

*SOCIETÁ ITALIANA DI  
EMATOLOGIA SPERIMENTALE*

*DISCUTIAMONE INSIEME*

*Firenze, 18 marzo 1993*

*Apoptosi:  
significato biologico e clinico*

*Colture a lungo termine:  
aspetti e applicazioni  
cliniche*

***Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)***  
***"Discutiamone Insieme"***

><

Hotel Montebello, via Montebello, Firenze, 18 marzo 1993

***APOPTOSI:***  
***SIGNIFICATO BIOLOGICO E CLINICO***

***COLTURE A LUNGO TERMINE:***  
***ASPETTI ED APPLICAZIONI CLINICHE***

## **APOPTOSI: SIGNIFICATO BIOLOGICO E CLINICO**

|   |    |
|---|----|
| <i>G. Bergamaschi, V. Rosti, L. Ponchio, G. Farina, A. Novella, C. Lucotti, C. Pedrotti, M. Cazzola</i><br>Apoptosi: significato biologico e clinico.....pag.   | 1  |
| <i>M. Danova</i><br>Impiego della citofluorimetria a flusso nella valutazione dell'apoptosi.....pag.  | 4  |
| <i>G. Bellomo</i><br>Meccanismi dell'apoptosi nei timociti .....  | 5  |
| <i>G. Bergamaschi, M. Danova, V. Rosti, M. Cazzola</i><br>Ruolo delle tirosinochinasi nella prevenzione dell'apoptosi in cellule mieloidi .....   | 6  |
| <i>R. Manfredini, E. Tagliafico, A. Grande, P. Zucchini, C. D'Ambrosio, D. Barbieri, C. Franceschi, G. Citro, G. Zupi, S. Ferrari</i><br>Possibile ruolo anti-apoptotico del protooncogene c-fes nel differenziamento mieloide ..pag.   | 7  |
| <i>D. Delia, A. Aiello, M.A. Pierotti</i><br>Ruolo del gene bcl-2 in cellule mieloidi .....   | 8  |
| <i>F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Colotta</i><br>Modulazione della morte pre-programmata della cellula nei leucociti polimorfonucleati umani.....pag.   | 9  |
| <i>N. Polentarutti, M. Sironi, A. Mantovani, F. Colotta</i><br>Induzione genica nella morte pre-programmata della cellula: induzione di c-fos e c-jun.....pag.  | 10 |
| <i>D. Gottardi, P. Ghia, A. Alfarano, M.G. Gregoret, M. Schena, F. Caligaris Cappio</i><br>Ruolo del gene bcl-2 in cellule linfoidi normali e di leucemia linfatica cronica.....pag.  | 11 |
| <i>S. Pileri, E. Sabatini, S. Faggi, G. Melilli, M. Benni, A. Bocchi, P. Gherlinzoni, L. Leoncini</i><br>Indice apoptotico nei linfomi maligni .....  | 13 |
| <i>G. Visani, G. Zauli, P. Tosi, M. Vitale, M.C. Re, G. Furlini, L. Zamai, E. Felicieri, D. Gibellini, B.R. Davis, S. Capitani, M. La Placa, S. Tura</i><br>HIV-1 e morte per apoptosi dei progenitori emopoietici CD-34-positivi ..... | 15 |
| <i>P. Farabegoli, G. Martinelli, M. Buzzin, S. Tura, M.A. Santucci</i><br>Il riarrangiamento bcr-abl promuove la sopravvivenza dei progenitori emopoietici attraverso la soppressione dell'apoptosi.....pag.                            | 16 |
| <i>P. Tosi, G. Visani, D. Gibellini, G. Zauli, E. Ottaviani, A. Cenacchi, B. Gamberi, S. Manfroi, S. Tura</i><br>Acido transretinoico e induzione di apoptosi nelle leucemie acute mieloidi .....                                       | 17 |

## **COLTURE A LUNGO TERMINE: ASPETTI E APPLICAZIONI CLINICHE**

|  |    |
|--|----|
| <i>R. Schirò, D. Longoni, A. Mangione, G. Masera, A. Biondi</i><br>Ruolo dello stroma midollare nella produzione di precursori emopoietici periferici<br>e da sangue di cordone in colture a lungo termine.....pag.  | 21 |
| <i>C. Almici, C. Carlo Stella, J.E. Wagner, V. Rizzoli</i><br>Caratterizzazione in coltura a lungo termine di cellule CD34+ separate<br>mediante elutriazione per centrifugazione controcorrente.....pag.  | 22 |
| <i>R.M. Lemoli, S.C. Gulati, S. Tura</i><br>La proliferazione di progenitori epatopoietici umani normali è stimolata<br>da "colony-stimulating factors" (CSFs) in colture a lungo termine (LTC)<br>in presenza od assenza di stroma.....pag.   | 24 |
| <i>W. Piacibello, F. Sanavio, A. Severino, A. Stacchini, S. Morelli, L. Fubini, M. Aglietta</i><br>Colture a lungo termine: ruolo di fattori di crescita emopoietici<br>nell'emopoiesi normale e mielodisplastica.....pag.   | 25 |
| <i>M. Bregni, S. Siena, J. Tong, E.F. Srour, R. Hoffman, A.M. Gianni</i><br>Progenitori ematopoietici capaci di sostenere l'ematopoiesi a lungo termine<br>in-vitro circolano nel sangue periferico di pazienti con tumori solidi trattati<br>con chemioterapia e fattori di crescita.....pag. | 26 |
| <i>L. Teofili, S. Iovino, S. Sica, A. Di Mario, G. Menichella, G. Leone</i><br>Capacità delle PBSC espanse con G-CSF a sostenere ematopoiesi<br>a lungo termine in vitro.....pag.  | 27 |
| <i>M.A. Santucci, D. Soligo, G.P. Bagnara, P.L. Strippoli, L. Bonsi, S. Tura</i><br>Distribuzione delle componenti della matrice extracellulare e dei recettori per le<br>molecole adesive nel microambiente midollare della leucemia mieloide cronica.....pag.                                | 28 |

**Apoptosi:  
significato biologico e clinico**

## APOPTOSI: SIGNIFICATO BIOLOGICO E CLINICO

**GAETANO BERGAMASCHI, VITTORIO ROSTI, LUISA PONCHIO, GIOVANNA FARINA, ANNUNZIATA NOVELLA, CLAUDIA LUCOTTI, CLAUDIA PEDROTTI, MARIO CAZZOLA**

*Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, sez. di Clinica Medica II, Università di Pavia e IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia*

Il termine apoptosi, che in greco antico significa letteralmente *cadere da* ( $\alpha\pi\omicron=da$ ,  $\pi\pi\tau\omega=cado$ ), e quindi caduta delle foglie, viene attualmente impiegato per indicare un tipo di morte programmata della cellula. Si tratta di un fenomeno biologico normale ed estremamente frequente, che interviene in quelle situazioni in cui un organismo multicellulare deve eliminare cellule senescenti: è un mezzo per regolare in modo preciso il numero di cellule di un tessuto senza danneggiare strutturalmente il tessuto stesso. L'apoptosi interviene nell'embriogenesi e nella morfogenesi, ed è un processo fisiologico nei tessuti adulti con elevato *turnover* cellulare, quali il midollo osseo emopoietico e il fegato, negli organi linfoidei per l'eliminazione dei cloni autoreattivi, negli organi endocrini, etc. Il processo apoptotico prevede l'attiva partecipazione della cellula alla sua morte.

