basso indice mitotico

La leucemia linfatica cronica (LLC) è l'esempio migliore per comprendere quale sia stato l'apporto della FISH in interfase nello studio di popolazioni cellulari con indice mitotico inferiore all'1%. L'analisi cromosomica di questi pazienti spesso non fornisce risultati per l'assenza di metafasi o dimostra un normale corredo cromosomico nel 40-50% dei casi. La FISH in interfase individua invece anomalie clonali del cariotipo nel 65% dei pazienti analizzati alla diagnosi o durante una fase stabile della malattia e nell'88% dei pazienti con malattia in progressione. Inoltre è stato osservato che le alterazioni osservate sono strettamente correlate allo stato mutazionale dei geni delle immunoglobuline. In particolare, i pazienti con delezione 13q mostrano più frequentemente geni V_H mutati, mentre quelli con trisomia 12 geni V_H in configurazione "germ-line". Nel 2000 è stato dimostrato che l'anomalia cromosomica influisce significativamente sulla durata di non trattamento, sulla sopravvivenza complessiva e sulla risposta alla terapia. Il tempo medio di non trattamento e la mediana di sopravvivenza sono 92 e 133 mesi per i pazienti con 13q-, 33 e 114 mesi per quelli con +12, 13 e 79 mesi per quelli con 11q- e 9 e 32 mesi per quelli con 17p-. Più recentemente è stato riportato che le anomalie cromosomiche definite dalla I-FISH si correlano con importanti caratteristiche biologiche della LLC. In particolare, suddividendo le anomalie riscontrate dalla FISH in categorie a rischio prognostico diverso, definito in base a quanto precedentemente riportato [prognosi più sfavorevole → più favorevole: 17p- → 11q- → 6q- → +12 → normale → 13q-x2 ? 13q-x1], è stata osservata una stretta correlazione tra anomalia cromosomica e stadio clinico, stato della malattia, positività per il CD38. Non è stata invece osservata alcuna correlazione tra anomalia cromosomica ed età, sesso, stato mutazionale dei geni delle immunoglobuline. In analisi multivariata solo la positività per il CD38 era significativamente associata all'anomalia riscontrata dalla FISH, che nella maggior parte dei casi era il 17p-.

Impiego simultaneo di FISH e analisi fenotipica (FICTION)

Leucemia acuta linfoblastica a cellule B (LAL-B)

Nella LAL-B l'impiego combinato di FISH ed immunofenotipo ha costituito un potente mezzo di indagine per analizzare la patogenesi delle leucemie pediatriche. In passato l'analisi di sequenze clonotipiche di fusione genomica di gemelli mono-ovulari affetti da LAL aveva fornito prove convincenti riguardo all'acquisizione in epoca prenatale durante l'emopoiesi fetale delle anomalie cromosomiche tipiche della LAL-B. Più recentemente la FISH ha dimostrato che le traslocazioni cromosomiche associate alle LAL sono presenti nel sangue cordonale di neonati normali. Pertanto, è stato supposto che per lo sviluppo di una franca leucemia sia necessaria una seconda alterazione genica che deve svilupparsi nel periodo post-natale. Tale ipotesi è suggerita anche dalla notevole variabilità della fase di latenza della malattia. Per quanto riguarda invece le iperdiploidie, anomalie più frequentemente osservate nelle LAL, non vi erano dati che ne indicassero la presenza nel sangue cordonale. Uno studio recente ha dimostrato che anche queste alterazioni del cariotipo sono presenti in epoca prenatale. Infatti, in un paziente che avrebbe poi sviluppato una LAL B a cariotipo iperdiploide la FICTION ha dimostrato che i progenitori B CD34 e CD19 positivi del sangue cordonale presentavano le stesse trisomie riscontrate nel cariotipo iperdiploide comparso al momento della successiva trasformazione leucemica.

Sindromi mielodisplastiche

In questo disordine onco-ematologico la FISH combinata con l'esame morfologico e soprattutto con quello fenotipico è stata impiegata per stabilire il livello di staminalità della cellula colpita dalla noxa leucemogena e per stabilire quali filiere cellulari fossero coinvolte nel processo mielodisplastico. In passato era stato ipotizzato che la cellula bersaglio della trasformazione neoplastica fosse una cellula staminale già commissionata in senso mieloide dato che le alterazioni displastiche e la citopenia erano usualmente a carico della sola linea mieloide ed un'evoluzione in LAL era un evento quanto mai raro. Per spiegare il mancato coinvolgimento della linea linfoide erano state fatte due ipotesi. La prima sosteneva che la restrizione di linea osservata potesse essere causata dal fatto che il processo neoplastico interessava cellule emopoietiche con gradi diversi di commissionamento; la seconda suggeriva che, dopo aver inizialmente colpito una cellula staminale o un progenitore multipotente, fosse il processo neoplastico stesso a determinare una restrizione di linea. Lo studio della clonalità, con analisi del pattern di inattivazione del cromosoma X, aveva però dimostrato che in alcuni pazienti anche i linfociti B e T facevano parte della popolazione neoplastica. Si trattava però di risultati da interpretare con cautela visto che le popolazioni cellulari esaminate erano separate su gradiente di Ficoll ed era quindi possibile una loro contaminazione. Inoltre la metodica presentava importanti limiti tecnici (ad esempio la mancanza di controlli interni). Anche la FISH con sonde specifiche per le anomalie citogenetiche strettamente correlate ad una diagnosi di SMD aveva però frequentemente fornito risultati contrastanti. Alcuni autori avevano riportato che il 5q-, anomalia tipica dell'anemia refrattaria, era

presente nelle cellule della serie mieloide, megacariociti compresi, ma era assente dalle cellule linfoidi sia B che T. Un altro studio aveva però indicato che alcuni linfociti B presentavano la delezione. Anche per la trisomia 8, monosomia 7 e la delezione 20q erano stati ottenuti dati contrastanti. Un contributo fondamentale per la definizione del livello di staminalità della cellula mielodisplastica è stato ottenuto con l'esame FISH di cellule marcate da anomalie in precedenza individuate dalla citogenetica convenzionale e sortate al FACS in base alle loro caratteristiche immunofenotipiche. Un primo studio era stato condotto in sette pazienti con SMD e trisomia 8. L'analisi FISH aveva dimostrato la presenza di +8 nei granulociti, negli eritroblasti, nei monociti. Le cellule CD3 positive (T linfociti), CD19 positive (B linfociti), CD3 negative e CD56 positive (cellule NK) e le sottopopolazioni CD34 positive (linfociti pro-B, T/NK, progenitori CD34 e Thy positivi) non presentavano la trisomia e quindi non facevano parte della popolazione mielodisplastica. Questo studio dimostrava che la trisomia 8 era presente nelle cellule CD34 e CD33 positive e quindi era confinata alle cellule commissionate in senso mieloide. Il risultato ottenuto aveva importanti conseguenze cliniche. Il mancato coinvolgimento della cellula staminale da parte del processo neoplastico faceva sì che i pazienti con SMD potessero essere candidati ad una procedura di autotrapianto. Questa ipotesi veniva però smentita da uno studio successivo che individuava il 5q- nelle cellule staminali di dodici pazienti affetti da SMD. La delezione 5q era presente nel 94% delle cellule CD34+CD38- e nel 25-90% delle cellule pro-B CD34+CD19+. Le cellule staminali con 5q- erano incapaci di ricostituire l'emopoiesi come veniva dimostrato dalla loro scarsa risposta alle citochine, dalla bassa quantità di "Long Term Culture –Initiating Cell" (LTC-IC) e dall'incapacità di garantire la ripresa dell'emopoiesi nei topi NOD/SCID. Uno studio successivo, condotto in pazienti con 5q- come singola anomalia o con 5q- associato a trisomia 8, dimostrava che le cellule CD34/Thy positive e CD38 negative non presentavano la delezione ma avevano gli stessi deficit funzionali delle cellule staminali mielodisplastiche, cioè non garantivano la ripresa dell'emopoiesi nei topi NOD/SCID ed avevano una scarsa attività LTC-IC. I difetti funzionali erano intrinseci e non mediati da fattori esterni. L'analisi dei due pazienti con 5q- associato a +8 aveva dimostrato che mentre il 5q- era invariabilmente presente nella cellula CD34+CD38-Thy-1+, la trisomia compariva più tardivamente. Quest'ultimo studio escludeva quindi la possibilità di eseguire un autotrapianto con cellule staminali periferiche nei pazienti con SMD. Ancor più recentemente la FISH ha dimostrato che la cellula CD45 positiva, CD34/CD38/Lin negativa presenta lo stesso marcatore cromosomico dei blasti mieloidi e non forma colonie emopoietiche pur producendo LTC-IC.

Anche le cellule mesenchimali dei pazienti con SMD sono state analizzate utilizzando la FISH. Inizialmente, sembrava che esse potessero presentare anomalie diverse da quelle della popolazione mielodisplastica, ma più recentemente è stato osservato che esse presentano un assetto cromosomico normale e non sono quindi coinvolte nella malattia. Al contrario, le cellule dendritiche presentano le stesse alterazioni cromosomiche della popolazione displastica.

Linfomi non-Hodgkin

Nel 1948 era stato proposto che le cellule tumorali potessero acquisire un nuovo fenotipo e partecipare alla formazione delle strutture vascolari del tessuto neoplastico. Nel mieloma multiplo è stato recentemente dimostrato che le cellule endoteliali del midollo osseo sono molto diverse da quelle quiescenti della vena ombelicale per capacità di crescita, profilo genico, caratteristiche ultrastrutturali e produzione di fattori di crescita. Per questo motivo è stato ipotizzato che le cellule mielomatose inducano la proliferazione delle cellule endoteliali del midollo osseo. Partendo da questa osservazione la FICTION è stata utilizzata per stabilire se le cellule endoteliali linfoma-associate presentassero le stesse anomalie cromosomiche delle cellule linfomatose. È stato sorprendentemente dimostrato che molte cellule endoteliali effettivamente presentano le stesse anomalie cromosomiche primarie e secondarie specifiche del linfoma. Ciò suggerisce che il linfoma possa originare da una cellula multipotente capace di differenziarsi sia in senso emopoietico che in senso endoteliale. Non è comunque possibile escludere fenomeni di fusione cellulare o di trasferimento genico successivi all'apoptosi della cellula tumorale.

Dimostrazione di anomalie criptiche all'esame citogenetico convenzionale (CC)

Sindromi eosinofile

In questa sindrome caratterizzata da aumentata produzione di eosinofili nel midollo osseo con conseguenti infiltrazioni tissutali e danni d'organo è stata dimostrata dalla FISH una traslocazione criptica alla citogenetica. Si tratta di un riarrangiamento intracromosomico tra il gene FIP1L1, mappato in 4q12, ed il gene PDGFRalpha, mappato in posizione più telomerica sempre a livello della banda 4q12. Il gene di fusione FIP1L1-PGFRalpha, sempre espresso, è dotato di attività fosfo tirosinchinasi sorprendentemente sensibile all'azione inibitoria dell'imatinib mesilato.

Leucemia acuta linfoblastica a cellule B

Nella LAL a cellule B la citogenetica convenzionale non è informativa nel 20% dei pazienti vuoi per cattiva qualità dei preparati vuoi per mancanza di divisioni cellulari. Uno studio condotto in 70 pazienti pediatriche affette da LAL ha dimostrato che l'analisi cromosomica convenzionale individua anomalie clonali del cariotipo nel 60% dei pazienti, la citogenetica molecolare nell'80%. Complessivamente 106 alterazioni del cariotipo erano state definite con l'aiuto della FISH mentre solo 34 con il bandeggio G. Alla FISH il 74% dei pazienti mostrava anomalie numeriche, il 54% anomalie strutturali ed il 20% aveva un assetto citogenetico normale. Inoltre, la citogenetica molecolare aveva dimostrato che dodici pazienti con citogenetica convenzionale normale presentavano in realtà anomalie cromosomiche a prognosi sfavorevole. Pertanto questo studio ha dimostrato l'utilità della FISH per una corretta stratificazione prognostica dei pazienti. Un altro studio condotto dallo UK Cancer Cytogenetic Group Study ha esaminato con I-FISH 2367 pazienti affetti da LAL-B.. La percentuale di successo è stata 91% e sono state individuate anomalie clonali nell'89% dei pazienti. In particolare la I-FISH ha dimostrato che un numero significativo di pazienti pre-

sentava la traslocazione BCR-ABL e riarrangiamenti di MLL non dimostrati dall'analisi cromosomica convenzionale. Inoltre il 33% dei pazienti privi di metafasi ed il 59% di pazienti a cariotipo normale presentavano alla FISH con sonde alfoidi un corredo cromosomico iperdiploide non rivelato dalla CC. Si conferma quindi che la I-FISH era assolutamente insostituibile per valutare a quale categoria di rischio appartenesse un determinato paziente.

LAL a cellule T

In questo disordine onco-ematologico la FISH in interfase ed in metafase ha identificato nuove traslocazioni cromosomiche. Tra queste bisogna ricordare la t(9;14)(q34;q32) che determina la fusione di ABL con il gene EML1 e la successiva attivazione costitutiva di ABL1. Un'altra anomalia non dimostrabile con l'analisi citogenetica convenzionale è l'inv(7)(p15q34) che determina la fusione tra il cluster degli "Homeobox genes" e il recettore per la catena beta del recettore della cellula T (TCR β), mappato in 7q34. L'anomalia provoca l'attivazione trascrizionale di due geni "Homeobox" (HOXA10 e HOXA11) come dimostrato dalla RT PCR "real-time". I pazienti con riarrangiamento del TCR β e con inv(7) presentano un'età compresa tra 15 e 49 anni ed un rapporto maschi:femmine di 1.5:1.0, mentre quelli TCR β positivi senza inversione presentano un'età media alla diagnosi più bassa ed un rapporto maschi:femmine di 3.6:1.0. Sul piano fenotipico la cellula linfoide T è CD1a, CD4, CD5, CD7 e CD10 positiva e CD2, CD8 negativa. È stato riportato che in sedici dei diciannove pazienti analizzati il riarrangiamento del TCR β non poteva essere sospettato in base ai risultati della citogenetica convenzionale. Inoltre l'inversione identificata era effettivamente una nuova anomalia ricorrente nelle LAL-T perchè in tutti i pazienti analizzati i punti di rottura a livello dei geni HOXA cadevano in una regione di 107 kilobasi, i geni HOXA10 e HOXA11 erano sempre sovra-espresi e l'assetto fenotipico era costante. Inoltre, i dati indicavano che il gene TCR β pur essendo coinvolto in traslocazioni/inversioni cromosomiche nel 20% dei pazienti con LAL-T, era molto probabilmente bersaglio di traslocazioni ancora da identificare. Altro dato importante era la conferma dell'interessamento dei geni HOXA da parte di traslocazioni cromosomiche. I geni "Homeobox" svolgono un ruolo cruciale non solo nell'emopoiesi normale, ma anche nell'ontogenesi della cellula T. In particolare, il gene HOXA10 è sovra-espreso negli stadi iniziali della differenziazione della cellula T con progressiva riduzione della sua espressione. Lo sviluppo di inv(7) potrebbe alterare tale pattern di espressione genica.

Un'altra anomalia criptica all'analisi citogenetica convenzionale è l'inv(14)(q11.2q32.31), che a livello del punto di rottura prossimale fonde l'estremità 5' del gene BCL11B (gli esoni 1-3 del gene) con il segmento genico TCRDD3 del locus TCRD, mentre a livello del punto di rottura distale fonde il gene TRDV1 al quarto esone di BCL11B. Il trascritto di fusione TRDV1-BCL11B è lungo 1344 paia di basi e contiene materiale derivato dalle regioni cromosomiche 20q11.22, 3p22.33 e 11p22. Ciò indica il carattere complesso dell'anomalia che determina una sovra-espressione di BCL11B e della regione costante di TCRD ma una mancata espressione del gene BCL11B "wild-type".

Quest'ultimo gene svolge un ruolo cruciale nella differenziazione della cellula T ed agirebbe da "tumor suppressor gene". Pertanto la perdita di espressione favorirebbe la trasformazione neoplastica.

Leucemia mieloide cronica (LMC)

Anche nella LMC la FISH con sonde "extra signal" o "dual color", capaci di individuare entrambi i prodotti della traslocazione 9;22 ha fornito nuove informazioni. La metodica ha dimostrato che il 10-15% dei pazienti mostra, oltre alla classica traslocazione, una delezione che di solito è adiacente o più spesso comprende i punti di rottura sui cromosoma 9 e 22 traslocati. La delezione è di dimensioni variabili ma è sempre ampia, potendo estendersi per diverse centinaia di kilobasi. Sul piano patogenetico essa non è un fenomeno tardivo, ma anzi è presente sin dalla diagnosi ed è tre volte più frequente nei pazienti con traslocazioni varianti. Siccome queste ultime sono determinate da errori nel riparo del DNA, era stato supposto che la delezione fosse causata proprio da un difettoso funzionamento i tali meccanismi. La delezione faceva sì che un evento inizialmente ritenuto bilanciato, senza perdita di materiale cromosomico, divenisse sbilanciato, con perdita di materiale cromosomico. Si poteva così creare un nuovo gene di fusione o più verosimilmente si poteva avere la perdita di più geni. Dal punto di vista clinico era stato inizialmente osservato che la delezione aveva un rilevante impatto prognostico sovrapponibile a quello del rischio calcolato secondo Sokal o secondo Harsford. Infatti la sopravvivenza mediana dei pazienti con e senza delezione era di 38 e 88 mesi rispettivamente. Uno studio successivo, che aveva analizzato 354 pazienti trattati con imatinib, non aveva mostrato differenze nella sopravvivenza mediana tra pazienti con e senza delezione, ma la percentuale di risposte ematologiche e citogenetiche era significativamente minore ed il tempo di evoluzione verso la crisi blastica era significativamente più breve per i pazienti con la delezione. Tali risultati sono stati però smentiti recentemente poiché è stato osservato che la delezione 9q non comporta una minore percentuale di risposte ematologiche e citogenetiche all'imatinib, non influisce sulla sopravvivenza e nemmeno sulla durata della risposta. In questo studio l'analisi multivariata dimostrava che il 9q- non aveva alcun impatto prognostico.

Sindromi mielodisplastiche

Vari studi hanno analizzato pazienti con cariotipo normale all'analisi cromosomica convenzionale e hanno dimostrato che la FISH individua anomalie cromosomiche criptiche nel 5-20% di questi pazienti. Uno studio ha dimostrato che la probabilità di osservare un pattern FISH anomalo è più alta nei pazienti con più elevata percentuale di blasti midollari, con malattia in fase avanzata e con più alto rischio prognostico calcolato in base all'IPSS. Inoltre i pazienti con FISH anomala mostrano una maggior probabilità di evoluzione in LAM e hanno un decorso clinico peggiore rispetto ai pazienti con FISH normale. Un secondo studio ha dimostrato che la FISH modificava il punteggio prognostico calcolato secondo l'IPSS in cinque dei nove pazienti con anomalie criptiche. Inoltre, i pazienti con FISH anomala presentano una sopravvivenza complessiva ed una sopravvivenza

libera da eventi significativamente peggiori rispetto a quelle dei pazienti con FISH normale. La morte e la probabilità di evoluzione in LAM sono quindici ed otto volte più frequenti nel primo gruppo di pazienti. Entrambi gli studi suggerivano che l'incapacità della citogenetica convenzionale d'individuare le anomalie dimostrate dalla FISH fosse dovuta alla cattiva qualità delle metafasi ed alla natura sub-microscopica delle porzioni cromosomiche coinvolte nelle anomalie osservate. Dal punto di vista clinico veniva stressato il rilevante apporto della FISH nella definizione clinica di questi pazienti che in base al risultato della metodica cambiavano categoria di rischio IPSS ed erano pertanto candidati a procedure terapeutiche alternative, specie se giovani.

Nei pazienti con SMD a cariotipo complesso la FISH ha spesso permesso di definire la natura di cromosomi marcatori e di individuare nuove traslocazioni cromosomiche sfuggite all'esame cromosomico convenzionale. In particolare l'impiego della metodica nei pazienti con monosomia 5 ha dimostrato che in molti casi il cromosoma 5 è in realtà rotto in numerosi frammenti oppure forma un isocromosoma per le braccia corte, irricognoscibile all'esame standard del cariotipo. La stessa cosa è stata osservata per il cromosoma 7, specie nel caso di riarrangiamenti della porzione terminale del braccio lungo. È stato inoltre suggerito che anche all'interno dei pazienti a cariotipo complesso possano essere identificati sottogruppi a prognosi diversa definita in base ai cromosomi coinvolti nelle anomalie numeriche e strutturali dimostrate dalla FISH.

Dimostrazione di fenomeni di amplificazione genica

LAL-B

Il 2% delle LAL a cellule B presenta un'amplificazione di AML1. Si tratta di pazienti con caratteristiche cliniche particolari e prognosi sfavorevole.

LAL-T

Vari studi hanno dimostrato che il 6% circa dei pazienti con LAL-T presenta un'amplificazione del gene ABL1. Si tratta di un evento del tutto inaspettato e causato da una traslocazione che si sviluppa a livello episomico e che coinvolge il gene ABL1 ed il gene NUP214, entrambi mappati in 9q34. I pazienti con questa alterazione molecolare presentano una sovra-espressione di ABL1. Sul piano clinico il dato più interessante è costituito dalla sensibilità all'imatinib mesilato.

LAM

Un numero esiguo di pazienti presenta un'amplificazione del gene MLL, mappato in 11q23. Il meccanismo con cui il gene determina la trasformazione neoplastica sembra essere diverso da quello operante negli altri tipi di alterazioni coinvolgenti MLL.

Valutazione della malattia minima residua

Sebbene la citogenetica convenzionale insieme alla RT PCR "real-time" sia rimasta il "golden standard" per valutare la risposta alla terapia e l'eventuale persistenza di malattia nei pazienti con LMC anche la FISH può essere utilmente

impiegata per dimostrare un'eventuale MMR. Questo è vero soprattutto nei pazienti con citogenetica negativa per il riarrangiamento BCR-ABL, ma con copie di trascritto BCR-ABL in costante aumento. La recidiva molecolare e la comparsa di positività alla FISH indurranno a trattare immediatamente il paziente ancor prima che si verifichi la recidiva ematologica. Tutte le traslocazioni cromosomiche determinano la fusione dei due geni situati a livello dei punti di rottura dei due cromosomi coinvolti nell'anomalia e la creazione di un gene di fusione. Utilizzando sonde commerciali marcate con fluorocromi diversi e specifiche per i geni interessati dalla traslocazione, è possibile individuare il riarrangiamento cromosomico dimostrando la presenza del gene(i) di fusione(i) su uno o su entrambi i cromosomi colpiti dal riarrangiamento. Nel caso della traslocazione 9,22 con fusione BCR-ABL, la sonda "classical" è composta da una sonda specifica per ABL, marcata in rosso, ed una specifica per BCR, marcata in verde. Le cellule con riarrangiamento BCR-ABL presentano, oltre ai due segnali rosso e verde che corrispondono ai cromosomi 9 e 22 normali, un segnale di fusione di colore giallo, prodotto dalla sovrapposizione rosso-verde che identifica il cromosoma 22 traslocato. Il limite principale della sonda "classical" consiste nell'alta percentuale di cellule (10% circa) con casuale sovrapposizione dei due segnali rosso e verde. Tale percentuale definisce la "soglia di positività". La sonda "extra signal" e la sonda "dual color dual fusion" identificano entrambi i cromosomi traslocati, cioè il der(9) ed il der(22). Per queste sonde il valore soglia di positività è più basso (3% circa) e può essere ulteriormente ridotto aumentando il numero di cellule analizzate, ma l'interpretazione dei risultati è spesso difficile. Pertanto sia la sonda "extra signal" che quella "dual color dual fusion" valutano più accuratamente la presenza di un'eventuale MMR rispetto alla sonda "classical". Per migliorare ancor più la sensibilità della metodica è stato proposto l'impiego di sonde "split-apart". Si tratta di due sonde marcate con fluorocromi diversi complementari alla sequenza di DNA del gene in studio. Tali sonde sono situate in posizione adiacente e mappano agli estremi della regione dove si localizzano i punti di rottura dell'alterazione cromosomica. Così, se la cellula è normale si osserva un segnale di fusione giallo (sovrapposizione rosso-verde), se la cellula presenta il riarrangiamento del gene in questione si osservano un segnale rosso ed un segnale verde separati. Per questo tipo di sonda la soglia di positività è inferiore a quella che si osserva per la "fusion FISH" in quanto la probabilità di "splitting apart" casuale è sicuramente inferiore alla probabilità di sovrapposizione casuale dei due segnali rosso e verde. Ciò rende la metodica particolarmente sensibile e quindi molto utile per dimostrare un'eventuale MMR. Oltre che per questo scopo la "split FISH" può essere efficacemente impiegata quando si vogliono individuare riarrangiamenti in cui uno dei due geni, ad esempio MLL, è partner di almeno 30 geni diversi. In questo caso però il gene partner di MLL viene rapidamente e facilmente individuato solo se sono presenti metafasi. Le potenzialità della "split FISH" sono state recentemente confermate dall'analisi di pazienti con LAL a fenotipo sia B che T. Sono state impiegate sonde per TCF3 (E2A), mappato in 19p13, MLL, mappato in 11q23, ETV6, mappato in 12p13, BCR, mappato in 22q11, SIL-TAL1, mappato in 1q32 e TLX3 (HOX11L2), mappato in 5q35.

Svantaggi della FISH

Abbiamo visto quali siano stati gli importanti contributi della FISH, specie quella in interfase, nei disordini onco-ematologici. Bisogna tuttavia ricordare che la metodica presenta importanti limiti. Infatti la FISH deve sapere anticipatamente qual'è il tipo di anomalia cromosomica che ci si aspetta di trovare in quella data popolazione neoplastica per poter scegliere la sonda più appropriata per l'analisi e, potendo utilizzare un numero limitato di fluorocromi, non riesce ad analizzare contemporaneamente più di tre anomalie. Recentemente anche questi limiti sono stati superati grazie all'introduzione della "multiplex-FISH" (M-FISH) e dello "Spectral Karyotyping" (SKY). Entrambe queste metodiche combinano il potere di screening dell'analisi cromosomica con l'accuratezza dell'analisi molecolare e hanno fornito il primo cariotipo "molecolare", nel quale le 22 paia di autosomi ed i due cromosomi del sesso sono colorati con colori diversi. Un'altra metodica derivata dalla FISH che ha già fornito importanti informazioni all'onco-ematologo è la "Comparative Genomic Hybridization" (CGH). La CGH era stata inizialmente condotta su preparati citogenetici ed i risultati forniti dalla metodica erano influenzati oltre che dalla percentuale di cellule dotate di una data alterazione genica anche dal grado di despiralizzazione dei cromosomi. Per superare questo limite si è sviluppata la "matrix CGH" che ha sostituito i cromosomi con sequenze di DNA spottate in "array" su un supporto di vetro. Tali sequenze di DNA possono essere BAC "Bacterial Artificial Chromosomes" con grandi inserti genomici od oligonucleotidi formati da sequenze relativamente brevi. Nei pazienti con Linfomi non-Hodgkin's e nella LLC la CGH non solo ha identificato nuovi geni importanti per la patogenesi della malattia, ma ha anche confermato i più recenti schemi classificativi.

Bibliografia

1. Bernasconi P. Onco-ematologia molecolare. Edimes 2003.
2. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 30: 971-972, 1971.
3. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science*, 26: 1268-1270, 1976.
4. Cremer T, Lichter P, Bordon J et al. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridisation using chromosome-specific library probes. *Hum Gen*, 80: 235-246, 1988.
5. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med*, 343: 1910-1916, 2000.
6. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Haematol*, 121: 287-295, 2003.
7. Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leucemia with biotinylated probes: identification of 11q23

- breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 9358-9362, 1990.
8. Maia AT, Tussiwand R, Cazzaniga G et al. Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia in cord blood. *Genes Chrom & Cancer*, 40: 38-43, 2004.
 9. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Brit J Haematol*, 129: 520-530, 2005.
 10. Rigolin GM, Bigoni R, Milani R et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*, 15: 1841-1847, 2001.
 11. Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M et al. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia*, 17: 2107-2122, 2003.
 12. Graux C, Colos J, Melotte C et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leucemia. *Nat Genet*, 36: 1084-1089.
 13. Van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18: 895-908, 2004.
 14. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6: 782-792, 2005.

Spectral karyotyping, multicolor FISH e comparative genomic hybridization (CGH): vantaggi e limiti

Cristina Mecucci

Ematologia-Policlinico Monteluce, Università degli Studi di Perugia

Le conquiste della genetica negli anni recenti hanno profondamente mutato i criteri di diagnosi e terapia delle leucemie e dei linfomi. È definitivamente provato che le lesioni genetiche acquisite nelle cellule maligne giocano un ruolo determinante nella genesi delle leucemie e dei linfomi, e che trattamenti specificamente indirizzati contro le lesioni genetiche consentono di raggiungere ottimi successi clinici. Durante gli anni di sviluppo del Progetto Genoma Umano sono state sviluppate tecnologie di base e raffinati strumenti di studio del DNA e dell'RNA.

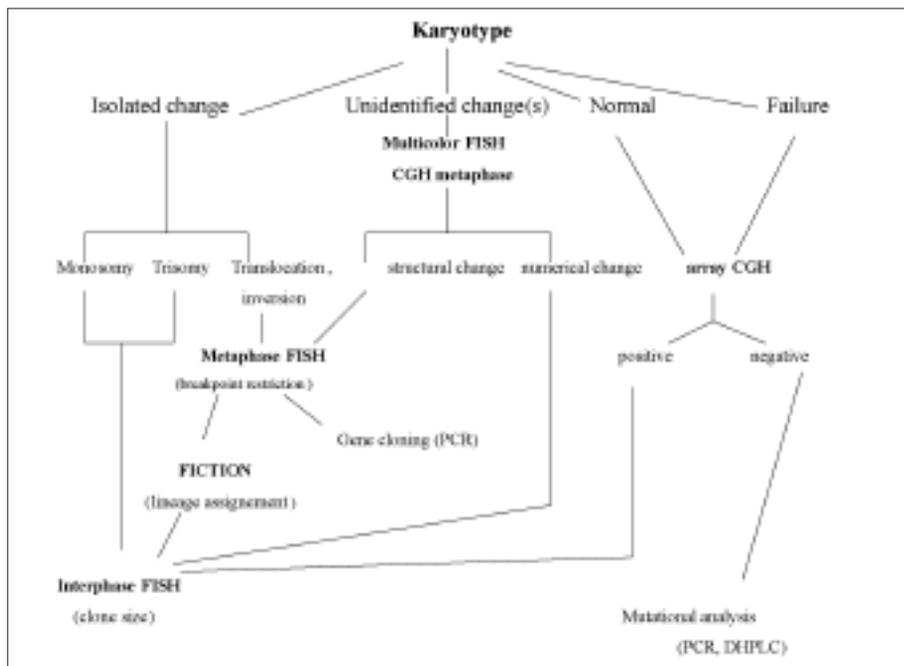


Fig. 1

È pratica corrente e consolidata l'applicazione delle classificazioni citogeneticomolecolari per la diagnosi corretta e la stratificazione prognostica. Esistono tuttavia alcuni limiti della citogenetica convenzionale, nonché della RT-PCR, che possono essere superati grazie all'integrazione di tecnologie del DNA, quali multicolor-FISH, CGH e microarray CGH.

Si propone a tale proposito una visione personale dell'integrazione della citogenetica convenzionale, citogenetica molecolare, metodica di PCR e di analisi mutazionale ai fini della diagnosi e ricerca nelle emopatie maligne.

Multicolor - FISH

Grazie al successo commerciale del sistema SKY, viene anche chiamata SKY-FISH. In realtà si tratta dello sviluppo di una ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) con painting cromosomici multipli in grado di colorare diversamente ciascuna coppia di cromosomi (cariotipo multicolore).

Da un punto di vista dell'immagine, l'effetto è spettacolare, da un punto di vista dell'efficienza, è un approccio vantaggioso dal momento che in un unico esperimento può essere individuata selettivamente ciascuna coppia di cromosomi. Il potere di risoluzione tuttavia, equivale a quello del painting di un intero cromosoma e pertanto in grado di individuare scambi di grossi frammenti senza entrare nel merito della delimitazione fine dei punti di rottura coinvolti nei riarrangiamenti strutturali, obiettivo per il quale è privilegiata la FISH in metafase con sonde locus-specifiche.

È una metodica costosa ma utile quando inserita in un algoritmo di diagnosi citogeneticomolecolare per l'interpretazione di cariotipi complessi, nonché di traslocazioni sbilanciate anche isolate. Alcuni risultati interessanti sono stati ottenuti nello studio di cariotipi normali.

Comparative genomic hybridization (CGH)

La CGH è uno sviluppo particolare dell'ibridazione in situ in metafase in cui la miscela di ibridazione o costituita al 50% di DNA tumorale e al 50% di DNA normale, (marcati con due diversi fluorocromi), viene ibridizzata su cromosomi metafasici normali.

Il pattern di ibridazione viene rielaborato con un software di lettura e tradotto in un profilo che riproduce, in ciascun cromosoma, il rapporto tra i due fluorocromi. Un eccesso o difetto del DNA tumorale versus quello normale si traduce in un segnale di aumento o diminuzione del fluorocromo legato al DNA tumorale, il cui significato genomico corrisponde a delezione, o duplicazione di materiale, dalla semplice trisomia fino all'amplificazione. Viene utilizzato un software di analisi di immagine Applied Imaging. Le metafasi sono esaminate utilizzando appropriate condizioni con tre differenti frequenze di eccitazione corrispondenti al DAPI, alla FITC e al Texas Red. Le regioni cromosomiche sono considerate sovra-rappresentate se il rapporto verde/rosso è inferiore a 0.83, sulla base di profili ottenuti da controlli normali. Le regioni centromeriche, le regioni eterocro-

matiche dei cromosomi 1,9, 16 e Y, e le regioni telomeriche sono escluse dall'analisi per la possibilità di falsi positivi.

Tale approccio è in grado di identificare solo sbilanciamenti cromosomici, ma particolarmente utile poiché in grado di fornire un'informazione genomica completa.

