

*SOCIETÀ ITALIANA DI
EMATOLOGIA SPERIMENTALE*

DISCUTIAMONE INSIEME

Firenze, 5 luglio 1993

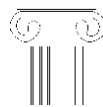
*Stem cell factor: aspetti biologici e
possibili applicazioni cliniche*

Oligonucleotidi antisenso

HAEMATOLOGICA

vol. 78, Supplement No. 5, December 1993

Official Organ for the Italian Society of Hematology
and the Italian Society of Experimental Hematology
Journal founded in 1920 by Adolfo Ferrata
Editor-in-Chief: Edoardo Ascari



Il Pensiero Scientifico Editore, Roma

HAEMATOLOGICA vol. 78, Supplement No. 5, December 1993

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)
“Discutiamone Insieme”

*Stem cell factor:
aspetti biologici e possibili applicazioni cliniche*

Oligonucleotidi antisenso

DISCUTIAMONE INSIEME

**STEM CELL FACTOR:
ASPETTI BIOLOGICI
E POSSIBILI APPLICAZIONI CLINICHE**

(coordinatori: G.P. Bagnara, W. Piacibello)

<i>M.F. Brizzi, G. Cavalloni, M. Pavan, M.G. Aronica, M.G. Zini, L. Pegoraro</i> Regolazione dell'espressione del c-kit in cellule emopoietiche umane	pag. 1
<i>F. Timeus</i> Caratterizzazione fenotipica e cinetica dei progenitori emopoietici del sangue di cordone ombelicale e loro regolazione	pag. 2
<i>G. Benedetti, C. Cherasco, P. Bondesan, D. Caracciolo, A. Pileri, A.M. Gianni, C. Tarella</i> Attività dello Stem Cell Factor (SCF) su progenitori emopoietici immaturi selezionati mediante immunotossina anti-cd71	pag. 3
<i>A. Fortuna, R. Lemoli</i> Lo Stem Cell Factor (SCF, C-kit ligand) aumenta sinergisticamente la proliferazione di cellule emopoietiche umane CD34 ⁺ e CD34 ⁺ DR ⁻ mediata dall'IL-9.....	pag. 4
<i>M. Fogli, R. Lemoli</i> IL-11 stimola la proliferazione di cellule emopoietiche umane CD34 ⁺ e CD34 ⁺ DR ⁻ e sinergizza con Stem Cell Factor (SCF), IL-3 e GM-CSF.....	pag. 5
<i>A. Grossi, P. Bacci, A.M. Vannucchi, G. Longo, D. Rafanelli, P. Rossi Ferrini</i> Effetto della somministrazione dello Stem Cell Factor (SCF) sulla megacariocitopoiesi murina	pag. 6
<i>C. Piaggio, M. Podestà, A. Bacigalupo</i> Stem Cell Factor (SCF) e aplasia midollare (SAA): effetto in vitro su progenitori emopoietici.....	pag. 7
<i>D. Ferrero, W. Piacibello, A. Severino, F. Sanavio, P. Bresso, P. Pregno, E. Gallo, A. Aglietta</i> Effetto dello Stem Cell Factor (SCF) umano ricombinante sulla proliferazione e sul mantenimento in vitro dei progenitori ematopoietici nelle sindromi mielodisplastiche.....	pag. 8
<i>F. Tumietto, P. Costigliola, P. Strippoli, L. Bonsi, G. Bubola, E. Ricchi, F. Chiodo, G.P. Bagnara</i> Infezione da HIV, AIDS ed espressione dello Stem Cell Factor (SCF) in cellule stromali midollari.....	pag. 9
<i>S. Ferrari, A. Grande, R. Manfredini, E. Tagliafico, R. Balestri, M. Pizzanelli, P. Zucchini</i> Studio dell'espressione dello Stem Cell Factor (SCF) e del corrispondente recettore in blasti di leucemia acuta	pag. 10
<i>L. De Felice, A. Tafuri, T. Valentini, M.G. Mascolo, C. Ciliberti, M.T. Petrucci, F. Mandelli</i> Effetto dello Stem Cell Factor (SCF) sulla proliferazione e la sensibilità in vitro all'ARA-C delle leucemie mieloidi acute. Confronto con altri fattori di crescita.....	pag. 11
<i>S. Siena</i> Effetto dello Stem Cell Factor (SCF) sui progenitori megacariocitari circolanti nel sangue periferico dopo terapia con ciclofosfamide ad alte dosi e fattori di crescita.....	pag. 12

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI C-KIT IN CELLULE EMOPOIETICHE UMANE

MARIA FELICE BRIZZI, GIULIANA CAVALLONI, MARZIA PAVAN, MARIA GRAZIA ARONICA, MARIA GABRIELA ZINI, LUIGI PEGORARO
Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino

Il proto-oncogene c-kit codifica per un recettore transmembrana che appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici e che presenta molte omologie con i recettori del CSF-1 e del PDGF. Il ligando per questo recettore è stato denominato dai gruppi che indipendentemente lo hanno clonato *Stem Cell Factor (SCF)*, *Mast Cell Growth Factor (MGF)*, *Steel Locus Factor* o più semplicemente *Kit Ligand*.

Sia il c-kit che il suo ligando sono implicati nella regolazione del tessuto emopoietico normale e leucemico. L'MGF sinergizza con vari fattori di crescita quali il GM-CSF e l'IL-3 nella stimolazione proliferativa e differenziativa di vari tipi di cellule progenitrici emopoietiche. Al fine di chiarire i meccanismi molecolari che sono alla base di questi sinergismi nonché della espressione di c-kit, noi abbiamo studiato, in cellule mieloidi umane dipendenti da fattori di crescita, gli effetti di alcune citochine, del ligando specifico e degli attivatori della protein chinasi C sulla trascrizione di c-kit e sull'espressione della proteina. Il trattamento con MGF o GM-CSF regola negativamente l'espressione di c-kit con un meccanismo verosimilmente di tipo post-trascrizionale, mentre quello con IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e IL-9 non produce alcun effetto. Gli esteri del forbolo – che come è noto mimano l'attivazione funzionale delle cellule differenziate – regolano negativamente c-kit sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, senza peraltro modificare l'attività funzionale del recettore.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E CINETICA DEI PROGENITORI EMOPOIETICI DEL SANGUE DI CORDONE OMBELICALE

F. TIMEUS, N. CRESCENZIO, D. MARRANCA, U. RAMENGI, M. GEUNA**,
G.P. BAGNARA*, L. BONSI*, V. GABUTTI

*Istituto di Clinica Pediatrica; **Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino; *Centro Interdipartimentale G. Prodi, Istituto di Istologia e Embriologia, Università di Bologna*

L'elevato numero di progenitori emopoietici contenuti nel sangue di cordone ombelicale ha recentemente permesso l'utilizzo di tali cellule per il trapianto.