L'apoptosi si distingue nettamente dalla necrosi, che è un fenomeno nettamente patologico. Nella necrosi, infatti, si ha una compromissione grave e rapida del potenziale metabolico della cellula, che diventa incapace di mantenere i gradienti ionici ai lati della membrana cellulare. Si ha movimento di acqua verso l'interno con rigonfiamento del citoplasma, dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico, cui fa seguito la flocculazione della cromatina nucleare e la degradazione aspecifica del DNA. La cellula si lisa e il contenuto cellulare si libera nell'ambiente circostante, con conseguente infiammazione. La necrosi è generalmente dovuta a insulti cellulari importanti, quali quelli prodotti da ischemia, ipotermia e esposizione ad agenti citotossici.

Le alterazioni morfologiche tipiche dell'apoptosi sono, in ordine sequenziale, le seguenti:

- compaiono vescicole citoplasmatiche e "bolle" della membrana plasmatica, queste ultime probabile espressione dell'esternalizzazione delle vescicole. Con questo processo, che richiede energia, la cellula rilascia acqua e altri costituenti citoplasmatici all'esterno, e ciò determina una riduzione del volume cellulare con aumento della densità (la centrifugazione in gradiente di densità può essere impiegata per separare le cellule apoptotiche);
- anche i nuclei si riducono di volume, si ha condensazione della cromatina e il DNA viene progressivamente degradato in modo caratteristico per l'attivazio-

ne di una specifica endonucleasi: questo fenomeno viene utilizzato per dimostrare l'apoptosi (vedi oltre). Il passo successivo è la frammentazione del nucleo stesso;

- si vengono quindi a creare i cosiddetti corpi apoptotici, ovvero frammenti di citoplasma contenenti frammenti di nucleo, che vengono fagocitati dai macrofagi, forse per il riconoscimento del recettore della vitronectina o di strutture contenenti carboidrati.

Nel corso del processo apoptotico, a livello ultrastrutturale si osservano:

- perdita dei microvilli e delle giunzioni intercellulari (la cellula si isola dalle cellule circostanti);
- convoluzione della superficie cellulare, che dà origine ai corpi apoptotici;
- dilatazione del reticolo endoplasmatico e fusione delle cisterne dilatate con la superficie cellulare;
- integrità strutturale dei mitocondri;
- condensazione della cromatina in ammassi granulari sotto la membrana nucleare, con perdita della tradizionale combinazione di eucromatina ed eterocromatina.

I metodi di valutazione dell'apoptosi sono i seguenti:

- valutazione morfologica e ultrastrutturale, secondo i criteri esposti sopra;
- elettroforesi del DNA, che dimostra la comparsa di frammenti oligonucleosomali (multipli di 180-200 paia di basi), in rapporto all'attivazione di una o più endonucleasi  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  dipendenti;
- citometria a flusso del DNA, che mostra una popolazione apparentemente ipodiploide per ridotta capacità del DNA di legare il colorante (propidio ioduro o altri) o per effettiva riduzione del contenuto di DNA;
- centrifugazione su gradienti di densità, che sfruttano il fatto che le cellule apoptotiche hanno densità più elevata;

Per quanto concerne l'ematologia, l'apoptosi è il processo fisiologico cui vanno incontro progenitori e precursori emopoietici in assenza di adeguate concentrazioni di fattori di crescita, e alcune cellule ematiche mature al termine della loro durata di vita. L'eritropoietina agisce essenzialmente prevenendo la morte programmata delle CFU-E e dei proeritroblasti: la carenza di eritropoietina e l'eccessiva morte di tali progenitori e precursori spiega l'anemia dell'insufficienza renale cronica.

Anche gli altri peptidi regolatori dell'emopoiesi interferiscono con l'apoptosi. IL-3 e GM-CSF agiscono su linee stabilizzate fattore-dipendenti mediante prevenzione dell'apoptosi. IL-1 e TNF prevenono l'apoptosi di monociti del sangue periferico, e IL-1 previene l'apoptosi dei granulociti maturi. Inoltre, IL-1 fa sì che l'antigene o i glicocorticoidi non provochino l'apoptosi dei linfociti T, mentre IL-6

può prevenire l'apoptosi di cellule mieloidi esprimenti p53.

Alcuni proto-oncogeni interferiscono con l'apoptosi: bcl-2 blocca l'apoptosi e allunga la sopravvivenza della cellula; c-myc stimola l'apoptosi in assenza di fattori di crescita; p53 normale (*wild type*) stimola l'apoptosi, mentre alcuni p53 mutanti la bloccano; APO-1 stimola l'apoptosi. Lesioni molecolari di questi geni potrebbero dunque innescare meccanismi di trasformazione neoplastica. L'attivazione di bcl-2 può prevenire la morte cellulare e giocare un ruolo nella patogenesi di alcune neoplasie mediante un meccanismo di accumulo cellulare: la t(14;18) dei linfomi follicolari umani produce attivazione di bcl-2. Va tenuto presente che l'EBV sopprime l'apoptosi mediante proteine codificate dai *latent genes*. Il blocco dell'apoptosi dovuto a mutazioni di p53 potrebbe rappresentare un meccanismo responsabile del passaggio di una leucemia mieloide cronica dalla fase cronica alla crisi blastica.

Mentre è stata data molta enfasi al risvolto neoplastico, si è trascurata l'altra possibilità, ovvero che l'eccessiva apoptosi sia responsabile di alcune emopatie. Il virus HIV produce apoptosi dei linfociti infettati con vari meccanismi: ad esempio, quando i linfociti CD4+ infettati dal virus HIV vengono attivati con mitogeni, ne viene accelerata l'apoptosi. Un campo tutto da esplorare è quello dell'aplasia midollare e delle mielodisplasie, patologie che potrebbero derivare da un'eccessiva propensione dei progenitori e/o dei precursori emopoietici all'apoptosi.



## IMPIEGO DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO NELLA VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

**MARCO DANOVA**

*Dipartimento di Medicina Interna, Sezione Clinica Medica II, Università e IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

Di recente abbiamo utilizzato la citometria a flusso (CFM) per approfondire gli studi sull'apoptosi indotta in linee leucemiche umane (HL-60, MO-7) da inibitori della DNA topoisomerasi I o II ed in timociti murini dal prednisolone. Le valutazioni in corso nel nostro laboratorio riguardano: 1) *Il contenuto nucleare di DNA* [La CFM permette sia di identificare e quantificare le cellule apoptotiche che di riconoscere la "fase-specificità" dell'induttore utilizzato. L'attivazione di endonucleasi in cellule apoptotiche causa estrazione di DNA a basso peso molecolare (durante la permeabilizzazione cellulare richiesta dalla metodica) con la conseguente comparsa di una popolazione a minor contenuto di DNA ("picco sub-G1") sull'istogramma. Nella maggior parte degli esperimenti effettuati, l'apoptosi era selettiva per cellule che si trovano in una particolare fase del ciclo cellulare (es. fase S per le HL-60, fase S o G2 per le MO-7)]; 2) *Il contenuto di proteine totali* [L'analisi biparametrica del contenuto di DNA e di proteine totali rivela una marcata diminuzione del contenuto proteico a carico delle cellule appartenenti al picco "sub-G1"]; 3) *La sensibilità del DNA alla denaturazione in situ* [Verificata in esperimenti di incorporazione di bromodesossiridina, risulta aumentata nelle cellule apoptotiche]; 4) *Le dimensioni e la struttura cellulare*; 5) *L'espressione di antigeni di proliferazione* (PCNA, Statina, Terminina) e *di oncogeni* (bcl-2, p53), in vario modo correlati alla proliferazione (o alla quiescenza cellulare) e all'apoptosi. I dati ottenuti sino ad ora indicano come la CFM sia uno strumento rapido e preciso per il monitoraggio precoce dell'apoptosi sia in studi di base che in ambito clinico.