Array CGH

È una tecnica ad alta capacità di risoluzione che permette l'analisi di molti geni in maniera simultanea nel corso di un singolo esperimento. Il principio è lo stesso della CGH convenzionale (Ibridazione competitiva tra 2 DNA genomici marcati con fluorocromi diversi), ma in questo caso le sonde non co-ibridano su piastre metafasiche, bensì su una matrice dotata di spots contenenti cloni per geni o regioni importanti in campo oncologico, immobilizzati su una superficie miniaturizzata. In un unico esperimento è possibile valutare la perdita o il guadagno di materiale per il pool di cloni a disposizione (cDNA, DNA genomico, oligonucleotidi sintetici, BAC, PAC). Tutto questo è consentito da un sistema scanner-PC-software in grado di valutare, analizzare e rielaborare il rapporto tra le quantità relative di acido nucleico (valutato in base alla fluorescenza) in ogni singolo spot. Limite importante della metodica è quello della presenza di falsi positivi legati a siti polimorfici presenti nei microarrays commerciali che utilizzano BAC e PAC. L'utilizzo di arrays con oligonucleotidi è particolarmente interessante per la soluzione di questi problemi interpretativi.

Come la CGH in metafase anche la array-CGH consente un'analisi full-genoma degli sbilanciamenti sia in senso di aumento che di diminuzione del DNA nelle cellule tumorali.

La letteratura è ricca di informazioni, inclusi nuovi risultati, derivanti dall'applicazione della multi-FISH nelle emopatie maligne.

A tutt'oggi non è frequente l'utilizzo della CGH, seppure i dati a disposizione in alcune patologie sottolineano l'importanza di questi approcci nell'interpretazione dei cariotipi complessi.

La correlazione dei risultati con i dati dell'expression profile sono particolarmente interessanti

Bibliografia

1. Cottier M, Tchirkov A, Perissel B, Giollant M, Campos L, Vago P. Cytogenetic characterization of seven human cancer cell lines by combining G- and R-banding, M-FISH, CGH and chromosome- and locus-specific FISH. *Int J Mol Med*, 14(4): 483-95, 2004.
2. El-Rifai W, Larramendy ML, Bjorkqvist AM, Hemmer S, Knuutila S. Optimization of Comparative Genomic Hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides. *Lab Invest*, 77(6): 699-700, 1997.
3. Gebhart E. Genomic imbalances in human leukemia and lymphoma detected by comparative genomic hybridization (Review). *Int J Oncol*, 27(3): 593-606, 2005.

4. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative Genomic Hybridization for molecular cytogenetics analysis of solid tumors. *Science*, 258: 818-821, 1992.
5. Lichter P, Boyle AL, Cremer T et al. Analysis of genes and chromosomes by non isotopic in situ hybridization. *GATA*, 8: 24-35, 1991.
6. Liebisch P, Viardot A, Bassermann N, Wendl C, Roth K, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Stilgenbauer S, Dohner H, Bentz M. Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 122(2): 193-201, 2003.
7. Mathew S, Raimondi SC. FISH, CGH, and SKY in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Methods Mol Biol*, 220: 213-33, 2003.
8. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375, 1996.
9. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet*, 15(4): 406-10, 1997.
10. Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Goettel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Dohner H, Bentz M, Schwaenen C, Lichter P. Automated screening for genomic imbalances using Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization. *Laboratory Investigation*, 82: 47-60, 2002.

Molecular identification of chromosomal translocations in leukemias

Giovanni Martinelli, Pier Paolo Piccaluga, Michele Malagola, Michela Rondoni, Stefania Paolini, Cristina Papayannidis

Istituto di Ematologia e Oncologia Medica, Policlinico Sant'Orsola, Bologna

The karyotype and molecular alterations of acute myeloid leukemia (AML) assessed at diagnosis is generally recognized as the single most valuable prognostic factor in AML. However, using conventional cytogenetic techniques, karyotype abnormalities are detected in only half of all AML cases, although the other half are commonly described as normal-karyotype AML. As more and more of molecularly targeted therapies become available for treatment and management of leukemias, there will be an urgent demand for rapid and reliable molecular diagnostic tests that can identify those cancers that are susceptible to each specific therapy. Regular and thorough molecular analysis of the patient's tumor cells before and during therapy will allow the selection of an optimal inhibitor for the mutation present.

Molecular alteration in AML with karyotype abnormalities

Intensive research efforts over the last decade have provided a better understanding of the molecular genetics underlying hematologic malignancies. Deregulated activation of protein tyrosine kinases (TKs) or transcription factor (TF) has turned out to be a key pathogenic event in human acute myeloblastic leukemogenesis. The 3 most common reciprocal rearrangements in acute myeloid leukemia (AML), t(15;17), inv(16)/t(16;16), and t(8;21), occur in about 20% of all AML cases and are associated with a favorable prognosis.¹⁻³ In these entities most patients achieve a complete remission (CR); however, 10% to 30% finally have a relapse.^{4,5} The corresponding leukemia-specific fusion transcripts, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, and *AML1-ETO*, can be targeted by polymerase chain reaction (PCR)-based methods at diagnosis and to detect minimal residual disease (MRD).^{6,7} Thus, the presence of residual *PML-RARA*⁺ cells strongly predicts relapse and therefore is an important parameter for treatment decisions. In contrast, the prognostic impact of the mere detection of residual *CBFB-MYH11* or *AML1-ETO* transcripts in CR has not been clarified yet⁸.

Today, the quantitative real-time PCR method allows the quantification of fusion transcript levels before, during, and after therapy.^{7,8}

Acute leukemia with CBFbeta-MYH11 fusion transcript

Pericentric inversion of chromosome 16, *inv(16)(p13q22)*, is found in about 8-9 % of newly diagnosed AML cases.⁹ The *inv(16)* positive AMLs are included with those with *t(8;21)* translocation in a group generally referred to as “Core Binding Factor” (CBF) leukemias, as both are characterized by rearrangements of genes that code for components of the heterodimeric transcription factor CBF, which plays an essential role in hematopoiesis.¹⁰ *Inv(16)* or the rarer *t(16;16)(p13;q22)* lead to fusion of the *CBFB* chain gene with the smooth muscle myosin heavy chain gene *MYH11*.¹¹ The resulting FG mRNA can be detected by RT-PCR and represents a suitable molecular marker for both diagnostic and monitoring studies.¹² So far, ten different *CBFB-MYH11* FG transcripts have been reported. The nomenclature used is derived and updated from the review by Liu et al.¹⁰ More than 85 % of positive patients have the type A transcript; type D and E transcripts each represent nearly 5 %, whereas all other types occur in sporadic cases. *CBFB-MYH11*-positive AML are usually considered to have a favorable prognosis, with more than 50 % of patients obtaining long-term CR. Such favorable results with conventional chemotherapy led some authors to consider that allo-BMT is not indicated to consolidate first CR in these patients, even when a suitable donor is available. Nevertheless, the relapse rate is still high indicating that reliable methods to detect MRD during hematologic CR are needed in order to better adapt the intensity of post remission therapy to specific cohorts of patients. So far, the use of qualitative RT-PCR-based methods employed to detect *CBFB-MYH11* FG transcripts did not allow consistent discrimination of prognostic subgroups of patients in CR. 10-20 % of PCR-negative patients eventually relapsed, suggesting that the achievement of PCR negativity is not synonymous with cure. Quantitative RT-PCR studies using competitive PCR or RQ-PCR enabled monitoring of the decrease in *CBFB-MYH11* FG transcripts during early phases of induction and consolidation therapies. Bonamici et Al. define a kinetic and the cut off level for predicting relapse.¹³

Acute leukemia with *t(8;21)(q22;q22)* and AML-ETO fusion transcript

The *AML1(CBFA2, RUNX1)-ETO (MTG8)* gene fusion results from the *t(8;21)(q22;q22)* which is the commonest chromosomal rearrangements associated with AML, being detected in approximately 8 % of AML cases in children and young adults.¹⁴⁻¹⁵ The *AML1* gene encodes the α subunit of the heterodimeric transcription factor CBF (core binding factor) which is critical for hemopoietic development and whose β subunit is disrupted by the *inv(16)/t(16;16)* which leads to the *CBFB-MYH11* FG. *AML1* breakpoints are located within intron 5, whilst *ETO* breakpoints occur upstream of exon 2. This gives rise to a single type of *AML1-ETO* FG transcript in which *AML1* exon 5 is fused to *ETO* exon 2, thereby simplifying molecular screening strategies and MRD monitoring. *AML1-ETO* is an important PCR target for MRD detection in view of the generally favorable outcome of patients with the *t(8;21)*, such that routine use of BMT in first CR has

been shown to confer no overall survival benefit. Therefore, it is of paramount importance to identify the relatively small subgroup of patients at high risk of relapse who could benefit from additional therapy¹⁶⁻¹⁷.

Acute leukemia with t(15;17) (q22;q21) and with the PML-RARA fusion gene transcript

The *PML-RARA* fusion transcript, which are the molecular result of the t(15;17)(q22;q21) translocation, are associated with the majority of APL cases, a distinct AML subset with M3 cytomorphology.¹⁸ APL accounts for 10-15 % of *de novo* AML in younger adults in Southern Europe.¹⁹ The two genes fused in the t(15;17) are *PML*, located on chromosome 15²⁰⁻²³ and the retinoic acid receptor α (*RARA*) gene on chromosome 17.^{24,25} Other genes have been shown to be fused to *RARA* in rare instances of morphological APL cases negative for the t(15;17), such as *PLZF* on chromosome 11q23, *NPM* on 5q35, *NUMA* on 11q13 and *STAT5B* on 17q21.²⁶ The chimeric *PML-RARA* protein is a transcriptional repressor. In the absence of ligand (retinoic acid, RA), it binds DNA together with co-repressors such as SMRT (silencing mediator for RAR and TR) and N-CoR (nuclear receptor co-repressor) and renders chromatin inaccessible to transcriptional activators or basal transcription machinery.^{26,27} *RARA* breakpoints always occur in intron 2 which is 17 Kb in length.²¹ By contrast, three regions of the *PML* locus are involved in the t(15;17) translocation breakpoints: intron 6 (bcr1; 55 % of cases), exon 6 (bcr2; 5 %), and intron 3 (bcr3; 40 %). As a consequence, there are three possible *PML-RARA* isoforms, referred to as long (L, or bcr1), variant (V, or bcr2) and short (S, or bcr3). It should be noted that the size of the PCR products varies in bcr2 positive cases, because of the variable breakpoint positions in exon 6 of the *PML* gene and inclusion of a variable number of *RARA* intron 2-derived nucleotides in the FG transcript.²⁸ Chimeric *PML-RARA* and *RARA-PML* transcripts are formed as a consequence of the reciprocal translocation between the *PML* and *RARA* loci. However, the observation that *RARA-PML* FG transcripts are present in most but not all APL cases, has favored the use of *PML-RARA* FG transcripts as PCR target for detection of APL cells at diagnosis and during monitoring. Standardized conditions for RT-PCR analysis of *PML-RARA* FG transcripts have been developed by the BIOMED-1 Concerted Action. Primer sets have been designed that allow the detection of the various *PML-RARA* FG transcripts, generated by the existence of different *PML* breakpoint regions as well as the presence of alternative splicing between central exons of *PML*. In the last decade, the availability of differentiation therapy with all-*trans* retinoic acid (ATRA) has produced a remarkable improvement in the outcome of patients with APL (reviewed in Grimwade, 1999).²⁷ The challenge is how to identify the relatively small subgroup of patients at particular risk of relapse who cannot be reliably distinguished on the basis of pre-treatment characteristics and who could potentially benefit from more intensive treatment in first remission. Overall, there is general agreement that a positive *PML-RARA* test after consolidation is a strong predictor of subsequent hematological relapse, whereas repeat-

edly negative results are associated with long-term survival in the majority of patients.²⁹ The Italian GIMEMA group (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne Adulto) reported that recurrence of PCR positivity, detected by 3-monthly BM surveillance marrows performed after completion of therapy, was highly predictive of relapse. Using such a strategy, approximately 70 % of relapses were successfully predicted. A different perspective in the application of MRD to identify APL patients at higher risk of relapse has been used by the MRC ATRA trial,³⁰ where the kinetics of achieving a molecular remission was evaluated. Finally, the benefit of early treatment at the time of molecular relapse has still to be proven, but preliminary evidence supports such a strategy.

Among the different methods (conventional karyotyping, FISH and PML immunostaining with specific antibodies), RT-PCR detection of the *PML-RARA* FG transcripts appears to be the only approach suitable for MRD detection. Moreover, quantitative PCR could provide information on the correlation between different levels of disease at early phases of therapy and clinical outcome. However, there have been relatively few studies reporting the use of RQ-PCR in APL patients. Although the molecular diagnosis and monitoring of APL patients represents one of the most relevant examples of the impact of molecular genetics in clinical hematology, further investigations are still needed.

Acute leukemia with MLL fusion transcript

Rearrangement of the MLL (myeloid-lymphoid or mixed-lineage leukemia) gene through a reciprocal chromosomal translocation is found in 5% of adult acute myeloid (AML) and 10% of pediatric acute lymphoid (ALL) leukemia. More than 25 different reciprocal chromosomal translocations, with an 11q23 breakpoint, fuse the MLL gene (also named ALL-1, HRX and Htrx1) to a second partner gene. These leukemias have poor prognosis and frequently have a monocytic, lymphoid or biphenotypic (myeloid and lymphoid) antigen expression in blast cells. Approximately 20-30% of patients diagnosed as having adult de novo AML have normal chromosomes by metaphase analysis and the majority of these patients have good prognosis. With the use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and southern blot analysis, it has been found that 21% had a tandem partial duplication of exons 2 to 6 or 2 to 8 of the MLL gene. These patients showed a very short median survival (2.7 months compared to a 6.8 months median survival for all other AML patients) in the study. The t(4;11) (q21;q23) is the most frequent 11q23 translocation in precursor-B-ALL and involves *MLL* (*HRX*, *Htrx*, *ALL1*) and *AF4* (*FEL*) genes.³¹ While *MLL-AF4* positivity is observed in 5% of pediatric and adult ALL cases, this subgroup accounts for 40 to 60% of infant and therapy induced ALL. At the molecular level, breakpoints in *MLL* and *AF4* genes are spread within introns, between exon 8 and 12 (*MLL*) and exon 3 and 7 (*AF4*), some transcripts being more frequent in either adult or infant ALL. Uckun et al,³² using a nested RT-PCR technique with 10⁻⁴ sensitivity, reported low expression levels of *MLL-AF4* transcripts in up to 13 % of pediatric ALL at diagnosis, some of them being negative for the *MLL-AF4*

rearrangement by Southern analysis, and in around 25 % of fresh normal BM or fetal liver samples.³² Based on these data, the authors suggested that RT-PCR assays for the *MLL-AF4* FG transcripts were not suitable for MRD monitoring. The heterogeneity of the *MLL-AF4* FG transcripts, their relatively low incidence in childhood and adult ALL and their poor prognosis with classical therapy explain the scarce number of reported MRD studies for this RT-PCR target.

Acute myeloblastic leukemia leukemia with t(9;22) (q34;q11) and BCR-ABL fusion transcript

The *BCR-ABL* FG is associated with formation of the Philadelphia translocation (Ph) and is one of the most common genetic abnormalities detected in leukemias.³³ in ALL and CML. Less frequently, it is associated with acute myeloid leukemia.³³ At the molecular level, the Ph chromosome or t(9;22) results in the juxtaposition of the 5' part of the *BCR* gene (chromosome 22) to the 3' part of the *ABL* gene (chromosome 9). Radich et al reported that RT-PCR assessment of MRD was, by multivariate analysis, the best prognostic indicator for continuous complete remission.³⁴ All data suggest that, in Ph+ ALL patients, quantitative monitoring of residual leukemic cells could prove more valuable than their qualitative detection to assist in clinical decision-making.

Molecular alteration in AML with karyotype in AML

Patients with normal-karyotype AML usually have an intermediate risk with a 5-year overall survival of between 35% and 45%, but clinical outcome may vary greatly. In addition, the appropriate choice of consolidation in first remission (chemotherapy versus autologous transplantation versus allogeneous transplantation) is unclear for these patients. Thus, additional markers with prognostic significance are needed to identify clinically relevant subgroups among AML patients with a normal karyotype. Some interesting molecular markers are now becoming available.

1. The transcription factor *CEBPA* (for CCAAT/enhancer binding protein- α) is expressed in myelomonocytic cells and specifically up-regulated during granulocytic differentiation. *cebpa* knockout mice show a selective block in neutrophil differentiation at the stage of myeloblasts that is similar to the maturation arrest seen in human AML patients. Dominant-negative mutations of the *CEBPA* gene have been reported as preferentially in AML patients with a normal karyotype and with myeloblastic AML subtypes (AML-M1 and M2; refs.³⁵⁻³⁶). Interestingly, prognosis of these AML patients seems to be favorable³⁷⁻³⁸.

2. *FLT3* (for *fms*-like tyrosine kinase 3) is a class III tyrosine kinase receptor (for review, see ref.³⁹). It is involved in signaling pathways regulating the proliferation of pluripotent stem cells and early progenitor cells. Internal *FLT3* tandemly duplicated sequences (ITD) within the JM domain encoded by exons 14 and 15 are the most frequent single mutation described in adult AML with a reported incidence between 13% and 32%⁴⁰⁻⁴⁶. Remarkably, *FLT3*-ITD AML exhibit a high relapse

risk, decreased disease-free survival (DFS) and overall survival (OS; refs.⁴⁴). Several groups have found in multivariate analysis that in AML FLT3-ITD is the most significant factor predicting an adverse outcome^{44,47}.

3. *BAALC* (for brain and acute leukemia, cytoplasmic) is a recently identified gene on chromosome 8q22.3 with a protein sequence showing no homology to any other known proteins or functional domains. In hematopoietic cells, *BAALC* expression is restricted to progenitor cells⁴⁸⁻⁴⁹. *BAALC* expression is found in AML and chronic myelogenous leukemias in blast crisis whereas no *BAALC* expression could be detected in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia. In AML patients with normal cytogenetics, high *BAALC* expression seems to predict a poor prognosis. However, the expression of the *BAALC* gene and its potential use as a prognostic marker in normal-karyotype AML in the absence of *CEBPA* or *FLT3-ITD* mutations are unknown.

4. *Nucleophosmin (NPM)*

Nucleophosmin (NPM), a nucleocytoplasmic shuttling protein with prominent nucleolar localization, regulates the ARF-p53 tumor-suppressor pathway. Translocations involving the NPM gene cause cytoplasmic dislocation of the NPM protein. Falini et Al. used immunohistochemical methods to study the sub-cellular localization of NPM in bone marrow-biopsy specimens patients with primary acute myelogenous leukemia (AML). They found a correlation between the presence of cytoplasmic NPM in 35 % percent of patients with clinical and biologic features of the disease. of the 591 specimens from patients with primary AML but not in secondary AML or extrahematopoietic neoplasms other than AML. The presence of cytoplasmic NPM it was associated with a wide spectrum of morphologic subtypes of the disease, a normal karyotype, and responsiveness to induction chemotherapy, but not with recurrent genetic abnormalities, such supporting that cytoplasmic NPM is a characteristic feature of a large subgroup of patients with AML who have a normal karyotype⁵⁰.

References

1. Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood*, 68: 1242-1249, 1986.
2. Schoch C, Haase D, Haferlach T et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia*, 10: 1288-1295, 1996.
3. Fenaux P, Chastang C, Chevret S et al. A randomized comparison of all-trans-retinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood*, 94: 1192-1200, 1999.
4. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic

- acid: result of the Randomized MRC Trial Blood, 93: 4131-4143, 1999.
5. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol*, 107: 69-79, 1999.
 6. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13: 1901-1928, 1999.
 7. Diverio D, Rossi V, Avvisati G et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMAAIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMAAIEOP Multicenter "AIDA" Trial Blood, 92: 784-789, 1998.
 8. Tobal K, Newton J, Macheta M et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood*, 95: 815-819, 2000.
 9. Rowe D, Cotterill SJ, Ross FM, Bunyan DJ, Vickers SJ, Bryon J, McMullan DJ, Griffiths MJ, Reilly JT, Vandenberghe EA, Wilson G, Watmore AE, Bown NP. Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta-MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 111: 1051-1056, 2000.
 10. Liu P, Hajra A, Wijmenga C, Collins F. Molecular pathogenesis of the chromosome16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood*, 85: 2289-2302, 1995.
 11. Claxton DF, Liu P, Hsu HB, Marlton P, Hester J, Collins F, Deisseroth AB, Rowley JD, Siciliano MJ. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myeloid leukemia. *Blood* 83: 1750-1756, 1994.
 12. Hébert J, Cayuela JM, Daniel MT, Berger R, Sigaux F. Detection of minimal residual disease in acute myelomonocytic leukemia with abnormal marrow eosinophils by nested polymerase chain reaction with allele specific amplification. *Blood* 84: 2291-2296, 1994.
 13. Guerrasio A, Pilatrin C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E, Parziale A, Marmont F, Diverio D, Divona M, Lo Coco F, Saglio G. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia*, 16: 1176-1181, 2002.
 14. Friedman AD. Leukemogenesis by CBF Oncoproteins. *Leukemia*, 13: 1932-1342, 1999.
 15. Tobal K and Yin JA. Monitoring of minimal residual disease by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for AML1-MTG8 transcripts in AML-M2 with t(8; 21). *Blood*, 88: 3704-3709, 1996.

16. Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood*, 95: 815-819, 2000.
17. Kondo M, Kudo K, Kimura H, Inaba J, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Horibe K. Real-Time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Detection of AML1-MTG8 Fusion Transcripts in t(8;21)-Positive Acute Myelogenous Leukemia. *Leuk Res*, 24: 951-956, 2000.
18. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*, 1: 549-550, 1977.
19. Biondi A, Rambaldi A. Acute promyelocytic leukemia. Henderson ES, Lister TA, Greaves MS, eds 2002; *Leukemia* 7th ed.: In press.
20. Longo L, Pandolfi PP, Biondi A, Rambaldi A, Mencarelli A, Lo Coco F, Diverio D, Pegoraro L, Avanzi G, Tabilio A, Zangrilli D, Alcalay M, Dotti E, Grignani F, Pelicci PG. Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med*, 172: 1571-1575, 1990.
21. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science*, 249: 1577-1580, 1990.
22. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 347: 558-561, 1990.
23. Lemons RS, Eilender D, Waldmann RA, Rebentisch M, Frej AK, Ledbetter DH, Willman C, McConnell T, O'Connell P. Cloning and characterization of the t(15;17) translocation breakpoint region in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 2: 79-87, 1990.
24. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330: 444-450, 1987.
25. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330: 624-629, 1987.
26. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20: 7186-7203, 2001.
27. Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol*, 106: 591-613, 1999.
28. Reiter A, Saussele S, Grimwade D, Wiesmels JL, Segal M, Weisser A, Hochhaus A, Willer A, Reichert A, Büchner T, Lengfelder E, Hehlmann R, Cross NCP. Genomic anatomy of the t(15;17): significant subclustering of genomic breakpoints within RARA intron 2. *Blood*, 98: 586a, 2001.
29. Lo Coco F, Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Rossi V, Avvisati G, Rambaldi A, Arcese W, Petti MC, Meloni G, Mandelli F, Grignani F, G. M, Barbui T,

- Pellicci PG. Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*, 340: 1437-1438, 1992.
30. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood*, 93: 4131-4143, 1999.
 31. Rowley JD. Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia*, 14: 513-517, 2000.
 32. Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty ML, Sensel MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N. Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood*, 92: 810-821, 1998.
 33. Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Demuynck H, Boogaerts M, Louwagie A, Doyen C, Stul M, Cassiman JJ, Dal Cin P, Castoldi G, Van den Berghe H. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: cytoimmunologic and cytogenetic features. *Haematologica*, 81: 423-427, 1996.
 34. Radich J, Gehly G, Lee A, Avery R, Bryant E, Edmands S, Gooley T, Kessler P, Kirk J, Ladne P, Thomas ED, Appelbaum FR. Detection of bcr-abl transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation. *Blood*, 89: 2602-2609, 1997.
 35. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*, 3: 89-101, 2003.
 36. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein α is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*, 18: 4301-4314, 1998.
 37. Pabst T, Mueller BU, Zhang P et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukaemia. *Nat Genet*, 27: 263-270, 2001.
 38. Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S et al. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood*, 15; 99: 1332-1340, 2002.
 39. Van Waalwijk B, van Doorn-Khosorvani S, Erpelinck C, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*, 4: 31-40, 2003.
 40. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: identification of prognostically relevant genotypes and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, 15; 22: 624-633, 2004.
 41. Snaddon J, Smith ML, Neat M et al. Mutations of CEBPA in acute myeloid leukaemia FAB Types M1 and M2. *Genes Chromosomes Cancer*, 37: 72-78, 2003.
 42. Kottaridis P, Gale RE, Linch DC. FLT3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*, 122: 523-538, 2003.

43. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10: 1911-1918, 1996.
44. Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3 activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 15; 99: 4326-4335, 2002.
45. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 15; 98: 1752-1759, 2001.
46. Schnittger S, Schoch C, Dugas M et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 1; 100: 59-66, 2002.
47. Griffin JD. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*, 97: 2193A-2193, 2001.
48. Tanner SM, Austin JL, Leone G et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20; 98: 13901-13906, 2001. Epub, 13, 2001.
49. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a cancer and leukemia group B study. *Blood*, 1; 102: 1613-1618, 2003. Epub, 15, 2003.
50. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 20; 352(3): 254-266, 2005. Erratum in: *N Engl J Med*, 17; 352(7): 740, 2005.

GENE EXPRESSION PROFILING
E PROTEOMICA

Necessità della biologia molecolare nella moderna medicina

Giuseppe Saglio, Stefano Ulisciani

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università di Torino

Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano - Torino

La medicina clinica è nel mezzo di una rivoluzione guidata da una sempre maggiore conoscenza del genoma umano e dai progressi in biotecnologia molecolare. Questa rivoluzione si ripromette di trasformare la pratica clinica da un approccio nei confronti del rischio basato sulla popolazione (oppure: un approccio basato sullo studio della popolazione a rischio) e il trattamento empirico, a un modello predittivo e individualizzato basato sulla classificazione molecolare delle malattie e sulla terapia mirata. L'idea è che approcci clinici personalizzati potrebbero aumentare l'efficacia del trattamento riducendone tossicità e costi.

Non c'è altro campo in cui tutto ciò sia così evidente come in oncologia. Le neoplasie sono malattie complesse. La nostra tassonomia rispetto al cancro, basata principalmente sull'aspetto istopatologico, include più di 200 entità distinte emergenti da altrettanti tipi cellulari. A tutto ciò si aggiunga che i tumori possiedono mutazioni somatiche e alterazioni epigenetiche, molte delle quali specifiche per ogni singola neoplasia; questa anormalità molecolare influenza l'espressione dei geni preposti al controllo della crescita cellulare, l'invasività, il potenziale metastatico e la risposta o la resistenza alla chemioterapia. La complessità genetica dei tumori probabilmente spiega la diversità clinica di lesioni istologicamente simili, ma è sempre stato difficile affrontare tale varietà con i metodi tradizionali, poichè meglio assortiti per lo studio di un solo gene per volta. L'avvento della tecnologia del *DNA microarray*, invece, permette la misurazione quantitativa di complessi, di pattern d'espressione multigenica nei tumori.

La tecnica del *DNA microarray* mostra set di polimeri di acidi nucleici, immobilizzati su una superficie solida, come sonde per le sequenze geniche. È relativamente facile da usare; è in grado di misurare l'espressione genica di migliaia di geni simultaneamente, e può essere applicata ad un gran numero di campioni in parallelo. I profili di espressione genica risultanti possono essere utilizzati per la classificazione molecolare dei tumori, assieme alla loro sede d'origine, alla loro predisposizione a metastatizzare e alla probabilità che rispondano alla terapia.. I profili derivati dal microarray possono anche aiutare nella comprensione delle vie molecolari associate ai diversi tipi di tumore. C'è quindi un forte interesse nel creare una nuova generazione di test diagnostici volti allo studio delle neoplasie,

basati sui profili di espressione genica, che possano predire accuratamente la storia naturale di un tumore e la risposta alla chemioterapia in ogni singolo paziente. I microarray sono uno strumento molto valido nell'ambito della ricerca poiché consentono ai ricercatori di ottenere una visione imparziale dell'espressione genica nei campioni tissutali; ciò detto, alcuni hanno messo in discussione la loro applicazione diretta in ambito clinico per una diagnosi individualizzata e un conseguente piano di trattamento. I microarray hanno un margine di errore non trascurabile e, occasionalmente, possono mostrare variabilità interreplicazione e intergruppo nella misurazione. Una seconda considerazione è che in un singolo campione, vengono misurate migliaia di variabili, molte delle quali sono irrilevanti ai fini dell'interesse clinico. Sono quindi necessari complessi strumenti statistici per estrarre dei saggi informativi dai non raffinati dati offerti dal microarray. Ancora, questa moderna tecnologia richiede snap-frozen tissue (sezioni congelate di tessuto) per l'analisi dei profili d'espressione genica basati sul microarray; risulta però possibile reperire i campioni congelati solo per una serie stabilita di tumori per lo studio iniziale di profili di microarray da utilizzare clinicamente, ne segue che gli studi di validazione sono spesso limitati dall'esiguità del materiale tissutale (vedi anche dalla disponibilità di tessuto), dal momento che i campioni tumorali sono generalmente fissati in formalina piuttosto che congelati. Queste considerazioni pongono considerevoli ostacoli all'uso routinario dei microarray nei laboratori clinici, dove i test devono essere altamente riproducibili e facilmente interpretabili. Una strategia per tradurre i profili di microarray in test clinici potrebbe essere quella di identificare per prima cosa dei piccoli profili diagnostici di espressione genica con dei microarray e poi validare l'utilità clinica di questi geni sia retrospettivamente, sia prospettivamente con l'uso di un saggio semplice, efficace e convenzionale come la RT-PCR quantitativa. Questa particolare strategia si realizza assumendo che esistano piccoli set di geni per ogni distinzione diagnostica di interesse. Appare evidente come questa convinzione non sia da ritenersi sempre valida. Il maggior punto di forza di questo approccio è che potenzialmente l'uso della firma genica, inizialmente scoperta con i microarray su tessuti congelati, può essere validato tramite RT-PCR quantitativa su campioni di tessuto fissati in formalina e immersi in paraffina, standard globale per gli studi di anatomia patologica. Lossos et al. Hanno usato un mezzo per identificare e validare un "marker" d'espressione genica specifico per il linfoma diffuso a grandi cellule B in grado di predire la risposta al ciclo chemioterapico standard per questa patologia, (CHOP). Il gene 6, da loro studiato tramite PCR, è indipendente dal sistema IPI e si aggiunge ad esso come ulteriore parametro clinico del verosimile andamento del trattamento nei pazienti con tale patologia. Pertanto Lossos e coll. Hanno superato una pietra miliare nello sviluppo dei test diagnostici clinici mirati allo studio dei tumori, muovendo da una imparziale osservazione dell'espressione genica nei vari tumori umani, alla creazione e iniziale validazione di un nuovo strumento diagnostico che si inserirebbe facilmente nella pratica clinica e dovrebbe affinare le misure attualmente disponibili usate per la stratificazione del rischio. Questo strumento predittivo suddivide la popolazione in base ad un'alta, media e bassa risposta al trattamento (categorie, que-

ste, paragonabili a quelle utilizzate anche dagli altri sistemi di valutazione). La valutazione di più larghe coorti di pazienti permetterebbe lo sviluppo di modelli probabilistici per una più accurata predizione della probabilità di risposta alla chemioterapia nei singoli pazienti. Ci sono poi iniziali indicazioni secondo cui sarebbe possibile lavorare direttamente su campioni di tessuto fissati e paraffinati per scoprire nuovi marcatori sia con l'utilizzo di saggi di RT-PCR quantitativa fortemente multiplexed sia con i microarray. Perché questi studi dovrebbero interessare così tanto i clinici? L'oncologia sta guidando un'era in cui si cerca di puntare alla diagnosi personalizzata e alla conseguente pianificazione terapeutica tramite lo sviluppo e l'attuazione di strumenti di diagnostica molecolare sempre più raffinati. Sebbene ai test di diagnostica clinica sia sempre stata riservata un'attenzione minore rispetto allo studio degli agenti terapeutici in ambito oncologico, il cambiamento è imminente. Per prima cosa sarebbe possibile creare test diagnostici molecolari in grado di predire la risposta di tutti i tumori umani a un singolo agente o a una terapia di associazione, consentendo una più attenta e individualizzata armonizzazione (conciliazione) della diagnosi molecolare con la terapia. Inoltre, studi iniziali sulla genomica tumorale si sono concentrati sui microarray d'espressione dell'RNA, insegnandoci come approcciarci ai complessi dati biologici nell'era genomica. Da questa esperienza si apprende quanto sia importante l'informazione sulle tecniche più innovative per avere un modello di ragionamento "molecolare" nei confronti delle patologie. Tali acquisizioni hanno profonde implicazioni se viste in direzione dello sviluppo di nuovi farmaci, della stesura di trial clinici e della pianificazione degli interventi terapeutici.