Per chiarire la biologia della cellula staminale cordonale abbiamo valutato le seguenti caratteristiche: i subset CD34⁺/CD33⁻, CD34⁺/CD33⁺ e l'espressione di c-kit mediante citometria a flusso nelle cellule mononucleate non aderenti deplete di linfociti T, B e cellule NK; il numero di progenitori in ciclo mediante suicidio con timidina tritiata; la produzione di alcune citochine (GM-CSF, IL-6, LIF) da parte di cellule mononucleate cordonali. Abbiamo inoltre valutato la possibilità di espandere in vitro progenitori cordonali mediante combinazioni di citochine.

Le cellule CD34⁺ non esprimenti il CD33 sono risultate il 58±27% delle CD34⁺ totali. La percentuale di cellule CD34⁺ esprimenti c-kit è risultata 91±6% (44±19% nel sangue periferico di soggetti normali). La percentuale di BFU-E±CFU-mix e CFU-GM in fase S era rispettivamente 88±7% e 77±20%. Le concentrazioni di IL-6, GM-CSF e LIF nel PHA-LCM di sangue cordonale sono risultate significativamente più elevate che nel PHA-LCM di soggetti adulti normali. Non-T, non-B, non-NK MNAC sono state preincubate per 7 giorni con le due seguenti combinazioni di citochine: A) rhIL-3 100 U/ml + rhIL-6 100 U/ml + rhSCF 50 ng/ml + rhLIF 50 ng/ml; B) rhSCF 50 ng/ml + rhLIF 50 ng/ml. Il numero di BFU-E + CFU-mix è aumentato 1.7 volte con la combinazione A e 1.4 volte con la combinazione B; il numero di CFU-GM è aumentato di 33 volte con A e 22 volte con B.

Vi è stato un significativo aumento delle cellule CD34⁺/CD33⁺ con entrambe le associazioni di citochine: 25.7 volte con A e 9.3 con B. Un lieve incremento delle cellule CD34⁺/CD33⁻ (1.6 volte) è stato ottenuto solo con l'associazione A.

I risultati ottenuti indicano che i progenitori emopoietici del sangue di cordone sono in fase di attiva proliferazione, le cellule staminali CD34⁺ contengono un'importante quota di elementi altamente immaturi CD33⁻ ed esprimono quasi tutte c-kit. Le possibilità di espansione in vitro sembrano interessare soprattutto il compartimento dei progenitori più differenziati.

ATTIVITÀ DELLO STEM CELL FACTOR (SCF) SU PROGENITORI EMOPOIETICI IMMATURI SELEZIONATI MEDIANTE IMMUNOTOSSINA ANTI-CD71

G. BENEDETTI^o, C. CHERASCO, P. BONDESAN, D. CARACCILO, A. PILERI, A.M. GIANNI*, C. TARELLA

*Divisione di Ematologia dell'Università di Torino, Ospedale Molinette; ^oIstituto di Clinica Medica I, Università di Perugia; *Istituto Nazionale Tumori, Unità Trapianto Midollo, Milano*

L'attività dello *Stem Cell Factor* (SCF) sui progenitori emopoietici commissionati e su quelli più immaturi sembra esplicarsi in associazione con altre citochine; l'SCF avrebbe cioè un ruolo sostanzialmente sinergizzante con gli altri fattori emopoietici. Nel nostro studio abbiamo analizzato l'attività dell'SCF su progenitori immaturi selezionati mediante un nuovo approccio basato sull'impiego di una immunotossina anti-CD71 (IT). È noto infatti che il CD71, recettore per la transferrina, è espresso dai progenitori commissionati proliferanti mentre manca sui progenitori immaturi quiescenti. Un anticorpo monoclonale anti-CD71 è stato quindi coniugato con la tossina S06 derivata dalla *saponaria officinalis*. Esponendo le cellule ad IT alla concentrazione di 10^{-7} M la crescita di colonie mieloidi ed eritroidi viene totalmente abolita. Tuttavia, il trattamento non danneggia le cellule più immature, che sono in grado di rigenerare, dopo 7-21 giorni di coltura liquida, la popolazione di progenitori commissionati. Numerosi fattori emopoietici, quali GM-CSF, IL-3, G-CSF, IL-6 e SCF, sono risultati variamente attivi nello stimolare la generazione di CFU-GM; tuttavia, nella prima settimana di coltura la massima stimolazione si è ottenuta con SCF da solo, senza osservare significative variazioni con l'aggiunta delle altre citochine. Il risultato indica che nelle fasi più precoci dell'emopoiesi l'SCF ha un ruolo predominante; questa sua attività sembra indipendente dalla presenza dei vari altri fattori di crescita testati.

LO STEM CELL FACTOR (SCF, C-KIT LIGAND) INCREMENTA SINERGISTICAMENTE LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE EMPOIETICHE UMANE CD34⁺ E CD34⁺CD33⁻DR⁻ MEDIATA DALL'IL-9

A. FORTUNA, R.M. LEMOLI

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

IL-9 è una citochina clonata di recente che ha mostrato un'azione proliferativa selettiva sui precursori emopoietici eritroidi. Nel nostro studio abbiamo valutato gli effetti della IL9 umana ricombinante, da sola o associata con altre citochine (SCF, IL3, GM-CSF) sulla crescita in vitro di precursori emopoietici purificati. Sono state utilizzate cellule midollari caratterizzate fenotipicamente come CD34⁺ e CD34⁺CD33⁻DR⁻. I saggi clonogenici sono stati eseguiti in presenza ed assenza di siero fetale. L'IL9 da sola non ha indotto la formazione di colonie. In presenza di eritropoietina (EPO), l'IL9 ha invece stimolato la proliferazione di colonie eritroidi (BFU-E) derivate da cellule CD34⁺ e CD34⁺CD33⁻DR⁻. La crescita IL9-dipendente di BFU-E è risultata aumentata in maniera additiva o sinergica dall'SCF, IL3 e GM-CSF. In particolare, la combinazione di IL9 e SCF ha indotto lo sviluppo di colonie eritroidi e multipotenti (CFU-GEMM) macroscopiche. In condizioni *serum-free*, l'IL9 ha stimolato la crescita di BFU-E in presenza di EPO. In associazione all'SCF si è evidenziato un marcato effetto sinergico sulla crescita di BFU-E e CFU-GEMM. L'IL9, usata singolarmente, ha mostrato un effetto minimo sulla proliferazione di colonie granulocito-macrofagiche (CFU-GM), ma ha aumentato il numero di CFU-GM derivate da cellule CD34⁺CD33⁻DR⁻ responsive all'IL3. L'attività dell'IL9 è stata anche studiata in un sistema di coltura liquida, specifico per la capacità di *self-renewal* dei precursori emopoietici (Delta Assay). In questo saggio, l'IL9 da sola ha mostrato un effetto minimo, mentre l'IL9 e SCF hanno agito sinergicamente inducendo la espansione di cellule CD34⁺CD33⁻DR⁻ capaci di dare origine a CFU-GM e BFU-E in colture secondarie in mezzo semisolido. Questi esperimenti indicano che l'IL9 è capace di iniziare la proliferazione di progenitori eritroidi molto immaturi (attività BPA) e questo effetto è potenziato dall'SCF ed altre citochine. Inoltre l'IL9 sinergizza in vitro con l'SCF nell'espansione di progenitori emopoietici pluripotenti.