## MECCANISMI DELL'APOPTOSI IN TIMOCITI

**GIORGIO BELLOMO**

*Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale, Università di Torino*

L'esposizione di timociti di ratto ed umani a metilprednisolone, desametasone, diossine, composti organici dello stagno ed X-irradiazione induce la comparsa di una sequenza di alterazioni biochimiche e strutturali caratterizzate da un sovvertimento della organizzazione della cromatina nucleare e da una sua successiva frammentazione. Tali alterazioni sono precedute da un incremento della concentrazione intracellulare dello ione calcio, legato sia ad una sua mobilizzazione da depositi intracellulari che ad un aumento del suo influsso netto dal medium extracellulare. Il pretrattamento di tali cellule con chelanti extracellulari ed intracellulari del  $\text{Ca}^{2+}$  e con antagonisti della calmodulina previene la comparsa sia delle modificazioni della struttura della cromatina che la sua successiva frammentazione. Inoltre, il trattamento con ionofori del  $\text{Ca}^{2+}$  (A23187, ionomicina) o con inibitori selettivi delle  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi intracellulari induce la comparsa della frammentazione della cromatina. Queste evidenze sperimentali hanno fatto prospettare il coinvolgimento dello ione calcio nell'induzione dell'apoptosi nei timociti.

Sono stati ipotizzati due differenti livelli a cui un aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  può essere coinvolto nel determinismo dell'apoptosi. Anzitutto, l'endonucleasi responsabile della frammentazione della cromatina nei timociti è  $\text{Ca}^{2+}$  e Mg21 dipendente ed un aumento della concentrazione intracellulare o intranucleare di  $\text{Ca}^{2+}$  può rappresentare lo stimolo "fisiologico" per una sua attivazione. Tuttavia, l'attività della endonucleasi è strettamente modulata dalla conformazione della cromatina (una condensazione della cromatina inibisce la frammentazione). Esperimenti condotti su nuclei isolati hanno dimostrato come un aumento della concentrazione intranucleare di  $\text{Ca}^{2+}$  si associ ad una alcalizzazione dello stesso compartimento e che queste condizioni, associate, portano ad un rilassamento della struttura della cromatina e ne permettono la sua successiva frammentazione. Appare altresì verosimile che l'effetto del  $\text{Ca}^{2+}$  sulla struttura della cromatina possa rappresentare un evento sufficiente ad innescare il processo di apoptosi. A favore di tale ipotesi starebbe la dimostrazione che l'inibizione della attività endonucleasica ad opera dello  $\text{Zn}^{2+}$  non previene l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , le modificazioni strutturali della cromatina e la morte per apoptosi.

## **RUOLO DELLE TIROSINO-CHINASI NELLA PREVENZIONE DELL'APOPTOSI IN CELLULE MIELOIDI**

**GAETANO BERGAMASCHI, MARCO DANOVA, VITTORIO ROSTI, MARIO CAZZOLA**

*Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Sezione di Clinica Medica II, Università di Pavia*

Dati sperimentali indicano che i fattori di crescita emopoietici favoriscono la sopravvivenza cellulare sopprimendo l'apoptosi o morte cellulare programmata. Poiché nella linea cellulare il fattore di crescita dipendente M07e, l'IL-3 ed il GM-CSF inducono la fosforilazione su tirosina di varie proteine citoplasmatiche, abbiamo studiato il ruolo della fosforilazione tirosinica indotta dai fattori di crescita nella prevenzione dell'apoptosi. Esperimenti sono stati effettuati con le linee cellulari HL60 ed M07e e con gli inibitori delle tirosino-chinasi genistein e tyrphostin AG82. Entrambi gli inibitori delle tirosino-chinasi determinano l'apoptosi delle cellule HL60 ed M07e. La presenza dell'apoptosi è suggerita dalla comparsa del caratteristico pattern di degradazione del DNA in frammenti oligonucleosomali e di alterazioni morfologiche caratteristiche come la frammentazione nucleare e la condensazione cromatinica. L'apoptosi è stata anche confermata dall'analisi del DNA mediante citometria a flusso che ha mostrato le cellule apoptotiche come una regione apparentemente ipodiploide, la regione A07 sotto la regione G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Gli inibitori delle tirosino-chinasi riducono anche la frazione di cellule in fase S. L'induzione dell'apoptosi da parte degli inibitori delle tirosino-chinasi non dipende dalla sintesi proteica perchè non viene inibita dalla cycloheximide. Che il tyrphostin sia un inibitore specifico delle tirosino-chinasi è anche indicato dalla completa prevenzione dei suoi effetti da parte dell'inibitore delle tirosino-fosfatasi sodio ortovanadato (vanadato). Il vanadato inibisce anche l'apoptosi e la riduzione della fase S nelle cellule M07e coltivate in assenza di fattori di crescita. Questi risultati suggeriscono che la fosforilazione su residui di tirosina rappresenti una fase essenziale nella trasduzione del segnale di IL-3 e GM-CSF. Poiché gli effetti degli inibitori delle tirosino-chinasi e della privazione di fattori di crescita possono essere prevenuti dalla contemporanea inibizione delle tirosino-fosfatasi, si ipotizza che variazioni dell'equilibrio tra tirosino chinasi e tirosino-fosfatasi determinino se una cellula sopravviverà o andrà in apoptosi.