Gene expression profiling: principi e applicazioni in ematologia

Sergio Ferrari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

La possibilità di ottenere i diversi tipi di cellule del sangue umane da varie fonti quali il sangue periferico, mediante prelievo o aferesi, dal midollo osseo, mediante biopsia osteo midollare, o da sangue di cordone ombelicale, e la ulteriore possibilità di purificare sottopopolazioni sia di cellule staminali, di precursori e di cellule terminalmente differenziate mediante marcatori di superficie e biglie immunomagnetiche, ha permesso di utilizzare in modo adeguato le metodologie post-genomiche quali i DNA microarrays e proteomica. La tecnologia dei DNA microarrays è stata sviluppata all'fine degli anni novanta e utilizza il principio della ibridazione di RNA cellulare totale ottenuto da contesti cellulari purificati su un supporto solido, nylon o silice, in cui le sequenze di DNA complementari (oligonuclotidi o cDNA) sono disposti ordinatamente e quindi riconoscibili, sul modello della ibridazione secondo la metodica di Grunstein-Hogness. La miniaturizzazione della griglia di DNA complementari ha portato allo sviluppo di chip che sono in grado di riconoscere fino a 52.000 diversi trascritti su una superficie di pochi cm². È altrettanto evidente che l'analisi dei risultati dell'ibridazione viene gestita da adeguati programmi di analisi che permettono la catalogazione di tutti i trascritti ibridati e quindi l'interpretazione dei risultati ottenuti. Oltre alla parte di biologia molecolare tale metodologia prevede quindi una notevole utilizzazione di competenze bioinformatiche. Il sistema che usiamo nel nostro laboratorio è quello sviluppato e messo a punto da Affymetrix. Il monitoraggio di tutti gli RNA presenti in una cellula prende il nome di trascrittoma o profilo di espressione genica e si può considerare, con qualche eccezione, il risultato diretto dell'attività trascrizionale della cellula. Il monitoraggio dei trascritti costituisce un livello intermedio di complessità, infatti mentre il numero di geni, come dedotto dal progetto genoma, è di circa 22-25.000, il numero dei trascritti è molto maggiore, se si considerano i meccanismi di splicing alternativo o siti multipli di inizio della trascrizione, e ammonta a circa 70-80.000. La complessità di studio aumenta notevolmente a livello proteico per le numerose modificazioni post-traduzionali a cui possono andare incontro le proteine e per la loro diversa capacità di interazione (interattoma) che porta alla possibile attivazione di oltre 100.000 funzioni per contesto cellulare. Quindi notevolmente diverse sono le difficoltà incontrate dai ricercatori negli studi di biologia genomica e post-

genomica. Rilevante ai fini di programmare correttamente gli esperimenti di DNA microarray è sia la conoscenza del sistema biologico sia il disegno sperimentale. In generale, la disponibilità della tecnologia dei DNA microarrays ha fornito uno strumento importante di indagine per lo studio del profilo di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, permettendo quindi di valutare quanti e quali geni sono accesi in uno specifico contesto cellulare (1). L'analisi comparativa fatta con questa metodologia in contesti cellulari diversi ha permesso inoltre: a) di affrontare il problema della complessità di programmi genetici quali quello proliferativo (2); b) di studiare i meccanismi molecolari che stanno alla base della trasformazione e progressione tumorale (3); c) di fare una classificazione molecolare di diversi tumori per finalità diagnostiche (4); d) di correlare l'espressione genica con la prognosi di diverse neoplasie (5); e) di identificare i geni espressi nel processo di differenziamento (6); d) di identificare i geni espressi in seguito a trattamenti farmacologici (7), aspetto rilevante per la terapia di numerose malattie neoplastiche e non; e) di studiare meccanismi di regolazione genica non ancora conosciuti (8). È evidente che la tecnologia dei DNA microarrays ha avuto ed ha un profondo impatto sulla la ricerca di base e applicata. Per quanto concerne la ricerca di base cercherò di riassumere i risultati da noi ottenuti utilizzando come modello biologico la mielopoiesi umana normale. Da anni infatti il nostro laboratorio si occupa dello studio, a livello molecolare, della mielopoiesi normale e leucemica con particolare interesse alla mono e granulocitopoiesi (9). Nello studio dell'emopoiesi normale uno dei problemi irrisolti riguarda i meccanismi molecolari che stanno alla base del differenziamento della cellula staminale emopoietica multipotente. In particolare i meccanismi di selezione di linea (lineage commitment) a cellule precursori e la regolazione dei programmi differenziativi che portano a cellule terminalmente differenziate profondamente diverse fra loro per morfologia e funzione (processo di maturazione). L'emopoiesi infatti avviene nel contesto microambientale midollare dove sono presenti, oltre alle cellule ematiche, anche numerose cellule accessorie responsabili della secrezione di numerose citochine e fattori di crescita emopoietici, nonché di interazioni cellula-cellula (nicchia emopoietica). Le cellule staminali emopoietiche dell'adulto (midollari e periferiche) e quelle fetali derivate dal sangue del cordone ombelicale hanno caratteristiche biologiche particolari quali l'auto-rinnovamento (self-renewal), la capacità di dare origine ai precursori delle linee differenziate mieloidi e linfoidi (lineage commitment) e quella di ripopolare il midollo di topi irradiati (engraftment). Più recentemente numerosi studi hanno evidenziato la capacità della cellula staminale emopoietica di trans-differenziare, di dare origine cioè a cellule non emopoietiche quali epatociti, cheratinociti, neuroni (developmental plasticity) (10). Una delle problematiche aperte è se questi segnali extracellulari siano in grado di influenzare le cellule staminali nel passaggio a precursori cellulari di specifiche linee (modello istruttivo) o se permettano semplicemente la sopravvivenza e la proliferazione di predeterminate cellule staminali (modello permissivo) (11). Anche se questo secondo modello sembra quello prevalente, la notevole plasticità differenziativa delle cellule staminali non permette di chiarire questo dubbio. Inoltre recentemente è stato proposto un

modello in cui la fase di transizione da cellula staminale a precursore multilineare e/o monolineare sarebbe determinato dall'antagonismo fra diversi regolatori trascrizionali dell'ematopoiesi (12). Recenti pubblicazioni hanno permesso di caratterizzare mediante lo studio del profilo di espressione genica, il fenotipo molecolare della cellula staminale emopoietica di topo (13) e umana (14). Una ulteriore problematica aperta è legata ai meccanismi molecolari che stanno alla base della maturazione terminale delle cellule emopoietiche.

In questo studio abbiamo applicato la tecnologia dei DNA microarrays alla caratterizzazione molecolare di diverse popolazioni di cellule staminali emopoietiche anche di recente isolamento come le CD34-/Lin- (15). Mediante l'analisi della variabilità del trascrittoma abbiamo cercato di correlare le proprietà biologiche di tali sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche con l'espressione differenziale di numerose famiglie geniche funzionalmente rilevanti quali fattori trascrizionali, trasduttori del segnale, molecole di adesione, marcatori di superficie, marcatori del differenziamento e geni ciclo relati. I risultati da noi ottenuti hanno chiaramente evidenziato che le cellule staminali emopoietiche CD34-/Lin- sono cellule quiescenti, fuori ciclo, hanno attivato delle vie di trasduzione inibitorie della proliferazione come quella dell'IL-10 e dell'IL-17. Le cellule staminali CD34+ sia Lin- che Lin+ sono cellule in ciclo, prevalentemente nella fase G1, con una attività trascrizionale notevolmente più permissiva in grado di esprimere geni rilevanti per l'autorinnovamento, il differenziamento e molecole di adesione importanti per l'engrafment. A conferma di questi dati di espressione, il saggio clonogenico ha evidenziato che le cellule staminali CD34+ sono sensibili, a differenza delle cellule staminali CD34-/Lin-, all'attività mitogenica della trombopoietina. Inoltre sono trascritti geni associati alla Fase G1 del ciclo e funzionalmente coinvolti nella sintesi proteica, nel processamento del RNA, nel rimodellamento della cromatina, ecc. Anche se non sono ancora noti gli stimoli microambientali che permettono l'entrata in ciclo delle cellule staminali CD34-/Lin- possiamo ipotizzare che il modello di emopoiesi più coerente con i nostri dati sia quello dell'espansione simmetrica della cellula staminale emopoietica e non necessariamente il modello di divisione asimmetrica. Inoltre riteniamo che il modello dell'emopoiesi non sia così strettamente gerarchico come molti autori sostengono, ma che le proprietà biologiche dipendano dallo stato cinetico di tali cellule e che la fase G1 sia la più coinvolta nella modulazione dell'espressione genica alla base dell'attorinnovamento, differenziamento o engrafment e quindi anche della plasticità differenziativa (16) in accordo con il modello di emopoiesi proposto da Quesenberry (17).

Anche se la mielopoiesi è un processo altamente riproducibile in vivo e in vitro ed ha quindi la caratteristica della "robustness" (18) è comunque perturbabile mediante diversi tipi di condizionamento quali ad es. trattamento con sostanze biologicamente attive quali la Vit. D3 o RA, mediante esperimenti di trasferimento genico nelle cellule staminali o nei precursori, o mediante inattivazione selettiva di funzioni geniche (silenzamento genico).

Altri studi condotti nel nostro laboratorio hanno riguardato le variazioni del trascrittoma nella fase di commitment (plasticità differenziativa) che porta la cellula

staminale CD34+ a precursori mieloblastici, monoblastici, eritroblastici e megacarioblastici. Il modello sperimentale da noi utilizzato è stato quello della coltura in vitro di cellule staminali emopoietiche derivate da sangue di cordone ombelicale, coltivate in presenza di un cocktail di citochine e fattori di crescita tali da sostenere la loro attività proliferativa e da specifici fattori di crescita per condizionarne il passaggio a precursori. Inoltre sempre utilizzando tale modello in vitro abbiamo studiato l'importanza della forma attiva della Vit. D3 nel commitment monocitario. I risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza che dosi fisiologiche di Vit: D3 attivano, mediante la via genomica, cioè attraverso il recettore VDR, il commitment della cellula staminale alla mono-macrogopoiesi come dimostrato dal saggio clonogenico in metil-cellulosa e come confermato dalle variazioni del trascrittoma (19). La purificazione, fatta mediante biglie immunomagnetiche, di precursori monoblastici CD14+ e mieloblastici CD14- e lo studio in vitro del loro potenziale proliferativo e differenziativo, studiato mediante citometria flusso, ha evidenziato che i monoblasti CD14+ hanno una capacità cicliante molto limitata, 2-3 cicli replicativi, e quindi si arrestano nella fase G1 del ciclo e differenziano spontaneamente, senza necessità di trattamento con agenti inducenti quali Vit. D3, TGF β , M-CSF, a macrofagi. I mieloblasti CD14- conservano invece una notevole capacità cicliante, sono in grado di completare 12-15 cicli replicativi, e una bipotenzialità differenziativa a mono-macrogopoiesi inducibile sia da Vit. D3 e M-CSF per la monocitopoiesi, che ATRA e G-CSF per la granulocitopoiesi. Lo studio in citometria della coespressione di due marcatori di linea come la MPO per la granulocitopoiesi e il CD14 per la mono-macrogopoiesi, hanno inoltre dimostrato una transizione continua di precursori mieloblastici, MPO positivi e CD14-, verso i precursori monoblastici CD14+ e MPO-. Infatti si osserva la coespressione dei due marcatori in una rilevante percentuale di cellule. Questa è una evidenza importante di "lineage swithching" o "intra hematopoietic plasticity" che si realizza a livello di precursori e non di progenitori (20). La comparazione dei profili di espressione genica dei monoblasti e dei mieloblasti ha permesso lo studio di una lista notevole di geni differenzialmente espressi appartenenti a diverse famiglie funzionali come modellatori della cromatina, fattori trascrizionali, recettori per fattori di crescita, marcatori di superficie, proteine dei granuli, molecola di adesione ecc. In particolare fra i fattori trascrizione evidenziati, l'espressione differenziale di MafB, ICSBP1, CEBP β nei monoblasti colpisce per l'entità della loro espressione differenziale. La rilevanza funzionale di Maf B nella monocitopoiesi umana è stata dimostrata da esperimenti di over-espressione mediata da vettori retrovirali, di tale fattore trascrizionale nel contesto staminale fetale CD34+. Tali esperimenti hanno messo in evidenza che il programma genetico attivato da MafB nel contesto dei progenitori CD34+ è specifico dei monoblasti e non dei mieloblasti e questo è confermato anche dal saggio clonogenico in metil-cellulosa (21). Altri fattori trascrizionali come HoxA10 e TFE 3 sono rilevanti per il commitment e il differenziamento mono-macrogofico.

Per quanto riguarda la ricerca applicata abbiamo sviluppato due linee di ricerca usando come modello sperimentale le Leucemie Mieloidi Acute. La prima ha

riguardato l'individuazione di una "signature" prognostica che distingue le LMA refrattarie sia agli agenti inducenti il differenziamento sia ai chemoterapici rispetto alle LMA sensibili, signature validata mediante RT-PCR quantitativa (22); la seconda, che è in corso riguarda, il confronto del profilo di espressione genica di diversi tipi di blasti leucemici con la controparte normale per individuare geni coinvolti nel blocco differenziativo e possibilmente nuovi marcatori che distinguano il contesto normale dal leucemico.

In conclusione possiamo dire che:

- 1) gli studi delle variazioni del trascrittoma nell'emopoiesi normale umana associati a studi funzionali hanno dato informazioni rilevanti riguardo ai meccanismi molecolari che stanno alla base delle proprietà biologiche delle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche
- 2) il modello cinetico sembra che sia alla base delle variazioni del profilo di espressione genica che si ha nelle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche, e che l'espansione di tali cellule è probabilmente più riducibile al modello di espansione simmetrica più che asimmetrica. Il modello cinetico può coesistere con l'ipotesi del modello strettamente gerarchico dell'emopoiesi.
- 3) La plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche dipende dagli stimoli microambientali, dalla capacità ciclabile di queste cellule e dall'induzione di fattori trascrizionali che sono alla base della scelta delle diverse linee differenziative.
- 4) il lineage switching è possibile anche a livello di precursori e non solo di progenitori emopoietici.
- 5) È possibile l'identificazione di "signature" prognostiche nell'ambito delle LMA valdate con altre metodologie quali la RT-PCR quantitativa.
- 6) Riteniamo che sia biologicamente interessante il confronto fra cellule leucemiche e controparte normale al fine di identificare nuovi geni o coinvolti nel blocco differenziativo dei blasti o nuovi marcatori in grado di discriminare il contesto leucemico da quello normale.

Bibliografia

1. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Gen*, 21: 10, 1999.
2. Cho RJ, Campbell MJ, Winzler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular Cell*, 2: 65, 1998.
3. Alon U, Barkai D, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *PNAS*, 96: 6745, 1999.
4. Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognos-

- stic subclasses in adult acute myeloid leukemia: *NEJM*, 350: 1605-1616, 2004.
5. Valk PJM, Verhaak GW, Beijen MA, Erpelinck CAJ, van Doorn-Khosrovani SB, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Lowenberg B, Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia: *NEJM*, 350: 1617-1628, 2004.
 6. Tagliafico E, Tenedini E, Bergamaschi A, Manfredini R, Percudani R, Siena M, Zanocco-Marani T, Grande A, Montanari M, Gemelli C, Torelli U, Ferrari Se. Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL-60 cells shows a phenotypic but not a complete functional conversion to monocytes. *Cell Death Diff*, 9: 1185-1195, 2002.
 7. Der SD, Zhou A, Bryan R, Williams G, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *PNAS*, 95: 15623, 1998.
 8. Young RA. Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell*, 102: 9, 2000.
 9. Ferrari S, Manfredini R, Grande A, Torelli G, Torelli U. Proliferation, differentiation arrest and survival in leukemic blast cells. *Ann. NY Acad. Sci USA*, 663: 204-214, 1992.
 10. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102: 3483-3493, 2003.
 11. Morrison SJ, Nirao M, Shah M, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88: 287-298, 1997.
 12. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Rev. Genetics*, 1: 57-64, 2000.
 13. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KA, Overton GC, Lemischka IR. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288: 1635-1640, 2000.
 14. Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM et al. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J Leukoc Biol*, 75: 314-323, 2004.
 15. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*, 4: 1038-1045, 1998.
 16. Manfredini R, Zini R, Salati S, Siena M, Tenedini E, Tagliafico E, Montanari M, Zanocco-Marani T, Gemelli C, Vignudelli T, Fogli M, Rossi L, Fagioli ME, Catani L, Lemoli RM, Ferrari S. The kinetic status of Hemopoietic Stem Cell (HSC) subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment and engraftment. *Stem Cells*, 23: 496-506, 2005.
 17. Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M et al. The marrow stem cell: the continuum. *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1:S19-S22, 2003.
 18. Stelling J, Sauer U, Szallasi Z, Doyle FJ, Doyle J. Robustness of cellular functions. *Cell*, 11: 675-685, 2004.
 19. Grande A, Montanari M, Tagliafico E, Manfredini R, Zanocco-Marani T, Siena M, Tenedini E, Gallinelli A, Ferrari Se. Physiological levels of 1α , 25

- dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *Journal of Leukocyte Biology*, 71: 641-651, 2002.
20. Montanari M, Gemelli C, Tenedini E, Zanocco Marani T, Vignudelli T, Siena M, Zini R, Salati S, Chiossi G, Tagliafico E, Grande A, Ferrari S. Correlation between differentiation capacity and mRNA expression profiling of CD34+ derived CD14- and CD14+ myeloid precursors. *Cell Death Diff*, 12: 1588-1600, 2005.
 21. Gemelli C, Montanari M, Tenedini E, Zanocco Marani T, Vignudelli T, Siena M, Zini R, Salati S, Manfredini R, Grande A, Ferrari S. Retrovirally mediated MafB over-expression induces the monocyte differentiation of monoblastic cell lines and CD34+ hematopoietic progenitors. In press *Cell Death Diff*.
 22. Tagliafico E, Tenedini E, Manfredini R et al. Identification of a molecular signature indicating refractoriness in Acute Myeloid Leukemia. Submitted.

Proteomica clinica: realtà e prospettive

Giampaolo Merlini

Laboratori di Biotecnologie, IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica,
Università degli Studi di Pavia

La proteomica apre nuovi orizzonti in numerose aree di ricerca in Medicina. La proteomica clinica è orientata alla scoperta di nuovi bersagli per farmaci innovativi e di nuovi biomarcatori altamente sensibili e specifici per la diagnosi precoce, per il follow-up e per definire la prognosi e orientare la strategia terapeutica. Tecnologie applicate alla proteomica, come il “surface-enhanced laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry” (SELDI-TOF MS) e vari tipi di “protein arrays” stanno muovendo dai laboratori di ricerca a quelli di chimica clinica come strumenti per l’analisi delle proteine. (1, 2) Queste tecnologie hanno consentito lo sviluppo del concetto di “profilo proteico” che utilizza numerosi biomarcatori, e che consente di definire “profile signatures” correlate alla malattia. Le principali applicazioni cliniche riguardano l’oncologia (tumori dell’ovaio, della mammella, del polmone, della prostata) la neurologia (malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer, la sclerosi multipla) la cardiologia, l’infettivologia, la nefrologia, l’endocrinologia. La proteomica si sta gradualmente estendendo a tutte le discipline. Tuttavia, numerosi problemi devono essere risolti per consentire l’impiego di queste tecnologie nel laboratorio di biochimica clinica. La variabilità pre-analitica, analitica e biologica hanno un impatto rilevante sul risultato finale. In particolare, la variabilità pre-analitica influenza pesantemente il profilo proteico ottenuto con le varie tecniche di spettrometria di massa. Per studiare questo problema cruciale la “Human Proteome Organization” (HUPO) ha istituito uno “Specimen Committee” nel 2002 per standardizzare le condizioni di raccolta e conservazione dei campioni. (3) Un’altra causa di variabilità che deve essere considerata nella ricerca di biomarcatori è la variabilità biologica interindividuale che somma le differenze di espressione proteica fra individui dovuta soprattutto all’età, sesso e razza. L’enorme quantità di dati prodotti dall’analisi proteomica, combinata alla variabilità dovuta alla strumentazione ed alla variabilità biologica richiede un robusto disegno sperimentale, appropriata calibrazione degli strumenti, la disponibilità di materiale di riferimento e metodi di bioinformatica adeguati, al fine di generare dati di buona qualità dai quali sia possibile trarre solide conclusioni. L’applicazione delle tecniche di proteomica nel campo della medicina sta trasformando il modo di condurre la ricerca di nuovi biomarcatori. Tuttavia, la

complessità dei materiali biologici è alla base delle promesse di applicazioni cliniche di grande rilevanza, ma pone anche importanti problemi di standardizzazione.

Bibliografia

1. Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res*, 4: 1086-97, 2005.
2. Colantonio DA, Chan DW. The clinical application of proteomics. *Clin Chim Acta*, 357: 151-8, 2005.
3. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*, 5: 3262-77, 2005.

Proteomica in oncologia

L. Bini, L. Bianchi, R. Cianti, D. Perini, A. Armini, M. Verani, C. Tani, V. Pallini
Laboratorio di Proteomica Funzionale, Dipartimento Biologia Molecolare, Università degli Studi di Siena

Per proteoma si intende “la totalità delle PROTEine espresse, e modificate dopo l’espressione, da un genOMA durante l’arco dell’intera vita di una cellula o di un tessuto” (Swinbanks 1995, Wasinger et al. 1995). Nella serie d’eventi regolatori che da un gene portano ad una proteina attiva, il proteoma rappresenta il prodotto finale del genoma (Rabilloud e Humphery-Smith 1999).

Tale termine deriva dal vocabolo genoma (genome), il quale a sua volta nasce dall’unione della parola GENE e cromosOMA (GENes and chromosOME), perciò anche la parola proteoma significa, in definitiva, l’intero complemento dei geni presenti in tutti i cromosomi di un organismo (Friedrich 1996, Klose 1999). L’introduzione di tale neologismo, proposta per la prima volta a Siena durante un congresso internazionale, dal ricercatore australiano Marc Wilkins, si è rivelata indispensabile per porre l’accento sul cambiamento che la biologia ed in particolare la biochimica sta vivendo. Tale concetto nasce in contemporanea con la conclusione dei primi progetti genomici, aprendo l’era post-genomica. Proprio i progetti genomici hanno rappresentato in questi ultimi anni la base della ricerca biologica e dell’industria biotecnologica. Sequenziando l’intero genoma di un organismo, per la prima volta, in biologia, si è arrivati a capire la complessità di un organismo dal punto di vista del contenuto d’informazione (Williams e Hochstarsser 1997). In un individuo il genoma rappresenta l’insieme delle regole che decidono come si legheranno i vari amminoacidi per formare le proteine. Definendo l’intero genoma di un organismo la biologia cessa così di essere illimitata, almeno a livello dell’informazione; il passo successivo è ora rappresentato dallo studio del proteoma per conoscere e caratterizzare le proteine che realmente sono coinvolte nei processi biologici, oltre che l’interazione delle varie molecole (proteine, zuccheri e lipidi) tra loro. Il complemento proteico di una cellula è altamente dinamico, poiché può variare in base a cambiamenti nell’ambiente esterno, a fenomeni epigenetici in genere, a particolari stati fisiologici della cellula (differenziamento, posizione nel ciclo cellulare, ecc...), stress, somministrazione di farmaci, patologie. Gli organismi multicellulari sono costituiti da vari proteomi in base alle diverse cellule che li compongono, mentre il genoma in ciascuna di loro rimane relativamente costante. Benché il proteoma di una cellula rappresenta solo l’espressione di una parte del genoma, i proteomi sono molto complessi. Esistono, infatti, molti punti di variazione tra il gene e il suo corrispondente prodotto attivo. Questi includono soppressioni, amplificazioni, spli-

cing e modificazioni co- e post-traduzionali. Quindi, in base a queste considerazioni, possiamo affermare che lo studio del proteoma deve essere considerato una scienza su larga scala al pari del genoma.

La parola proteoma appare in concomitanza con il sequenziamento completo di un organismo auto-replicativo come il batterio *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al. 1995). Una volta ottenuti i primi genomi completi è risultata evidente la scarsa informazione che se ne poteva ricavare soprattutto sulla regolazione molecolare e su tutti i processi associati che si svolgono all'interno della cellula. Anche gli attuali strumenti della bioinformatica sono insufficienti a predire la struttura e la funzione di tutti i geni (Awood 2000).

Come già detto il DNA è una molecola di memoria piuttosto stabile, che rimane tal quale durante tutta la vita di un organismo. Ma la presenza di un gene all'interno delle molecole di DNA non dice se, quando e in che misura questo verrà trascritto e tradotto, e neanche quale sarà il grado o la natura della sua competenza funzionale. La situazione, inoltre, può essere ulteriormente complicata se pensiamo che molti geni hanno un prodotto primario, rappresentato dal mRNA, e un prodotto finale, la proteina.

Perciò l'era post-genomica comprende, oltre allo studio globale dei geni e delle proteine, anche quello dei trascritti (trascrittoma), seguendo in maniera quantitativa i livelli di mRNA all'interno delle cellule (DeRisi et al. 1997, Lockhart et al. 1996, Wodicka et al. 1997). Tali approcci si basano essenzialmente sull'abbondanza dei messaggi presenti nelle cellule, con la possibilità di quantificare anche una singola molecola (SAGE, Differential display, ecc.), senza dare una risposta precisa sulle proteine presenti, che sono le vere molecole funzionali di un organismo. Una proteina, infatti, può essere sintetizzata solo attraverso il suo mRNA, ma è altrettanto vero che un polipeptide può essere presente in una cellula quando il suo mRNA non lo è più e d'altra parte possono esistere molti mRNA che non sono tradotti in polipeptidi. Vari studi evidenziano una correlazione molto bassa tra i livelli di mRNA ed i corrispondenti livelli di proteina (Anderson et Seilhamer 1997, Anderson et Anderson 1998, Haynes et al. 1998). Quindi è molto difficile dedurre l'abbondanza proteica direttamente dal livello dell'espressione dell'mRNA, né analisi comparative dell'espressione proteica possono derivare direttamente da un confronto dei livelli di mRNA. L'analisi dei trascritti, inoltre, non fornisce informazioni utili sulle modificazioni post-traduzionali, le quali sono responsabili della regolazione dell'attività proteica (per esempio la fosforilazione nei fenomeni di trasduzione del segnale).

In definitiva ognuno di questi approcci, genoma, trascrittoma e proteoma, fornisce informazioni uniche che devono essere integrate per capire completamente tutti i fenomeni che regolano la vita cellulare.

La proteomica

La proteomica comprende tutte le tecnologie su larga scala necessarie per svolgere un progetto proteoma e data la complessità dello studio proteico tali tecnologie sono molte e più complicate di quelle usate per il sequenziamento del DNA.

Non solo l'alfabeto di base è più grande (4 nucleotidi per il DNA, 20 amminoacidi normali più quelli modificati per le proteine), ma anche alcuni geni possono subire "splicing" alternativi creando vari prodotti. Dobbiamo, inoltre, considerare l'editing dell'mRNA che porta a messaggeri modificati e di conseguenza a tipi differenti di polipeptidi. Anche le proteine stesse vengono modificate dopo la loro sintesi, tramite tagli o aggiunte di vari gruppi chimici come zuccheri, fosfati, solfati, metili, acetili, lipidi. Per rendere il tutto ancora più complicato, dobbiamo pensare che mentre un organismo ha essenzialmente un unico genoma, è anche composto da tipi cellulari diversi, ognuno dei quali avrà un complemento proteico preciso, che varia inoltre durante la vita cellulare stessa. Per esempio il bruco e la farfalla hanno entrambi lo stesso genoma, ma proteomi molto diversi. Questo vale anche per organismi unicellulari dove le proteine espresse variano in base alle condizioni ed al periodo di crescita.

Oggi giorno esistono due tipi di approcci riconosciuti per lo studio proteomico (Figura 1), il primo definito, "classico", prevede l'uso dell'elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione su gradiente di pH immobilizzato (Bjellqvist et al. 1982 e 1993) per la separazione contemporanea di migliaia di componenti proteiche, dell'analisi computerizzata, per individuare le variazioni qualitative e quantitative, della spettrometria di massa per l'identificazione proteica su larga scala (Shevchenko et al. 1996, Aebersold and Mann 2003) e della bioinformatica che contribuisce con specifici programmi e banche dati (Appel et al. 1994). Il secondo è basato essenzialmente sulla separazione proteica attraverso tecniche cromatografiche spesso multidimensionali e sull'uso della spettrometria di massa per l'identificazione e la caratterizzazione dei peptidi separati (Washburn et al. 2001).



Fig. 1 - Rappresentazione schematica delle principali parti di un progetto proteomico.

1- Approccio proteomico basato sull'elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione

L'elettroforesi bidimensionale rimane il mezzo più potente per studi di proteomica comparativa. Infatti attraverso i gel bidimensionali, in cui ogni macchia proteica ha una posizione univoca determinata dal peso molecolare e dal punto isoelettrico, si può studiare visivamente come al variare delle condizioni ambientali, di crescita, di differenziamento o patologiche, cambi l'espressione di gruppi o singole proteine, mettendo in evidenza "sets" di polipeptidi accomunati da relazioni e/o legami metabolici, così come possono essere visualizzate classi di proteine accomunate da caratteristiche modificazioni post-traduzionali (fosforilazioni, glicosilazioni, ossidazioni, ecc...) (O'Farrell 1975; Bjellqvist et al. 1993; Herbert et al. 1997).. Potendo inoltre disporre delle sequenze espresse o genomiche di un organismo, tramite tecniche di spettrometria di massa e di sequenziamento proteico parziale, si può risalire dalla macchia proteica al gene codificante, attraverso ricerche di omologia con sequenze note depositate in banche dati. Una volta verificata la fattibilità di questo approccio, si può passare ad analizzare e monitorare sottosistemi (o subsets) specifici di proteine. Per questo ci possiamo avvalere dell'immunoblotting con anticorpi specifici utilizzando come sistema di rivelazione la chemiluminescenza (Modesti et al. 2001, Magi et al. 2004, Rottoli et al. 2005). Inoltre l'approccio combinato dell'elettroforesi bidimensionale con tecniche di pre-frazionamento, in grado di ridurre la complessità del campione di partenza, e tecniche di "contigazione" dei gel elettroforetici, in grado di ampliare specifiche finestre sperimentali di separazione elettroforetica, ne fanno attualmente la procedura di separazione proteica di elezione (Poland et al. 2003, Ravichandran et al. 2004).

Le immagini bidimensionali ottenute vengono poi analizzate con particolari programmi computerizzati che consentono di valutare tutte le differenze qualitative e quantitative che possono essere presenti tra campioni differenti (cellule normali e patologiche, cresciute in condizioni diverse, ecc..).

Oggi giorno l'identificazione e la caratterizzazione proteica è ottenuta con la spettrometria di massa che tramite il calcolo della massa relativa, identifica le proteine. Questa tecnica, applicata negli ultimi anni nel campo proteomico, ha consentito di avere una quantità di identificazioni sufficienti per parlare di "high-throughput approach" anche per lo studio del proteoma (Schevchenko et al. 1996; Mann and Talbo 1996, Roepstorff 1997; Gygi et al. 1999; James et al. 1993). Tramite spettrometria di massa, inoltre, si possono determinare e caratterizzare le modificazioni post-traduzionali delle proteine.

Infine, la scienza del proteoma si avvale dell'ausilio indispensabile della bioinformatica che ha il compito fondamentale di fornire programmi specifici e maneggevoli per organizzare e decifrare le migliaia di informazioni che vengono prodotte e permettere l'immagazzinamento di tutti questi dati in banche dati. L'estrema riproducibilità dell'elettroforesi bidimensionale ha permesso, anche, la costruzione di banche dati specifiche per proteine separate tramite elettroforesi bidimensionale dove, oltre alla parte testuale che riguarda l'identificazione e la caratterizzazione dei polipeptidi, sono presenti immagini di gel di riferimento

adoperabili direttamente per paragonare i propri gel (SWISS-2DPAGE, <http://www.expasy.ch/ch2d/ch2d-top.html>; SIENA-2DPAGE, <http://www.bio-mol.unisi.it/2d/2d.html>) (Appel 1997).

Pur avendo raggiunto elevati standard di riproducibilità l'elettroforesi bidimensionale risente tuttora di una variabilità sperimentale che spesso si riflette nella necessità di almeno triplicare il numero di gel elettroforetici effettuati su ciascuno specifico campione, al fine di ridurre in parte tale variabilità. Una procedura innovativa di marcatura fluorescente pre-elettroforetica, denominata DIGE (Differential In Gel Electrophoresis), rappresenta attualmente il sistema di rivelazione dei pattern proteici più affidabile per le analisi delle variazioni quantitative su campioni diversi (Tonge et al. 2001). Il sistema DIGE prevede la marcatura fluorescente differenziale di due campioni diversi prima della separazione elettroforetica che possono essere poi caricati nello stesso gel elettroforetico, che sottoposto a scansione differenziale produrrà le immagini digitali distinte dei due campioni. La procedura di analisi quantitativa dei due campioni richiede un programma specifico disponibile commercialmente, il DeCyder Differential Analysis software, che rispetto ai tradizionali software di analisi di immagini bidimensionali contiene algoritmi per la co-rivelazione delle immagini fluorescenti e per l'analisi quantitativa specificamente studiati per il sistema DIGE. Tali algoritmi utilizzano la miscela dei due campioni, marcata separatamente con un terzo fluoroforo, come standard interno in cui tutte le proteine dei singoli campioni sperimentali sono rappresentate. Il sistema DIGE/DeCyder rappresenta attualmente il metodo più affidabile per l'analisi quantitativa differenziale di sistemi proteici complessi, poiché permette un'analisi differenziale in-gel, eliminando così la variabilità sperimentale normalmente rilevabile nell'analisi differenziale di campioni diversi corsi su gel diversi.

2- Approccio proteomico "gel free"

Un metodo di separazione alternativo all'elettroforesi bidimensionale è rappresentato dalla cromatografia multidimensionale (MudPIT) (Washburn et al. 2001, Wang and Hanash 2003). Questo metodo si basa sulla digestione triptica di tutte le proteine di un campione seguita dalla separazione tramite cromatografia liquida multidimensionale. Di solito come prima separazione viene usata una cromatografia a scambio ionico, in cui ogni frazione viene successivamente separata tramite una cromatografia a fase inversa. Quindi le varie frazioni eluite vengono iniettate direttamente in uno spettrometro di massa per ottenere le sequenze peptidiche e quindi l'identificazione delle proteine presenti nel campione. Questi sistemi hanno il vantaggio di permettere l'identificazione anche di proteine presenti all'interno della cellula in basse concentrazioni o proteine molto idrofobiche che difficilmente vengono viste con l'elettroforesi bidimensionale, ma, in verità, non riescono a fornire molte informazioni sulle modificazioni post-traduzionali e/o la quantità di proteina presente (Rabilloud 2002, Schratzenholz 2004).