IL11 STIMOLA LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE EMPOIETICHE UMANE CD34 E CD34⁺CD33⁻DR⁻ E SINER- GIZZA CON STEM CELL FACTOR (SCF), IL3 E GM-CSF

M. FOGLI, R.M. LEMOLI

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

Studi recenti hanno mostrato un possibile ruolo regolatorio dell'IL11 sulla proliferazione ed il differenziamento di precursori emopoietici umani e murini.

Nel nostro studio è stato valutato l'effetto della IL11 umana ricombinante, da sola, o associata ad altre citochine (SCF, IL3, GM-CSF), sulla crescita in vitro di precursori emopoietici purificati. Sono state utilizzate cellule CD34⁺ purificate dalla frazione mononucleata midollare mediante immunoassorbimento su colonna avidina-biotina e successivamente depletate dalle cellule CD33⁺DR⁺ con separazione immunomagnetica. Sono stati poi eseguiti saggi clonogenici in presenza ed assenza di siero fetale.

L'IL11, da sola, ha indotto la crescita di un piccolo numero di colonie granulocito-macrofagiche (CFU-GM), derivate da cellule midollari CD34⁺. Non è stata in grado invece di supportare la crescita di colonie dalle cellule CD34⁺CD33⁻DR⁻. L'aggiunta di eritropoietina (EPO) ha determinato l'aumento del numero di CFU-GM e indotto la crescita di colonie eritroidi (BFU-E) derivate dalla frazione CD34⁺, ma non dalla popolazione CD34⁺CD33⁻DR⁻.

La combinazione dell'IL11 con gli altri fattori (SCF, IL3, GM-CSF) in presenza di EPO ha determinato un aumento sinergico del numero di CFU-C. Inoltre, l'aggiunta di SCF ha favorito lo sviluppo di colonie macroscopiche eritroidi e multipotenti (CFU-GEMM). La risposta proliferativa all'IL11 dei precursori emopoietici, in condizioni *serum free* è risultata simile a quella delle colture contenenti siero.

L'effetto dell'IL11 è stato anche studiato in un sistema di coltura liquida, specifico per valutare la capacità di *self-renewal* dei precursori emopoietici (Delta Assay). In questo saggio, l'IL11 da sola ha mostrato un effetto minimo, mentre IL11 e SCF hanno agito sinergicamente e la loro azione proliferativa è risultata aumentata dall'aggiunta di GM-CSF.

Questi studi indicano che l'IL11 può essere considerata una citochina *permissiva*, capace cioè di favorire la proliferazione di cellule emopoietiche umane fortemente indifferenziate, che risultano così in grado di rispondere all'azione di altri CSFs. In particolare l'IL11 è risultata capace di sinergizzare in vitro con lo SCF nell'espansione dei progenitori emopoietici CD34⁺CD33⁻DR⁻.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DELLO STEM CELL FACTOR (SCF) SULLA MEGACARIOCITOPOIESI MURINA

A. GROSSI, P. BACCI, A.M. VANNUCCHI, G. LONGO, D. RAFANELLI,
P. ROSSI FERRINI

Divisione di Ematologia, Università di Firenze; USL 10/D, Firenze

Allo scopo di valutare l'effetto della somministrazione dello *Stem Cell Factor* (SCF) sulla megacariocitopoiesi murina, topi Swiss sono stati iniettati per sei giorni con SCF a dosi variabili da 25 a 200 ug/kg/giorno o con SCF (200 ug/kg/giorno) più rhEpo (8 u/giorno).

È stato osservato che lo SCF determina un incremento dose-risposta sul numero delle CFU-Mk sia midollari che spleniche, con un ulteriore significativo aumento determinato dall'associazione SCF+Epo.

In altri esperimenti in cui la somministrazione dello SCF – alle stesse dosi usate per i test clonogenici – è stata limitata a due giorni, sono stati valutati alcuni parametri di maturazione megacariocitaria. Il trattamento ha determinato un incremento dose-dipendente del numero dei megacariociti splenici e midollari, delle dimensioni megacariocitarie e dell'incorporazione di S35 nelle piastrine neoformate. In questo tipo di esperimenti l'associazione con rhEpo, usata sempre alla dose di 8 u/giorno, ha determinato un aumento non significativo dei valori, rispetto alla somministrazione del solo SCF.

I risultati ottenuti indicano, quindi, che lo SCF è capace di influenzare la megacariocitopoiesi e confermano che l'eritropoietina può intervenire come potenziatore nella regolazione della proliferazione dei progenitori megacariocitari.

STEM CELL FACTOR (SCF) E APLASIA MIDOLLARE (SAA): EFFETTO IN VITRO SU PROGENITORI EMOPOIETICI

C. PIAGGIO, M. PODESTÀ, A. BACIGALUPO

Divisione di Ematologia, Ospedale San Martino, Genova

È difficile quantificare il danno staminale presente nelle aplasie midollari: questo sia perché manca un sistema in vitro capace di identificare progenitori molto immaturi, sia perché la crescita in vitro dei progenitori più maturi – mieloidi o eritroidi – è probabilmente sottostimata.

In questo studio abbiamo testato l'effetto dello *Stem Cell Factor* (SCF) sulla crescita di progenitori emopoietici in pazienti affetti da anemia aplastica acquisita.

Undici campioni di sangue midollare sono stati coltivati in presenza di SCF: si è notato un aumento significativo ($p < 0.01$) nella crescita di progenitori eritroidi (BFU-E) e multipotente (CFU-GEMM), assenti nelle colture di base. Inoltre abbiamo testato la risposta allo SCF dei progenitori emopoietici presenti nel sangue periferico in pazienti trattati con G-CSF.

Dopo un'incubazione di 5 giorni in terreno liquido contenente GM-CSF+IL3+SCF è stato rilevato un aumento significativo di CFU-GM; questo incremento era raddoppiato se l'incubazione avveniva in presenza di GM-CSF+LIF.

Questi risultati confermano che la crescita in vitro di progenitori sia da sangue midollare che periferico può essere aumentata in presenza di SCF, ed è quindi sottostimata in condizioni di colture standard; suggerisce anche che tali progenitori sono presenti nel sangue periferico di pazienti aplastici trattati con G-CSF.