## POSSIBILE RUOLO ANTIAPOPTOTICO DEL PROTOONCOGENE C-FES NEL DIFFERENZIAMENTO MIELOIDE

**R. MANFREDINI, E. TAGLIAFICO, A. GRANDE, P. ZUCCHINI, C. D'AMBROSIO, D. BARBIERI\*, C. FRANCESCHI\*, G. CITRO#, G. ZUPI#, S. FERRARI**

*Centro di Ematologia Sperimentale, Clinica Medica 11, Università di Modena.*

*\*Istituto di Patologia Generale, Università di Modena.*

*#Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale, Istituto Regina Elena, Roma.*

Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che cellule HL60, pretrattate per 5 giorni con un oligomero AS-FES, e indotte a differenziare a granulociti con Acido Retinoico, non giungevano alla maturazione terminale, ma morivano entro 2 giorni dall'induzione. La morfologia di tali cellule deponeva fortemente per l'insorgenza di un processo apoptotico. L'analisi citofluorimetrica monoparametrica per lo studio del contenuto di DNA ha rivelato nelle HL60 trattate con AS-FES già dopo 24h dall'induzione con AR la comparsa, accanto ai normali picchi 2C e 4C, di un picco di fluorescenza ipodiploide (corrispondente al DNA della popolazione apoptotica), che si accentuava nei giorni seguenti fino a sostituire totalmente dopo 4 giorni i picchi 2C e 4C, i quali erano invece gli unici presenti nelle cellule trattate con S-FES o non trattate. L'analisi molecolare del DNA estratto dalle cellule trattate con AS-FES dopo 1, 2 e 3 giorni dall'induzione con AR mostrava il caratteristico pattern di frammentazione dovuta al clivaggio internucleosomico, mentre il DNA estratto dalle cellule trattate con S-FES si presentava non frammentato. Successivamente abbiamo saggiato la capacità di alcuni fattori di sopravvivenza, quali IL3, IL6, SCF, GM-CSF e G-CSF, di contrastare il processo apoptotico: solo il GM-CSF e il G-CSF sembrano efficaci in tal senso; risultati analoghi sono stati ottenuti in alcuni esperimenti preliminari su blasti di leucemia promielocitica acuta.

## ESPRESSIONE E REGOLAZIONE DEL GENE BCL-2 IN CELLULE MIELOIDI

**D. DELIA, A. AIELLO, M.A. PIEROTTI**

*Divisione di Oncologia Sperimentale A, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

In questo studio presentiamo dati immunobiochimici e molecolari sulla espressione del gene *bcl-2* in cellule mieloidi normali e neoplastiche.

Analisi condotte su aspirati midollari normali hanno evidenziato la proteina *bcl-2* in mieloblasti, promielociti, mielociti, ma non monociti o polimorfi. Ancora più interessante è la presenza della proteina in progenitori emopoietici di piccole dimensioni con fenotipo CD34+, CD33-, CD45RO-, HLA-DR+O-.

Diverse linee cellulari, quali KG-1, RwLeu4, HL-60, THP-1 esprimono livelli costitutivi di *bcl-2*. Induzione di differenziazione della linea cellulare HL-60 mediante trattamento con TPA o acido retinoico porta ad una regolazione negativa del trascritto e della proteina. Risultati simili si osservano in altre linee non trattate con agenti virali quali la vitamina D3 e TPA. Questi dati indicano che l'espressione del gene *bcl-2* è regolata dalla differenziazione, ed in particolare la progressione maturativa si accompagna, sia *in vivo* che *in vitro*, ad una regolazione negativa del gene.

È da notare inoltre che, contrariamente a quanto osservato in cellule emopoietiche, il gene *bcl-2* viene regolato positivamente in linee di neuroblastoma indotte a maturare con acido retinoico. Sembra pertanto che i processi maturativi siano associati con una differente regolazione di *bcl-2*, in maniera tessuto-specifica.

Quale è il significato di *bcl-2* in cellule mieloidi, alla luce dei dati sulla sua attività anti-apoptotica?

In cellule progenitrici CD34+ l'espressione del gene *bcl-2* potrebbe conferire, insieme ad altri geni quale MDR, un vantaggio selettivo nei confronti di certe situazioni cliniche che potrebbero mettere a rischio la loro sopravvivenza, e quindi quello dell'intero sistema emopoietico. In cellule mature, la presenza o assenza del gene potrebbe giocare un ruolo sulle proprietà fisiologiche della cellula rispetto alla funzione e/o alla sopravvivenza.

## MODULAZIONE DELLA MORTE PRE-PROGRAMMATA DELLA CELLULA NEI LEUCOCITI POLIMORFONUCLEATI UMANI

**FABIO RE, NADIA POLENTARUTTI, SILVANO SOZZANI, ALBERTO MANTOVANI, FRANCESCO COLOTTA**

*Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano*

Le cellule polimorfonucleate mature circolanti sono fra i leucociti quelli con l'emivita più breve e, in vitro, vanno rapidamente incontro a morte cellulare programmata. In questo studio abbiamo esaminato la possibilità che segnali infiammatori, come citochine e prodotti batterici, possano regolare la sopravvivenza dei PMN. Si è visto che i PMN in coltura muoiono rapidamente, mostrando percentuali di sopravvivenza a 24, 48, 72 e 96 ore rispettivamente del  $97.3 \pm 1.9\%$ ,  $36.8 \pm 5.3\%$ ,  $14.5 \pm 3.1\%$  e  $4.2 \pm 2.9\%$  (media  $\pm$  SE di 20 diversi donatori). I PMN incubati con interleuchina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), *tumor necrosis factor*, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (CSF), *granulocyte-CSF* e *interferone- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), ma non con prototipici fattori chemiotattici (fMLP, C5a ricombinante, IL-8), hanno mostrato un marcato aumento della sopravvivenza con valori, dopo 72 ore di incubazione, varianti fra  $89.5 \pm 5.8\%$  per IL- $1\beta$  e  $47.6 \pm 6.4\%$  per IFN- $\gamma$ . L'emivita è di 35 ore per le cellule non trattate e di 115 ore per le cellule trattate con IL- $1\beta$ . I PMN trattati con lipopolisaccaride (LPS) o con un ceppo di streptococchi inattivati hanno anch'essi mostrato un'aumentata sopravvivenza rispetto alle cellule non trattate (rispettivamente  $94.4 \pm 3.2\%$  e  $95.5 \pm 2.4\%$  a 72 ore). I PMN trattati per 48 ore con IL- $1\beta$  e LPS mantengono la capacità di produrre anione superossido quando stimolati con fMLP e esteri del forbolo. Tutti gli induttori della sopravvivenza dei PMN proteggono queste cellule dalla morte cellulare programmata, in quanto riducono la proporzione di cellule con le caratteristiche morfologiche dell'apoptosi e la frammentazione del DNA in multipli di 180 pb. Quindi, alcune citochine e prodotti batterici possono prolungare la sopravvivenza dei PMN interferendo con il processo fisiologico dell'apoptosi. Il prolungamento della sopravvivenza può essere importante per la regolazione della resistenza dell'ospite e l'infiammazione, e può rappresentare uno stadio permissivo cruciale per alcune citochine e prodotti batterici che attivano l'espressione genica e le funzioni dei PMN.

## INDUZIONE GENICA NELLA MORTE PROGRAMMATA DELLA CELLULA: INDUZIONE DI C-FOS E C-JUN

**NADIA POLENTARUTTI, MARINA SIRONI, ALBERTO MANTOVANI, FRANCESCO COLOTTA**

*Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano*

La morte cellulare indotta da privazione di fattori di crescita è un evento programmato in cui è richiesta la trascrizione di geni. È pertanto ipotizzabile che geni codificanti per fattori trascrizionali possano giocare un ruolo importante in questo processo.

Noi abbiamo verificato questa ipotesi analizzando l'espressione e il coinvolgimento dei protooncogeni *c-fos* e *c-jun*, che codificano per fattori trascrizionali, in cellule linfoidi private dai fattori di crescita.