Un metodo più sofisticato utilizza marcatori isotopici specifici (ICAT) per facilitare la comparazione del proteoma di due campioni contemporaneamente (Gygi et al 1999). La tecnologia ICAT si basa sulla reazione di miscele proteiche con reagenti

specifici per gruppi sulfidrilici. Questi reagenti contengono un linker di massa differente ed una estremità formata da biotina per la purificazione tramite cromatografia di affinità. Due campioni da paragonare vengono marcati con i due reagenti di massa differente, di modo che lo stesso peptide presente nei due campioni differirà di una massa precisa che potrà essere individuata in spettrometria di massa. Altri approcci detti “gel free” si basano sugli “array proteici” in cui proteine, compresi gli anticorpi, possono essere legate a superfici di vetro e di carta chimicamente derivatizzate con un’alta densità spaziale. In queste condizioni le proteine possono ancora interagire specificatamente con altre proteine o con piccole molecole in soluzione (MacBeath et al. 2000, Borrebaeck 2000, Kusnezow and Hoheisel 2002, Predki 2004,). Tali “array” sono utili per la determinazione delle interazioni proteina-proteina e per identificare proteine che interagiscono con piccole molecole.

Una versione modificata di un chip proteico è basata sulla tecnologia SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) che ha il vantaggio di una integrazione diretta con la spettrometria di massa (Fung et al. 2001). Le proteine vengono catturate direttamente su una piastra modificata per MALDI-TOF. Ogni chip contiene 9 differenti superfici catturanti in modo da coprire il più ampio spettro di proteine separate. La tecnologia SELDI rimane un metodo analitico che permette la quantificazione di proteine con massa differente, ma non permette la loro identificazione. Questo metodo, come altri basati solo sulla separazione, soffre molto la diversa concentrazione delle singole proteine nel campione da analizzare, per cui proteine molto abbondanti possono coprire proteine poco abbondanti. Tale tecnologia ha comunque il vantaggio di essere molto rapida e quindi facilmente applicabile nell’ambito della chimica clinica ed in particolare per lo studio dei processi tumorali soprattutto da un punto di vista diagnostico e prognostico (Zhang et al. 2004)

Applicazioni in oncologia

In molti campi della biologia, oggi giorno, viene seguito un approccio di studio globale come quello proteomico per capire quali siano i meccanismi di regolazione alla base dei vari fenomeni molecolari. Possiamo ricordare l’applicazione in biomedicina e in clinica, soprattutto nello studio dei tumori, dove lo studio del proteoma viene usato come mezzo diagnostico e prognostico oltreché per definire l’eventuale patogenesi della malattia. Il processo tumorale scaturisce da numerose e complesse interazioni geniche, oltreché da vari eventi cellulari ed è soprattutto influenzato da differenti fattori ambientali e sotto l’influenza di regolazioni epigenetiche. Per questo motivo un approccio globale, soprattutto basato sullo studio dei prodotti genici, come è quello proteomico, può essere fondamentale per ottenere una visione dei cambiamenti proteici implicati nel processo tumorale. Inoltre nel campo clinico la proteomica offre il vantaggio di potere identificare e caratterizzare marcatori proteici multivariati che possono caratterizzare lo stato patologico o un trattamento farmacologico molto meglio che lo studio di marcatori individuali. Infatti un insieme di marcatori proteici indipendenti l’uno

dall'altro ed associati ad una patologia, considerati nel loro insieme come un unico marcatore multivariato, saranno meno soggetti alle variazioni genetiche o ambientali che non il livello di una singola proteina (Anderson 2005).

In letteratura esistono numerosi studi proteomici legati all'identificazione di marcatori prognostici e/o diagnostici dei processi tumorali. I principali tumori studiati riguardano la vescica (Celis and Gromov 2003, Celis et al. 2004), la mammella (Bini et al 1997, Dwek and Alaiya 2003, Zang et al. 2004), il polmone (Okuzawa 1994, Chen et al 2003, Yanagisawa et al. 2003), l'ovaio (Alaiya et al. 1997 and 2002), ed il colon (Friedman et al. 2004).

In conclusione dai risultati dei vari studi riportati, la proteomica appare realmente come una metodologia importante da applicare in oncologia, ma che spesso rappresenta il punto di partenza in quanto i potenziali biomarker messi in evidenza, anche non relazionati l'uno all'altro, per essere utilizzati in clinica dovranno essere validati con altre tecniche e su un numero maggiore di campioni.

Bibliografia

1. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207, 2003.
2. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397: 176-180, 1999.
3. Altmann R, Arnold W, de Haan M, Hamberg K et al. The yeast genome directory. *Nature*, 387: 5, 1997.
4. Alaiya AA, Franzen B, Fujioka K, Moberger B, Schedvins et al. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors. *Int. J. Cancer*, 73: 678-683, 1997.
5. Alaiya AA, Franzen B, Hagman A, Dysvik B, Roblick UJ et al. Molecular classification of borderline ovarian tumors using hierarchical cluster analysis of protein expression profiles. *Int. J. Cancer*, 98: 895-899, 2002.
6. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18: 533-537, 1997.
7. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19: 1853-1861, 1998.
8. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol*, 563: 23-60, 2005.
9. Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396: 133-140, 1998.
10. Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem Sci*, 19: 258-260, 1994.
11. Appel RD. Interfacing and integrating databases. In Wilkins M, Williams K, Appel R, Hochstrasser D editors. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 149-175.

12. Atwood TK. Paradigm of proteome. *Science*, 290: 471-473, 2000.
13. Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F et al. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, 18: 2832-2841, 1997.
14. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 6: 317-39, 1982.
15. Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez JC, Hochstrasser D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*, 14: 1357-1365, 1993.
16. Blattner FR, Plunkett G. 3rd, Bloch CA, Perna NT et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277: 1453-1474, 1997.
17. Borrebaeck CAK. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol. Today*, 21: 379-382, 2000.
18. Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273: 1058-1073, 1996.
19. Celis JE, Gromov P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr. Opin. Biotech*, 10: 16-21, 1999.
20. Celis JE, Gromov P. Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell*, 3: 9-15, 2003.
21. Celis JE, Gromova I, Moreira JM, Cabezon T, Gromov P. Impact of proteomics on bladder cancer research. *Pharmacogenomics*, 5: 381-394, 2004.
22. Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 13537-13542, 2003.
23. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544, 1998.
24. Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 392: 353-358, 1998.
25. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686, 1997.
26. Dwek MV, Alaiya AA. Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues. *Br J Cancer*, 89: 305-307, 2003.
27. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269: 496-512, 1995.
28. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-403, 1995.
29. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390: 580-586, 1997.

30. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 281: 375-388, 1998.
31. Friedman DB, Hill S, Keller JW, Merchant NB, Levy SE et al. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4: 793-811, 2004.
32. Friedrich GA. Moving beyond the genome projects. *Nat. Biotechnol.*, 14: 1234-1237, 1996.
33. Fung ET, Thulasiraman V, Weinberger SR, Dalmasso EA. Protein biochips for differential profiling. *Curr Opin Biotechnol.*, 12: 65-69, 2001.
34. Gygi SP, Han DK, Gingras AC, Sonenberg N, Aebersold R. Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: tools for cancer research in the post-genomic era. *Electrophoresis*, 20: 310-319, 1999.
35. Haynes PA, Gygi SP, Figeys D, Aebersold R. Proteome analysis: biological assay or data archive? *Electrophoresis*, 19: 1862-1871, 1998.
36. Herbert B, Sanchez JC, Bini L. Two-dimensional electrophoresis: The state of the art and future directions. In Wilkins M., Williams K., Appel R., Hochstrasser D., editors. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 13-33, 1997.
37. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 24: 4420-4449, 1996.
38. Hughes GJ, Frutiger S, Paquet N, Pasquali C et al. Human liver protein map: update 1993. *Electrophoresis*, 14: 1216-1222, 1993.
39. James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun*, 195: 58-64, 1993.
40. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C trachomatis*. *Nat Genet*, 21: 385-389, 1999.
41. Kaneko T, Tanaka A, Sato S, Kotani H et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res*, 2: 153-166, 191-198, 1995.
42. Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res*, 3: 109-136, 1996.
43. Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y et al. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res*, 5: 55-76, 1998.
44. Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Yamazaki S et al. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res*, 6: 83-101, 145-152, 1999.
45. Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O et al. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 390: 364-370, 1997.

46. Klose J. Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis*, 20: 643-652, 1999.
47. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249-256, 1997.
48. Kusnezow W, Hoheisel JD. Antibody microarrays: promises and problems. *Biotech, Suppl*, 14-23, 2002.
49. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14: 1675-1680, 1996.
50. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289: 1760-1763, 2000.
51. Magi B, Ettore A, Liberatori S, Bini L et al. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ*, 11: 842-852, 2004.
52. Mann M, Talbo G. Developments in matrix-assisted laser desorption/ionization peptide mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol*. 7: 11-19, 1996.
53. Modesti A, Bini L, Carrarsi L, Magherini F, Liberatori S, Pallini V, Manao G, Pinna LA, Raugi G, Ramponi G. Expression of the small tyrosine phosphatase (Stp1) in *Saccharomyces cerevisiae*: a study on protein tyrosine phosphorylation. *Electrophoresis*, 22: 576-585, 2001.
54. Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML et al. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399: 323-329, 1999.
55. Nowak R. Bacterial genome sequence bagged. *Science*, 269: 468-470, 1995.
56. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250: 4007-4021, 1975.
57. Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, Linder S, Hirano T, Bergman T, Ebihara Y, Kato H, Auer G. Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 15: 382-390, 1994.
58. Poland J, Cahill MA, Sinha P. Isoelectric focusing in long immobilized pH gradient gels to improve protein separation in proteomic analysis. *Electrophoresis*, 24: 1271-1275, 2003.
59. Predki, P. F. Functional protein microarrays: ripe for discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 8: 8-13, 2004.
60. Rabilloud T, Humphery-Smith I. Introduction: the virtue of proteomics. in T. Rabilloud, editor. *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1-8, 1999.
61. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2: 3-10, 2002.
62. Ravichandran V, Lubell J, Vasquez GB, Lemkin P, Sriram RD, Gilliland GL. Ongoing development of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis data standards. *Electrophoresis*, 25: 297-308, 2004.

63. Roepstorff P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr Opin Biotechnol*, 8: 6-13, 1997.
64. Rottoli P, Magi B, Cianti R, Bargagli E, Vagaggini C, Nikiforakis N, Pallini V, Bini L. Carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics*, 5: 2612-2618, 2005.
65. Schrattenholz A. Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? *Drug Discovery Today: Technologies*, 1: 1-8, 2004.
66. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 93: 14440-14445, 1996.
67. Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H et al. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol*, 179: 7135-7155, 1997.
68. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282: 754-759, 1998.
69. Swinbanks D. Government backs proteome proposal. *Nature*, 378: 653, 1995.
70. The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282: 2012-2018, 1998 .
71. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388: 539-547, 1997.
72. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, 1: 377-396, 2001.
73. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19: 242-247; 2001.
74. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16: 1090-1094, 1995.
75. Wilkins MR, Gasteiger E, Tonella L, Ou K et al. Protein identification with N and C-terminal sequence tags in proteome projects. *J Mol Biol*, 278: 599-608, 1998.
76. Williams K, Hochstarsser D, Introduction to the proteome. In Wilkins M, Williams K, Appel R, Hochstrasser D, editors. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1-12, 1997.
77. Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. Genome-wide

- expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 15: 1359-1367, 1997.
78. Yan JX, Wilkins MR, Ou K, Gooley AA. Large-scale amino-acid analysis for proteome studies. *J. Chromatogr*, 736: 291-302, 1996.
 79. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC et al. Proteomic patterns of tumour subsets in nonsmall-cell lung cancer. *Lancet*, 362, 433-439, 2003.
 80. Zang L, Toy DP, Hancock WS, Sgroi DC, Karger BL. Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and ¹⁶O/¹⁸O isotopic labeling. *J Proteome Res*, 3: 604-612, 2004.
 81. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J et al. Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 64: 5882-5890, 2004.

Clinical proteomics and biomarker discovery

William Clarke

Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, U.S.A.

Proteomics can be described as a systematic analysis of proteins within a defined system for their identity, quantity, and function. Clinical proteomics is a rapidly growing field of increasing importance that demonstrates promise to identify biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapeutic efficacy by using current technology to compare proteome profiles between differing physiologic and disease states.

The main difference between genomics and proteomics is that the genome is a static entity that goes relatively unchanged from day to day, while the proteome is a dynamic collection of proteins that demonstrate variation between individuals, between cell types, and between entities of the same type but under different pathological or physiological conditions (1). The states of proteins within a patient also changes over time and also in response to multiple external stimuli. Modifications may derive from translational, post-translational, regulatory and degradation processes that affect protein structure, localization, function, and turnover. The typical approach to biochemical analyses is to identify a system, develop an assay to monitor activity within that system, followed by identification and characterization of the protein component responsible for the activity. However, advances in technology for protein purification and identification have driven proteomics research to a different approach where comprehensive protein databases for individual conditions can be used to characterize individual patients and disease states by studying systems biology. This approach does not begin with a specific activity or question and is therefore not hypothesis driven (or the hypotheses are very broad, i.e. “there will be a change in protein expression between two patient states”), which limits the need for analyte specific assays. While the problem of developing analyte-specific assays is negated through this broad new approach, there are other obstacles that are equally challenging. Standardization of conditions for analysis is a very important concept in proteomic analysis is important for both intra- and inter-lab comparisons due to the dynamic nature of the proteome. The Human Proteome Organization (HUPO), along with the Plasma Proteome Project, has been formed to address this issue as well as promote new research, increase awareness of existing research, and foster cooperation between laboratories to address obstacles to proteomic research

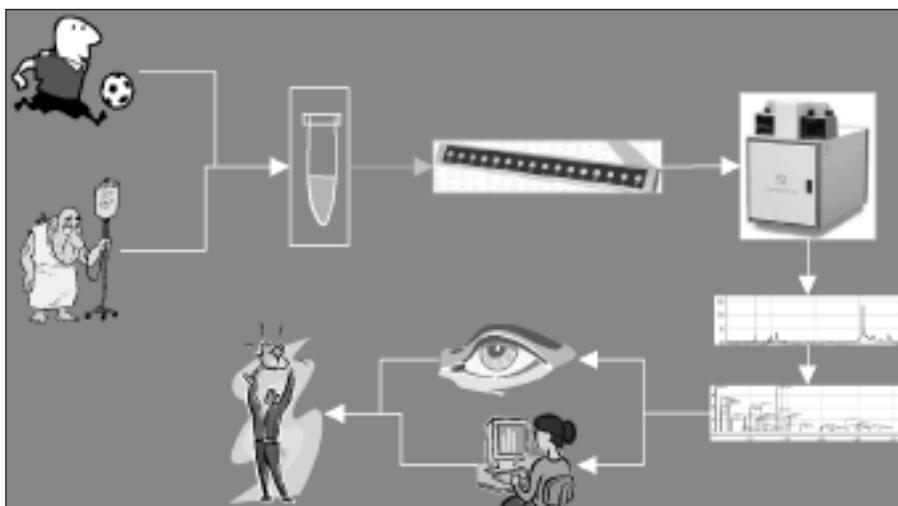


Fig. 1 - Scheme for identification of biomarkers.

(www.HUPO.org). The large amount of data generated from this wide array of expressed proteins along with an extensive list of potentially important observations can lead to difficulty in interpretation of results in biological context, demonstrating the need increasingly powerful bioinformatics tools. Several analytical methodologies have been developed in response to emerging challenges in proteomic analyses. In addition, computer engineers and biostatisticians are modifying informatic techniques used for gene array analysis, as well as developing new methods to sift through the volumes of data produced during proteomic analyses.

Biomarkers for diagnosis/prognosis

Biomarkers have the potential to clarify the clinical picture for diagnosis, or to help determine the patient prognosis on presentation to help stratify the patients, and identify those most at risk for adverse events. An excellent example of biomarker utility for this purpose is the use of cardiac biomarkers. Myoglobin and the troponins are used to make a diagnosis of myocardial infarction in the context of acute coronary syndromes. In addition, biomolecules such as BNP or NT-proBNP can be used in conjunction with quantitative values for troponin to triage the patients according to their risk for an adverse event, and ultimately direct the course of treatment or determine whether a hospital admission is necessary. However, not all biomarkers are as clean as the cardiac markers. Tumor markers such as CA125 and CA27.29 can be used to follow therapy or as a prognostic tool to differentiate those likely long-term survivors from short-term survivors, but none have demonstrated any diagnostic utility as a stand alone test.

It is in this context that biomarker research is being conducted today, both for dis-

covery of better tumor markers for diagnostics and also to find biomarkers for clinical conditions for which there are no previously established biomarkers. These applications range from ovarian cancer biomarkers to biomarkers of transplant rejections to biomarkers for neurologic and psychiatric diseases, such as Alzheimer's disease or depression. Currently there is not a standard approach for discovery, or for how to utilize the data, but the goal is the same for each for the groups – to find a marker, or combination of markers, that will allow for early detection and therapeutic intervention for a particular disease.

Biomarkers for therapeutic drug management

The use of biomarkers for management of pharmacotherapy is perhaps the least developed area in clinical proteomics. Biomarkers for therapeutic drug management are complementary to traditional TDM because they are indicative of pharmacodynamics for a particular therapeutic drug, whereas TDM is reflective of the pharmacokinetics for that same particular drug. As such, biomarkers for drug management have the potential to objectively monitor individual therapeutic response to a drug, which is necessary for true personalized medicine. Some advantages to biological monitoring of therapeutic efficacy include accounting for inter-individual response to therapeutic agents within the target reference range, the ability to account for intra-individual differences in response due to pathophysiologic changes, and the ability to detect sub-clinical responses to therapies when the blood concentration is within the target range.

Traditionally, management of pharmacotherapy has been achieved by TDM and titration of the drug dosage to clinical effect. This approach works well if the patient is one of those whose response to the drug fits within the population-based reference intervals; however, many patients exhibit variability in pharmacokinetic

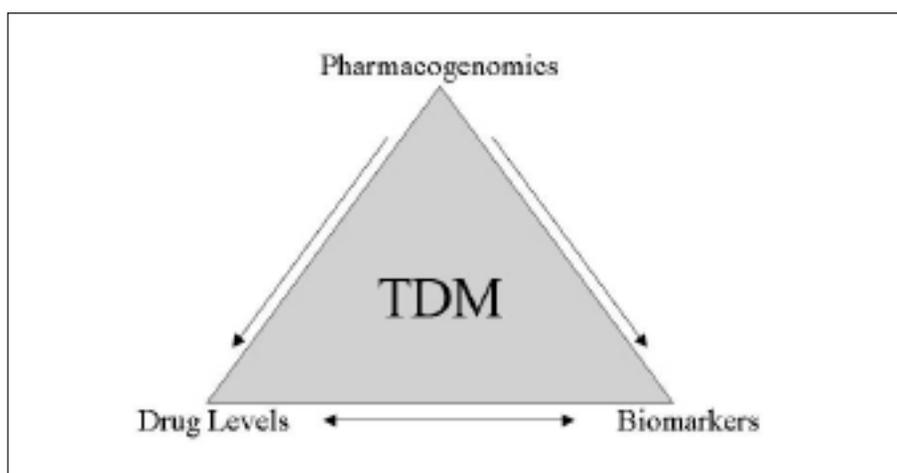


Fig. 2 - Utilization of biomarkers for drug management.

ics and pharmacodynamics that make personal optimization of therapy – personalized medicine – challenging if not impossible using conventional tools alone. Pharmacogenetic testing can identify patients that may be at risk for an ADR and should therefore avoid certain drugs or receive non-standard dosage of a particular therapeutic agent. The use of biomarkers – pharmacodynamic monitoring – is key for evaluating therapeutic response in the context of personalized medicine, but it is not a stand alone technology, because the results will not make sense without the pharmacokinetic data (i.e. is the non-standard drug response due to variability in drug target activity, or is it just that the serum drug concentration is low due to increased clearance?). Utilization of pharmacogenetics, TDM, or biomarkers by themselves will not achieve the goal; but a paradigm where genetic testing is employed before initiation of therapy to determine the starting dose, coupled with monitoring of both drug levels (pharmacokinetics) and biomarkers (pharmacodynamics) to adjust and optimize the dosage for the individual patient to achieve maximum clinical effect with minimal side effects would be the best solution - truly personalized medicine will require a combination of all three approaches for effective drug management.

References

1. Hancock WS, Wu SL, Shieh P. The challenges of developing a sound proteomics strategy. *Proteomics*, 2: 352-9, 2002.
2. Aebersold R. A mass spectrometric journey into protein and proteome research. *J Am Soc Mass Spectrom*, 14: 685-95, 2003.
3. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207, 2003.
4. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, 48: 1296-304, 2002.
5. Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, Shih Ie M, Pham T, Fung ET, et al. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med*, 126: 1518-26, 2002.
6. Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2: 566-80, 2003.
7. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant*, 17: 77-88, 2003.

MANIPOLAZIONI CELLULARI E SCOPO TERAPEUTICO

Espansione ex-vivo di cellule staminali emopoietiche

P. Rebutta, L. Lazzari, T. Montemurro, R. Giordano

Cell Factory 'Franco Calori', Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia,
Dipartimento Trasfusionale e di Riferimento per il Trapianto di Organi e Tessuti
Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue placentare raccolto alla nascita da donatori allogenici non imparentati (trapianto *unrelated*) costituisce una modalità terapeutica che è stata finora utilizzata nel trattamento di alcune migliaia di pazienti, prevalentemente affetti da leucemie, linfomi e malattie congenite (1). Circa 2/3 della casistica finora trattata è rappresentata da pazienti in età pediatrica (2-5). Infatti, il trapianto del sangue placentare presenta un importante limite, legato al volume relativamente piccolo di sangue che permane nella placenta al termine del parto. Per questa ragione, in gran parte dei pazienti adulti il numero di cellule presenti in una unità di sangue placentare – il cui volume è compreso generalmente fra 50 e 150 mL - non consente di eseguire il trapianto in condizioni di ragionevole sicurezza. A questo proposito, vi è un generale consenso che i pazienti debbano ricevere una dose di cellule nucleate non inferiore ad almeno 20 milioni/kg di peso corporeo, idealmente superiore a 40-50 milioni/kg. Il rischio principale legato alla somministrazione di una bassa dose cellulare è la mancanza o il ritardo dell'attecchimento delle cellule staminali trapiantate.

Per superare queste difficoltà, numerosi gruppi hanno attivato programmi di ricerca finalizzati a promuovere l'espansione (cioè ad aumentare il numero) delle cellule staminali del sangue placentare (6-10).

La ricerca relativa all'espansione delle cellule staminali ematopoietiche si articola su due livelli. Innanzi tutto è necessario selezionare le sostanze stimolanti più appropriate fra le numerose citochine che interagiscono con le cellule staminali e definirne l'opportuna concentrazione. Contemporaneamente, va messo a punto un sistema di coltura adatto: devono essere garantiti alle cellule un ambiente sterile a temperatura controllata, un adeguato apporto di ossigeno e di nutrienti, nonché la rimozione delle sostanze tossiche prodotte dal metabolismo cellulare. Il sistema deve essere sufficientemente pratico e flessibile per studiare le diverse variabili, ma anche offrire sufficienti garanzie in modo tale da poterne ipotizzare l'impiego prima nell'animale e poi nell'uomo. Quest'ultima applicazione richiede la conformità alle procedure di *good manufacturing practice*, che rappresentano le rigorose modalità operative utilizzate dall'industria farmaceutica.

Il procedimento messo a punto e attualmente in uso presso la Milano Cord Blood Bank impiega 4 citochine (TPO, FL, IL-6 e SCF) in assenza di siero, in un sistema di fiasche di coltura di plastica nelle quali vengono aggiunti reagenti freschi due volte la settimana (11,12). Le cellule sono incubate a 37°C in presenza di CO₂ al 5%.

Prima di arrivare all'impiego nell'uomo, le cellule espanse devono essere trapiantate in un modello animale, per dimostrare che esse non hanno perso la capacità di attecchire e crescere in vivo. Si tratta di una parte molto complessa e costosa della ricerca, perché devono essere impiegati particolari ceppi di topi, denominati NOD/SCID, affetti da gravi carenze immunitarie. Questa caratteristica rende questi topi idonei all'esperimento perché incapaci di rigettare le cellule trapiantate, ma richiede altresì un trattamento particolare degli animali, molto fragili di fronte a qualsiasi rischio infettivo.

Presso la Milano Cord Blood Bank sono stati valutati numerosi cicli di espansione di sangue placentare fresco e scongelato, in gruppi di topi NOD/SCID. Queste ricerche sono state condotte in collaborazione con il gruppo di Adrian Thrasher dell'University College di Londra e con il gruppo di Wanda Piacibello dell'Università di Torino.

Il primo obiettivo di questi studi è stato selezionare il cocktail di citochine in grado di espandere il numero delle cellule staminali CD34+, precedentemente isolate con un sistema immunomagnetico, pur mantenendole indifferenziate. Le cellule CD34+ isolate sono state quindi coltivate in assenza di stroma alla concentrazione di 5000 cellule/ml per più di 10 settimane. Questi studi hanno documentato un'espansione dei progenitori più primitivi (cellule CD34+/38-) di circa 2 logaritmi dopo 5 settimane di coltura e di circa 3 logaritmi dopo 10 settimane (11). Le cellule espanse con tale procedura sono state successivamente trapiantate con successo in topi NOD/SCID (12).

Uno studio successivo ha permesso di valutare gli effetti della procedura di espansione sul potenziale clonogenico dei progenitori dei megacariociti (CD61+ e CD34+/61+) da sangue placentare fresco e criopreservato. Sono state perciò espanse con il precedente protocollo per due settimane sia cellule fresche che cellule scongelate dopo criopreservazione. I risultati di questi studi hanno dimostrato una più grande capacità clonogenica per i progenitori megacariocitari espansi rispetto ai progenitori non espansi, con andamento simile per i campioni freschi e per quelli criopreservati (13-15).

È stata quindi eseguita una nuova serie di studi in vivo, che hanno consentito di dimostrare la mantenuta capacità di attecchimento e di crescita in vivo delle cellule CD34+ espanse in topi NOD/SCID. A tale scopo, cellule isolate da sangue placentare sono state espanse secondo le condizioni precedentemente descritte; sono poi stati trapiantati 8 topi NOD/SCID con dosi variabili di cellule CD34+ espanse (da 8,9 a 2,2x10⁵/topo), senza supporto di citochine in vivo. Dopo 40 giorni dal trapianto è stata valutata la presenza di antigeni umani nel midollo di topo attraverso l'analisi citofluorimetrica e la valutazione del potenziale clonogenico. Inoltre, le cellule midollari positive per l'antigene CD45 umano sono state esaminate per la presenza degli antigeni CD13, CD19 e CD34 umani. I risultati

hanno dimostrato una predominante componente mieloide umana e un avvenuto attecchimento. I livelli di attecchimento erano correlati al numero di cellule CD34+ trapiantate (0,3-10% hCD45+) (16,17).

Infine, è stata valutata l'espressione del gene dell'IL12 nei progenitori staminali emopoietici derivati da sangue placentare. È nota infatti la capacità di questa citochina di attivare una risposta citotossica antitumorale. Alti livelli di IL12 potrebbero aumentare in vivo l'effetto antitumorale nel post-trapianto. Un vettore plasmidico che portava l'IL12 e il gene per la resistenza alla neomicina è stato inserito mediante elettroporazione in cellule messe in coltura per 2 settimane. Le cellule sono state selezionate mediante incubazione con G418 per 5 giorni. Tutti i campioni analizzati con PCR sono risultati positivi, dimostrando l'efficienza di tale metodo di trasfezione non virale per cellule emopoietiche espanse (18).

Più recentemente il nostro gruppo, in collaborazione con il professor Massimo Aglietta e la dottoressa Wanda Piacibello, ha ottimizzato un sistema di coltura che consente di trasdurre stabilmente cellule CD34+ derivate da sangue di cordone ombelicale a lungo termine e di espandere le stesse cellule, preservandone le caratteristiche intrinseche, per poter ottenere un numero elevato di CD34+ esprimenti il transgene da trapiantare in modo da soppiantare il fenotipo maligno mediante un vettore lentivirale veicolante il gene per la GFP o un vettore retrovirale veicolante il gene per il DLNGFR. Le cellule trasdotte espanse ex vivo in presenza di FL, TPO, SCF e IL-6 e inoculate nei riceventi mieloablati (trapianti seriali primari, secondari e terziari in topi NOD/SCID) sono state in grado di sostenere un attecchimento significativamente più alto rispetto a quello ottenuto in topi inoculati sia con cellule non manipolate che con cellule manipolate ma non espanse.

Durante le fasi conclusive di tali studi, presso la Milano Cord Blood Bank è stata ampliata l'area criobiologica e conseguito l'accreditamento della Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT, 14 dicembre 2004), che si è aggiunto alla certificazione ISO 9000 acquisita nel 1997. Infine, a fianco della Milano Cord Blood Bank è stata realizzata la Cell Factory 'Franco Calori', comprensiva di 2 laboratori BL3. Presso tale struttura, sottoposta a visita ispettiva da parte del Ministero della Salute il 24/25 gennaio 2005, sono state espanse le cellule successivamente trapiantate con successo a tre pazienti, affetti da talassemia, anemia falciforme e mielodisplasia, presso l'Unità di Oncoematologia Pediatrica del Policlinico San Matteo di Pavia, diretta dal professor Franco Locatelli.

Nonostante l'elevato numero di ricerche svolte in laboratorio e nei modelli animali per definire protocolli di espansione del sangue placentare per uso clinico, l'impiego di cellule espanse nell'uomo è stato finora limitato a pochi pazienti trattati all'interno di protocolli sperimentali, parte dei quali tuttora in corso.

Le principali casistiche finora riportate nella letteratura sono costituite dai 28 pazienti arruolati da Jarosca e coll (19) in uno studio clinico di fase I e dai 37 pazienti studiati da Shpall e coll (20). Nel primo studio, le cellule sono state espanse con siero umano e bovino, PIXY 321, FL ed EPO. Nonostante l'espansione di 82 volte delle CFU-GM, lo studio di Jarosca e coll non ha evidenziato una riduzione del tempo di attecchimento delle piastrine, né delle linee mieloide

ed eritroide. Nello studio di Shpall e coll le cellule CD34+ di una parte dell'unità di sangue placentare sono state espanse per 10 giorni prima del trapianto, eseguito con una dose complessiva di $0,9 \times 10^7$ cellule/kg. Anche questo studio non ha evidenziato una importante riduzione del tempo di attecchimento dei neutrofilici (28 giorni) e delle piastrine (106 giorni).

I risultati clinici poco significativi finora raccolti hanno stimolato lo studio di nuovi approcci metodologici e di nuovi protocolli, alcuni dei quali sono attualmente in corso di sperimentazione a livello preclinico. Fra questi, presentano elementi di particolare interesse l'uso di biomateriali in sistemi di coltura cellulare tridimensionali (21-23), l'utilizzo di co-culture e sistemi di perfusione (24), l'esecuzione dell'espansione a bassa concentrazione di ossigeno (25), la selezione di cellule CD133+ in G0 quale popolazione di partenza, dato che tali cellule sembrano mostrare un potenziale di espansione a lungo termine maggiore delle cellule CD34+ (26). Altri recenti studi hanno valutato l'impiego di nuove tecniche di stimolazione ad alta energia delle cellule per aumentare non solo l'efficienza di espansione ma anche l'efficienza di trasduzione cellulare con vettori lentivirali sia in vitro che in vivo (27), o proposto l'esecuzione dell'espansione in presenza di cellule mesenchimali quali cellule di supporto (28,29), in presenza di un chelante del rame (30), o previa aggiunta al medium di coltura di acido valproico (31). Altri autori, infine, hanno standardizzato le procedure mediante l'uso di particolari apparecchiature per la manipolazione delle cellule (32).

In conclusione, nonostante la mole degli studi finora eseguiti e i promettenti risultati di qualche recente esperienza, non è stato ancora raggiunto un consenso sull'utilità clinica delle procedure di espansione del sangue placentare e sulla metodologia da utilizzare per espandere le cellule. È pertanto necessario, data la rilevanza della problematica clinica che l'espansione potrebbe contribuire a risolvere facilitando il trapianto di sangue placentare nel paziente adulto (33), approfondire ulteriormente gli studi in quest'area di ricerca sia a livello preclinico sia promuovendo l'esecuzione di trial clinici controllati di adeguate dimensioni, nei quali vengano utilizzate cellule manipolate secondo le norme di *good manufacturing practice* in strutture formalmente certificate per l'esecuzione di queste complesse procedure.

Bibliografia

1. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 354-71, 2004.
2. Gluckman E, Broxmeyer HE, Adamson JW, Stevens CE. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Engl J Med*, 321: 1174-8, 1989.
3. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, e coll. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*, 337: 373-81, 1997.
4. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al. Outcomes among 562 recipients

- of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 339: 1565-77, 1998.
5. Gluckman E, Rocha V, Chastang C, on behalf of Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Cord blood hematopoietic stem cells: biology and transplantation. *Hematology*, 1-14, 1998. American Society of Hematology, Washington, DC, 1998.
 6. Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood*, 87: 3082-8, 1996.
 7. Conrad PD, Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. *J Leukoc Biol*, 64: 147-55, 1998.
 8. Koller MR, Manchel I, Maher RJ, Goltry KL, Armstrong RD, Smith AK. Clinical-scale human umbilical cord blood stem cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transpl*, 21: 653-63, 1998.
 9. Kögler G, Callejas J, Sorg RV, Fisher J, Migliaccio AR, Wernet P. The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transpl*, 21: 233-41, 1998.
 10. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dané A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T, Aglietta M. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34⁺ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, 93: 3736-49, 1999.
 11. Lazzari L, De Bernardi N, Villa A, Porretti L, Fermo E, Lecchi L, Rebullà P, Sirchia G. The combination of TPO, FLT-3, IL-6 and IL-11 in stroma-free liquid cultures allows extensive expansion and maintenance of hemopoietic stem cells. *Blood*, 92: 312b (abstr, suppl 1, part 2), 1998.
 12. Lazzari L, De Bernardi N, Villa A, Porretti L, Fermo E, Lecchi L, Rebullà P, Sirchia G. Cord blood stem cells expanded ex vivo with TPO, FLT-3, IL-6 and IL-11 and serum-free medium show engrafting potential in NOD/SCID mice. *Blood*, 92: 114a (abstr, suppl 1, part 1), 1998.
 13. Lazzari L, De Bernardi N, Lucchi S, Montemurro T, Villa A, Garcea F, Silenzi C, Lecchi L, Rebullà P, Sirchia G. Correlation Between Nucleated Cell And Cfu-Mk Counts In Placental/Umbilical Cord Blood. *Bone Marrow Transplant*, 23 (Suppl 1) 681, 1999.
 14. Lazzari L, Lucchi S, Giordano R, Porretti L, Magri M, Bertelè G, Lecchi L, Rebullà P, Sirchia G. The Clonogenic Potential Of Expanded Megakaryocyte Progenitors From Fresh And Cryopreserved Cord Blood Stem Cells. *Bone Marrow Transplant*, 25 (Suppl 1): 41, 2000.
 15. Lazzari L, De Bernardi N, Lucchi S, Montemurro T, Bertelè G, Puglisi G, Porretti L, Lecchi L, Sirchia G. Leukemia inhibitory factors does not substitute or enhance the effect of interleukin-6 and -11 ex-vivo expansion of cord blood stem cells. *Exp Hematol*, 27: 118, 1999.