EFFETTO DELLO STEM CELL FACTOR UMANO RICOMBINANTE SULLA PROLIFERAZIONE E SUL MANTENIMENTO IN VITRO DEI PROGENITORI EMATOPOIETICI NELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE

D. FERRERO, W. PIACIBELLO, A. SEVERINO, F. SANAVIO, P. BRESSO, P. PREGNO, E. GALLO, M. AGLIETTA

Università degli Studi di Torino, Ospedale Molinette, Torino

In questo studio è stato impiegato lo *Stem Cell Factor* (SCF) umano ricombinante alla dose di 30-300 ng/ml, in presenza di concentrazioni ottimali di GM-CSF, G-CSF, IL-3, EPO, per stimolare la crescita di CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-MK di 26 pazienti con Sindromi Mielodisplastiche (SMD).

La risposta delle CFU-GM allo SCF è risultata molto variabile. Nel 60% dei casi si è osservato un aumento tra il 62 e il 400% della crescita stimolata da GM-CSF o G-CSF e un aumento del 110-1400% delle colonie indotte da IL-3. Un incremento nella crescita di BFU-E stimulate da EPO o EPO + IL-3 (80-4200%) è stato osservato in 13/24 casi: si è osservata una stretta correlazione fra incremento della crescita delle BFU-E ed i livelli di emoglobina ($r=0.80$). La crescita delle CFU-MK in risposta all'IL-3 è stata lievemente aumentata dallo SCF in 5/21 casi, mentre non è stato osservato nessun effetto sulla crescita di CFU-E. Le cellule midollari sono state altresì coltivate in terreno liquido per 7 giorni in presenza o meno di EPO (0.1-1 U/ml), con/senza SCF (30 ng/ml). Il recupero di CFU-E e BFU-E al termine della coltura è risultato variabile, ma sempre decisamente inferiore a quanto osservato nelle colture di midollo normale. Al contrario lo SCF è stato in grado di aumentare in 11/18 casi la produzione di CFU-GM in coltura liquida, per 2-5 settimane. In conclusione, lo SCF è in grado di stimolare la crescita delle BFU-E solo da pazienti con SMD senza grave anemia. Tale citochina, poco attiva sulla megacariocitopoiesi, sembra più efficace nello stimolare la granulomonocitopoiesi, ma non è noto se ha effetto preferenziale verso i progenitori normali o neoplastici.

INFEZIONE DA HIV, AIDS ED ESPRESSIONE DELLO STEM CELL FACTOR IN CELLULE STROMALI MIDOLLARI

F. TUMIETTO*, P. COSTIGLIOLA*, P. STRIPPOLI°, L. BONSI°, G. BUBOLA°,
E. RICCHI*, F. CHIODO*, G.P. BAGNARA°†

*Istituto Malattie Infettive, Università di Bologna; °Istituto di Istologia ed Embriologia Generale, Università di Bologna; †Centro Interdipartimentale di Ricerche sul Cancro 'G. Prodi', Università di Bologna

L'infezione da HIV determina un danno del sistema immunitario ad espressione variabile, all'origine del quale si riconoscono come cause sia l'azione citopatica diretta del virus, rivolta nei confronti delle cellule linfo-monocitarie che esprimono il recettore CD4, sia il determinarsi di numerosi fenomeni solo indirettamente riconducibili all'azione del virus stesso. Con il progredire dell'infezione si assiste inoltre ad un progressivo danneggiamento dell'emopoiesi, che si traduce clinicamente in leucopenia e, non raramente, in pancitopenia, anche in assenza di un'evidente causa, quali linfomi non-Hodgkin, con esordio in IV stadio.

Abbiamo analizzato, in colture a lungo termine allestite con midollo osseo di soggetti con infezione da HIV, l'espressione molecolare e la produzione cellulare di *Stem Cell Factor* (SCF) (o *c-kit ligand* - Kl, *Mast Cell Growth Factor* - MGF), citochina prodotta dalle cellule dello stroma midollare ed in particolare dai fibroblasti e dalle cellule endoteliali. Lo SCF svolge un ruolo fondamentale nella modulazione dell'emopoiesi in sinergia con altre citochine, quali l'interleuchina-3 ed il GM-CSF. Lo studio è stato condotto su 7 soggetti con AIDS. L'espressione dell'mRNA dello SCF è stata valutata mediante Northern Blot, mentre la produzione di questo fattore di crescita è stata studiata mediante saggio biologico, utilizzando una linea cellulare (M07), SCF-dipendente. L'espressione messaggeriale costitutiva e previa stimolazione con IL-1 β , è risultata sovrapponibile a quella fornita dai midolli di soggetti sani. Anche la produzione costitutiva dello SCF nel campione studiato non si è discostata da quella documentata nelle colture di controllo, essendo quindi valutabile intorno a 1.5 ng/ml.

Questi risultati preliminari suggeriscono che la produzione di SCF non è alterata nei soggetti con infezione da HIV, e che la malattia non sembra esercitare un danno importante a carico del microambiente emopoietico.

STUDIO DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLO STEM CELL FACTOR DI C-KIT IN LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

S. FERRARI, A. GRANDE*, R. MANFREDINI, E. TAGLIAFICO*, R. BALESTRI,
M. PIZZANELLI, P. ZUCCHINI*

*Istituto di Chimica Biologica, *Centro di Ematologia Sperimentale, Istituto di Clinica Medica II, Università di Modena*

Abbiamo studiato in numerosi casi di LMA i livelli di espressione dello *Stem Cell Factor* (SCF) e del suo recettore, il protooncogene *c-kit*. I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato che in tutti i casi presi in esame si ha la contemporanea espressione di questi due geni. Questo permette di ipotizzare che a livello dei blasti leucemici più indifferenziati si mantenga un'attività proliferativa di tipo autocrino. Per verificare questa ipotesi abbiamo inoltre studiato, in alcuni casi di LMA-M2 – di cui uno recante la trisomia del cromosoma 4 – l'espressione sia di *c-kit* che dello SCF. L'analisi di Northern blot ha evidenziato una *over-expression* di tale protooncogene nel caso con trisomia 4, mentre l'analisi di Southern non ha messo in evidenza dei frammenti ottenuti, compatibile con l'alterazione citogenetica. Inoltre, l'espressione dello SCF nello stesso paziente, studiata mediante RT-PCR semiquantitativa, è molto bassa se rapportata agli altri casi di LMA-M2. Sempre nello stesso paziente il numero di cellule in fase S è modesto, come risulta dai bassi livelli di espressione dell'istone H3. Per converso, negli altri casi di LMA-M2 si ha un'elevata espressione dello SCF, una modestissima espressione di *c-kit* e livelli molto bassi di istone H3. Questi risultati ci hanno permesso di ipotizzare che per la realizzazione di uno stimolo proliferativo autocrino è indispensabile che i livelli di espressione del fattore di crescita e del suo recettore siano equilibrati, cioè la loro espressione deve essere anche quantitativamente coordinata. Infine, lo studio dell'espressione dello SCF in corso di differenziamento in vitro delle HL60 con ATRA o TPA non ha evidenziato un significativo aumento.