Linee cellulari dipendenti da IL6 e IL2 vanno incontro a morte programmata dopo la privazione del fattore di crescita, come dimostrato dall'analisi della morfologia delle cellule e del DNA frammentato. Analisi di Northern blot mostra che i protooncogeni *c-fos* e *c-jun* sono rapidamente indotti (entro 60') dopo la privazione del fattore di crescita in cellule murine dipendenti da IL6 e IL2. L'induzione è transiente, non essendo rilevabile a 120' dopo la privazione. L'induzione di questi protooncogeni è a livello trascrizionale, come dimostrato da esperimenti con actinomicina D e *run-off*. Oligonucleotidi antisenso contro mRNA di *c-fos* e di *c-jun* riducono consistentemente l'espressione di questi geni in cellule trattate. Questa riduzione era associata ad un aumento della sopravvivenza delle cellule linfoidi private del fattore di crescita, suggerendo che l'espressione dei protooncogeni *c-fos* e *c-jun* può rappresentare un importante evento precoce nell'attivazione del programma genetico della morte cellulare.

## **RUOLO DEL GENE BCL-2 IN CELLULE LINFOIDI NORMALI E DI LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (B-LLC)**

**DANIELA GOTTARDI, PAOLO GHIA, ALDA ALFARANO, MARIA GRAZIA GREGORETTI, MARINA SCHENA, FEDERICO CALIGARIS-CAPPIO**

*Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino*

Caratteristica essenziale della B-LLC è il progressivo accumulo di B linfociti maturi che sono >99% nella fase G<sub>0</sub> dal ciclo cellulare. Il prodotto del gene *bcl-2* regola la morte cellulare programmata (apoptosi): lo studio delle linee cellulari transfettate con il gene del *bcl-2* e dai topi transgenici per i minigeni *bcl-2-Ig* indica che il *bcl-2* conferisce una aumentata sopravvivenza ai B linfociti maturi *resting* e ne promuove l'accumulo inibendo la morte per apoptosi e favorendo il blocco in G<sub>0</sub>. Lo studio dell'espressione del *bcl-2* può quindi consentire di reinterpretare i meccanismi che portano a definire la B-LLC come una malattia da accumulo.

Abbiamo osservato la presenza di trascritti *bcl-2* in 24/24 casi di B-LLC. La quantità di trascritto nelle cellule di B-LLC è elevata, paragonabile a quella osservata nella linea cellulare Karpas 422 che presenta la classica traslocazione t(14;18) dal locus *bcl-2*. L'espressione di *bcl-2* nelle cellule di B-LLC non dipende da una *gene amplification* e neppure da riarrangiamenti genici [a differenza di quanto accade nei linfomi follicolari con la t(14;18)], dal momento che in nessuno dei nostri casi studiati mediante Southern Blot e impiega dei *probes major breakpoint region*, *minor breakpoint region* e *5' breakpoint region* era presente un riarrangiamento. L'emivita dello mRNA di *bcl-2* dalle cellule di B-LLC è, analogamente a quella dei B linfociti normali, di 2h 30'/3h: di conseguenza, gli aumentati livelli di *bcl-2* non dipendono da un'aumentata stabilità del messaggio. L'espressione di *bcl-2* può essere modulata (ma non abolita) da stimoli e citochina che determinano attivazione B linfocitaria. Inducendo la proliferazione della cellula di B-LLC, mediante una combinazione di protocolli di stimolazioni mitogeniche che utilizzano IL-2 e IL-4, si ha una riduzione dei livelli sia di messaggio che di proteina stabile nel tempo, suggerendo la possibilità che, nella cellule di B-LLC l'espressione di *bcl-2* e l'attività proliferativa siano inversamente correlate. Analoga regolazione della espressione di *bcl-2* si osserva nei B linfociti normali ottenuti da tonsilla: i B linfociti mantellari (*resting*) sono *bcl-2* positivi, i blasti B dei centri germinativi sono *bcl-2* negativi. Coltivando in vitro cellule di B-LLC in presenza di oligonucleotidi antisenso fosforotioati al fine di bloccare la traduzione dello mRNA per il *bcl-2* abbiamo osservato la frammentazione del DNA,



caratteristica dell'apoptosi, in 2/5 casi di B-LLC.

L'insieme di questi dati porta a ritenere plausibile l'ipotesi che l'elevata espressione di bcl-2 nelle cellule di B-LLC inibisca l'apoptosi e conferisca a queste cellule il vantaggio di sopravvivenza che ne determina il progressivo accumulo.

## INDICE APOPTOTICO NEI LINFOMI MALIGNI

**S. PILERI, E. SABATTINI, S. FAGGI, G. MELILLI, M. BENNI, A. BOCCHI,  
P. GHERLINZONI, L. LEONCINI\***

*Sezione di Istologia Emolinfopatologica - Istituto di Ematologia, I Servizio di Anatomia Patologica, Università di Bologna*

*\*Istituto di Anatomia Patologica - Università di Siena*

L'ampiezza della frazione di crescita e la tendenza alla morte cellulare rappresentano due elementi di primaria importanza nel decorso dei processi neoplastici. Tra le possibili modalità di morte cellulare, particolare importanza ha l'apoptosi, fenomeno geneticamente programmato, che si realizza mediante un clivaggio endonucleolitico del DNA a livello di siti internucleosomali, in assenza di alterazioni della membrana cellulare e degli organelli intracitoplasmatici. Il processo comporta la frammentazione del DNA in corpuscoli (corpi apoptotici), i quali al microscopio si presentano rotondeggianti di dimensioni piuttosto variabili, intensamente basofili ed otticamente densi. Alcuni lavori hanno recentemente indicato l'esistenza di una correlazione inversa fra la tendenza all'apoptosi e l'espressione del prodotto dell'oncogene *bcl-2*: in particolare, quest'ultimo – sintetizzato in maniera indipendente rispetto alla *t(14,18)* – fungerebbe da "antidoto" nei confronti della morte programmata cellulare.

In 50 linfomi non-Hodgkin corrispondenti alle principali categorie dell'Updated Kiel Classification, sono stati studiati e correlati tra loro i seguenti parametri: 1) *indice apoptotico*, mediante analisi citomorfometrica; 2) *indice proliferativo*, tramite conta delle mitosi e determinazione immunocitochimica della molecola Ki-67; 3) *espressione del prodotto dell'oncogene bcl-2*, per via immunohistologica. Quest'ultimo parametro è stato espresso esclusivamente in termini di positività o negatività, dal momento che la maggior parte dei casi è apparsa rispondere alla legge del tutto o del nulla.

L'indice apoptotico e l'espressione del prodotto di *bcl-2* sono risultati fra loro inversamente correlati, mostrando i linfomi *bcl-2+* un basso indice apoptotico, e viceversa. Un'analogha correlazione inversa è stata osservata fra l'indice proliferativo e l'espressione della proteina *bcl-2*, mentre gli indici apoptotico e proliferativo hanno evidenziato una correlazione di tipo diretto, anche se non lineare. Tutti i risultati ottenuti si sono rivelati statisticamente significativi ed indipendenti dall'istotipo del linfoma. In analisi multivariata, l'indice apoptotico è apparso il parametro più strettamente correlato alla *lethality rate*.