16. Lazzari L, Thrasher A, Lucchi S, Blundell MP, Porretti L, Lecchi L, Rebulli P, Sirchia G. Engraftment in NOD/SCID mice of placental/umbilical cord blood stem cells expanded in a stroma- and serum-free medium: a system suitable for clinical application. *Blood*, 94 (Suppl 1): 2551, 1999.
17. Blundell MP, Demaison C, Brouns G, Goldman JP, Kinnon C, Thrasher A, Lazzari L, Sirchia G. Quality of repopulation in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice engrafted with expanded cord blood CD34+ cells. *Blood*, 4: 3269, 1999.
18. Lazzari L, Bianchi P, Lucchi S, De Bernardi N, Clerici G, Lecchi L, Zanella A, Sirchia G. Ex-vivo expansion and non-viral transduction of interleukin-12 gene in cord blood stem/progenitor cells. *Exp Hematol*, 27: 119, 1999.
19. Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howrey R, Chao N, Douville J, Burhop S, Fu P, Kurtzberg J. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*, 101: 5061-7, 2003.
20. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8: 368-76, 2002.
21. Ehring B, Biber K, Upton TM, Plosky D, Pykett M, Rosenzweig M. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. *Cytotherapy*, 5: 490-9, 2003.
22. Hutson EL, Boyer S, Genever PG. Rapid isolation, expansion, and differentiation of osteoprogenitors from full-term umbilical cord blood. *Tissue Eng*, 11: 1407-20, 2005.
23. Takagi M. Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *J Biosci Bioeng*, 99: 189-96, 2005.
24. Robinson S, Niu T, de Lima M, Ng J, Yang H, McMannis J, Karandish S, Sadeghi T, Fu P, del Angel M, O'Connor S, Champlin R, Shpall E. Ex vivo expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 7: 243-50, 2005.
25. Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*, 22: 716-24, 2004.
26. Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro. *Stem Cells*, 22: 704-15, 2004.
27. Berger M, Frairia R, Piacibello W, Sanavio F, Palmero A, Venturi C, Pignochino Y, Berta L, Madon E, Aglietta M, Fagioli F. Feasibility of cord blood stem cell manipulation with high-energy shock waves: An in vitro and in vivo study. *Exp Hematol*, 33: 1371-87, 2005.
28. Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Jia BB, Qiu LY, Wang LJ, Wang GZ, Huang GP.

- Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; [ahead of print].
29. McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 6: 311-7, 2004.
 30. Peled T, Mandel J, Goudsmid RN, Landor C, Hasson N, Harati D, Austin M, Hasson A, Fibach E, Shpall EJ, Nagler A. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded ex vivo with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy*, 6: 344-55, 2004.
 31. De Felice L, Tatarelli C, Mascolo MG, Gregorj C, Agostini F, Fiorini R, Gelmetti V, Pascale S, Padula F, Petrucci MT, Arcese W, Nervi C. Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Res*, 65: 1505-13, 2005.
 32. Astori G, Adami V, Mambrini G, Bigi L, Cilli M, Facchini A, Falasca E, Malangone W, Panzani I, Degraffi A. Evaluation of ex vivo expansion and engraftment in NOD-SCID mice of umbilical cord blood CD34+ cells using the DIDEKO "Pluricell System". *Bone Marrow Transplant*, 35: 1101-6, 2005.
 33. Bradley MB, Cairo MS. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Hum Immunol*, 66: 431-46, 2005.

Generazione e caratterizzazione funzionale delle cellule dendritiche

Francesco Fagnoni

Laboratorio di Oncologia Sperimentale, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia

Identificazione e ruolo fisiologico delle cellule dendritiche.

Le cellule dendritiche (Dendritic Cells - DC) sono state identificate come tali nel 1973 da Steinman e Cohn (1) sulla base della loro spiccata attitudine alla induzione di risposte linfocitarie allogeniche oltre che del tipico aspetto morfologico ricco di prolungamenti di tipo dendritico accompagnato da mancanza di markers fenotipici di altre linee cellulari (Figura 1).

Le DC originano da precursori emopoietici nel midollo osseo e costituiscono un sistema flessibile di cellule dotate di spiccata motilità distribuito nella maggior parte dei tessuti, ma particolarmente concentrato nelle aree di contatto con l'ambiente esterno, come la cute e le mucose (2) (Figura 2).

La funzione del sistema delle DC è di percepire precocemente le situazioni di minaccia o pericolo in grado di determinare danno cellulare e tissutale, di captare gli antigeni liberati nella sede del danno, e di dare avvio all'attivazione della immunità adattativa tramite presentazione antigenica ai linfociti T (3) (Figura 3). Le DC fisiologicamente controllano lo stato di attivazione dei linfociti T e quindi della maggior parte dell'immunità adattativa responsabile del mantenimento

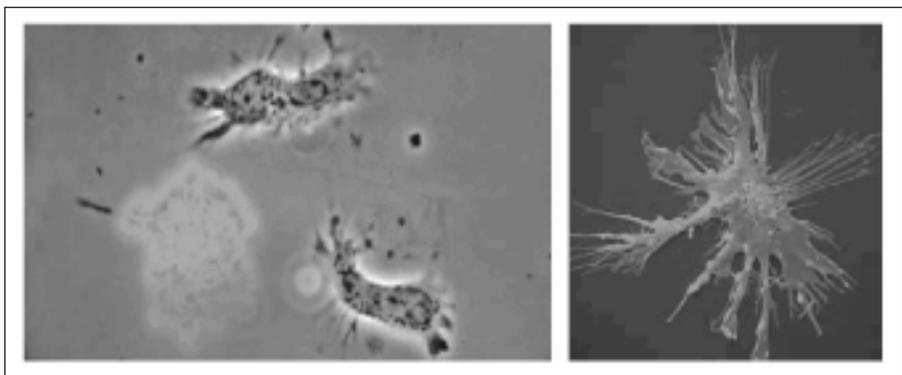


Fig. 1 - Tipica morfologia ricca di estroflessioni e prolungamenti dendritici delle DC differenziate in coltura.

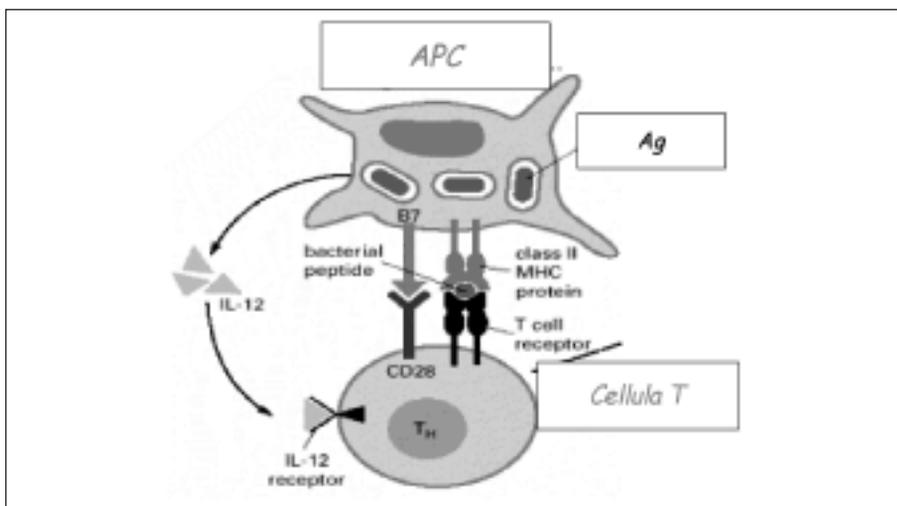


Fig. 4 - Schema di presentazione antigenica e attivazione di un linfocita T CD4+ da parte di DC.

che quantitativo con l'attività di antigen-presenting cells esercitata da monociti-macrofagi, linfociti B, ed altri tipi cellulari. La peculiare capacità di attivare i linfociti T dipende principalmente dalla espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I e II, nel cui contesto vengono presentati rispettivamente ai linfociti T CD8 e CD4 i frammenti peptidici di degradazione degli antigeni internalizzati e processati, e dalla espressione di elevati livelli di molecole di costimolazione (Figura 4).

Le DC tuttavia non svolgono unicamente un ruolo di attivazione. Al contrario, in condizioni normali ed in assenza di segnali derivanti soprattutto dall'ingresso di agenti patogeni o di danno tissutale, le DC rimangono in uno stato di quiescenza che a sua volta ha la funzione di mantenere i linfociti in uno stato di anergia nei confronti dei tessuti autologhi, e quindi di tutelare la tolleranza immunologica e l'omeostasi generale dell'organismo (4). In ultima analisi, le DC hanno una funzione fondamentale nel controllo dell'immunità innata e adattativa sia in condizioni basali, sia in risposta a stimoli massimali.

Produzione di cellule dendritiche per uso clinico

Il riconoscimento della capacità delle DC di attivare fisiologicamente i linfociti T ha posto le basi per il loro sfruttamento clinico con lo scopo di migliorare l'efficacia delle procedure di vaccinazione (5) e per impostare nuovi approcci di immunoterapia in grado di indurre artificialmente il sistema immunitario a riconoscere gli antigeni tumorali come estranei e coordinare una risposta immunitaria antitumorale (6). La crescita della maggior parte dei tumori spontanei nell'uomo infatti avviene in assenza di una significativa risposta immunitaria antitumorale (7) e si ritiene che questa scarsa immunosorveglianza possa esse-

re dovuta almeno in parte alla insufficiente funzione delle DC (8, 9). In realtà, il tessuto tumorale in corso di espansione inizialmente non induce alcun segnale o danno tissutale in grado di attivare le DC (10). Inoltre il tessuto neoplastico strutturato contiene soprattutto macrofagi e poche DC quiescenti, ed è in grado di produrre citochine e altri fattori solubili che ostacolano l'eventuale attivazione delle DC intratumorali. Considerando questi aspetti, e per compensare alla inadeguata funzione delle DC nei pazienti oncologici, da circa 10 anni è stata introdotta la terapia cellulare somatica con DC autologhe manipolate ex vivo e caricate con antigeni tumorali (Figura 5), che ha dato un nuovo impulso alla strategia di immunoterapia attiva (11). La produzione di DC per sperimentazioni cliniche viene eseguita con metodi diversi partendo da sorgenti cellulari comprendenti i monociti, i progenitori staminali emopoietici, ed i precursori delle DC nel sangue periferico.

L'impiego dei monociti prevede un primo stadio differenziativo verso DC immature ed un successivo stadio maturativo finale (12) (Figura 6).

La differenziazione da monociti CD14+ a DC mieloidi immature viene ottenuta riproducibilmente con 5 giorni di coltura in presenza di quantità farmacologiche di GM-CSF ed IL-4. Il GM-CSF ha un ruolo trofico e differenziativo sia sui monociti che sulle DC, mentre IL-4 da un lato aumenta l'espressione delle molecole di HLA di classe I e II (DR, DP, DQ) e dall'altro annulla l'espressione di CD14. La maturazione finale viene ottenuta con 24 - 48 ore di ulteriore coltura in presenza di varie combinazioni di fattori principalmente costituiti da LPS, TNF-alfa, CD40L, IL-1, IL-6, PGE2, ed altri. Le DC mature hanno una elevata attività immunostimolante con una bassa attività di captazione antigenica, mentre le DC immature hanno caratteristiche opposte. La maggior parte delle sperimentazioni cliniche sino ad oggi è stata eseguita con questo protocollo utilizzando sia

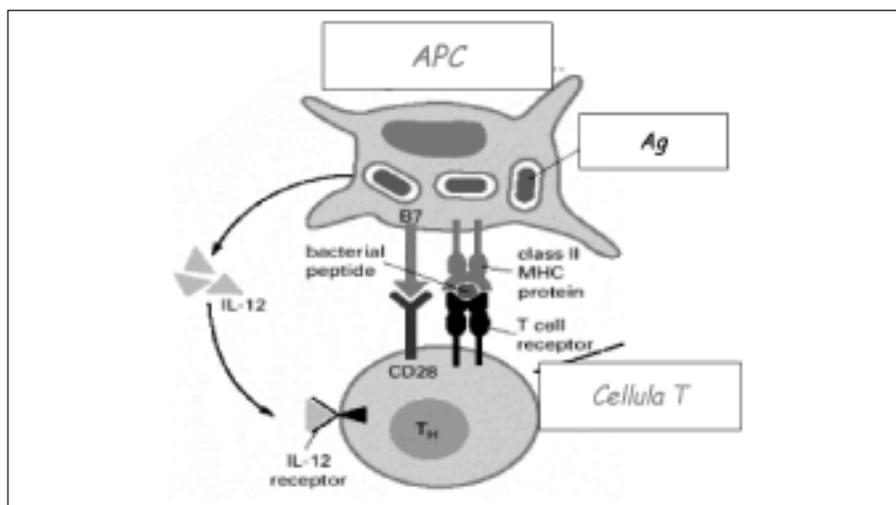


Fig. 5 - Schema di terapia cellulare con DC manipolate ex vivo.

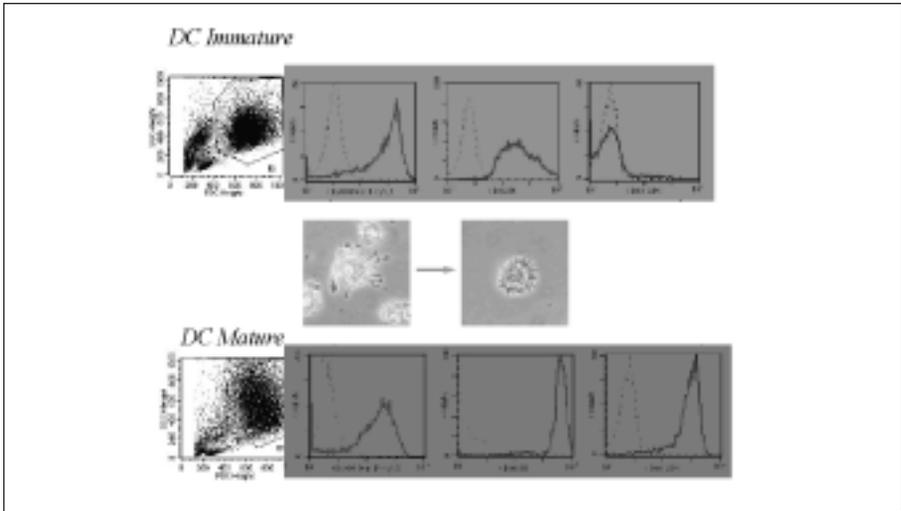


Fig. 6 - Fenotipo delle DC immature e mature ottenute dopo condizionamento con citokine dei monociti CD14+ del sangue periferico.

DC immature, che DC semimature o mature. Anche se non sono stati eseguiti confronti diretti nel contesto di studi clinici, il consenso generale è che le DC mature possano dare i risultati migliori, per cui le DC immature sono ormai state abbandonate. Le maggiori critiche avanzate nei confronti di questo protocollo di generazione di DC riguardano il periodo relativamente prolungato di coltura (circa 7 giorni) e l'impiego di IL-4 che non svolge alcun ruolo nella differenziazione delle DC in vivo ed è invece implicata fisiologicamente nella induzione di risposte di tipo Th2. A questo riguardo, il gruppo guidato da Filippo Belardelli ha proposto un protocollo alternativo interessante di generazione DC (13) che da un lato accorcia i tempi di coltura (3 - 5 giorni) e dall'altro sostituisce IL-4 con Interferon-alfa, una citochina prodotta massivamente durante le prime fasi di infezione virale che può svolgere un ruolo fisiologico nel differenziamento e nell'attivazione delle DC. Lo svantaggio di questo protocollo è costituito da una resa cellulare molto bassa, da una scarsa attività di captazione antigenica e, almeno per ora, dalla mancanza di risultati preliminari nell'impiego clinico. Anche se rimangono divergenze sulle combinazioni di citochine e fattori di crescita da impiegare in coltura, attualmente i monociti CD14+ del sangue periferico costituiscono la sorgente più accessibile, maneggevole, e di miglior resa in termini di quantità e purezza per la produzione di DC.

Le DC da progenitori emopoietici vengono ottenute con la messa in coltura per circa 2-3 settimane di cellule CD34+ isolate da midollo osseo, sangue periferico mobilizzato o cordone ombelicale (14). L'aggiunta di numerose citochine, fra cui sono costanti GM-CSF e TNF-alfa, induce la proliferazione e la differenziazione dei progenitori CD34+ in senso monocitario e dendritico. Il risultato finale è costituito da una popolazione eterogenea circa 10-20 volte superiore a quella di

partenza in cui circa il 20-40% delle cellule ha caratteristiche di DC mieloidi e cellule di Langerhans con i tipici granuli di Birbeck. Questo metodo quindi ha il vantaggio di riprodurre la dendritopoiesi midollare comprendente una fase proliferativa necessaria per l'eventuale trasfezione con vettori virali, ma ha lo svantaggio di tempi di coltura ancora più prolungati rispetto ai monociti e di una scarsissima purezza delle DC ottenute. I risultati clinici delle sperimentazioni condotte con DC generate da progenitori emopietici hanno dato risultati interessanti, ma poiché la preparazione è costosa e laboriosa, questa procedura è stata impiegata da pochi gruppi (15).

Le DC da precursori del sangue periferico vengono ottenute con messa in coltura per 18-20 ore in contenitori di teflon antiaderenti delle cellule monucleate depletate dai monociti mediante gradiente multistrato di percoll (16). Durante questa prima fase di coltura i precursori DC perdono la forma sferica e compatta che hanno nel sangue periferico ed iniziano ad estroflettere i tipici prolungamenti dendritici formando densi agglomerati ("clusters") con i linfociti T autologhi. In questa fase le DC hanno un peso specifico inferiore a quello dei linfociti ed una maggiore resistenza alle condizioni di iperosmolarità. Questa caratteristica ne consente il graduale arricchimento mediante l'uso di gradienti ipertonici (per es. di metrizamide) che precipitano i linfociti e trattengono le DC in superficie. Il vantaggio di questo metodo è che si possono isolare DC da precursori, non solo mieloidi ma anche plasmacitoidi, in soli 2-3 giorni senza aggiunta di citochine e fattori di crescita esogeni, mentre i principali svantaggi sono legati ad una bassa resa cellulare (0.1 - 0.01% delle cellule mononucleate di partenza) ed alla difficoltà a raggiungere gradi di purezza elevati (40-80% della cellularità totale del prodotto finale). Le sperimentazioni cliniche con DC generate da precursori del sangue periferico hanno conseguito risultati clinici incoraggianti, ma sono state impiegate solo da pochi centri fra cui principalmente l'Università di Stanford e la company Dendreon di Seattle.

La caratterizzazione fenotipica e funzionale delle DC generate con ciascuno di questi protocolli ha riguardato una quantità limitata di standard qualitativi di riferimento comuni. Dal punto di vista fenotipico gli standard comuni comprendono l'espressione di molecole HLA di classe I e II, delle principali molecole di costimolazione (CD40, CD80, CD86), e di alcuni markers di maturazione dendritica a funzione per lo più sconosciuta (CD1a, CD1c, CD83). Dal punto di vista funzionale la costante di riferimento è la capacità di induzione di risposte T linfocitarie nella coltura mista allogenica (Allo-MLR), mentre la risposta autologa (Auto-MLR) e la induzione di risposta primaria contro neoantigeni peptidici o nominali sono stati considerati in pochi casi. Analogamente, la verifica della capacità di produzione di IL-12 per il "priming" linfocitario in senso Th1 e la capacità di orientamento delle risposte T linfocitarie in senso Th1 verso Th2, è stata considerata in pochi casi. Infine, il test più probante e definitivo costituito dalla verifica della cosiddetta attività di "cross-priming" riguardante la induzione di risposte citotossiche mediate da linfociti T CD8+ (CTL) dopo presentazione di antigeni solubili esogeni, è rimasto solo ipotetico nella maggior parte dei casi. In conclusione, sono varie le possibilità ed opportunità di generare cellule di grado

clinico con morfologia e fenotipo di DC partendo da progenitori, precursori e monociti. Tuttavia rimane aperta la questione fondamentale sulla adeguata caratterizzazione di queste cellule soprattutto in funzione del loro impiego clinico.

Sperimentazioni cliniche di immunoterapia attiva antineoplastica con cellule dendritiche

La prima somministrazione di DC a scopo clinico è stata eseguita con somministrazioni di DC autologhe isolate ex vivo con gradienti di densità a partire da precursori del sangue periferico e caricate in vitro con la immunoglobulina idiotipica isolata dal tumore autologo su alcuni pazienti affetti da linfoma follicolare resistente alle terapie convenzionali (17). I risultati di questo studio hanno fornito la dimostrazione preliminare della sicurezza, della fattibilità e della attività immunogenica di questa strategia di immunoterapia attiva che è stata in seguito confermata, insieme alla dimostrazione di efficacia clinica, in uno studio successivo eseguito su una casistica più estesa (18). Dall'introduzione di questa strategia sono stati eseguiti oltre un centinaio di trials clinici di fase I/II condotti per quasi tutte le forme istopatologiche neoplastiche conosciute oltre che in alcuni trials clinici di fase III tutt'ora in corso, mentre i pazienti trattati ammontano ormai ad oltre un migliaio (19).

Un denominatore comune dei trials clinici pubblicati è la inclusione di pazienti con malattia avanzata e resistente alla chemioterapia citotossica, alla radioterapia, ed altre terapie standard. Per quanto riguarda i risultati, uno degli obiettivi primari ottenuti da questi studi di fase precoce è riferibile alla costante assenza o scarsa rilevanza di effetti tossici e avversi. Questo primo risultato è particolarmente significativo se si tiene conto che la qualità di vita di questi pazienti spesso è già stata in parte compromessa dagli effetti tossici e collaterali indotti da chemioterapia e radioterapia. Persino il temuto rischio di reazioni autoimmuni sino ad ora è rimasto confinato al solo ambito teorico, per cui la immunizzazione con DC manipolate ex vivo è una forma di terapia cellulare somatica che può essere considerata sicura nei pazienti oncologici.

I risultati clinici ottenuti fino ad ora indicano una quota di pazienti, in percentuale variabile dal 10% al 40% secondo le diverse casistiche, ha avuto risposte cliniche obiettive costituite in maggior parte da risposte parziali, ma anche alcune risposte complete. Questi dati clinici non sono ancora conclusivi, ma possono essere definiti incoraggianti tenendo conto dello stato di malattia avanzata e del pesante pretrattamento dei pazienti inclusi e meritano quindi di essere approfonditi nell'ambito di casistiche più numerose e di nuovi studi clinici.

Attuali limiti e prospettive per future sperimentazioni cliniche

A fronte dell'eccellente profilo di sicurezza e di alcuni risultati clinici incoraggianti, la terapia cellulare con DC presenta ancora una serie di problemi che ostacolano la riproducibilità nell'applicazione clinica e l'avvio di studi randomizzati e controllati. Uno dei principali ostacoli è legato alla mancanza di standardizzazio-

ne delle procedure di manipolazione *ex vivo* delle DC, del tipo di preparato antigenico con cui caricarle, ed infine della via e del protocollo di somministrazione (20). Paradossalmente la grossa mole di ricerche condotte in questo campo nei modelli animali e in esperimenti preclinici ha fornito una serie numerosa di spunti e di alternative, ma non ha fornito chiare indicazioni sulla efficacia relativa dei diversi approcci e soprattutto non ha ancora contribuito a definire metodi standardizzati e di facile applicabilità clinica. Questo aspetto è ancor più rilevante se si considera che alcuni studi hanno evidenziato la possibilità di generare, sia durante il differenziamento (21) che al termine della fase di maturazione finale (22), DC scarsamente immunostimolanti o addirittura in grado di indurre tolleranza (DC tollerogeniche). Queste ultime da un lato potrebbero avere a loro volta un potenziale impiego clinico in senso immunosoppressivo, ma dall'altro andrebbero accuratamente evitate in un contesto di immunoterapia antitumorale. Questa insospettata plasticità funzionale delle DC pone in evidenza la necessità di una caratterizzazione funzionale adeguata e specifica per l'impiego clinico e la produzione di un prodotto per terapia cellulare con caratteristiche quanto più assimilabili a quelle di un emoderivato che possa essere sottoposto ad uno stringente controllo di qualità.

Bibliografia

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137: 1142-62, 1973.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-52, 1998.
3. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296: 301-5, 2002.
4. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, 194: 769-79, 2001.
5. Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*, 109: 1519-26, 2002.
6. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*, 104: 2235-46, 2004.
7. Rothenberg E. What is the role of T-lymphocyte surveillance in neoplastic disease? *Am J Surg*, 143: 664-9, 1982.
8. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2: 293-9, 2001.
9. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Robustelli Della Cuna G, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic Cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*, 100: 230-237, 2002.
10. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21: 807-39, 2003.

11. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, 18: 245-73, 2000.
12. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179: 1109-18, 1994.
13. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med*, 191: 1777-88, 2000.
14. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*, 360: 258-61, 1992.
15. Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med*, 199: 1503-11, 2004.
16. Fagnoni FF, Takamizawa M, Godfrey WR, Rivas A, Azuma M, Okumura K, Engleman EG. Role of B70/B7-2 in CD4+ T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology*, 85: 467-74, 1995.
17. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 2: 52-8, 1996.
18. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 99: 1517-26, 2002.
19. Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest*, 21: 873-86, 2003.
20. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*, 10: 475-80, 2004.
21. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, 193: 233-8, 2001.
22. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1: 311-6, 2000.

Approcci di terapia cellulare adottiva per sostenere la ricostituzione immunologica in pazienti immunocompromessi

Rita Maccario

Laboratorio di Ricerca Immunologia dei Trapianti, Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il trapianto allogenico di cellule staminale emopoietiche (CSE) può essere considerato uno dei primi approcci di terapia cellulare adottiva (1). Dalla fine degli anni '60 il trapianto allogenico CSE si è imposto, da prima come terapia risolutiva per bambini affetti da immunodeficienza primitiva grave, e negli anni successivi con crescente successo per la cura di leucemie acute o croniche, altre forme di neoplasie o patologie congenite (2-7). A discapito degli ottimi risultati conseguiti in questo settore, i trapianti allogenici sono ancora gravati da una percentuale rilevante d'insuccessi, in maggior parte attribuibili a complicanze immunologiche, quali il rigetto e la reazione del trapianto contro l'ospite (*graft versus host disease*, GVHD), alla ricaduta neoplastica o al profondo stato d'immunodeficienza transitoria associata al trapianto che favorisce l'insorgenza di gravi infezioni opportunistiche. In particolare, gravi infezioni virali o fungine possono, con alta frequenza, colpire i pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE purificate da donatore HLA-parzialmente compatibile, poiché i riceventi questo tipo di trapianto non possono giovare del trasferimento da donatore a ricevente delle cellule immunocompetenti che, nel trapianto convenzionale non manipolato da donatore HLA-compatibile, sono infuse al paziente ricevente insieme alle CSE. I linfociti T, B e *natural killer* (NK), d'origine del donatore, proliferano e si differenziano nel ricevente di trapianto di CSE mediante due differenti percorsi, l'espansione periferica dei linfociti maturi trasferiti con l'espianto e la differenziazione di un nuovo sistema immunitario che deve percorrere tutte le tappe ontogenetiche necessarie alla differenziazione delle CSE in cellule effettrici della risposta immunitaria. Il processo di differenziazione di un nuovo sistema immunitario derivato dalle CSE del donatore è un processo più lento dell'espansione periferica dei linfociti maturi, è timo-dipendente per quanto riguarda i linfociti T, è capace di rigenerare un repertorio completo delle funzioni linfocitarie ed è responsabile della ricostituzione immunologica a lungo-termine dei pazienti sottoposti a trapianto di CSE. Il processo d'espansione periferica s'innesca nelle prime settimane dopo il trapianto, è responsabile della ricostituzione immunologica preco-

ce e coinvolge, fra gli altri, i linfociti “alloreattivi”, contenuti nell’espianto del donatore, che esprimono recettori capaci di riconoscere le cellule del ricevente poiché estranee (*non-self*). L’espansione periferica di linfociti T alloreattivi è responsabile dell’insorgenza e gravità della GVHD e deve, pertanto, essere controllata da terapie preventive immunosoppressive, nel caso di trapianto allogenico di CSE non manipolato da donatore HLA-compatibile o da procedure di T- e B-deplezione dell’espianto, nel caso di trapianto da donatore solo parzialmente HLA-compatibile. Le strategie di prevenzione della GVHD, basandosi sulla soppressione della risposta immunitaria o sull’eliminazione dei linfociti T, B, ed NK indeboliscono inevitabilmente anche le difese immunologiche dirette contro i patogeni opportunisti e la recidiva di malattia neoplastica.

Il primo approccio d’immunoterapia cellulare adottiva in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE è stato sviluppato agli inizi degli anni ‘90 dal gruppo di Seattle, guidato da Riddell e Greenberg (8), allo scopo di prevenire le gravi patologie correlate all’infezione post-trapianto da citomegalovirus (HCMV), soprattutto la polmonite interstiziale. L’approccio del gruppo di Seattle consiste nella preparazione ed infusione, prima del manifestarsi della patologia, di cloni linfocitari T citotossici CD8+ HCMV-specifici per i pazienti incapaci di ricostituire precocemente, dopo il trapianto, la risposta immunologica virus-specifica. Per quanto i risultati ottenuti siano stati molto incoraggianti, solo recentemente altri gruppi hanno confermato l’utilità dell’approccio, sviluppando tecniche alternative di clonaggio, espansione ed infusione di linfociti T CD4+ HCMV-specifici o di linee policlonali composte di linfociti T sia CD4+ sia CD8+ (9,10). I risultati più entusiasmanti in termini di prevenzione ed effetto terapeutico sono stati, tuttavia, ottenuti con l’immunoterapia cellulare adottiva delle infezioni da virus di Epstein-Barr (EBV). Una pietra miliare in questo specifico settore è rappresentata dagli studi del gruppo guidato da Rooney e Brenner, iniziati a metà degli anni ‘90 (11) che hanno dimostrato l’efficacia a lungo termine della terapia cellulare adottiva con linee linfoblastoidi T policlonali con attività citotossica EBV-specifica, sia per la prevenzione sia per la terapia della malattia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD) EBV-correlata. Questi primi studi sono stati, in seguito, confermati da altri gruppi e l’esperienza maturata in ambito di trapianto allogenico di CSE è stata estesa, al trattamento della PTLD EBV-correlata in pazienti sottoposti a trapianto d’organo solido (12,13) e alla terapia d’altre neoplasie EBV correlate, ad esempio il carcinoma naso-faringeo, resistente alle terapie convenzionali (14). Recentemente l’approccio di terapia cellulare adottiva con cloni linfocitari T CD4+ è stato applicato anche alla prevenzione delle infezioni invasive da aspergillo (10). Le esperienze cliniche coronate da successo, sopra citate, hanno dato un notevole impulso alla ricerca in questo settore allo scopo di estendere gli approcci di terapia cellulare adottiva anche ad altri agenti infettivi opportunisti, quali adenovirus, varicella zoster, polioma virus BK che possono causare gravi complicanze, anche letali, ai pazienti immunocompromessi dalle procedure trapiantologiche e dai trattamenti immunosoppressivi cui sono sottoposti i pazienti trapiantati per prevenire e/o controllare rigetto e GVHD (15,16).

Per i pazienti con leucemia, primo obiettivo del trapianto allogenico di CSE è la

sostituzione di un sistema emopoietico malato e danneggiato in modo irreversibile dalla radio/chemioterapia con quello sano d'origine del donatore. Una consolidata esperienza clinica ha, tuttavia, dimostrato che il trapianto allogenico di CSE svolge un'importantissima azione d'immunosorveglianza antineoplastica, descritta come "effetto del trapianto contro la leucemia" (*graft versus leukaemia*, GVL). L'effetto GVL è mediato, prevalentemente, dai linfociti T e NK, d'origine del donatore, dotati di specificità "alloreattiva" e capaci, quindi, d'eliminare, le cellule leucemiche del paziente (16,17). La maggior parte dell'effetto GVL è strettamente connessa con la reazione del trapianto contro l'ospite (*graft versus host reaction*, GVHR) e con la GVHD, quest'ultima mediata prevalentemente dai linfociti T. Nei casi in cui l'effetto GVL innescato dal trapianto allogenico non sia sufficiente ad eliminare la malattia neoplastica, una delle possibili strategie d'intervento utili a prevenire o curare la recidiva leucemica consiste nell'infusione ritardata di linfociti del sangue periferico (*delayed lymphocyte infusion*, DLI) del donatore di CSE, applicata allo scopo di innescare, a distanza di tempo dal trapianto, una GVHR che aiuti ad eliminare le cellule neoplastiche. La DLI è particolarmente efficace per la terapia della ricaduta dopo trapianto in caso di leucemia mieloide cronica, ma il suo effetto antileucemico è significativamente inferiore in caso di leucemia acuta o di sindrome mielodisplastica (18). Inoltre, questa forma di terapia cellulare è gravata da un considerevole rischio di innescare GVHD grave, talvolta difficilmente controllabile.