EFFETTO DELLO STEM CELL FACTOR SULLA PROLIFERAZIONE E LA SENSIBILITÀ IN VITRO ALL'ARA-C DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE. CONFRONTO CON ALTRI FATTORI DI CRESCITA

L. DE FELICE, A. TAFURI, T. VALENTINI, M.G. MASCOLO, C. CILIBERTI, M.T. PETRUCCI, F. MANDELLI

Ematologia, Dipartimento di Biopatologia Umana, Università "La Sapienza", Roma

Recenti studi in vitro hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule leucemiche esprime il recettore c-kit e prolifera in risposta al suo ligando, lo *Stem Cell Factor* (SCF). Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto dello SCF sulla proliferazione e la sensibilità in vitro alla citosina arabinoside (ARA-C) in 12 leucemie mieloidi acute (LAM). L'attività dello SCF, sia impiegato singolarmente che in associazione con il PIXY (proteina di fusione GM-CSF/IL-3) è stata paragonata con quella di altre citochine (G-CSF, GM-CSF, IL-3, PIXY, G-CSF+IL-3). Sono state allestite colture liquide di cellule leucemiche in presenza dei GFs. Dopo 48-72 ore è stata valutata la risposta proliferativa sia in termini di incremento delle cellule clonogeniche (CFU-L), che di variazione dei parametri citocinetici. Successivamente, dopo ulteriori 24 ore di incubazione in presenza di ARA-C (10 uM, 1 uM, 0.01 uM), sono state valutate le modificazioni della citotossicità indotte dai GFs.

Nell'80% dei casi lo SCF ha determinato la proliferazione dei blasti leucemici espressa come incremento sia delle CFU-L (media 3.8 volte) che delle cellule in fase S, con una notevole eterogeneità per quanto riguarda l'intensità di risposta. Il confronto con le altre citochine evidenzia una minore attività dello SCF in termini di intensità di risposta, ma non di percentuale di rispondenti, rispetto all'IL-3 (incremento medio 4.3 volte) e al PIXY (4.6 volte). L'associazione SCF+PIXY ha determinato in tutti i casi un notevole incremento proliferativo sia in termini di risposta clonogenica (incremento medio 10.7 volte) che di reclutamento in ciclo (incremento medio fase S 10.8 volte e riduzione fase G0 3.3 volte). L'espressione di c-kit, determinata con metodo citofluorimetrico, risultava correlata con la risposta proliferativa.

Riguardo alle variazioni dell'effetto citotossico dell'ARA-C dopo *priming* con GFs, valutato come crescita residua di CFU-L, lo SCF incrementa la citotossicità nel 50% dei casi, risultando meno attivo rispetto ad altri GF-s quali IL-3, GM-CSF e PIXY. L'associazione SCF+PIXY determina invece un significativo potenziamento dell'effetto citotossico dell'ARA-C nella totalità dei casi. La notevole efficacia dell'associazione SCF+PIXY nell'incrementare l'effetto di farmaci ciclo-specifici può fornire indicazioni per nuove strategie terapeutiche nelle LAM.

**EFFETTO DELLO STEM CELL FACTOR (SCF) SUI PROGE-
NITORI MEGACARIOCITARI CIRCOLANTI NEL SANGUE
PERIFERICO DOPO TERAPIA CON CICLOFOSFAMIDE AD
ALTE DOSI E FATTORI DI CRESCITA**

SALVATORE SIENA

Testo non pervenuto.

DISCUTIAMONE INSIEME

OLIGONUCLEOTIDI ANTISENTO

(coordinatori: G. Martinelli, S. Ferrari)

<i>S. Ferrari, R. Manfredini, U. Torelli</i> Antisense strategies in leukemias	pag. 17
<i>D. Delia</i> Inibizione dell'espressione del gene bcl-2 con oligonucleotidi antisense. Effetti sulla crescita e sopravvivenza cellulare	pag. 24
<i>S. Morelli, L. Calastretti, E. Copreni, A. Nicolin</i> Inibizione specifica di leucemie t(14;18) mediante oligonucleotidi antisense	pag. 25
<i>M. Introna, M. Arsura</i> Ruolo dei geni c-myb e b-myb nel controllo della proliferazione di cellule ematopoietiche umane	pag. 26
<i>F. Lanza, S. Moretti, A. Latorraca, D. Gandini, A. Bardi, S.C. Bi, G.L. Castoldi, J.M. Goldman</i> Ruolo degli oligonucleotidi p53 antisense nel modulare la cinetica di crescita di progenitori midollari normali e leucemici	pag. 27
<i>V. Rosti, G. Bergamaschi, C. Lucotti, A. Novella, M. Cazzola</i> Impiego di oligonucleotidi antisense per studiare il ruolo di c-abl nella proliferazione in vitro di progenitori emopoietici normali e di leucemia mieloide cronica	pag. 28
<i>R. Manfredini, R. Balestri, M. Pizzanelli, E. Tagliafico, A. Grande, P. Zucchini, S. Papa, S. Ferrari</i> Studio delle correlazioni fra proliferazione e differenziamento mediante l'uso di oligonucleotidi antisense	pag. 29
<i>B. Scaggiante, A. Michelutti, C. Morassutti, M. Baccarani, F. Quadrioglio</i> Modulazione in vivo del gene umano della multidrug resistance con oligonucleotidi capaci di formare tripla elica di DNA	pag. 30
<i>A. Ripalti, F. Campanini, M.C. Boccuni, Q. Ruan, M.P. Landini</i> Uso di RNA antisense contro HCMV UL44 (proteina accessoria della DNA polimerasi) nella inibizione della replicazione virale.....	pag. 31

ANTISENSE STRATEGIES IN LEUKEMIAS

SERGIO FERRARI, ROSSELLA MANFREDINI, UMBERTO TORELLI^o

Institute of Biological Chemistry and °II Medical Clinic, University of Modena, Italy

Several studies indicate that protooncogene products play a regulatory role in basic cellular functions such as proliferation, differentiation and apoptosis because of their interference with several signal transduction pathways.¹ These results have been obtained using different methodologies such as microinjection of specific MoAb² or in vitro transcribed antisense RNA,³ transfection of plasmids or retroviral vectors expressing antisense RNA sequences,⁴ antisense oligodeoxynucleotides⁵ and more recently gene locus disruption by homologous recombination.⁶

One of the opportunities offered by these methodologies is to obtain a specific and possibly complete inhibition of target gene at the DNA, mRNA and protein level and then to look at the biological implications of the specific gene inactivation. Therefore these experimental approaches allow the discrimination between genes which are simply related to a specific gene function and genes regulating or limiting that cell function.