In termini generali, i risultati ottenuti suggeriscono che sia l'attività proliferativa che l'attitudine all'apoptosi hanno un ruolo importante nel determinare le caratte-

ristiche del tumore, influenzando, ad esempio, sul volume della massa neoplastica, e che il prodotto di bcl-2 sembra svolgere un'azione modulante nei confronti di entrambe queste funzioni. Certamente, queste supposizioni richiedono di essere confermate su più ampie casistiche, non tralasciando di accertare anche le eventuali correlazioni fra l'espressione del prodotto dell'oncogene bcl-2 e l'infezione da virus di Epstein-Barr.

## **HIV-1 E MORTE PER APOPTOSI DEI PROGENITORI EMPOIETICI (CD34)**

**G. VISANI, G. ZAULI, P. TOSI, M. VITALE, M.C. RE, G. FURLINI, L. ZAMAI, E. FELICIERI, D. GIBELLINI, B.R. DAVIS, S. CAPITANI, M. LAPLACA, S. TURA**

*Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna*

*Istituto di Microbiologia, Università di Bologna*

*Istituto di Anatomia Umana, Citomorfologia-CNR, Università di Bologna*

*Istituto di Anatomia Umana, Ferrara*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Brescia*

*Medical Research Institute, S. Francisco, USA*

In questo studio è stato valutato l'effetto di una esposizione a breve termine a due differenti ceppi linfocitotropi HIV-1 (HIV III B e ICR-3) sulla sopravvivenza di progenitori (CD34+) emopoietici midollari purificati da donatori HIV-1-negativi e di una linea cellulare emopoietica CD34 positiva e fattore-dipendente (TF-1).

È stato osservato all'indagine citofluorimetrica un significativo aumento ( $p < 0.05$ ) nella frequenza di morte cellulare per apoptosi sia nella popolazione cellulare CD34+ che nella linea TF-1, senza peraltro alcun segno di replicazione virale nelle cellule trattate.

L'apoptosi indotta da HIV-1 è probabilmente attivata dall'interazione della glicoproteina gp120 dell'envelope con il recettore CD4. In esperimenti crociati, il trattamento della TF-1 con gp120 ricombinante più un anticorpo policlonale anti-gp120 o con l'anticorpo anti-CD4+ IgG di coniglio ha significativamente aumentato la percentuale di morte per apoptosi.

Questi dati indicano che HIV-1 (e la gp120 da sola) può esercitare un ruolo diretto nella patogenesi delle citopenie periferiche nei pazienti portatori di AIDS, inducendo morte per apoptosi delle cellule progenitrici emopoietiche senza la necessità di una infezione diretta.

## **IL RIARRANGIAMENTO BCR/ABL PROMUOVE LA SOPRAVVIVENZA DEI PRECURSORI EMPOIETICI ATTRAVERSO LA SOPPRESSIONE DELL'APOPTOSI**

**P. FARABEGOLI, G. MARTINELLI, M. BUZZI, S. TURA, M.A. SANTUCCI**

*Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna*

La morte cellulare indotta in interfase da basse dosi di radiazioni ionizzanti è almeno in parte attribuibile ad attivazione dell'apoptosi. Noi abbiamo valutato il ruolo dell'espressione della proteina p210, prodotto del gene chimerico bcr/abl nella regolazione dell'apoptosi radioindotta in una linea di progenitori emopoietici a discreto grado di commissionamento, la 32D. Tale linea è stabilmente IL-3 dipendente per la proliferazione in vitro e muore per apoptosi a seguito della deprivazione di IL-3 per 24-48 ore. L'esposizione ad una singola dose di radiazioni ionizzanti, pari a 2 Gy ne induce morte per apoptosi, come dimostrato dalla comparsa dei caratteristici frammenti di degradazione del DNA a basso peso molecolare. L'espressione della p210 inibisce l'apoptosi radioindotta in due differenti subcloni di 32D transfettati col gene bcr/abl, rispettivamente denominati PC1 (espansione policlonale) e LG7 (espansione clonale).

Questi risultati suggeriscono che il prolungamento della sopravvivenza cellulare, dovuto alla inibizione della morte cellulare programmata contribuisca alla espansione mieloide in corso di Leucemia Mieloide Cronica. Esso può eventualmente contribuire alla maggiore suscettibilità del clone trasformato ad eventi genetici secondari ed alla trasformazione blastica terminale.

## ACIDO TRANSRETINOICO E INDUZIONE DI APOPTOSI NELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI

**P. TOSI, G. VISANI, D. GIBELLINI, G. ZAULI, E. OTTAVIANI, A. CENACCHI,  
B. GAMBERI, S. MANFROI, S. TURA**

*Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna*

*Istituto di Microbiologia, Università di Bologna*

*Istituto di Anatomia Umana, Università di Ferrara*

L'acido all-transretinoico (ATRA) è considerato, al momento, un utile strumento terapeutico per la leucemia acuta a promielociti (LANL M3). Questo farmaco è in grado di provocare modificazioni morfologiche e differenziamento funzionale in cellule di LANL M3 sia *in vitro* che *in vivo*; il suo meccanismo d'azione, tuttavia, non è stato a tutt'oggi completamente chiarito. In questo studio abbiamo valutato, con metodo quantitativo, gli effetti dell'ATR sul fenomeno dell'apoptosi in cellule di LANL M3 di 9 pazienti. Dopo 1, 3 e 8 giorni di coltura liquida in presenza di ATRA  $10^{-6}$  molare, 6 su 9 casi hanno mostrato un incremento progressivo dell'apoptosi che raggiungeva il suo massimo dopo 8 giorni di coltura in percentuale variabile dal 19 al 52%. In tutti i campioni trattati, tuttavia, si evidenziavano segni morfologici di differenziamento in senso granulocitario e monocitario.

Successivamente sono state studiate le cellule di 9 pazienti con LANL di differenti citotipi (2 M1, 3 M2, 3 M4 ed 1 M5) e in presenza di ATRA si è verificato un incremento dell'apoptosi (in media il 40%). Questi dati indicano che l'apoptosi è uno dei meccanismi con cui l'ATRA esercita la sua azione ma, almeno nella LANL M3, non è l'unico fenomeno responsabile dei suoi effetti.

---

Lavoro finanziato in parte da MURST, fondi 60-40%.