Il fondamento logico dell'uso, per i pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE, di protocolli d'immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T capaci, a differenza della DLI, di aggredire selettivamente solo le cellule leucemiche poggia sulla dimostrazione dell'efficacia, in assenza d'effetti collaterali rilevanti, della terapia cellulare adottiva, virus-specifica, soprattutto nella prevenzione e cura di PTLD EBV-correlate. In entrambi i casi, le cellule potenzialmente utilizzabili per generare ed espandere linee linfocitarie T policlonali, o derivate da singoli cloni linfocitari T, sono d'origine del donatore di trapianto di CSE e derivano, quindi, da un individuo immunocompetente in grado di sviluppare un repertorio immunologico completo ed efficiente. Nel caso di terapia cellulare adottiva antivirale, numerose esperienze cliniche hanno dimostrato come le cellule trasfuse abbiano la possibilità d'incontrare numerosi antigeni virali immunodominati, capaci di stimolare una considerevole espansione numerica dei linfociti T virus-specifici e di favorire lo sviluppo di memoria immunologica, utile al controllo delle eventuali successive riattivazioni del virus stesso. Nel caso di terapia cellulare adottiva antitumorale, la possibilità di successo è moderata dall'evidenza dei numerosi potenziali meccanismi con cui la cellula tumorale potrebbe, anziché attivare, bloccare la risposta immunitaria antineoplastica trasferita (*immune escape*). Il vantaggio della terapia cellulare adottiva, rispetto alla DLI potrebbe derivare, oltre che da un rischio ridotto di sviluppo di GVHD grave, anche dal fatto che nel primo caso la risposta antitumorale può essere indotta, espansa e potenziata *ex-vivo*, evitando così la parte di meccanismi d'*immune escape* che agiscono inibendo la fase d'induzione ed espansione dei linfociti T antileucemia.

Le linee policlonali o monoclonali di linfociti T, idonee per terapia cellulare adot-

tiva, devono possedere una serie di requisiti indispensabili per garantire la sicurezza ed efficacia del loro impiego *in vivo* (16). Idealmente, i requisiti necessari comprendono: 1) capacità di uccidere selettivamente o, almeno, in modo nettamente preferenziale le cellule leucemiche e, di conseguenza, scarsa capacità d'aggreddire le cellule sane del paziente; 2) capacità di espandersi rapidamente *in vitro* e, possibilmente, *in vivo* mantenendo inalterate le loro caratteristiche di funzione e specificità; 3) capacità di raggiungere i siti dell'organismo dove sono in fase d'espansione le cellule leucemiche; 4) capacità di differenziare e mantenere cellule della memoria immunologia che garantiscano immunosorveglianza antileucemica a lungo termine.

La prima scelta strategica, utile per impostare un programma di terapia cellulare adottiva antileucemia riguarda il tipo d'antigene utilizzato per la generazione sia di linfociti T citotossici (CTL) antileucemia che d'altre sottopopolazioni linfocitarie T, necessarie per l'espansione dei CTL. Almeno tre categorie d'antigeni sono state analizzate per esplorare la loro potenzialità d'indurre *in vitro* una risposta immunitaria antileucemia mediata da linfociti T, impiegabile in approcci d'immunoterapia cellulare adottiva per pazienti sottoposti ad allo-TCSE: (i) antigeni tumore-specifici non-polimorfici, (ii) antigeni minori polimorfici (mHA_g), e (iii) antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali.

Una scelta strategica, alternativa a quelle sopra menzionate, è l'utilizzo delle cellule leucemiche, rese apoptotiche mediante irradiazione, quale fonte d'antigene tumorale per la generazione di CTL antileucemia, originati dalle cellule mononucleate del donatore di trapianto allogenico di CSE. Nel 1999 Falkenburg e coll. (19) hanno descritto, utilizzando quest'approccio, la prima esperienza di terapia cellulare adottiva antileucemia in una paziente con leucemia mieloide cronica, in fase accelerata di malattia dopo trapianto e resistente a DLI; lo studio ha dimostrato la possibilità di ottenere, mediante l'infusione di un ragguardevole numero di cellule coltivate *in vitro*, uno stato di remissione ematologia completa dopo infusione di linee policlonali di CTL antileucemia, derivate dal sangue periferico del donatore mediante stimolazione *in vitro* con blasti leucemici apoptotici del paziente e interleuchina-2 (IL-2). Questo risultato rappresenta una pietra miliare per la sperimentazione di un simile approccio di terapia cellulare adottiva, anche per pazienti affetti da leucemia acuta.

Studi successivi si sono, perciò, focalizzati sull'ottimizzazione di metodologie che consentissero di espandere efficientemente *in vitro* CTL capaci di mantenere attività antileucemia anche dopo parecchi cicli di ristimolazione (20,21). In particolare un interessante protocollo metodologico messo a punto e recentemente descritto da Montagna e coll. (22,23) utilizza: i) cellule dendritiche - le *antigen presenting cells* professioniste - d'origine del donatore, ii) blasti leucemici del paziente trapiantato, resi apoptotici mediante irradiazione, quale fonte d'antigeni tumorali, iii) popolazioni arricchite in linfociti CD8-positivi d'origine del donatore quali cellule effettrici dell'attività citotossica antileucemia, iv) aggiunta, ad opportuni tempi di coltura, di cellule *feeder* (cellule mononucleate del donatore, deprivate di linfociti CD8-positivi) irradiate e di citochine (IL-7, IL-12, IL-2)

importanti per l'induzione ed espansione a lungo-termine dei CTL. I risultati fino ad ora ottenuti *in vitro*, hanno dimostrato come la strategia metodologica d'utilizzo di blasti leucemici apoptotici, presentati da cellule dendritiche del donatore di trapianto allogenico di CSE indipendentemente dal suo fenotipo HLA, non richiede la definizione di uno specifico antigene tumorale e consente di generare, dalle cellule mononucleate del donatore stesso, linee linfocitarie T antileucemia policlonali capaci di espandersi per parecchi cicli replicativi senza perdere le caratteristiche intrinseche di specificità e funzionalità. L'uso della cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumorali, presentati presumibilmente con un meccanismo di *cross-priming* dalle cellule dendritiche, non permette, d'altro canto, di definire la natura degli antigeni riconosciuti dai CTL antileucemia che potrebbero comprendere proteine tumore-specifiche, mHAg e antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali. La policlonalità della risposta evocata rappresenta, tuttavia, anche in assenza della definizione precisa degli antigeni riconosciuti dai CTL antileucemia, un vantaggio considerevole in termini di potenziale efficacia dei CTL antileucemia *in vivo* poiché diminuisce la possibilità che la risposta T citotossica possa essere bloccata da meccanismi d'*immune escape*. L'insieme di queste osservazioni rappresenta un'importante base biologica per la programmazione di protocolli d'immunoterapia cellulare adottiva, basati sull'uso di CTL antileucemia per il controllo della malattia residua minima e per la prevenzione della recidiva, in pazienti oncoematologici sottoposti a trapianto allogenico di CSE.

Bibliografia

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as hematopoietic transplantation. *Blood*, 106: 4397-4406, 2005.
2. Heslop HE, Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*, 157: 217-22, 1997.
3. Comoli P, Labirio M, Basso S, et al: Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*, 99: 2592-2598, 2002.
4. Comoli P, Maccario R, Locatelli F, Valente U, Basso S, Garaventa A, Toma P, Botti G, Melioli G, Baldanti F, Nocera A, Perfumo F, Ginevri F. Treatment of immunotherapy. *Nature*, 411: 385-389, 2001.
5. Good RA. Bone marrow transplantation for immunodeficiency diseases. *Am J Med Sci*, 294: 68-74, 1987.
6. Treleaven J, Barrett J. *Bone Marrow Transplantation in Practice*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 399, 1992.
7. Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Semin Oncol*, 24: 114-123, 1997.
8. Locatelli F, Burgio GR. Transplant of hematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going. *Haematologica*, 83: 550-563, 1998.
9. Arcese W, Aversa F, Bandini G, De Vincentiis A, Falda M, Lanata L, Lemoli

- RM, Locatelli F, Majolino I, Zanon P, Tura S. Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow. *Haematologica*, 83: 159-82, 1998.
10. Gluckman E, Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. *Curr. Opin. Hematol*, 7: 353-357, 2000.
 11. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral disease. *Annu Rev Immunol*, 13: 545-586, 1995.
 12. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H.. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99: 3916-3922, 2002.
 13. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, Capanni M, Urbani E, Mancusi A, Aversa F, Martelli MF, Romani L, Velardi A. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am J Transplant*, 5: 1415-1422, 2005.
 14. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, Basso S, Carminati O, Labirio M, Schiavo R, Secondino S, Frasson C, Perotti C, Moroni M, Locatelli F, Siena S. Cell Therapy of Stage IV Nasopharyngeal Carcinoma With Autologous Epstein-Barr Virus-Targeted Cytotoxic T Lymphocytes. *J Clin Oncol*, Oct 3; [Epub ahead of print], 2005.
 15. Comoli P, Azzi A, Maccario R, Basso S, Botti G, Basile G, Fontana I, Labirio M, Cometa A, Poli F, Perfumo F, Locatelli F, Ginevri F. Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation*, 78: 1229-1232, 2004.
 16. Locatelli F, Comoli P, Montagna D, Rossi F, Daut L, Maccario R. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 17: 479-92, 2004.
 17. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched haemopoietic transplantation. *Trends Immunol*, 23: 438-444, 2002.
 18. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*, 103: 767-76, 2004.
 19. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willems R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 94: 1201-1208, 1999.
 20. Montagna D, Locatelli F, Calcaterra V, Comoli P, Moretta A, Giorgiani G, Zecca M, Bonetti F, Giraldi E, Rondini G, Maccario R. Does the emergence and persistence of donor-derived leukaemia-reactive T lymphocytes protect patients given an allogeneic BMT from recurrence? Results of a preliminary study. *Bone Marrow Transplant*, 22: 743-750, 1998.

21. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, Comoli P, Locatelli F, Maccario R, Fisher A, Cavazzana-Calvo M. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood*, 93: 3550-3557, 1999.
22. Montagna D, Maccario R, Locatelli F, Rosti V, Yang Y, Farness P, Moretta A, Comoli P, Montini E, Vitiello A. Ex vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood*, 98: 3359-3366, 2001.
23. Montagna D, Maccario R, Montini E, Tonelli R, Lisini D, Pagani S, Comoli P, Moretta A, Assirelli E, Basso S, Vitiello A, Pession A, Locatelli F. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol*, 31: 1031-8, 2003.

Cellule staminali mesenchimali: caratterizzazione biologica e prospettive di applicazione clinica

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

I criteri per l'esatta identificazione della *cellula staminale mesenchimale* (CSM) rimangono ancora oggi da precisare, nonostante i numerosi studi sperimentali e clinici condotti in questi ultimi anni. Infatti, non è stato sino ad ora trovato alcun marcatore specifico in grado di identificare le CSM, sia in vitro che in vivo; non può quindi venir utilizzata alcuna procedura quantitativa per precisarne la presenza in una determinata popolazione cellulare. Oggi le CSM vengono comunemente definite mediante la combinazione di una serie di loro proprietà fisiche, morfologiche, fenotipiche e funzionali, molte delle quali chiaramente non-fisiologiche.

In vitro le CSM possiedono un ampio potenziale differenziativo, rigenerano clonalmente, danno origine ad una progenie differenziata; in colture appropriate possono proliferare ed espandersi più di mille volte, in un breve periodo di tempo. Sono quindi vere cellule staminali, perché hanno la capacità di autorinnovarsi e di dare origine a più tipi di cellule differenziate. Si deve tuttavia sottolineare che le attuali conoscenze biologiche sulle CSM sono, almeno in gran parte, quelle di una biologia in vitro, al di fuori del contesto nell'organismo vivente (Javazon et al., 2004).

Le CSM più studiate sono quelle del midollo osseo che contiene, oltre alle cellule staminali ematopoietiche in grado di produrre gli elementi maturi del sangue, anche cellule staminali non-ematopoietiche di tipo mesenchimale. Tali cellule sono dotate di automantenimento e di capacità differenziativa pleiotropica in senso osteoblastico, condroblastico, adipocitico, mioblastico e fibroblastico. Per la loro proprietà di generare le cellule del microambiente midollare, fanno parte delle *cellule stromali midollari*. È da sottolineare che le cellule stromali del microambiente midollare sono fortemente eterogenee essendo costituite, oltre che dalla progenie delle CSM, anche da cellule endoteliali e da macrofagi (questi ultimi, anche se generati dalle cellule staminali ematopoietiche, vengono considerati elementi funzionali dello stroma).

Sul piano funzionale, lo stroma del microambiente midollare svolge un ruolo fon-

damentale nella regolazione della proliferazione e differenziazione ematopoietica. Le cellule stromali sintetizzano fattori di crescita e citochine regolatrici, esprimono molecole di adesione e producono proteine della matrice extracellulare che compartimentalizzano le molecole regolatrici. Tali molecole e fenomeni di localizzazione a livello dello stroma midollare sono essenziali per lo svolgimento di una regolare ematopoiesi.

Origine e sviluppo delle CSM

L'ontogenesi delle CSM costituisce un'area di ricerca ancora poco conosciuta, che merita di essere maggiormente esplorata per ottenere maggiori conoscenze che consentano di meglio comprendere le caratteristiche peculiari delle CSM presenti nei tessuti adulti. Al riguardo è da sottolineare che il potenziale di espansione clonale e plasticità differenziativa nelle cellule embrionali e fetali è significativamente più elevato di quello presente nelle popolazioni cellulari adulte, e che questo è stato dimostrato anche in linee di cellule stromali (Charbord et al., 2002).

Sull'origine e sviluppo delle CSM è interessante riportare alcune osservazioni. La prima è che il sangue umano circolante contiene precocemente durante lo sviluppo non solo un numero elevato di cellule staminali ematopoietiche, ma anche un'abbondante quantità di cellule mesenchimali circolanti (Campagnoli et al., 2001). Queste cellule sono presenti in gran numero dalla settima settimana di gestazione e persistono sino alla dodicesima settimana circa, quando si riducono spiccatamente sino a quasi scomparire dalla circolazione fetale. Queste cellule sono fenotipicamente simili alle classiche CSM dell'adulto quando saggiate nelle medesime condizioni colturali, tranne che esse dimostrano una maggiore multipotenzialità in vitro (inclusendo anche una potenzialità miogenica, endoteliale e neurale), contengono una maggior frequenza di CFU-F (*colony forming unit-fibroblast*), e appaiono più robuste con più rapido profilo di crescita e mantenimento di multipotenzialità attraverso un maggior numero di passaggi in coltura. Questa osservazione suggerisce che precocemente durante lo sviluppo si verifica un'onda di cellule mesenchimali circolanti, che può popolare i compartimenti stromali dei tessuti ematopoietici e degli altri tessuti.

Sebbene la presenza di cellule stromali circolanti si riduca marcatamente dopo la dodicesima settimana di gestazione, è stata dimostrata la persistenza in circolo a livelli minimi di cellule staminali multipotenti. Diversi gruppi di ricerca hanno infatti isolato dal sangue di cordone ombelicale popolazioni di cellule multipotenti non ematopoietiche, una delle quali simile alle classiche CSM con espressione degli antigeni di Classe I, CD13 e CD44, e un'altra con assenza degli antigeni di Classe I e II e progressiva espressione di marcatori embrionali (Rex1 e SSEA4) (Goodwin et al., 2001; Wernet et al., 2001). L'isolamento e le condizioni colturali utilizzate per ottenere queste popolazioni cellulari sono simile a quelle descritte dal gruppo di Verfaillie (2001) per ottenere le *multipotent adult progenitor cells* (MAPC); ciò indica l'importanza delle procedure colturali in questo settore di ricerca. A sostegno del fatto che cellule multipotenti mesenchimali cir-

colanti possano persistere a lungo durante la vita, è inoltre da ricordare che il gruppo di Robey (2001) ha segnalato la presenza di progenitori multipotenti nel sangue circolante di soggetti adulti.

Le osservazioni sin qui riportate provano l'esistenza di cellule staminali ampiamente multipotenti nel feto, in una fase precoce della gestazione, e la loro persistenza in quantità inferiore nell'età adulta. Tuttavia, rimangono da dimostrare l'identità di queste cellule e la loro relazione con le CSM ottenute in coltura da cellule adulte.

Un'altra osservazione riguarda la presenza di cellule fetali nel sangue circolante e nei tessuti materni per decenni dopo la gravidanza, e la loro possibile partecipazione alla rigenerazione di tessuti in specifiche malattie, specie autoimmuni (Bianchi, 2000); questa osservazione è stata fatta con l'impiego della FISH per i cromosomi X e Y, che ha consentito di dimostrare un chimerismo fetale nella madre, anche nel primo trimestre di gestazione (Johnson et al., 2001). Interessante è poi riportare il riscontro, nella tiroide di donne affette da tiroidite che avevano avuto gravidanze con feti maschi, di follicoli tiroidei di origine completamente maschile (Srivasta et al., 2001). Questi ultimi dati sono una prova addizionale indiretta della presenza in circolazione durante lo sviluppo di cellule staminali, che si distribuiscono nei vari compartimenti tissutali dove permangono per tutta la vita come una riserva per riparare e rigenerare i tessuti.

Caratteristiche in vitro delle CSM

CSM sono state coltivate con variabile difficoltà da campioni ottenuti da specie diverse: topo, ratto, cane, gatto, cavia, coniglio, babbuino e uomo. Le sorgenti utilizzate sono state il midollo osseo, l'osso, il sangue periferico, il tessuto adiposo, il sangue di cordone ombelicale, il liquido amniotico, alcuni tessuti fetali. La metodologia usualmente impiegata per isolare le CSM è stata quella indicata da Friedenstein (1995), che utilizza la proprietà fisica dell'aderenza alla plastica. Anche i macrofagi, le cellule endoteliali, i linfociti e le cellule muscolari lisce aderiscono alla plastica; sono quindi necessari alcuni passaggi in colture adeguate per eliminare la contaminazione; le colture finali rimangono morfologicamente eterogenee, comprendendo cellule fusiformi, oppure poligonali, oppure cuboidi, isolate o raggruppate in nidi cellulari.

Un'altra importante proprietà delle CSM in vitro è quella di formare colonie. L'unico sistema di coltura oggi in grado di saggiare le capacità proliferative dei progenitori mesenchimali è il *CFU-F assay*. A tale test ci si deve riferire, anche se i rapporti fra CSM e CFU-F debbono essere ulteriormente precisati. Le colonie derivate da CFU-F sono molto eterogenee, sia per forma e dimensioni, sia per potenziale differenziativo. Esistono differenze di specie ancora da spiegare; ad esempio, la capacità proliferativa delle CFU-F murine è superiore rispetto a quella delle CFU-F umane (Javazon et al., 2001).

Fenotipicamente le CSM esprimono parecchi marcatori non specifici; infatti nessuno di essi, singolarmente o in combinazione, ha dimostrato di raggiungere un elevato livello di specificità. Routinariamente le CSM vengono quindi caratteriz-

zate in base alla mancanza di espressione dei marcatori ematopoietici (CD45, CD34, CD14) e in base all'espressione invece di peculiari molecole di adesione (CD90, CD105, CD44). Fatte ferme queste condizioni, anche per quanto riguarda il fenotipo esistono differenze secondo le specie, i tessuti di origine, i metodi di isolamento, le modalità colturali.

Da quanto sin qui riportato risulta evidente che criteri morfologici e fenotipici non possono venir utilizzati per la specifica identificazione delle CSM. Forse l'approccio più utile per una presuntiva identificazione di tali cellule è quello funzionale; infatti, per l'attuale identificazione di popolazioni di CSM il principale criterio richiesto è la capacità di una loro differenziazione in osso, cartilagine e grasso. È importante sottolineare che quando le popolazioni di CSM vengono analizzate con il saggio di clonalità si dimostrano eterogenee, con singole cellule variabili in potenziale differenziativo e capacità di espansione (Owen e Friedenstein, 1988). All'interno di una determinata popolazione di CSM si osserva, nelle migliori condizioni sperimentali, una bassa quantità di cellule capaci di differenziazione tridimensionale, e maggior quantità di cellule dotate di capacità bi- o mono-dimensionale (Di Girolamo et al., 1999). Inoltre, generalmente solo pochi cloni sono capaci di un'estesa espansione. È stato quindi proposto di applicare alle culture di CSM un modello gerarchico, nel quale la multipotenzialità viene gradualmente perduta, ed il commissionamento gradualmente acquisito, con passaggi in culture successive (analogamente a quanto accade per le cellule staminali/progenitori emopoietici) (Javazon et al., 2004).

Una cellula che appare essere una forma distinta, ma correlabile alla classica CSM, è la *multipotential adult progenitor cells* (MAPC), ben caratterizzata da Reyes e Verfaillie (2001). Rispetto alle classiche CSM, le MAPC sono capaci in vitro di differenziare, oltre che in un ampio spettro di cellule mesenchimali, anche in cellule endoteliali ed epiteliali; inoltre, singole MAPC trapiantate in blastocisti embrionali di topo danno origine a cellule derivate dal donatore in tutti i tessuti ed organi, incluso il sistema nervoso (Jiang et al., 2002). Sebbene le MAPC possano rappresentare un progenitore più indifferenziato e pluripotente delle CSM, le relazioni fra le due popolazioni cellulari sono ulteriormente da precisare, soprattutto per quanto riguarda il loro comportamento in vivo.

Caratteristiche immunologiche delle CSM

La conoscenza delle proprietà immunologiche delle CSM aumenta l'interesse per un loro possibile impiego in trapiantologia; infatti, infuse in individui allogeneici non vengono rigettate. Tuttavia, come per le altre informazioni sulle capacità funzionali delle CSM, anche le notizie sulle proprietà immunologiche sono state ottenute soprattutto in colture cellulari. Il fenotipo immunologico delle CSM coltivate è descritto come MHC Classe I+, MHC Classe II-, CD40-, CD80-, CD86- (Tse et al., 2003). Questo immunofenotipo è considerato come non-immunogenico e suggerisce che le CSM possano essere efficaci nell'indurre una

tolleranza immunologica: l'espressione di antigeni di Classe I consentirebbe di attivare cellule T alloreattive, ma per l'assenza di molecole costimolatorie non si potrebbe innescare un segnale secondario, e si formerebbero cellule T anergiche. Alcuni Autori hanno segnalato la soppressione di cellule T stimulate in vitro mediante cocultura con CSM; la soppressione si verifica con cellule T stimulate sia con mitogeni policlonali, sia con anticorpi anti-CD3, sia con alloantigeni (Le Blanc et al., 2003). Questa soppressione è indipendente dall'MCH-matching fra cellule T e CSM (Di Nicola et al., 2002). Il meccanismo di tale soppressione è ancora controverso; infatti, alcuni Autori hanno dimostrato che la T-soppressione avviene solo dopo il contatto diretto cellula-cellula, mentre altri hanno osservato che l'attività soppressiva esiste anche in forma di fattore solubile. Le CSM sono inoltre capaci di inibire la produzione di linfociti citotossici in vitro.

È ancora da sottolineare la scarsità dei dati sugli effetti immunomodulatori delle CSM in vivo. È stato dimostrato che le CSM hanno prolungato la sopravvivenza di trapianti cutanei allogenici in babbuini immunocompetenti (Bartholomew et al., 2002). Recentemente è stato poi pubblicato che cellule tumorali di topo iniettate in un topo ricevente allogenico crescono se vengono coiniettate con CSM di topo, mentre le cellule tumorali iniettate da sole vengono distrutte dal sistema immune dell'ospite (Djouad et al., 2003). Queste due segnalazioni suggeriscono che l'effetto immunosoppressivo delle CSM osservato in vitro può essere trasferito in vivo, ma ulteriori prove sono senz'altro necessarie.

Sconosciuti sono i meccanismi della scarsa o mancante risposta immune all'infusione di CSM allogeniche, anche se l'argomento, come già riportato, è importante in prospettiva di un impiego di tali cellule in procedure trapiantologiche. Appaiono quindi senz'altro necessari studi preclinici in vivo, condotti secondo precisi modelli fisiopatologici, per chiarire le capacità immunogenetiche e immunomodulatorie delle CSM.

Trapianto allogenico e CSM

Sulla base di alcune considerazioni intuitive, più che di provati dati sperimentali, l'infusione di CSM è stata proposta per facilitare il trapianto di cellule staminali ematopoietiche. La prima considerazione riguarda il concetto che, fornendo un supporto di cellule stromali, si possa facilitare il recupero ematopoietico. La seconda considerazione è che, per le particolari proprietà immunologiche delle CSM, queste possano favorire l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche e ridurre la GVHD. Nel tentativo di chiarire il ruolo svolto dalle CSM nel trapianto di midollo osseo, sono stati quindi condotti alcuni studi clinici preliminari.

Un primo approccio al problema è quello di identificare le CSM del donatore nell'ospite dopo il trapianto. La capacità dello stroma o delle CSM ad attecchire dopo un trapianto eseguito con procedure mieloablative convenzionali è argomento ancora controverso, anche se la maggior parte degli studi non ha potuto documentare la persistenza a lungo termine nell'ospite di cellule stromali del donatore (Stute et al., 2002; Awaya et al., 2002). Le discordanze fra i dati al

riguardo riportati in letteratura sono in gran parte dovute alla diversa sensibilità delle metodiche utilizzate dai singoli Autori. A tal riguardo è da ricordare che Cilloni et al. (2000) solo utilizzando l'amplificazione con PCR sono riusciti a documentare un limitato chimerismo di cellule stromali del donatore in 7 su 41 pazienti trapiantati con cellule mismatched di sesso e T-deplete, dopo condizionamento con TBI. Quindi si può senz'altro affermare che il trapianto di midollo osseo, eseguito secondo le procedure mieloablative convenzionali, generalmente si accompagna ad un minimo trapianto di stroma del donatore.

Un problema clinicamente rilevante è se l'infusione di un grande numero di CSM espanse in coltura possa colonizzare ed attecchire nel midollo osseo. È stato dimostrato da parecchi studi che la maggior parte delle CSM, ottenute da colture di midollo osseo e infuse endovena, viene sequestrata nel letto capillare dei vari tessuti, prevalentemente nel polmone (Gao et al., 2001). Analisi ripetute a distanza di tempo hanno poi dimostrato che nel midollo osseo le cellule del donatore sono evidenziabili a bassi livelli (di PCR), non più elevati di quelli riscontrati in altri tessuti. Queste osservazioni dimostrano che, nelle circostanze sperimentali riportate, le CSM midollari coltivate tendono ad occupare in modo aspecifico il letto capillare e non ad accasarsi specificamente nel midollo osseo. Recentemente Rombouts e Ploemacher (2003) hanno però osservato, in topi singenici irradiati a dosi subletali, che CSM midollari "fresche" presentano un elevato *homing* a livello del midollo osseo, capacità che perdono dopo coltura. Questo studio sta a dimostrare che l'espansione in coltura altera le caratteristiche di attecchimento e di *homing* delle CSM, e che lo stroma può venir trapiantato in assenza di barriere immunologiche e usando l'irradiazione per creare lo spazio necessario.

Alcuni studi clinici segnalano l'elevato grado di tollerabilità della coinfezione di midollo osseo e di CSM autologhe, con accelerazione della ripresa piastrinica e granulocitaria (Koc et al., 2000). Inoltre, sono state segnalate alcune osservazioni non conclusive sull'efficacia dell'infusione delle CSM nel facilitare l'attecchimento del trapianto di midollo osseo e la prevenzione della GVHD (Koc et al., 2002). È stata poi dimostrata in modo certo la grande efficacia del trapianto di midollo osseo o dell'infusione di CSM nella terapia dell'osteogenesi imperfetta (Horwitz et al., 2001).

Considerando il trapianto allogenico di organi solidi, appare interessante ricordare i risultati segnalati per la prima volta dal gruppo di ricerca di Pittsburg (Starzl et al., 1992; Pham et al., 1995). Questi Autori hanno osservato, in pazienti che avevano ricevuto anni prima un trapianto d'organo (fegato, rene, cuore, polmoni), la presenza nel sangue e nei vari tessuti di cellule del donatore a bassi livelli; tale chimerismo era associato ad una bassa incidenza di rigetto cronico. Le cellule chimeriche del donatore sono leucociti residenti nell'organo trapiantato, che hanno la capacità di migrare e colonizzare i tessuti del ricevente (leucociti *passenger*); queste cellule, una volta migrate nell'organismo ospite, sono in grado di modularne la risposta immunitaria inducendo una tolleranza verso l'organo trapiantato. Secondo tale concetto il chimerismo sarebbe una condizione necessaria per indurre la tolleranza.

Leucociti *passenger*, che passano dall'organo trapiantato nei tessuti del ricevente, hanno origine dal midollo osseo del donatore (Wood, 2003). Per questo motivo è stato proposto di infondere midollo osseo del donatore, contemporaneamente all'esecuzione del trapianto d'organo, per aumentare la quota di leucociti *passenger* trasferiti al ricevente, e indurre in questi una maggior tolleranza verso l'organo trapiantato. Le prime esperienze cliniche comunicate dal gruppo di Pittsburg con l'impiego di questa procedura sono state favorevoli, in termini di accettazione dell'allotrapianto e di riduzione del condizionamento immunosoppressivo, e sono state confermate da studi successivi.

È quindi oggi conoscenza acquisita che l'infusione di midollo osseo, contemporanea ad un trapianto allogenico di organo solido, ne migliora l'accettazione. L'intervento delle singole componenti cellulari midollari nei meccanismi immunologici che portano a tale incremento di tolleranza è ancora tutto da precisare. Particolarmente interessanti appaiono studi sul possibile ruolo svolto al riguardo dalle CSM, cellule dotate di capacità immunomodulatorie e di notevole plasticità differenziativa.

Quale ruolo delle CSM in medicina rigenerativa?

Parecchi dati pubblicati di recente sostengono un ruolo svolto da cellule derivate dal midollo osseo nella riparazione di vari organi e tessuti danneggiati. Fra le diverse popolazioni cellulari midollari le CSM, per la loro particolare plasticità, possono al riguardo occupare un ruolo importante; inoltre, per il loro intervento nei processi di immunotolleranza, il loro impiego potrebbe essere utile anche in ambito allogenico.

Per quanto riguarda la terapia cellulare di lesioni scheletriche è da ricordare lo studio condotto in bambini affetti da osteogenesi imperfetta trattati con trapianto allogenico di progenitori mesenchimali midollari ottenuti da soggetti sani, con il risultato di un netto miglioramento della malattia (Horwitz et al., 1999). In ortopedia e chirurgia craniofacciale il maggior impiego in vivo di CSM è oggi quello del loro impianto diretto (eventualmente con l'ausilio di adeguati supporti) nella sede delle lesioni ossee o cartilaginee da correggere o da riparare; il risultato è una marcata accelerazione nella formazione di osso e cartilagine.

In questi ultimi anni sono state condotte parecchie ricerche sperimentali di terapia cellulare di un danno miocardio. Diverse sono state le popolazioni cellulari utilizzate: fibroblasti, mioblasti scheletrici, cardiomioblasti, cellule di midollo osseo in toto, cellule ematopoietiche, CSM; le cellule sono state infuse per via sistemica o iniettate direttamente nella sede della lesione. È da sottolineare che tutte queste popolazioni cellulari, utilizzate con modalità diverse, hanno mostrato di migliorare la funzionalità miocardica nel modello animale dell'infarto miocardio acuto; tuttavia, il meccanismo di questo effetto rimane ancora da precisare. Parecchi di questi studi hanno infatti documentato la persistenza o l'attecchimento delle cellule del donatore nella zona peri-infartuale, ma veramente pochi hanno dimostrato in modo convincente la differenziazione

cardiomiocitaria e l'integrazione funzionale delle cellule nella regione danneggiata. Sono stati quindi postulati altri meccanismi, oltre la sostituzione dei cardiomiociti: induzione di neoangiogenesi, riduzione di apoptosi, aumento di produzione di collagene; questi vari meccanismi potrebbero concorrere a migliorare il rimodellamento miocardio postinfartuale. In conclusione, è ancora da studiare in campo sperimentale il migliore approccio per la terapia cellulare di un danno miocardico, e rimane da precisare se a questo scopo l'impiego di CSM possa costituire un vantaggio rispetto a quello di altri tipi cellulari. I primi studi clinici condotti in questo settore di ricerca sono giunti a conclusioni contrastanti: alcuni Autori non hanno osservato alcun beneficio (Kuethe et al., 2004), altri hanno documentato risultati favorevoli dopo brevi follow-up (Assmus et al., 2002; Schachinger et al., 2003), altri ancora hanno interrotto la sperimentazione clinica per imprevisti effetti sfavorevoli (Kang et al., 2004). Quindi, riguardo ai benefici ed ai potenziali rischi della terapia cellulare di un danno miocardico non sono state ancora tratte conclusioni definitive; sono senz'altro necessarie particolari cautele.

Un'altra applicazione sperimentale alla quale viene riservato particolare interesse è l'impiego di una terapia cellulare per riparare un danno del sistema nervoso centrale o del midollo spinale. La maggior parte degli studi sono stati logicamente condotti con l'impiego di cellule staminali neurali. Tuttavia, alcuni Autori hanno ottenuto risultati favorevoli utilizzando CSM, somministrate direttamente nella sede della lesione in ratti con danno provocato al midollo spinale (Chopp et al., 2000; Hofstetter et al., 2002); in queste condizioni sperimentali è stato possibile identificare nel tessuto danneggiato poche cellule del donatore con marcatori neurali, ma l'effetto più probabile sarebbe correlato con la produzione di fattori trofici da parte delle CSM. Sul piano clinico è da sottolineare il grande interesse per questo settore di ricerca.

Bibliografia

1. Assmus B., Schachinger V., Teupe C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106, 3009-3017, 2002.
2. Awaya N., Rupert K., Bryant E. et al. Failure of adultmarrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exper. Hematol.*, 30,937-942, 2002.
3. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exper. Hematol.*, 30, 42-48, 2002.
4. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis diseases associated with fetal cel microchimerism. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 92, 103-108, 2000.
5. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98, 2396-2402, 2001.