The methodology of the antisense oligodeoxynucleotides is based upon the concept of using basically mature mRNA as the primary target. The hybrid duplex formed between mRNA and the complementary oligodeoxynucleotide will lead to a decreased half life of the messenger by RNase H degradation⁷ or to a translational arrest.⁸

Furthermore, antisense oligonucleotides targeted to donor-acceptor sites for splicing pre-mRNA can inhibit gene expression at the post-transcriptional level^{9, 10} and oligonucleotides complementary to genomic DNA can interact with it, by means of Hogness base pairing in the major groove, to form a triple-helical structure and inhibit the transcription of the target gene.^{11, 12}

A continuous evolution of this methodology has led to a technical improvement because of the possibility to synthesize modified oligodeoxynucleotides which are more stable¹³ and the conjugation of these oligomers with different chemical compounds that can improve the cellular uptake. In fact it has been recently described a delivery system based on receptor mediated endocytosis to introduce the oligos complexed with transferrin-polylysine conjugate into the cells.¹⁴ Using this technology it has been reported that protooncogenes such as c-fos,¹⁵ c-myc,¹⁶ c-myb,¹⁷ and normal genes such as cdc2,¹⁸ PCNA,¹⁹ IL-6,²⁰ and CSF1²¹ play a regulatory role in cell proli-

Keywords: antisense oligonucleotides, leukemias, proliferation, differentiation, apoptosis.

Supported by a grant from AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) and by CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), contract number 9202179.PF39.

Address correspondence to Sergio Ferrari, Istituto di Chimica Biologica, Università degli Studi di Modena, via Campi 287, 41100 Modena, Italy.

feration since their inactivation inhibits proliferation in several different cell lines and in normal hematopoietic cells.

These results offer new insights of the molecular mechanisms underlying and controlling the genetic program of cell proliferation. In the normal hematopoietic tissue, when the myeloid differentiation commitment of a normal precursor cell occurs, the G1 phase of the cell cycle progressively increases in length and terminally differentiated granulocytes are practically arrested in this phase of the cycle and cannot be triggered along the proliferative pathway.²² This observation rises the question of the possible correlation between the proliferative and differentiative pathways. It has to be pointed out by Wichstrom that spontaneous myeloid differentiation has been obtained after inhibition of HL60 cells proliferation with a c-myc antisense oligomer.²³ Furthermore, experiments carried out in our laboratory indicate that G1 arrested cells, after the inhibition of cell proliferation with a specific antisense c-myb oligomer, are capable to differentiate only along the monocytic differentiation pathway even if treated with all-trans retinoic acid,²⁴ a specific granulocytic differentiation inducer.

These results strongly support the existence of different *differentiative windows* in myeloid differentiation and particularly that the genetic program underlying granulocytic differentiation is activated only when proliferation and differentiation occur simultaneously, whereas monocytic and macrophagic differentiation can be activated also when the cell population is G1 arrested. The treatment of normal bone marrow cells with an antisense c-myb oligomer allows the monocytic-macrophagic colonies formation but not granulocytic colonies in methyl cellulose assay. On the other hand the overexpression of several cell-cycle related genes such as c-myc,²⁵ c-myb,²⁶ c-erbA,²⁷ and c-jun²⁸ in different myeloid and erythroid cell lines suppresses almost completely the differentiation capability of these cells. The overexpression of a normal p53 gene can induce spontaneous granulocytic differentiation in HL60 cells.²⁹

The preliminary conclusion of these experiments is that several oncogenes are involved primarily in cell proliferation and that cell differentiation requires permanent withdrawal of these gene products and the permanent exit from the cell-cycle. On the other hand, the knowledge of the mechanisms which control cell differentiation is still quite primitive. The study of the function of oncogenes product during hematopoietic differentiation has provided critical insights on the molecular mechanism underlying this process.³⁰

In fact, particularly interesting are the results obtained by using antisense oligos to inactivate the receptor for CSF1, the cellular homologue of the fms oncogene, which is a receptor involved in the monocytic differentiation.

The inactivation of the c-fms oncogene mRNA inhibits completely the capability of HL60 cells to differentiate along the monocytic pathway.³¹

Another oncogene which we studied in our laboratory, related to granulocytic differentiation, is the c-fes.³² In fact this protooncogene, encoding a p93 c-fes tyrosine kinase protein, is expressed only in myeloid cells and its abundance increases in polymorphonuclear cells.^{33, 34} The inactivation of the c-fes mRNA with a specific antisense oligomer in HL60 and spontaneous promyelocytic blast cells doesn't interfere with the proliferation of these cells but completely inhibits the granulocytic differentiation, inducible by all-trans retinoic acid, because of the activation of the apoptotic program.³⁵

The same antisense oligomer doesn't interfere with monocytic differentiation induced in HL60 cells by vitamin D3 and only marginally interferes with the macrophage differentiation inducible in these cells by phorbol esters. Therefore, our observations indicate that the function of the c-fes protooncogene product is essential during myeloid differentiation and during the mature granulocytes life. Its function might therefore be similar, in granulocytic cells, to that of the bcl-2 oncogene in pre-B cells.³⁶

Other studies showed that several hematopoietic cell lines expressing bcl-2 underwent to proliferation arrest and apoptosis when treated with specific antisense oligos.³⁷ All the results above mentioned lend support to the fact that proliferation, differentiation and apoptosis are strictly genetically related processes.³⁸

This is particularly evident in normal myelopoiesis where a dynamic balance occurs between quiescent, proliferating, differentiating and apoptotic cells. This balance is altered in acute myeloid leukemias. In fact in blast cells of acute leukemia, independent from their type, both proliferation and differentiation are arrested, their half life is remarkably longer than that of normal maturing myeloid cells so that their inability to mature and undergo apoptosis plays a major role in leukocytosis. It is thus evident that the *growth advantage* of these leukemic blast cells is originated not by an increased cell proliferation activity, but mainly by the maturation arrest leading to a prolonged survival.³⁹ This biological behaviour is common to the vast majority of acute myeloid leukemia independently from their type and from their genetic abnormalities. It is clear however that when the proteins encoded by these oncogenes are in some way altered (point mutations, gene rearrangements, gene amplifications) the leukemic transformation can occur.⁴⁰

The selective inhibition of the expression of activated oncogenes, which often underlies an abnormal cellular function, is one of the desired goals of cancer therapy. Several studies describe the inactivation of oncogene products using the antisense oligonucleotides technology. In this regard particularly interesting are the studies concerning the possible role of the

BCR/ABL chimeric mRNA in chronic myeloid leukemia (CML) carrying the t(9;22) translocation.^{41, 42}

Kinetic studies performed in CML indicate that these abnormal cells do not proliferate or mature faster than the normal counterpart. Instead the basic defect underlying the abnormal degree of granulocytopoiesis in CML appear to reside in the expansion of the myeloid progenitor pool in bone marrow and in peripheral blood. Nevertheless the generation of terminally differentiated cells indicates that the process of hematopoiesis retains several normal features. The biological behaviour of CML is therefore different from that characterizing AML and therefore we can consider the chronic phase of CML basically as an hyperplastic rather than a neoplastic disease. The c-abl protooncogene encodes a cytoplasmic protein with tyrosine kinase activity^{43, 44} which can be also involved in the survival of hematopoietic cells⁴⁵. The tyrosine kinase activity is increased in cells carrying bcr/abl hybrid gene encoding a novel phosphoprotein.