**Colture a lungo termine:  
aspetti e applicazioni cliniche**

## **RUOLO DELLO STROMA MIDOLLARE NELLA PRODUZIONE DI PRECURSORI EMOPOIETICI PERIFERICI E DA SANGUE DI CORDONE IN COLTURE A LUNGO TERMINE**

**R. SCHIRÒ, D. LONGONI, A. MANGIONE, G. MASERA, A. BIONDI**

*Clinica Pediatrica, Università di Milano, Ospedale S. Gerardo, Monza.*

Il modello di crescita dei precursori emopoietici in Colture a Lungo Termine permette la produzione continua di cellule clonogeniche per oltre 2 mesi a partenza da un singolo inoculo midollare. In questo sistema si creano pertanto le condizioni che regolano l'equilibrio tra differenziazione e automantenimento dell'esiguo pool di cellule staminali presenti nel campione di partenza. Tale regolazione si realizza aderente che contribuisce grazie alla formazione di uno strato alla liberazione di fattori solubili stimolatori/inibitori con meccanismi di regolazione discreta nel tempo. In tale sistema è pertanto possibile valutare e quantizzare il contenuto in Long Term Culture Initiating Cells (LTC-IC): cellule estremamente immature responsabili della produzione successiva di progenitori. Lo stroma si sviluppa data la presenza nel midollo di fibroblasti adipociti e cellule endoteliali e la possibilità di formazione di stroma in vitro si ottiene unicamente inoculando cellule midollari. D'altra parte in distretti periferici quali sangue circolante e cordone ombelicale sono contenuti precursori indifferenziati. Scopo dello studio è stata l'analisi del contenuto di LTC-IC in sangue periferico umano normale e in sangue di cordone cresciuti su stroma midollare allogeneico preirradiato. Il contenuto di LTC-IC è risultato simile o maggiore al controllo midollare per il sangue di cordone: l'interazione tra precursori emopoietici e lo stroma sembra essere regolato da molecole di adesione già descritte nell'interazione intracellulare del microambiente midollare.



## CARATTERIZZAZIONE IN COLTURA A LUNGO TERMINE DI CELLULE CD34+ SEPARATE MEDIANTE ELUTRIAZIONE PER CENTRIFUGAZIONE CONTROCORRENTE

**C. ALMICI, C. CARLO STELLA, JE WAGNER\*, V. RIZZOLI**

*Cattedra di Ematologia, Centro Trapianti di Midollo Osseo, Università di Parma, Parma*

*\*Hematology/Oncology Department, University of Minnesota, USA.*

La disponibilità di tecniche che permettano la separazione su larga scala di frazioni cellulari altamente arricchite in cellule progenitrici emopoietiche, rappresenta un requisito fondamentale sia per studi biologici finalizzati a studiare le interazioni cellula-cellula, sia per applicazioni cliniche, quali il trapianto di midollo osseo.

Abbiamo utilizzato l'elutrazione per centrifugazione controcorrente (ECC) e l'espressione dell'antigene CD34 al fine di frazionare cellule di midollo osseo umano normale e caratterizzare le diverse popolazioni clonogeniche così ottenute. Cellule mononucleate ( $3.5-6.3 \times 10^8$ ) di midollo osseo umano normale (n=8) sono state iniettate all'interno di un rotore per elutrazione Beckman JE-5.0, equipaggiato con una camera standard (Beckman Instr., Spinco Division, Palo Alto, CA, USA), ad una velocità di flusso di 15 ml/min, con una velocità del rotore di 3000 rpm e ad una temperatura di 22°C. Sono state ottenute (fase 1) quattro frazioni cellulari utilizzando velocità di flusso, rispettivamente, di 25, 29, 33 e 37 ml/min; l'ultima frazione è stata ottenuta raccogliendo le cellule rimaste nella camera di elutrazione dopo aver fermato la centrifuga (frazione rotor off=R/O). Le cellule delle frazioni 25/29, 33/37 e R/O sono state poi incubate, in sequenza, in fiasche AIS-MicroCELLector ricoperte da agglutinina di soia (fase 2) e in fiasche ricoperte con l'anticorpo monoclonale anti-CD34 (fase 3). Al termine delle tre fasi della procedura le frazioni arricchite in cellule CD34+ sono state raccolte e valutate per: 1) espressione di antigeni di superficie (CD34, CD33, CD38, HLA-DR); 2) incidenza di progenitori emopoietici midollari (CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E) in coltura a breve ed a lungo termine (LTC-IC). Il 66-94% delle cellule delle diverse frazioni sono risultate positive per l'espressione dell'antigene CD34. A differenza delle cellule CD34+ delle frazioni 33/37 e R/O, le cellule CD34+ della frazione 25/29 sono risultate negative per CD38, CD33, CD19, ma positive per HLA-DR. In coltura a breve termine in metilcellulosa dalla frazione 25/29 sono state ottenute  $185 \pm 63.3$  colonie per  $0.5 \times 10^5$  cellule seminate, mentre dalle frazioni 33/37 e R/O rispettivamente  $5111.3 \pm 298.5$  e

4553±764.6 in confronto a 175.5±68.9 colonie per  $0.5 \times 10^5$  cellule del campione non sottoposto a separazione. Le cellule di ogni frazione sono state seminate su stroma allogenico irradiato per valutare la capacità di automantenimento in coltura a lungo termine; alla seconda e quinta settimana di coltura è stata sacrificata una fiasca per la valutazione del numero di cellule e di colonie presenti in ogni singola frazione in riferimento sia alla componente cellulare non aderente che aderente allo stroma.

In conclusione, i nostri dati evidenziano che combinando l'ECC con tecniche di separazione immunologica, è possibile frazionare l'eterogeneo compartimento delle cellule CD34+ ottenendo sottopopolazioni caratterizzate da differente attività biologica.

## LA PROLIFERAZIONE DI PROGENITORI EMATOPOIETICI UMANI NORMALI È STIMOLATA DA “COLONY-STIMULATING FACTORS” (CSFs) IN COLTURE A LUNGO TERMINE (LTC) IN PRESENZA OD ASSENZA DI STROMA

**ROBERTO M. LEMOLI, SUBASH C. GULATI, SANTE TURA.**

*Istituto di Ematologia “Seràgnoli” - Università di Bologna*

*Department of Medicine, MSKCC, New York, USA*

L'attività proliferativa di *early acting* (r-hu-IL1, r-hu Stem Cell Factor) e *intermediate-late acting* CSFs (r-hu-IL3, r-hu-GM-CSF), da soli e combinati, è stata studiata in LTC in presenza od assenza di stroma formato (sacche gas-permeabili).

Il nostro studio mostra: 1) la capacità delle sacche gas-permeabili di sostenere la coltura a lungo termine di cellule ematopoietiche in assenza di *feeder-layer*; 2) l'attività proliferativa dei precursori ematopoietici è fortemente stimolata dalla addizione di CSFs; 3) diversi CSFs inducono diversi effetti proliferativi per cui *early acting* CSFs (IL1, SCF), in questo sistema sperimentale, inducono la stimolazione e la maturazione delle cellule ematopoietiche con perdita della capacità di *self-renewal*; 4) *intermediate* o *late-acting* CSFs inducono l'espansione del compartimento proliferativo, commissionato ematopoietico senza esaurire il pool delle cellule staminali.

## **COLTURE A LUNGO TERMINE: RUOLO DI FATTORI DI CRESCITA EMOPOIETICI NELL'EMOPOIESI NORMALE E MIELODISPLASTICA**

**W. PIACIBELLO, F. SANAVIO, A. SEVERINO, A. STACCHINI. S. MORELLI, L. FUBINI, M. AGLIETTA**

*Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, Università di Torino e Novara*

Le sindromi mielodisplastiche costituiscono un eterogeneo gruppo di disordini clonali della cellula staminale pluripotente, caratterizzati da emopoiesi inefficace, che si traduce in citopenia periferica contrastante con un midollo spesso ipercellulare.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare: 1) la possibilità dello studio delle colture a lungo termine in questa patologia; 2) il possibile effetto *enhancing* dello Stem Cell Factor (SCF) sulla proliferazione e sull'automantenimento dei progenitori emopoietici più immaturi.