6. Charbord P., Oostendorp R., Pang W. et al. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal and postnatal mouse blood-forming tissues. *Exper. Hematol.*, 30, 1202-1210, 2002.
7. Chopp M., Zhang X.H., Li Y. et al. Spinal cord injury in rat : treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*, 11, 3001-3005, 2000.
8. Cilloni D., Carlo-Stella C., Falzetti F. et al. Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 96, 3637-3643, 2000.
9. Di Girolamo C.M., Stokes D., Colter D. et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* 107, 275-281, 1999.
10. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99, 3838-3843, 2002.
11. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102, 3837-3844, 2003.
12. Friedenstein A.J. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif. Tissue Int.* 56, Suppl.1, S17, 1995.
13. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 169, 12-20, 2001.
14. Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N., et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 7, 581-588, 2001.
15. Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Nat. acad. Sc. USA*, 99, 2199-2204, 2002.
16. Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L. et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, 97, 1227-1231, 2001.
17. Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exper. Hematol.*, 32, 414-425, 2004.
18. Javazon E.H., Colter D.C., Schwarz E.J. et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*, 19, 219-225, 2001.
19. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-49, 2002.
20. Johnson K.L., Nelson J.L., Furst D.E. et al. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, 44, 1848-1854, 2001.
21. Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y., et al. Effects of intracoronary infusion of

- peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 363, 751-756, 2004.
22. Koc O.N., Day J., Nieder M. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.*, 30, 215-222, 2002.
 23. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 18, 307-316, 2000.
 24. Kueth F., Richartz B.M., Sayer H.G. et al. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int. J. Cardiol.*, 97, 123-127, 2004.
 25. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et al. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell. Biol.* 153, 1133-1140, 2001.
 26. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exper. Hematol.*, 31, 890-896, 2003.
 27. Owen M., Friedenstein A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42-60, 1988.
 28. Pham S.M., Keenan R.J., Rao A.S. et al. Perioperative donor bone marrow infusion augments chimerism in heart and lung transplant recipients. *Ann. Thorac. Surg.*, 60,1015-1020, 1995.
 29. Reyes M., Lund T., Lenvik T. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 2615-2625, 2001.
 30. Reyes M., Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 231-235, 2001.
 31. Rombouts W.J., Ploemacher R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 17, 160-170, 2003.
 32. Schaschinger V., Assmus B., Lehmann R. et al. Clinical evidence for benefit of intracoronary progenitor cell therapy on post-infarction remodeling: results of the TOPCARE-AMI trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41 (Suppl. B), 404, 2003.
 33. Srivasta B., Srivasta S., Johnson K.L.etal. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet*, 358, 2034-2038, 2001.
 34. Starzl T.E., Demetris A.J., Murase N et al. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet*, 339, 1579-1582, 1992.
 35. Stute N., Fehse B., Schroder J. et al. Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent sex-

- mismatched allogeneic bone marrow transplant. *J. Hematother Stem Cell Res.*, 11, 977-984, 2002.
36. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75, 389-397, 2003.
 37. Wernet P., Fischer I., Knipper A., et al. Detection of unrestricted multipotential stem cells in human cord blood. *Blood*, 98, ASH Suppl., Abs. 2300, 2001.
 38. Wood K.J. Passengers leukocytes and microchimerism, what role in tolerance induction? *Transplantation*, 75, 17S-20S, 2003.

Dal laboratorio alla clinica: aspetti normativi per una terapia cellulare

Francesco Fagnoni

Laboratorio di Oncologia Sperimentale, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia

L'impiego a scopo terapeutico di cellule vitali è una pratica consolidata da decenni con l'avvento delle trasfusioni di emoderivati e dei trapianti di organi e tessuti. Tuttavia negli ultimi decenni l'attività di ricerca biomedica basata su colture cellulari ha fatto emergere anche la possibilità di generare cellule e tessuti con potenzialità terapeutiche per una vasta serie di patologie oncoematologiche, autoimmunitarie, neurologiche, cardiovascolari, metaboliche, ortopediche, oculistiche, odontostomatologiche, etc...

L'impiego clinico di cellule dotate di specifica attività biologica generate in vitro, o estesamente manipolate con modificazione delle proprietà originarie, configura la definizione di terapia cellulare e viene sottoposto ad una serie di normative specifiche e distinte da quelle inerenti agli ambiti trasfusionale e trapiantologico nei quali invece la manipolazione è minima. In accordo con questa definizione, il principio attivo della terapia cellulare è costituito da un Prodotto di Terapia Cellulare (PTC) che deve avere caratteristiche di identità, sterilità, purezza, funzionalità e stabilità definite secondo regole che assicurino la sicurezza del prodotto destinato all'uso clinico. Queste regole comprendono tutti gli aspetti della preparazione e dell'impiego del PTC e riguardano vari requisiti:

- requisiti organizzativi del personale adibito alla preparazione del PTC comprendenti fra gli altri la identificazione di un responsabile tecnico di laboratorio autorizzato dall'Agenzia Italiana sul Farmaco (AIFA). Il responsabile tecnico del laboratorio deve garantire la gestione in regime di sistema di qualità ed essere in grado di rispettare i criteri di produzione del PTC in condizioni di "Good Manufacturing Practice" (GMP);
- requisiti strutturali del laboratorio in cui ha sede la preparazione del PTC, che deve garantire adeguate condizioni di isolamento del PTC dall'ambiente esterno (cosiddetta "cell factory");
- requisiti della procedura di produzione del PTC e caratteristiche dei materiali con cui il PTC entra in contatto direttamente o indirettamente durante la preparazione;
- requisiti della documentazione medico-scientifica alla base della sperimentazione clinica che si intende eseguire nello specifico contesto clinico in osservanza alla normativa sulla istituzione delle sperimentazioni cliniche di fase I.

Le normative riguardanti tutti questi aspetti attualmente sono suddivise in molteplici leggi, decreti e linee guida che tuttavia stanno subendo una rapida evoluzione, sia a livello nazionale che a livello europeo, sotto la spinta di una richiesta crescente di dare avvio a sperimentazioni di terapia cellulare.

Riferimenti normativi essenziali (in ordine cronologico):

1. Decreto Legislativo 29 maggio 1991, N178
2. Decreto del Presidente della Repubblica del 21 settembre 2001. N. 439. (G.U. n.294, del 19.12.2001, pagg 3-6)
3. Decreto del Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità del 26 aprile 2002
4. Decreto Legislativo 24 giugno 2003, N.211
5. Decreto Ministro della Salute 2 marzo 2004
6. Direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004
7. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità 2004; N.17 (7/8), pagg. 9-14 (<http://www.iss.it/>)
8. EMEA: Point to consider on the manufacture and quality control of human somatic cell therapy medicinal products (<http://www.emea.eu.int>)

Bone marrow cell transdifferentiation: the controversy

Annarosa Leri, Jan Kajstura, Piero Anversa

Cardiovascular Research Institute, Department of Medicine, New York Medical College,
Valhalla, New York 10595

The adult bone marrow contains several cell populations. In addition to differentiated cells, such as stroma cells, vascular cells, adipocytes, osteoblasts and osteoclasts, primitive cells reside in the bone marrow. This class of undifferentiated cells with stem cell properties is heterogeneous being composed of HSCs and mesenchymal stem cells (MSCs). These two subsets of cells have been employed in the repair of damaged organs giving rise to tissues distinct from the organ of origin. However, a mixed population of bone marrow cells rather than a highly purified stem cell pool has commonly been used for the restoration of injured organs. We define this heterogeneous cell population as bone marrow cells (BMCs), i.e., a cell preparation that contains an enriched pool of HSCs together with variable degrees of MSCs and endothelial progenitor cells.

In 1961, Till and McCulloch discovered clonogenic bone marrow cells that gave rise to multilineage hematopoietic colonies in the spleen. Till and McCulloch proposed that these cells were multipotent HSCs that possess the properties of self-renewal and multilineage differentiation. The definition of stem cells has not changed and bone marrow HSCs are functionally defined by their capacity to self-renew, form clones and differentiate into mature blood cell types. Although HSCs were discovered more than four decades ago, their isolation has become possible only more recently when surface markers were identified. Different epitopes characterize HSCs in different species. Mouse HSCs correspond to a subpopulation of BMCs that are c-kit+Sca-1+Thy-1-low. Operationally, this population is multipotent and repopulates the bone marrow of irradiated mice. However, the c-kit+Sca-1+Thy-1-low cells are functionally heterogeneous. Based on the identification of additional surface markers and clonal analysis, the Mac-1-negative-CD4-negative cells within this category are enriched for long-term reconstituting cells. Conversely, the Mac-1-low-CD4-negative pool contains short-term repopulating cells. Finally, the Mac-1-low-CD4-low cells correspond to transient multipotent progenitors together with B lymphocyte progenitors. The CD34 antigen has been used to sort human HSCs, which, however, are also present in the CD34 negative fraction. AC133 is another marker of human HSCs but, so far, there is no specific epitope for the true stem cell.

The discovery that adult HSCs or BMCs retain a remarkable degree of developmental plasticity and may have the potential to differentiate across boundaries of lineage and tissue has divided the scientific and clinical community. Therefore, the therapeutic efficacy of BMCs for the damaged heart has been questioned. Consistently, the injection of BMCs improves the performance of the pathologic heart but the mechanism by which the administration of BMCs results in enhanced cardiac function remains controversial. In spite of these uncertainties, clinical trials have been completed and some are ongoing. The safety of this approach has been documented and double blind clinical studies have shown positive effects confirming the critical role that BMCs may have in myocardial regeneration. Limitations in the analysis of myocardial regeneration in humans due to the difficulty in obtaining cardiac biopsies, together with contrasting findings in animals, have prompted different interpretations of the positive outcome of BMC administration. Three possibilities have been advanced. They include the development of coronary vessels that rescue hibernating myocardium, de novo formation of myocytes and vascular structures or the activation and growth of resident progenitor cells via a paracrine effect mediated by the implanted BMCs. These mechanisms of action of BMCs are not mutually exclusive and may be operative in the rescue of the injured heart. However, it is relevant to discuss available information to establish what has been shown so far and what has to be done to document unequivocally the actual role of BMCs in the management of cardiac diseases. This analysis can only be performed by comparing protocols and data accumulated in animal studies.

The efficacy of adult BMCs for myocardial regeneration after infarction was documented four years ago. BMCs of male mice heterozygous for EGFP were collected, immunodepleted for lineage markers and then sorted for the stem cell antigen c-kit. Enriched lineage negative c-kit-positive cells were injected in the border zone of infarcted mice where they colonized to the dead tissue and gave rise to contracting myocardium occupying 68% of the original infarct. The newly formed EGFP-Y-chromosome positive cells corresponded to functionally competent myocytes and vascular cells organized in coronary arterioles and capillary structures. Overall, the aspect of the newly formed myocardium was that of a rather immature tissue with myocytes small in size, $\sim 500 \mu\text{m}^3$, and vessels with a small lumen and a thick multilayered wall. Myocardial regeneration with amelioration of cardiac performance was obtained only in 40% of the treated mice. Coronary ligation in mice is a complex procedure with an inherent variability in infarct size and a 50% probability of correct injection. The mouse heart beats ~ 600 times per minute and has a left ventricular (LV) wall that is less than 1 mm thick. These factors make the injection of cells within the LV wall highly problematic. When these technical difficulties were overcome by the mobilization of BMCs with the systemic administration of SCF and G-CSF, myocardial regeneration was obtained in all infarcted treated animals. The new myocardium was composed of contracting myocytes and patent coronary vessels.

These studies prompted other investigators to document the ability of BMCs to repair the damaged heart. Initially, the hypothesis tested was whether spontaneous mobilization of BMCs occurs after infarction and whether these circulating cells

home to the region of injury rescuing the dead tissue. Although the degree of engraftment and transdifferentiation in coronary vessels was low and markedly exceeded that of cardiomyocytes, this report confirmed the plasticity of BMCs. The difference in the degree of myocardial reconstitution between this and the previous studies can be attributed to several factors. They include the pathologic model - ischemia-reperfusion injury in irradiated mice vs. permanent coronary occlusion in non-ablated mice - together with the modality of intervention - spontaneous mobilization of BMCs vs. intramyocardial injection of BMCs or cytokine mediated BMC mobilization - and the type of BMCs - c-kit enriched BMCs vs. peripheral blood cells. The bone marrow of irradiated mice was repopulated with a subset of cells capable of excluding the Hoechst 33342 dye. These cells are positive for both c-kit and Sca-1 and are probably more enriched for true HSCs than the lineage negative c-kit positive cells implemented in other studies. In spite of several unresolved issues, these observations are consistent with the notion that BMCs can adopt the cardiogenic fate by forming myocytes and coronary vessels.

More recently, the possibility that cell therapy of the infarcted heart exerts its beneficial effects not only by reconstitution of dead myocardium but also by the activation of resident progenitor cells in the spared portion of the ventricular wall has been carefully examined. To evaluate properly the formation of cardiomyocytes and coronary vasculature in the region bordering the infarct and distant from the infarct, the accumulation of newly formed myocytes and vascular structures was measured utilizing markers of the cell cycle and morphometric methods. Although similar protocols were employed in the analysis of myocyte and vessel growth, positive and negative results were obtained concerning the paracrine effects of the administered BMCs. However, an enriched population of mouse c-kit-positive BMCs was used in one case and a novel human bone marrow stem cell in the other. Both cell populations differen-

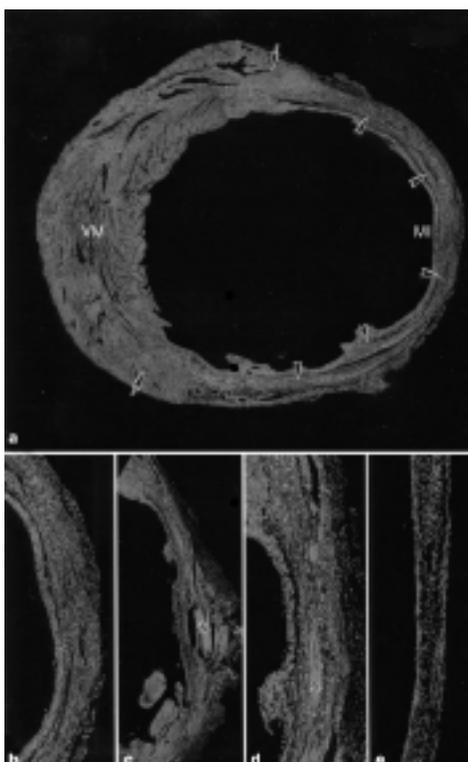


Fig. 1 - (from Nature 2001): a, Myocardial infarct (MI) injected with Lin- c-kit^{POS} cells from bone marrow (arrows). Arrowheads indicate regenerating myocardium; VM, viable myocardium. b, Same MI at higher magnification. c, d, Low and high magnifications of MI injected with Lin-c-kit^{POS} cells. e, MI injected with Lin-c-kit^{NEG} cells; only healing is apparent. Asterisk indicates necrotic myocytes. Red, cardiac myosin; green, propidium iodide labeling of nuclei. Original magnification, x12 (a); x25 (c) x50 (b, d, e).

tiated into cardiac cell lineages and repaired the infarcted heart, but the latter also promoted a robust regenerative response in the surviving myocardium. Thus, a specific human BMC has the ability to transdifferentiate in cardiac muscle cells, smooth muscle cells and endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. Additionally, this unique cell population can induce endogenous neovascularization and cardiomyogenesis. Thus, these findings support the notion that BMCs adopt the cardiac phenotype and potentiate the growth reserve of the adult heart. Collectively, these observations point to the therapeutic import of BMCs for cardiac diseases in humans.

References

1. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A. and Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001.
2. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, and Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair in infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349, 2001.
3. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, and Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428: 668-673, 2004.
4. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, and Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428: 664-668, 2004.
5. Lanza R, Moore MA, Wakayama T, Perry AC, Shieh JH, Hendrikx J, Leri A, Chimenti S, Monsen A, Nurzynska D, West MD, Kajstura J, and Anversa P. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. *Circ Res* 94:820-827, 2004.
6. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, and Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115: 326-338, 2005.
7. Leri A, Kajstura J, and Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 85:1373-1461, 2005.
8. Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, and Anversa P. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96: 127-137, 2005.
9. Leri A, Kajstura J, and Anversa P. Identity deception: not a crime for a stem cell. *Physiology* 20:162-168, 2005.

**TECNICA DEL *NUCLEAR TRANSFER* (NT)
E SUE APPLICAZIONI**

La tecnica del nuclear transfer (NT) e le sue applicazioni

Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia

Trasferimento di DNA, spermatozoi e nuclei somatici

La tecnologia sottesa alla tecnica del trasferimento di nuclei somatici in oociti, divenuta nota anche al grande pubblico in seguito alla clonazione della pecora Dolly e del topolino Cumulina, è una tecnologia impiegata per diverse applicazioni: dal trasferimento di DNA per transgenizzare a quello di spermatozoi per riproduzione in vitro sino a quello di nuclei somatici per clonazione riproduttiva (in medicina veterinaria) e la derivazione di cellule staminali embrionali. Si avvale, nella sua essenza, di raffinati sistemi elettronici per il fine controllo di micromovimenti meccanici. Negli anni '30 del secolo scorso gli embriologi sperimentali diedero vita ad una serie di lavori dove la microchirurgia della cellula uovo e delle prime fasi di sviluppo embrionale costituiva l'approccio metodologico utile a dissezionare la costituzione molecolare dello zigote, della morula, blastula e gastrula, con tutta una varietà di operazioni, dal trapianto alla ablazione di singole parti costitutive le fasi embriologiche dello sviluppo che si andavano studiando. Per sopperire alla mancanza della necessaria tecnologia per operare alla scala dimensionale dell'ocita di mammiferi, gli animali modello erano ancora gli anfibii che presentano uova relativamente grandi rispetto ai mammiferi vivipari. Negli anni '50 i biologi dispongono già di micropipette che possono essere manovrate meccanicamente e non più manualmente. Ancora meglio, le azioni di decompressione o compressione all'interno delle micropipette possono già essere attuate con sistemi meccanico – idraulici e non più con l'azione della lingua e del cavo orale. Si apre così la stagione delle grandi applicazioni in medicina veterinaria ed in zootecnia: in animali con caratteristiche di alto valore economico si applicano le tecniche di microchirurgia della morula – gastrula per aumentare il numero di embrioni di particolare valore. Grazie allo sviluppo di microforge per la preparazione di micropipette sempre più dotate di fini calibri, allo sviluppo di sistemi sempre più raffinati per controllare i movimenti (piezoelettrici) si arriva negli anni '70 a disporre della necessaria tecnologia per microiniettare negli oociti soluzioni di DNA e spermatozoi. Da qui prenderanno l'avvio alcune tecniche su scala industriale di transgenesi, terapia genica (sostituzione genica), fecondazione in vitro per ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) e clonazione vera e pro-

pria (trasferimento di nuclei somatici). La biologia dello sviluppo nell'ultimo ventennio ha fatto gran uso di questa tecnologia (NT, Nuclear Transfer) sino ai clamorosi risultati della ricostituzione dello zigote da oociti enucleati grazie al trasferimento di nuclei somatici. Sulla applicazione per ottenere cloni di animali di particolare valore in zootecnia (sia per la conservazione di specie in via di estinzione sia per la produzione animale) vi è una vasta letteratura di settore. La possibilità tecnica di maggior rilievo della tecnica del NT è quella della riprogrammazione genetica di nuclei somatici una volta trasferiti all'interno di oociti enucleati, in particolare per la produzione di cellule staminali autologhe.

Derivazione di cellule staminali embrionali umane

La prima linea cellulare di staminali embrionali (ES) è stata isolata nel topo negli anni '80 da M. J. Evans e da M. H. Kaufman, nel Regno Unito, mentre le prime linee cellulari di ES umane (3 maschili e 2 femminili) vengono allestite da J. A. Thompson nel 1998, negli USA, a partire da blastocisti. Negli ultimi anni sono state migliorate le metodiche per l'isolamento e la coltura in vitro di ES ed è stata dimostrata la possibilità di produrre ES a partire da un nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata, prelevata ad esempio da una biopsia, ridando ad esso le caratteristiche di totipotenzialità che possedeva nello zigote. Ciò si può realizzare grazie alla tecnica di NT. Una svolta importantissima nella ricerca sulle ES è giunta, infatti, con la clonazione della pecora Dolly e del topo Cumulina: si è stabilito che il nucleo di cellule somatiche, terminalmente differenziate, quando trasferito nel citoplasma di una cellula uovo enucleata è in grado di acquisire un nuovo programma genetico e di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale con la nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una *copia genomica* del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare: è un clone genetico prodotto per clonazione riproduttiva. Se il processo di clonazione riproduttiva viene interrotto alle fasi iniziali dello sviluppo (a livello di blastocisti) questa stessa tecnica permette di produrre ES.

Si attua così una clonazione terapeutica.

L'efficienza della produzione di staminali embrionali umane autologhe da NT è giunta oggi ad un livello (35%) capace di assicurare la produzione di una linea staminale per ciclo di stimolazione ovarica, come dimostrato dai biologi sudcoreani del gruppo di W.S. Hwang nel maggio 2005.

La produzione di ES da NT è fonte di un acceso dibattito etico ed il pianeta si presenta spaccato in due, con paesi la cui legislazione consente tale pratica seppure sotto stretto controllo (U.K., Spagna, Belgio, Singapore, Corea del Sud), altri in cui è del tutto vietata (Italia, Germania) o consentita solo con fondi privati (U.S.A.).

Nel prossimo futuro le linee più promettenti di ricerca riguardano la riprogrammazione genetica dei nuclei somatici di cellule terminalmente differenziate grazie al loro trasferimento all'interno di oociti enucleati (ottenibili in grande quantità da animali di interesse economico, mucca e pecora) in parallelo ad una altra

strategia, detta del *citoplasto*. In questa seconda strategia l'obiettivo è quello di poter ottenere cellule staminali in grandi quantità a partire da cellule somatiche terminalmente differenziate senza incontrare limitazioni ed ostacoli di natura etica. Grazie all'impiego di sostanze simili in composizione chimica alle sostanze presenti nel citoplasma della cellula uovo (citoplasto artificiale), sostanze non ancora identificate precisamente, oppure all'impiego di oociti transpecifici quali quelli di rana ed altri anfibi (citoplasti naturali).

Cellule staminali embrionali umane: lessico, cronologia, NT e citoplasti

Lessico

Per comprendere appieno il significato biologico del termine cellula staminale è bene conoscere chiaramente quale è la derivazione del termine staminale. Il termine rende l'inglese staminal, a sua volta un neo-latinismo (non è mai esistito in lat. un agg. *staminalis, -e!) creato in ambiente scientifico anglosassone su materiale latino. Alla base della forma vi è, comunque, il lat. STAMEN, -INIS, sost. ntr. formato da due distinti morfemi, - la base lessicale (di origine indeuropea) *sta- "stare saldamente collocato; stare; - il morfema derivazionale (di origine indeuropea) *-men-, usato ampiamente per la formazione di sostantivi indicanti, inizialmente, il prodursi dell'effetto di un'azione e poi, per traslato, l'effetto dell'azione stessa.

Qualche esempio, tratto dal latino, ag-men "l'esercito in marcia"; lu-men "il bagliore della luce" (vs. lux "la luce, vera e propria); ful-men, il bagliore precedente il tuono; cri-men, l'azione del separare / selezionare e poi, per traslato, l'oggetto della selezione; se-men, inizialmente, l'azione del seminare, poi, ciò che si semina.

STAMEN è dunque inizialmente un termine tecnico della tessitura ed indica l'ordito, del tessuto (lett. "ciò che sta fermamente saldo"), sul quale si sovrappone la trama, a formare il tessuto nella sua forma finale. Poi indica più in generale "il filo" e, con valore traslato, "il filo della vita; il destino; la sorte; lo stame della vita".

Ciò che è importante notare, nel valore semantico di lat. stamen, è l'idea (astratta) di qualche cosa che "sta fermo, stabilmente", che vale quale "principio di fondo, basilare".

Da qui cellula staminale, basilare, fondante.

Recenti studi hanno messo in dubbio che le cellule staminali somatiche abbiano una capacità differenziativa limitata solo ad alcuni tessuti ed al mantenimento delle popolazioni cellulari differenziate del tessuto di appartenenza. Infatti, a partire dalla seconda metà degli anni '90 è stata dimostrata la presenza di cellule staminali in tessuti differenziati nei quali si riteneva che le cellule staminali non fossero più presenti, ad esempio nel tessuto nervoso centrale. Il contributo più importante di questi studi è stato quello di rivelare la capacità di differenziamento delle cellule staminali non solo nei tipi cellulari propri del tessuto di appartenenza, ma anche in tipi cellulari di tessuti diversi grazie ad un processo detto di transdifferenziazione. Vari studi hanno dimostrato la capacità delle cellule staminali

somatiche di transdifferenziarsi in tipi cellulari diversi sia in vitro che in vivo. Cellule staminali del sangue sono state differenziate in cellule muscolari, cardiache, endoteliali, gliali, epatiche e del dotto biliare. A questo proposito vale la pena di ricordare lo straordinario esperimento effettuato, nel topo, da Diane Krause (della Università di Yale), nel quale si dimostra la capacità di una singola cellula staminale del midollo osseo di ripopolare in vivo il midollo osseo stesso di animali irradiati, ma anche di transdifferenziarsi in cellule epiteliali di tessuti diversi quali fegato, polmone e pelle. Cellule staminali sono state ritrovate anche nel muscolo striato scheletrico in grado di originare cellule del midollo osseo; nel tessuto nervoso capaci di differenziarsi in cellule nucleate del sangue, in cellule muscolari scheletriche ed in diversi tessuti embrionali; nel tessuto adiposo (si pensi alla liposuzione quale fonte di staminali somatiche) in grado di differenziarsi in cellule adipose, della cartilagine, dell'osso e del muscolo; della regione del limbus della cornea in cellule della cornea; cellule endoteliali in cellule cardiache; cellule staminali sono state recentemente descritte anche nel cuore in seguito ad infarto, organo nel quale si riteneva non fossero presenti.

Ad oggi è solo in dubbio la presenza di cellule staminali nel pancreas. Ciò non significa non siano presenti. L'elenco dei tessuti e degli organi dai quali è possibile ottenere cellule staminali in grado di transdifferenziarsi in vitro o in vivo si allunga di giorno in giorno (di recente sono state trovate anche nella polpa dei denti decidui). È importante ricordare che le cellule staminali somatiche sono localizzate in specifiche "nicchie" definite da un contesto biochimico, più che anatomico, caratterizzate da un microambiente complesso che permette alle cellule staminali di mantenere le proprie caratteristiche. Le conoscenze relative alla biologia delle cellule staminali sono ancora molto limitate e l'opportunità di riconoscerle e svelarne le caratteristiche biologiche per giungere ad applicazioni terapeutiche su vasta scala dipenderà essenzialmente dai finanziamenti erogati a queste ricerche.

Cronologia

Una cronologia degli sviluppi e delle ricerche sulle cellule staminali può aiutare a meglio inquadrare tutte le problematiche, scientifiche, etiche e legali, legate alla loro derivazione ed al loro impiego.

Si deve al lavoro di ricercatori canadesi della McGill University (Montreal, Quebec, Canada), nel corso degli anni '50 dell'ultimo secolo, la prova dell'esistenza di cellule staminali. Come già detto, si definisce cellula staminale una cellula capace di dividersi in modo da originare una cellula figlia identica alla cellula madre (staminale) ed una cellula capace di differenziarsi in un tipo cellulare specifico di uno dei tanti tessuti che compongono il corpo animale. Sino agli inizi degli anni '50 si era teorizzata la loro esistenza in base al concetto di "stato dinamico dei costituenti del corpo", concetto già presente in Eraclito (V secolo avanti Cristo).

Negli anni '30 e '40 viene sviluppata la tecnica di autoradiografia grazie alla quale è possibile introdurre nello studio delle cellule e dei tessuti, sino ad allora studiati nelle loro relazioni architetturali nelle tre direzioni spaziali, la dimensio-

ne tempo. Charles Leblond ed i suoi collaboratori (H. Cheng, W. Chang, J. Marques Pereira, B. Messier, J. Nadler) rivelano così la dinamica della assunzione, e lo spostamento tra diversi tipi cellulari, di sostanze normalmente presenti nelle cellule ma marcate con elementi chimici capaci di emettere elettroni (ad esempio isotopi radioattivi di idrogeno, zolfo, carbonio). Dimostrano in tal modo che le cellule alla base dei villi intestinali sono capaci di dividersi in maniera asimmetrica, come si era ipotizzato, e sono staminali. Leblond ne dimostra l'esistenza anche nel testicolo, individuando un tipo particolare di spermatogonio (detto A) capace di assicurare il rinnovo costante delle cellule dell'epitelio seminifero (la cui esistenza era intuitivamente già stata ipotizzata: in caso contrario, dopo una singola eiaculazione, un maschio di mammifero sarebbe privo di spermatozoi). Ai lavori della scuola canadese segue una serie di contributi della comunità scientifica che dimostrano l'esistenza di cellule staminali in tutti i diversi comparti anatomici ed a partire da questi anni è un lento susseguirsi di tanti piccoli avanzamenti delle conoscenze che, come è tipico nella impresa scientifica, in breve tempo permettono applicazioni terapeutiche già oggi ben consolidate grazie all'impiego di staminali non embrionali (trapianti di midollo osseo, pelle artificiale, cornea), altre, sia con staminali embrionali che somatiche, in via di definizione (Parkinson, infarto, diabete) o del tutto sperimentali (stroke spinali, Alzheimer, sclerosi amiotrofiche).

Negli anni '60, R. Cole, R.G. Edwards e J. Paul (1964 e 1966) alla Glasgow University (UK) isolano la prima colonia di cellule staminali embrionali (immortali) da blastocisti di coniglio e R.L. Gardner (1968) dimostra la capacità differenziativa di una singola cellula staminale embrionale nel topo. Nella decade successiva, M.J. Evans (1972) isola e caratterizza cellule staminali embrionali di topo mentre R.A. Fleischman e B. Mintz (1979) iniettano nelle placente di topi immunosoppressi staminali ematopoietiche embrionali e curano una anemia geneticamente determinata. Negli anni '80 M. J. Evans e M. H. Kaufman (1981) isolano e stabiliscono la prima linea cellulare di staminali embrionali nel topo e S. Fishel (1984) ottiene le prime cellule staminali embrionali umane. Gli anni '90 vedono molti avanzamenti, A.M. Wobus (1991 e 1995) ottiene cellule del cuore da staminali embrionali di topo e E.Y. Snyder (1992) dimostra che staminali neuronali embrionali sono trapiantabili ed attecchiscono nel cervelletto di topo. Ancora, S. Weiss (1992) isola staminali neuronali dal cervello di topi adulti mentre S. Okabe (1996) differenzia diversi tipi di cellule nervose da staminali embrionali di topo. Le prime linee cellulari di staminali embrionali umane (3 maschili e 2 femminili) e di scimmie macache vengono allestite da J. A. Thompson (1998) mentre M.J. Shambloott (1998) ottiene le prime linee di cellule germinali umane. La possibilità di coltivare cellule ES umane ottenute da blastocisti al quattordicesimo giorno di sviluppo è ovunque limitata alle blastocisti che provengono dalle cliniche di fecondazione in vitro e sono dunque embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Unica eccezione è il sud Corea ove gli oociti possono essere ricavati da giovani donne che volontariamente donano queste cellule. Agli inizi del nuovo secolo (2000) S.H. Lee produce neuroni dopaminergici da staminali embrionali

di topo mentre A. Vescovi e G. Cossu transdifferenziano staminali neuronali somatiche (i.e. non embrionali) in cellule del sangue e del muscolo. Nell'anno 2001, N. Lumelsky ottiene cellule secernenti insulina da staminali embrionali di topo e diversi gruppi scandinavi confermano che il trapianto di staminali neuronali somatiche, derivate da feti abortiti, sono efficaci nel trattamento del Parkinson (487 ad oggi); D. Orlic impiega staminali del midollo osseo per rigenerare cuori umani infartuati. Y. Jiang (2002) dimostra che staminali somatiche del midollo osseo possono formare diversi tipi di tessuto confermando il dato di D. Krause che, nei topi, con una singola staminale del midollo osseo è possibile ripopolare tutti i distretti anatomici. K. Hubner, H. Scholer e M. Boiani (2003) producono cellule germinali (oociti) da staminali embrionali di topo. Nell'anno 2004, W.S. Hwang, in Seoul, riceve 242 oociti da 16 donatrici e deriva alcune linee di staminali embrionali umane mentre

T. Barberi, dell'Istituto Sloan Kettering di New York, ottiene milioni di neuroni dopaminergici da una singola staminale embrionale umana. Sempre il gruppo di Hwang, nell'anno 2005, porta la efficienza di derivazione delle staminali embrionali autologhe al 35%: significa la produzione di una linea cellulare di staminali per ciclo di stimolazione ovarica di donatrice di oociti, aprendo con ciò le porte alla possibilità concreta di clonazione terapeutica.

Reversibilità del programma differenziativo

La cellula uovo possiede tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie a dare inizio allo sviluppo dell'embrione. Con il procedere dello sviluppo, le cellule iniziano a differenziarsi, cioè ad assumere caratteristiche e funzioni diverse e parallelamente l'organizzazione dell'embrione diventa sempre più complessa. Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase temporale dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e in momenti successivi alla loro effettiva differenziazione, ai diversi tipi cellulari che compongono l'organismo adulto. In alcuni tessuti dell'adulto permarranno comunque cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo capacità di rinnovo di tipo embrionale. Queste ultime costituiscono le cellule staminali, cellule in grado di sostituire quelle differenzianti nei tessuti caratterizzati da un alto ricambio cellulare causato da processi di continuo differenziamento (ad esempio, le cellule germinali maschili dell'epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico) o da processi di continua morte cellulare (ad esempio nell'epidermide). Le cellule staminali sono pluripotenti, mantengono cioè capacità proliferative durante tutta la vita dell'individuo e si dividono asimmetricamente, con una delle due cellule figlie che rimane di tipo staminale e l'altra che inizia il processo differenziativo. Nei mammiferi, le cellule staminali pluripotenti sono presenti nella massa di cellule del nodo embrionale della blastocisti nelle fasi preimpianto, nell'embrione e nel feto durante lo sviluppo e si ritrovano anche nell'individuo adulto. Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce nell'individuo adulto sono presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali.

Dall'embrione preimpianto allo stadio di blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino ad ottenerne migliaia, le cosiddette cellule embrionali staminali (ES cells, Embryonic Stem cells) la cui caratteristica principale è l'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare. Cellule ES di topo sono state differenziate *in vitro* in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche.