An antisense oligonucleotide inhibiting specifically the bcr/abl chimeric mRNA leads to a suppression of CML leukemic cells colony formation although the mechanism of inhibition of CML leukemic cells is not yet clarified.⁴⁶ Using the antisense strategy it has been found that other oncogenes are involved in hematological malignancies, i.e. the bcl-2 oncogene in follicular lymphomas³⁷ and c-myc in Burkitt lymphomas.⁴⁷

Several laboratories are involved in the study of the possible role of PML-RARa and RARa-PML chimeric mRNAs, transcribed specifically in acute promyelocytic blast cells carrying the t(15;17), in the pathogenesis of this type of leukemia.⁴⁸⁻⁵⁰ The overexpression of these proteins in U937 cells showed a strong interference with the differentiative program of these monoblastic cell.⁵¹ It has been also reported that bone marrow purging of leukemic cells can be efficiently obtained using specific c-myb⁵² and bcr/abl⁵³ antisense oligonucleotides.

In conclusion we can affirm that the antisense methodology is a promising approach to control the neoplastic cell *growth* in hematological malignancies where the genetic alterations are well characterized. The experimentation of antisense oligos is recently been carried out in laboratory animals and in clinical trials of patients having different hematological neoplastic diseases. In the future it will be probably possible to reach one of the more desired goal in cancer therapy: specificity of action and selective cell death of cancer cells.⁵⁴

References

1. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S.

- Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64:281-302.
2. Kaczmarek L, Hyland JK, Watt R, Rosenberg M, Baserga R. Microinjected c-myc as a competence factor. *Science* 1985; 228:1313-5.
 3. Melton DA. Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:144-8.
 4. Colman A. Antisense strategies in cell and developmental biology. *J Cell Science* 1990; 97:399-409.
 5. van der Krol AR, Mol JNM, Stuitje AR. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biothechniques* 1988; 6:958-76.
 6. Waldman A. Targeted homologous recombination in mammalian cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 1992; 12:49-64.
 7. Dash P, Lotan I, Knapp M, Kandel ER, Goelet P. Selective elimination of mRNAs in vivo: complementary oligodeoxynucleotides promote RNA degradation by an RNase H-like activity. *Proc. Natl. Acad. sci USA* 1987; 84: 7896-7900.
 8. Cazenave C, Stein CA, Loreau N, Thuong NT, Neckers LM, Subasinghe C, helene C, Cohen AS, Toulmè JJ. Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucl Acids Res* 1989; 17:4255-73.
 9. Munroe SH. Antisense RNA inhibits splicing of pre-mRNA in vitro. *EMBO J* 1988; 7: 2523-32.
 10. Smith CC, Aurelian R, Reddy MP, Miller PS, Ts'o POP. Antiviral effect of an oligo (nucleoside methylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2787-91.
 11. Mergny JL, Duval-Valentin G, Nguyen CH, Perrouault L, Faucon B, Rougee L, Monenay-Garestier T, Bisagni E, Hélène C. Triplex helix-specific ligands. *Science* 1992; 256: 1681-1684.
 12. Thuong NT, Hélène C. Sequence specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides. *Angew Chem Int Ed Engl* 1993; 32:666-90.
 13. Iribarren AM, Sproat BS, Neuner P, Sulston I, Ryder U, Lamond AI. 2'-O-Alkyl oligoribonucleotides as antisense probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7747-51.
 14. Citro G, Perrotti D, Cucco C, D'Agnano I, Sacchi A, Zupi G, Calabretta B. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7031-4.
 15. Holt JT, Gopal TV, Moulton AD, Nienhuis AW. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4794-8.
 16. Wickstrom EL, Bacon TA, Gonzales A, Freeman DL, Lyman GH, Wickstrom E. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1028-32.
 17. Anfossi G, Gewirtz AM, Calabretta B. An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1989; 86:3379-83.
 18. Furukawa Y, Piwnica-Worms H, Ernst TJ, Kanakura Y, Griffin JD. CDC2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 1990; 250:805-8.
 19. Jaskuski D, de Riel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 1988; 240: 1544-6.
 20. Schwab G, Siegall CB, Aarden LA, Neckers LM, Nordan, RP. Characterization of an interleukin-6-mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266. *Blood* 1991; 77:587-93.
 21. Birchenall-Roberts MC, Ferrer C, Ferris D, et al. Inhibition of murine monocyte proliferation by a colony stimulating factor-1 antisense oligodeoxynucleotide. *J Immunol*