Abbiamo studiato campioni provenienti da 16 pazienti con MDS alla diagnosi e, come controllo, campioni di 4 donatori normali. Per l'assay a lungo termine utilizziamo cellule midollari molto arricchite di progenitori emopoietici mediante selezione negativa e le coltiviamo a bassa tensione di O<sub>2</sub> per almeno 5-7 settimane in microwells. Anziché i *feeder-layers* tradizionali abbiamo utilizzato una miscela di vari fattori di crescita (tra cui SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-1 ed IL-6).

Mentre i midolli normali sono in grado di perfetta crescita fino a 7 e più settimane, con un output di CFU-GM 5-6 volte superiori a quelle dell'input, soprattutto in presenza di SCF, i progenitori emopoietici presenti nei campioni midollari di MDS non sono in grado di crescita a lungo termine.

La presenza di SCF è in grado soltanto di indurre una rapida e transiente espansione di un pool di pre-CFU-GM di entità assai variabile da caso a caso.

## **PROGENITORI EMATOPOIETICI CAPACI DI SOSTENERE L'EMATOPOIESI A LUNGO TERMINE IN-VITRO CIRCOLANO NEL SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI CON TUMORI SOLIDI TRATTATI CON CHEMIOTERAPIA E FATTORI DI CRESCITA**

**M. BREGNI, S. SIENA, J. TONG, E.F. SROUR, R. HOFFMAN, A. M. GIANNI**

*Istituto Nazionale Tumori, Milano, Italia;*

*Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA*

Il sangue periferico di pazienti con tumore, dopo terapia con farmaci ad alte dosi e fattori di crescita ematopoietici, comprende grandi quantità di progenitori ematopoietici orientati verso la differenziazione mieloide, eritroide e megacariocitica; non è chiaro se comprenda anche cellule più indifferenziate, capaci di sostenere l'ematopoiesi a lungo termine. A questo scopo il sangue periferico di sei pazienti con carcinoma della mammella trattate con chemioterapia antitumorale (ciclofosfamide ad alte dosi, 7 g/m<sup>2</sup>) e fattori di crescita (IL-3+GM-CSF: 3 pazienti; IL-3+G-CSF: 2 pazienti; PIXY321: 1 paziente) è stato studiato nella fase di ripresa ematopoietica per verificare la frequenza: a) delle cellule con fenotipo CD34+/HLA-DR-; b) dei progenitori CFU-mix, CFU-GM, BFU-E, BFU-MK; c) delle cellule capaci di dare origine a coltura a lungo termine.

Dopo chemioterapia ad alte dosi ed infusione di citochine il sangue periferico conteneva un numero di progenitori ematopoietici fino a 930 superiore rispetto al sangue e/o al midollo osseo in condizioni normali; inoltre cellule CD34+/HLA-DR-, isolate dal sangue periferico e poste in coltura a lungo termine in assenza di stroma, hanno dato origine a progenie cellulare per 12 settimane, a CFU-GM per 8-10 settimane e a BFU-E per 2-6 settimane. Questi risultati suggeriscono che il compartimento circolante è in grado di ricostituire anche a lungo termine il sistema ematopoietico di pazienti sottoposti a terapie mieloablativa, e di costituire un bersaglio ottimale per manipolazioni geniche.

## **CAPACITÀ DELLE PBSC ESPANSE CON G-CSF A SOSTENERE L'EMATOPOIESI A LUNGO TERMINE IN VITRO**

**L. TEOFILI, S. IOVINO, S. SICA, A. DI MARIO, G. MENICHELLA, G. LEONE**

*Istituto di Semeiotica Medica, Università Cattolica, Roma*

Per valutare la capacità delle cellule staminali del sangue periferico (PBSC) a sostenere l'ematopoiesi a lungo termine abbiamo combinato tecniche di separazione cellulare con tests clonogenici su cellule in coltura a lungo termine. Cellule mononucleate, come tali ottenute con ficoll o arricchite in CD 34+ dopo centrifugazione su percoll e immunoselezione magnetica, provenienti dal midollo o da leucaferesi periferiche (eseguite di ripresa midollare dopo chemioterapia +G-CSF), sono state poste in coltura a lungo termine su stromi midollari *feeder* irradiati ed a scadenza settimanale è stato valutato il contenuto in CFU-GM e BFU-E della popolazione in sospensione ed aderente. Non sono state riscontrate differenze significative nel contenuto di CFU-GM e BFU-E tra le cellule di provenienza midollare e periferica durante le varie settimane, salvo forse un maggior contenuto in CFU-GM delle monucleate periferiche alla terza settimana di coltura. La durata delle cellule in coltura (>5 settimane) è risultata non dipendere dalla loro provenienza.

## **DISTRIBUZIONE DELLE COMPONENTI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE E DEI RECETTORI PER LE MOLECOLE ADESIVE NEL MICROAMBIENTE MIDOLLARE DELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA**

**M. A. SANTUCCI, D. SOLIGO, G. P. BAGNARA, P. L. STRIPPOLI, L. BONSI, S. TURA**

*Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna*

L'adesione al microambiente midollare gioca un ruolo cruciale nel controllo della proliferazione e del differenziamento dei precursori emopoietici. Le cellule Ph1+ sono deficitarie nell'adesione al compartimento stromale dell'emopoiesi. Tale difetto rende ragione del prematuro rilascio di precursori nel sangue periferico e della loro recircolazione attraverso gli organi e i tessuti, incluso il midollo osseo; con ogni probabilità contribuisce anche alla espansione del clone trasformato sulla controparte normale. Il coinvolgimento del microambiente midollare nella leucemia mieloide cronica (LMC) è tuttora argomento controverso. L'osservazione che l' $\alpha$ -IFN controlla l'emopoiesi Ph1+ attraverso la sua attività sul microambiente midollare costituisce una prova indiretta di un'alterazione funzionale di questo compartimento nella LMC. Tale alterazione funzionale potrebbe dipendere da una disregolazione nella produzione dei messaggi solubili a segno positivo e negativo e/o nelle proprietà adesive. I risultati del nostro studio non evidenziano differenze significative nel livello di produzione di fattori di crescita (IL-3, cKit, GM-CSF e G-CSF) da parte delle cellule stromali del microambiente midollare normale e della LMC, nè nella distribuzione delle molecole adesive della matrice extracellulare (collagene I, II, IV e VII, laminina, fibronectina, vitronectina ed emonectina) mentre mostrano una ridotta o aberrante espressione delle  $\beta$ -1 integrine VLA-1 e VLA-3 sulle cellule dello stroma midollare della LMC. Quanto tale difetto rappresenti una caratteristica costitutiva del microambiente midollare della LMC o piuttosto un epifenomeno indotto da altre popolazioni accessorie è argomento di studio. In entrambe i casi esso potrebbe essere implicato nel vantaggio proliferativo dell'emopoiesi clonale.

**Consulenza editoriale a cura di  
ViGiEffe Edizioni s.n.c.  
via Cardano, 58  
PAVIA**

**stampa a cura di  
Galli Thierry Stampa  
MILANO**

---

**pubblicato a Pavia il 25 maggio 1993**