Accanto a queste sorgenti fisiologiche di cellule staminali, negli ultimi tre anni, se ne è aggiunta un'altra molto promettente basata sulla possibilità di modificare il programma genetico delle cellule differenziate. Questa nuova possibilità si è sviluppata a partire dal 1997 quando sono stati pubblicati i risultati di alcune ricerche che dimostrano come il programma genetico di nuclei di cellule terminalmente differenziate può essere modificato fino ad una sua completa riprogrammazione. I ricercatori Willmut e Campbell, nella pecora, e successivamente Yanagimachi e collaboratori, nel topo, hanno stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, quando trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, viene riprogrammato ed è capace di iniziare lo sviluppo embrionale e di portare alla nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare e quindi possiamo definirlo un clone genetico.

Rimangono oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di deprogrammazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento nell'ooplasma. È però chiaro, come dimostrato da Kikyo e Wolffe, che la riprogrammazione comporta modificazioni nella composizione proteica della fibra di DNA, modificazioni capaci di determinare variazioni regolative della attività di espressione genica: la cromatina si decondensa, la struttura a nucleosomi si destabilizza per la sostituzione degli istoni somatici H_1 con la loro variante oocitaria B_4 e la dissociazione dalla fibra di DNA delle proteine regolatrici.

Attivazione del genoma embrionale

Un aspetto importante che ci aiuta nel definire i tempi in cui avvengono le modificazioni delle funzioni del genoma della cellula somatica, successivamente al suo trasferimento nel citoplasma della cellula uovo, riguarda le modalità ed i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna presenti nel citoplasma dell'oocita e prodotti durante l'oogenesi. mRNA e proteine materne si esauriscono col procedere dello sviluppo embrionale mentre parallelamente inizia la sintesi di mRNA da parte dell'embrione. L'attivazione del genoma embrionale (ZGA, Zygotic Genome Activation) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammifero. Nel topo lo ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. Se l'embrione non esprime correttamente i geni embrionali entro questi tempi non potrà proseguire lo sviluppo. Ad esempio,

lo zigote di topo ottenuto con il trasferimento di un nucleo somatico deve necessariamente avere il nuovo programma genetico attivo allo stadio di 2 cellule per procedere correttamente nello sviluppo embrionale. Ne consegue che per la comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolti nel processo di de-differenziazione e riprogrammazione del genoma dei nuclei somatici, gli studi devono essere effettuati nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, nei momenti immediatamente successivi al trasferimento dei nuclei somatici negli oociti enucleati.

Fattori della riprogrammazione del genoma del nucleo trasferito: citoplasti!

Tra i diversi fattori coinvolti nelle prime fasi che seguono il trasferimento del nucleo somatico nell'ooplasma, sicuramente importanti sono il grado di ploidia del genoma (il contenuto in DNA) ed il momento del ciclo cellulare in cui si trova il nucleo trasferito. Si è notato, ad esempio, che il trasferimento di nuclei nella fase G_0 del ciclo cellulare facilita lo sviluppo preimpianto, aumentando il numero di blastocisti ottenute.

Sebbene nella maggior parte delle cellule il contenuto in DNA (le dimensioni del genoma) e le sequenze del DNA rimangano invariate col procedere dello sviluppo embrionale, il repertorio di geni che viene espresso in un dato tipo cellulare e in un dato momento del ciclo cellulare è limitato e specifico per ogni tipo cellulare. L'espressione del genoma embrionale viene regolata e limitata da una serie di meccanismi di tipo epigenetico quali la metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare. Questi meccanismi, attivi durante la gametogenesi e le prime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, sono coinvolti nel modellare e modulare le funzioni del genoma. Cambiamenti in uno o più di questi regolatori epigenetici determinano modificazioni nell'espressione genica.

La regolazione dell'espressione di molti geni è dipendente dalla presenza/assenza di citosine metilate lungo la sequenza del DNA del gene. La metilazione è associata ad importanti eventi nello sviluppo embrionale quali l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di Mammifero e nel fenomeno dell'*imprinting*, processo che consiste in una marcatura differenziale dei genomi paterno e materno durante la gametogenesi così che l'espressione di alcuni geni dipende dalla loro origine parentale. Il gamete maschile e quello femminile, differenzialmente metilati al momento della fecondazione, hanno una diversa organizzazione della cromatina. I geni costitutivi (quelli che si esprimono in tutti i tessuti) sono demetilati in entrambi i gameti e si mantengono demetilati durante tutte le fasi dello sviluppo preimpianto; al contrario, i geni tessuto specifici sono fortemente metilati nello spermatozoo e meno metilati nell'oocita e vanno incontro ad una generale demetilazione durante lo sviluppo preimpianto, per poi essere nuovamente metilati successivamente all'impianto. Questo processo di demetilazione pare necessario per ristabilire uno stato di pluripotenzialità prima dell'inizio della determinazione e differenziazione cellulare che prende il via con la gastrulazione, subito dopo l'impianto, ed è contemporaneo ad una estesa *de novo* metilazione. La presenza di citosine metilate è in grado di modificare la conforma-

zione della cromatina così da facilitare o impedire il legame con fattori o inibitori della trascrizione.

La comprensione dei meccanismi che intervengono nel differenziamento cellulare e nei processi che lo rendono reversibile apre non solo vasti scenari di conoscenza, ma ancor più vaste possibilità applicative in ambito biomedico e farmacologico. È così possibile prevedere la possibilità di ottenere *in vitro* la de-differenziazione di una cellula somatica prelevata da un individuo adulto e poi di guidarne la re-differenziazione per ottenere un tipo cellulare nuovo in grande quantità, ritrasferibile nel corpo dell'individuo oppure coltivabile fino all'ottenimento di una popolazione omogenea e potenzialmente in grado di progredire nelle fasi successive dell'istogenesi e dell'organogenesi. O ancora, la possibilità di indurre cellule quiescenti a riacquisire funzioni utili in un organismo differenziato o di modificare i meccanismi della progressione neoplastica fino alla completa reversione del tumore ed alla riprogrammazione delle attività normali della cellula.

La più promettente applicazione in ambito biomedico delle tecniche di riprogrammazione delle funzioni del genoma è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari o di veri e propri tessuti da trapianto differenziati *ad hoc*. Per le diverse patologie si può prevedere di differenziare *in vitro* i tipi cellulari necessari per la terapia da attuare. Questa via, sebbene ancora non praticabile in tutte le sue tappe, sicuramente offre una prospettiva per i milioni di pazienti affetti da patologie degenerative o croniche la cui incidenza nella popolazione è estremamente elevata.

Una strategia completamente diversa è quella di associare le tecniche del trasferimento nucleare con le metodiche impiegate per il differenziamento delle cellule staminali. È chiaro che anche questa strategia richiede l'uso di oociti, con ciò incontrando sia i problemi di natura etica legati all'impiego ed alla donazione di gameti sia quelli relativi alla salute della donna donatrice di oociti. L'impiego di cellule uovo di altre specie risultata incoraggiante; Tanja Dominko ha dimostrato che il citoplasma dell'oocita di bovino è in grado di determinare la proliferazione cellulare del nucleo di cellule somatiche di ratto, maiale, ariete e scimmia sino alla formazione della cavità del blastocele. I risultati di questi lavori rendono chiaro che i meccanismi e le molecole che regolano i primi stadi dello sviluppo embrionale e la precoce differenziazione cellulare sono evolutivamente conservati.

In questa prospettiva è quindi prioritario il proseguimento della ricerca in modelli animali sui meccanismi e sulle molecole che governano i fenomeni di de-programmazione e ri-programmazione. Ad oggi, i fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione del nucleo somatico e che specificano funzionalmente le cellule staminali sono scarsamente conosciuti. Tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione *Genesis*, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate. Lo scopo di queste ricerche è quello di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei delle cellule somatiche in assenza del gamete femminile impiegando citoplasti artificiali. Questa strategia di ricerca è fortemente auspicata nel rapporto della commissione di studio sull'uso delle cellule staminali per finalità terapeutiche, presieduta dal Nobel Renato

Dulbecco, di recente istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel *rapporto Dulbecco*, la commissione, recepiti i più recenti avanzamenti delle conoscenze scientifiche nel settore della biologia delle cellule staminali e dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson (www.doh.gov.uk) per la ricerca sulle cellule staminali, ha sottolineato il fatto che il sostegno alla ricerca sul differenziamento cellulare al fine di ottenere cellule e tessuti è centrale per lo sviluppo delle politiche sanitarie basate sulla medicina rigenerativa.

Alcuni laboratori stanno sviluppando un “citoplasto artificiale” per riprogrammare geneticamente le cellule somatiche impiegando particolari miscele (fattori di trascrizione, ioni bivalenti, piccole molecole di RNA) al fine di ottenere cellule ES senza limitazioni etiche. Sebbene più lontano nel tempo, l’esito di queste ultime ricerche permetterebbe alla medicina rigenerativa di non incontrare ostacoli tecnici o barriere etiche e ciò aprirebbe vastissimi scenari applicativi in ambito biomedico e farmacologico. Si pensi alla possibilità di ottenere in vitro, impiegando una miscela di sostanze che mima la azione del citoplasma dell’oocita, la riprogrammazione genetica delle cellule somatiche ottenute da una biopsia, e ciò senza impiegare le cellule uovo. L’ottenimento degli oociti è il primo problema della clonazione, terapeutica o riproduttiva: se questa fosse lecita, le donne delle fasce socialmente meno protette dei paesi del terzo e quarto mondo si vedrebbero offrire danari per vendere oociti, con gravissimo danno per la loro salute. Questa via alternativa per la produzione di cellule ES in assenza del gamete femminile, impiegando citoplasti naturali o artificiali, era già stata segnalata nell’anno 2002 nel rapporto della commissione presieduta dal Nobel Renato Dulbecco (commissione di studio sull’utilizzo delle cellule staminali per finalità terapeutiche), a suo tempo istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel *rapporto Dulbecco*, la commissione, dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson per la ricerca sulle cellule staminali (www.dh.gov.uk), auspicava fortemente il sostegno a queste ricerche poiché da esse possono derivare applicazioni terapeutiche ad oggi di difficile praticabilità per l’impossibilità di disporre di un numero sufficiente di cellule da trapiantare.

Bibliografia essenziale

1. Dennis C, Take a cell, any cell... in <<Nature>>, 426: 490-491, 2003.
2. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Neyhan Z, Memili E, Mckusik B, E First N, Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species in <<Biology of Reproduction>>, 60, pp. 1496-1502, 1999.
3. Garagna S, Redi CA, Zuccotti M, Clonazione: storia e tecniche in <<Le Scienze>>, 377: 46-52, 2000.
4. Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Cellule sempre nuove in <<Le Scienze>>, 392: 35-41, 2001.
5. Kikyo N. E Wolffe A.P., Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons in <<Journal of Cell Science>>, 113: 11-20, 2000.

6. Lake JA, Rathjen J, Remiszewski J, Rathjen PD. Reversible programming of pluripotent cell differentiation in <<Journal of Cell Science>>, 113: 555-566, 2000.
7. Stem cell research and ethics in <<Science>>, 287: 1417-1446, 2000.
8. Thomson JA, Odorico J.S., Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines in <<Trends in Biotechnology>>, 18: 53-57, 2000.
9. W. S. Hwang et al. Science, doi: 10.1126, 2005.

Biotechnologie del nuclear transfer e clonazione riproduttiva

Maurizio Zuccotti¹, Silvia Garagna², Carlo Alberto Redi²

1. Sezione di Istologia ed Embriologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma

2. Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia

L'idea di trasferire il nucleo di una cellula somatica differenziata all'interno di un oocita enucleato venne per la prima volta all'embriologo Hans Spemann agli inizi del 1900. Spemann si domandava se fosse possibile modificare le funzioni di un genoma di una cellula differenziata fino a far acquisire ad esso le caratteristiche possedute dal genoma totipotente di uno zigote. John Gurdon durante i primi anni '70 dimostra, per la prima volta, che è sperimentalmente possibile, dopo averlo trasferito all'interno di un oocita enucleato, rimuovere il programma genetico di un nucleo di una cellula differenziata di fegato di rana adulta e farlo partecipare allo sviluppo embrionale. In questo modo ottiene i primi girini e le prime rane adulte clonate. Quasi trenta anni dopo vengono clonati, con metodi che molto simili, i primi mammiferi.

Dalla clonazione della pecora Dolly (1997) e del topo Cumulina (1998) sono passati alcuni anni durante i quali l'attività di ricerca in questo campo si è focalizzata sull'individuazione dei meccanismi e delle molecole implicate nei processi di rimozione della memoria genetica del nucleo somatico trasferito e di ricostruzione di un nuovo programma genetico in grado di far iniziare e sostenere lo sviluppo embrionale. La metilazione del DNA, l'acetilazione e la metilazione degli istoni, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare sono alcuni dei meccanismi epigenetici ad oggi considerati maggiormente coinvolti in questi processi di riprogrammazione genetica.

Un po' di storia...

L'idea di trasferire il nucleo di una cellula somatica differenziata all'interno di un oocita enucleato venne per la prima volta all'embriologo Hans Spemann agli inizi del 1900. Con questo esperimento Spemann cercava di dimostrare se il differenziamento nucleare è un processo irreversibile oppure modificabile dal citoplasma dell'ooocita. In altre parole è possibile modificare le funzioni di un genoma di una cellula differenziata fino a far acquisire ad esso le caratteristiche possedute dal genoma totipotente di uno zigote?

Negli anni in cui Spemann lavorava la tecnologia necessaria a svolgere l'esperimento da lui suggerito non era ancora disponibile. Lo sviluppo delle tecnica del *nuclear transfer* ebbe inizio con gli esperimenti di Briggs e King, i quali nel 1952 pubblicano un articolo sulla famosa rivista *Proceedings of the National Academy of Science* (scaricabile al sito www.pnas.org) riuscendo per la prima volta a costruire gli strumenti necessari ad eseguire il trasferimento di un nucleo di cellula somatica di anfibio in un oocita precedentemente enucleato. La figura 1 mostra in modo schematico l'esperimento svolto da questi ricercatori. Gli zigoti così ottenuti non saranno però in grado di proseguire nello sviluppo. Nel 1970, John Gurdon riprova quegli stessi esperimenti e finalmente riesce ad ottenere un buon sviluppo dell'embrione ottenuto da nuclear transfer fino allo stadio di girino e per una percentuale di circa il 2% lo sviluppo completo fino allo stadio adulto (Figura 1).

Gurdon impiegò per i suoi esperimenti nuclei di epatociti, le cellule del fegato, di *Xenopus*, un anfibio molto utilizzato come modello animale per studi embriologici e genetici. Questa data ha rappresentato il momento di svolta nella storia del nuclear transfer e, per la prima volta, rispondeva alla domanda che Speman si era posto agli inizi del secolo. Gurdon dimostrava che il nucleo di una cellula differenziata prelevata da un individuo adulto era in grado di contribuire alla nascita di un nuovo individuo con il profilo genetico identico a quello del donatore del nucleo: in altre parole un clone genetico. Il gamete femminile dimostrava così di possedere la capacità di riprogrammare il nucleo differenziato, possiede quindi quelle molecole e meccanismi in grado di rimuovere la memoria genetica del nucleo e rimodellarla imponendo un nuovo programma genetico in grado di iniziare e sostenere lo sviluppo embrionale fino a termine.

A partire dagli anni '70 molti ricercatori tentarono di impiegare le stesse tecniche

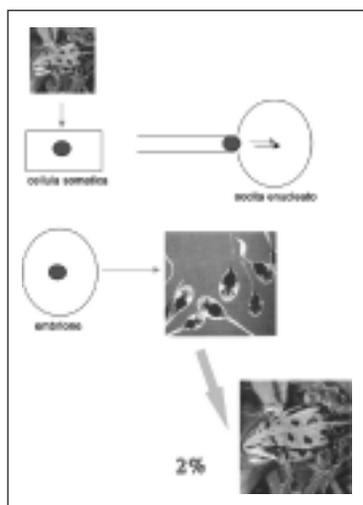


Fig. 1



Fig. 2

per ottenere la clonazione di mammiferi. Questi esperimenti proseguirono per oltre quindici anni senza successo. Nel 1986 Steen Willadsen pubblica un lavoro sulla rivista *Nature* dimostrando di essere stato in grado di clonare delle pecore a partire da nuclei di cellule della massa cellulare interna dell'embrione allo stadio di blastocisti. Queste cellule sono pluripotenti e da esse, impiegando un sistema di coltura, si ottengono le cellule staminali embrionali (ES). La clonazione da nuclei di cellule differenziate continuava a mietere insuccessi, al punto che Mc Graph e Solter, in una ricerca pubblicata su *Nature* sostengono che la clonazione di mammiferi da cellule differenziate adulte è 'tecnicamente impossibile' (Gurdon e Byrne, 2003).

Questa loro affermazione verrà smentita alcuni anni dopo dai lavori del gruppo di ricercatori Scozzesi diretto da Ian Wilmut e Keith Campbell. Nel 1997, in un articolo che passò alla storia, questi due biologi dimostrano che è possibile clonare anche i mammiferi da nuclei di cellule adulte isolate dalle ghiandole mammarie. Nasce così la pecora Dolly (Figura 2).

La pecora però non è il modello animale più versatile per poter affrontare le tematiche bioetiche sorte dalla clonazione del primo mammifero da cellule differenziate. La pecora è poco conosciuta negli aspetti legati alla sua fisiologia, biologia della riproduzione e dello sviluppo, genetica. È il topolino a godere di questo primato. Per questo molti ricercatori subito dopo la nascita di Dolly cercheranno di replicare i risultati impiegando questo modello animale. Inoltre, l'esperimento del gruppo scozzese si rivelerà difficile da ripetere perché il fenotipo della cellula donatrice del nucleo che ha portato alla clonazione di Dolly non era noto, avendolo isolato da cellule della ghiandola mammaria non riconoscibili.

Nel 1998, Yanagimachi (già famoso per aver inventato la fecondazione in vitro e per le sue scoperte nell'ambito della biologia della riproduzione) ed il suo gruppo all'Università delle Hawaii clonano il primo topo da cellule a fenotipo noto e terminalmente differenziate, quali le cellule follicolari del cumulo ooforo (Wakayama et al., 1998).

Le diverse tecniche del nuclear transfer

L'obiettivo dell'impiego della tecnica del nuclear transfer è quello di trasferire il nucleo di una cellula all'interno di un'altra. Per l'ottenimento di un nuovo embrione clonato si impiega il nucleo di una cellula somatica (pluripotente o terminalmente differenziata) e lo si trasferisce all'interno di un'ovocita enucleato. Per ottenere questo obiettivo i due gruppi di ricerca, scozzese ed americano, hanno impiegato due diverse strategie.

Per la clonazione di Dolly è stata trasferita la cellula intera all'interno dello spazio perivitellino compreso tra l'ovocita e la zona pellucida. La fusione tra le due membrane plasmatiche della cellula somatica e della cellula uovo è stata indotta con una piccola scossa elettrica (Figura 3). Un metodo alternativo a questo, sempre utilizzato dal gruppo scozzese in altri esperimenti consiste nel coltivare la cellula somatica in un terreno nel quale è presente il virus di Sendai inattivato, che ha perso quindi le sue proprietà virali, ma è in grado di indurre la fusione tra le

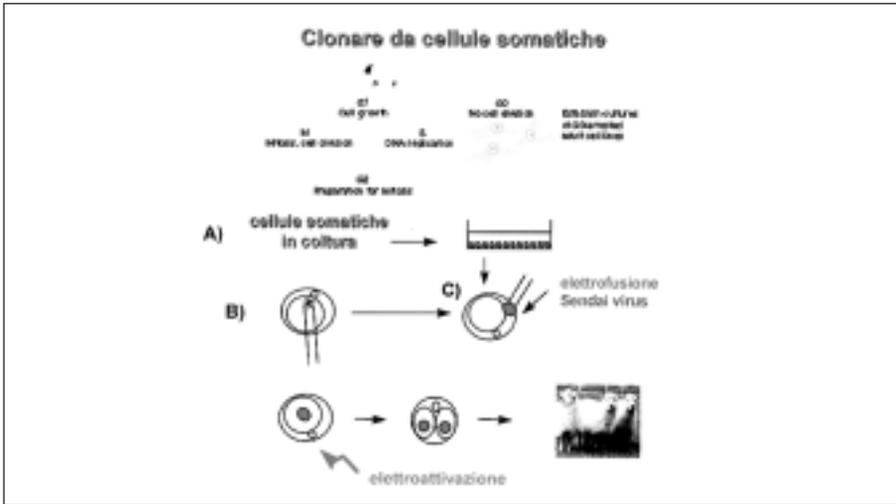


Fig. 3

due membrane (Figura 3). Pochi minuti dopo la fusione delle due membrane, in un caso e nell'altro, il nucleo della cellula somatica penetra nell'ooplasma. Il gruppo diretto da Yanagimachi ha invece impiegato la tecnica del trasferimento diretto, mediante micropipetta, del nucleo della cellula somatica. Questa tecnica, la stessa utilizzata fin dai tempi in cui Briggs e King conducevano i primi

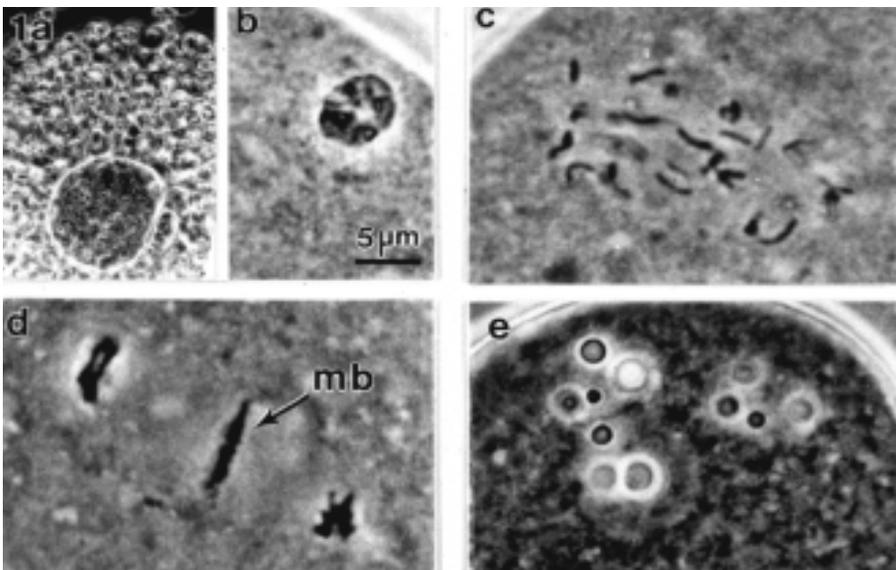


Fig. 4

esperimenti di nuclear transfer negli anfibi, è stata modificata per consentire una maggiore efficienza di trasferimento negli oociti di topo, notoriamente molto fragili e facilmente danneggiabili. La modifica è consistita nell'aggiunta di uno chiamato 'piezo' alla base della micropipetta utilizzata per la iniezione del nucleo somatico. Il piezo è un piccolo compressore che permette dei movimenti a velocità regolabile, in avanti e in dietro, della micropipetta così che questa possa penetrare la zona pellucida prima e la membrana plasmatica poi senza danneggiarle (Figura 4). La percentuale di sopravvivenza degli oociti di topo prima dell'impiego del piezo era molto bassa (e potrebbe essere questa una delle cause dell'insuccesso fino ad allora avuto nella clonazione di questa specie), ora, con questo meccanismo, è aumentata notevolmente fino ad arrivare oggi, in mani esperte, anche al 100%.

La cellula giusta al momento giusto

Non tutte le cellule possono essere impiegate per clonare un mammifero. E soprattutto non tutti i momenti del ciclo cellulare possono essere utilizzati. I risultati migliori si ottengono quando le cellule sono nelle fasi G0 e G1 del ciclo cellulare. Quando la cellula sta replicando il DNA, in fase S, non viene riprogrammata

I fattori epigenetici coinvolti nel processo di riprogrammazione

Sebbene non siano ancora noti i meccanismi biologici attraverso i quali il citoplasma ospite ed il nucleo trasferito interagiscono per produrre un embrione competente allo sviluppo, alcuni avanzamenti sono stati ottenuti alla comprensione dei fattori epigenetici e genetici coinvolti nel processo di riprogrammazione del nucleo. È bene qui ricordare che il 98-99% degli zigoti ottenuti da trasferimento nucleare non completeranno mai lo sviluppo embrionale fino alla nascita; essi moriranno sia nel periodo pre- che postimpianto. È attraverso lo studio delle alterazioni dello sviluppo di questi embrioni che si potranno comprendere i processi biologici che avvengono durante la riprogrammazione genetica.

Alterazioni del DNA nucleare

Una procedura standard utilizzata per confermare l'identità genetica degli organismi clonati è l'analisi delle sequenze di DNA microsatellite. Questi studi hanno confermato che in queste regioni del DNA non sembrano esserci differenze e che gli individui clonati sono geneticamente identici al donatore del nucleo impiegato per il trasferimento. Alterazioni più drastiche riguardano il numero cromosomico dell'embrione clonato, che spesso risulta aneuploide a causa di errori dovuti a malsegregazione dei cromosomi durante la prima divisione mitotica. In alcuni casi il genoma si frantuma per incompatibilità legata alla diversa fase del ciclo cellulare in cui si trovano l'oocita (sempre in metafase II) e il nucleo trasferito. Infatti, l'importanza di sincronizzare allo stesso stadio del ciclo cellulare dell'oocita la cellula donatrice del nucleo è stata ben dimostrata (Campbell, 1998).

Questi due tipi di alterazione si verificano anche più frequentemente quando le cellule donatrici non sono isolate dal tessuto e subito impiegate, ma provengono da colture cellulari e, come succede per questo tipo di cellule, possono aver già accumulato diversi tipi di riarrangiamenti cromosomici.

Alcuni lavori hanno riportato l'accorciamento dei telomeri negli individui clonati. Questo è un argomento controverso e non sempre confermato in altri studi e in diversi modelli animali; infatti, alcuni ricercatori hanno descritto un accorciamento, altri un allungamento e altri ancora il mantenimento della lunghezza dei telomeri (Mullins et al., 2003).

Alterazioni del DNA mitocondriale

I mitocondri sono i soli organelli citoplasmatici che contengono un proprio DNA (mtDNA). Poiché i mitocondri dello spermatozoo vengono degradati durante le prime divisioni dell'embrione preimpianto o, in alcune specie, non penetrano all'interno dell'ovocita durante il processo di fecondazione, l'mtDNA di un individuo è di derivazione esclusivamente materna. Negli embrioni clonati è stato dimostrato che alcuni mitocondri della cellula donatrice vengono trasferiti nell'ovocita con il nucleo (se viene utilizzata la tecnica della fusione cellulare, chiaramente, tutto il citoplasma della cellula donatrice viene trasferito con il nucleo nell'ovocita; mentre se viene impiegata la tecnica del trasferimento del solo nucleo, durante il processo di enucleazione della cellula donatrice parte del citoplasma rimane sempre adeso al nucleo e quindi trasferito con esso) e questi permangono durante tutto lo sviluppo embrionale e, in quantità molto basse, perfino nell'individuo adulto (Takeda et al., 2003). Non è ancora chiaro se questa condizione di eteroplasmia venga trasmessa alla linea germinale di femmine clonate e quindi se si mantenga nelle generazioni successive. La presenza di mtDNA somatico potrebbe rappresentare un problema per gli individui clonati e per la loro progenie, perché l'mtDNA somatico è maggiormente propenso a mutazioni.

Alterazioni dell'espressione genica

Le primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto sono sostenute dalla presenza di RNA e proteine di origine materna. Quando queste molecole stanno per esaurirsi, avviene l'attivazione del genoma embrionale con l'espressione di nuovi geni i cui trascritti sono necessari al proseguimento dello sviluppo. Questo momento di passaggio, il cui stadio varia nelle diverse specie, è estremamente critico perché se questi geni non vengono attivati oppure vengono espressi nel momento sbagliato o in quantità scorretta, l'embrione non sarà in grado di proseguire lo sviluppo. L'attivazione del genoma embrionale è forse il primo momento critico e di verifica dell'avvenuta corretta riprogrammazione che l'embrione clonato incontra. Alcuni recenti lavori hanno confrontato, con tecniche quantitative, l'espressione genica di embrioni preimpianto di topo normali e clonati dimostrando che questi ultimi attivano i geni embrionali nel momento giusto, ma in quantità più basse e con un'elevata variabilità tra embrioni (Sebastiano et al., 2005) (Figura 5). Quindi la riprogrammazione genetica degli embrioni clonati avviene prima che essi raggiungano lo stadio di 2 cellule (24 ore dall'attivazione

allo sviluppo), quando i geni embrionali vengono espressi per la prima volta, ma è chiaramente incompleta e/o scorretta poiché questi stessi geni sono sotto espressi. L'analisi qualitativa dell'espressione di 10.000 geni durante lo sviluppo postimpianto, eseguita impiegando la tecnica dei *microarrays*, ha mostrato che il 4% di essi ha un profilo completamente diverso dal feto di controllo (Humphreys et al., 2002). Tra questi 10.000 geni alcuni sono risultati imprintati e esprimevano l'allele corretto come nell'embrione derivato da fecondazione, suggerendo che la memoria epigenetica che regola la loro espressione (stabilitasi durante la gametogenesi) non viene modificata dal processo di riprogrammazione.

Alterazioni epigenetiche del DNA, della cromatina e dell'architettura nucleare

I risultati ottenuti finora mostrano che il processo di riprogrammazione agisce seguendo regole comuni a tutti gli embrioni ricostituiti, ma hanno anche eviden-

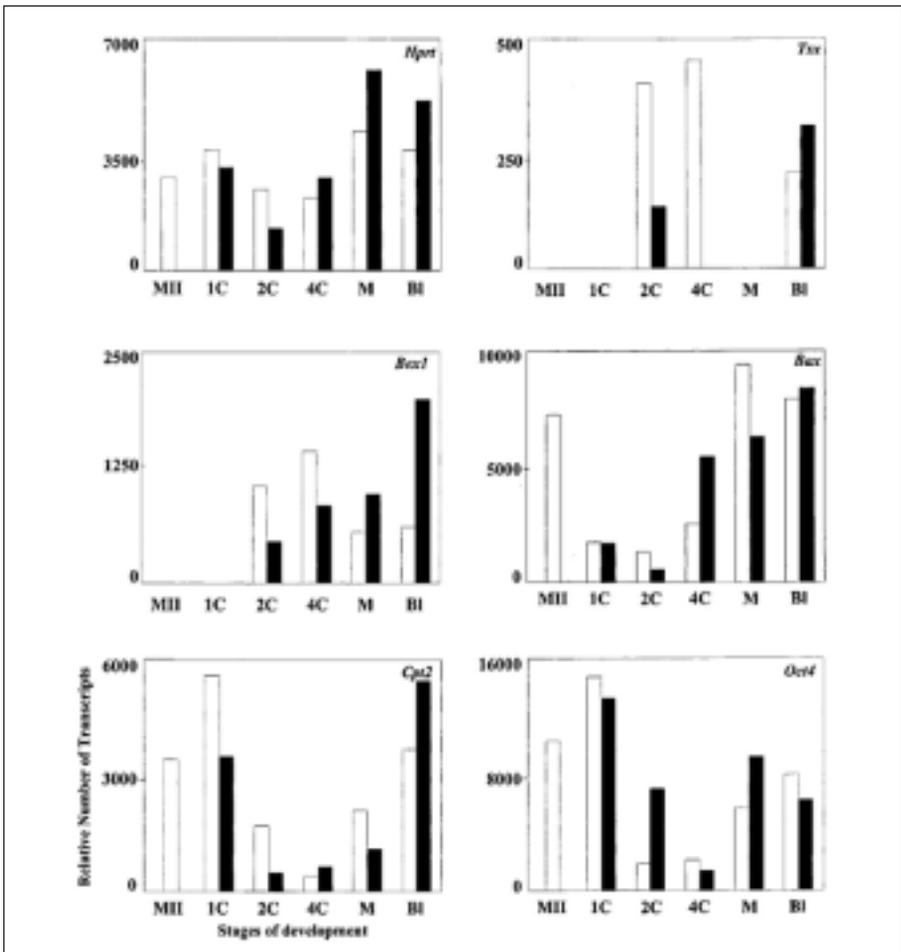


Fig. 5

ziato che ciascun embrione preimpianto clonato ha una propria storia legata alle modalità con cui questo processo agisce nell'eliminare, modificare e ricostruire l'eredità epigenetica. Le alterazioni quantitative all'espressione genica dipendono molto probabilmente proprio da un alterato profilo epigenetico delle cellule dell'embrione clonato.

Profili aberranti di metilazione del DNA sono stati dimostrati sia durante lo sviluppo pre- (Dean et al., 2001; Mann et al., 2003) che postimpianto (Cezar 2003), così come alterazioni della acetilazione degli istoni (Enright et al., 2003; Santos et al., 2003), della organizzazione della cromatina (Kim et al., 2002; Vignon et al., 2002) e dell'architettura nucleare (Moreira et al., 2003).

Bibliografia

1. Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle.
2. Cezar GG. Epigenetic reprogramming of cloned animals. *Cloning Stem Cells*, 5: 165-180, 2003.
3. *Cloning*, 1: 3-15, 1999.
4. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13734-13738, 2001.
5. Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: Levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, 69: 1525-1530, 2003.
6. Gurdon JB, Byrne JA. The first half century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8048-8052, 2003.
7. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 12889-12894, 2002.
8. Kim JM, Ogura A, Nagata M, Aoki F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod*, 67: 760-766, 2002.
9. Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 69: 902-914, 2003.
10. Moreira PN, Robl JM, Collas P. Architectural defects in pronuclei of mouse nuclear transplant embryos. *J Cell Sci*, 116: 3713-3720, 2003.
11. Mullins LJ, Wilmut I, Mullins JJ. Nuclear transfer in rodents. *J Physiol*, 554: 4-12, 2004.
12. Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 13: 1116-1121, 2003.
13. Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, Kojima T, Takahashi S, Imai H, Yamanaka M, Onishi A, Hanada H. Proliferation of donor mitochondrial DNA in

- nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol Reprod Dev*, 64: 429-437, 2003.
14. Vignon X, Zhou Q, Renard JP. Chromatin as a regulative architecture of the early developmental functions of mammalian embryos after fertilization or nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 4: 363-377, 2002.
 15. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374, 1998.
 16. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813, 1997.



Tipografia Viscontea
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382/526253 r.a. - Fax 0382/423120