- 1990; 45:3290-6.
22. Ferrari S, Grande A, Manfredini R, Torelli U. Terminal differentiation. *NY Acad Sci* 1992; 663:180-6.
 23. Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 1988; 8:963-73.
 24. Ferrari S, Donelli A, Manfredini R, et al. Differential effects of c-myb and c-fes antisense oligodeoxynucleotides on granulocytic differentiation of human myeloid leukemia HL60 cells. *Cell Growth Diff* 1990; 1:543-48.
 25. Freytag S. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct pre-differentiation state in G₀/G₁. *Mol Cell Biol* 1988; 8:1614-23.
 26. Clarke MF, Kukowska-Latallo JF, Westin E, Smith M, Procownik E. Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1988; 8:884-92.
 27. Falcone G, Tato F, Alema S. Distinctive effects of the viral oncogenes myc, erb, fps and src on the differentiation program of quail myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:2379-83.
 28. Prochownik EV, Smith MJ, Snyder K, Emeagwali D. Amplified expression of three jun family members inhibits erythroleukemia differentiation. *Blood* 1990; 76:1830-7.
 29. Soddu S, Landino G, Citro G, et al. Wild type p53 gene expression induces granulocytic differentiation of HL60 cells. *Blood* 1994; in press.
 30. Bottlinger D. Interaction of oncogenes with differentiation programs. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1989; 147:31-77.
 31. Wu J, Zhu JQ, Han KK, Zhu DX. The role of c-fms oncogene in the regulation of HL-60 cell differentiation. *Oncogene* 1990; 5:873-7.
 32. Roebroek AJM, Schalken JA, Verbeek S, et al. The structure of the human c-fes/fps proto-oncogene. *EMBO J* 1985; 4:2897-903.
 33. Ferrari S, Torelli U, Selleri L, et al. Expression of human c-fes oncogene occurs at detectable levels in myeloid but not in lymphoid cell populations. *Br J Haematol* 1985; 59:21-5.
 34. Smithgall TE, Yu G, Glazer RI. Identification of the differentiation associated p93 tyrosine protein kinase of HL-60 leukemia cells as the product of the human c-fes locus and its expression in myelomonocytic cells. *J Biol Chem* 1988; 263:15050-5.
 35. Manfredini R, Grande A, Tagliafico E, et al. Inhibition of c-fes expression by an antisense oligomer causes apoptosis of HL60 cells induced to granulocytic differentiation. *J Exp Med* 1993; 178:381-9.
 36. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer S. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-6.
 37. Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, Yum S, Cohen J. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 1990; 50:6565-70.
 38. Torelli U, Ferrari S, Manfredini R. Proliferation, differentiation and programmed cell death: an outline of their genetic control and disorders in normal and leukemic myelopoiesis. In press on "Hematopoietic growth factors, oncogenes and cytokines in Clinical Hematology. Current aspects and future directions". Basel: Karger AG.
 39. Ferrari S, Manfredini R, Grande A, Torelli G, Torelli U. Proliferation, differentiation arrest and survival in leukemic blast cells. *NY Acad Sci* 1992; 663:204-14.
 40. Weinberg RA. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor

- Laboratory Press 1989.
41. Witte ON. Role of the bcr-abl oncogene in human leukemia. *Cancer Res* 1993; 53:485-9.
 42. Rowley JDA. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
 43. Caracciolo D, Valtieri M, Venturelli D, Peschle C, Gewirtz AM, Calabretta B. Lineage-specific requirement of c-abl function in normal hematopoiesis. *Science* 1989; 245: 1107-10.
 44. Rosti V, Bergamaschi G, Ponchio L, Cazzola M. c-abl function in normal and chronic myelogenous leukemia hematopoiesis: in vitro studies with antisense oligomers. *Leukemia* 1992; 6:1-7.
 45. Evans CA, Owen-Lynch PJ, Whetton AD, Dive C. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Res* 1993; 53:1735-8.
 46. Szczylik C, Skorski T, Nicolaides NC, et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; 253:562-4.
 47. McManaway ME, Neckers LM, Loke SL, et al. Tumor-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligodeoxynucleotide. *Lancet* 1990; ii:808-11.
 48. Kakizuka A, Miller WH, Umesono K, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARa with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991; 66:663-74.
 49. Alcalay M, Zangrilli D, Fagioli M, et al. Expression pattern of the RARa-PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4840-4.
 50. Geng JP, Tong JH, Dong S, et al. Localization of the chromosome 15 breakpoints and expression of multiple PML-RARa transcripts in acute promyelocytic leukemia: a study of 28 chinese patients. *Leukemia* 1993; 7:20-6.
 51. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RARa fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 1993; 74:423-31.
 52. Calabretta B, Sims RB, Valtieri M, et al. Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2351-5.
 53. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, et al. Highly efficient purging of Philadelphia1 leukemic cells from bone marrow cells by exposure to bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides combined with mafosfamide. *Blood* 1992; 20:1252-6.
 54. Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. Is the bullet really magical? *Science* 1993; 261:1004-12.

INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE BCL-2 CON OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO. EFFETTI SULLA CRESCITA E SOPRAVVIVENZA CELLULARE

D. DELIA

Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

La sovraespressione del gene *bcl-2* è associata con aumentata sopravvivenza cellulare.

In questo studio abbiamo analizzato gli effetti biologici che derivano da una diminuita espressione di *bcl-2*.

Otto oligonucleotidi antisenso (OAS) fosforotioati complementari a varie regioni del trascritto *bcl-2* sono stati testati su linee cellulari emopoietiche umane positive per l'espressione del gene.

Soltanto due degli otto OAS (AS 955 ed AS 1188) sono stati in grado di inibire, alle dosi di 0.5-1 μM ed in presenza di basso siero, la proliferazione cellulare.

Analisi citofluorimetriche hanno mostrato, su colture trattate con AS955 or AS1188, la riduzione di cellule in S/G2-M e la presenza di un picco alla sinistra del G1, caratteristico di cellule apoptotiche. Le analisi ultrastrutturali hanno evidenziato elementi apoptotici in colture trattate con oligonucleotidi antisenso, ma non-senso.

Analisi in Northern blot e reverse-PCR hanno mostrato un calo significativo del trascritto *bcl-2* in cellule trattate con AS955. Questo oligonucleotide è stato inoltre in grado di inibire la traduzione in vitro della proteina *bcl-2*.

Questi risultati indicano che OAS specifici per *bcl-2* sono in grado di inibire specificamente l'espressione della proteina *bcl-2* e la proliferazione cellulare e di indurre morte cellulare programmata.

INIBIZIONE SPECIFICA DI LEUCEMIE t(14;18) MEDIANTE OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

S. MORELLI, L. CALASTRETTI, E. COPRENI, A. NICOLIN
Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano

Le recenti scoperte di alterazioni al codice genetico associate alla trasformazione neoplastica, oncogeni, consente di immaginare oligonucleotidi in grado di ibridizzare selettivamente con la struttura mutata, risultando composti potenzialmente specifici per la lesione oncogena.

Le nostre ricerche qui riportate riguardano linee cellulari ottenute da linfomi follicolari B umani caratterizzati da una traslocazione cromosomica – t(14;18) – che unisce il gene troncato bcl-2 al gene troncato della catena pesante delle immunoglobuline. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati per agire con meccanismo antisenso (aODN) ed ibridizzare il messaggero chimerico nella regione di giunzione bcl-2-IgH.

Gli aODN hanno dimostrato attività inibente la crescita del linfoma DHL-4 portatore della alterazione genica t(14;18) in modo dose-dipendente. Di notevole rilevanza, gli aODN sono risultati inattivi nei confronti di una batteria di cellule normali e neoplastiche, inclusi tumori umani della linea B portatori di t(14;18).

Il meccanismo d'azione dipende, almeno in parte, nell'inibire la sintesi della proteina bcl-2, che over-espressa in seguito alla traslocazione, determina un vantaggio proliferativo. Nel caso specifico, l'iperespressione di bcl-2 inibisce normali meccanismi di morte cellulare programmata che vengono ripristinati dall'inibizione della bcl-2 prodotta dagli aODN.

I risultati descritti sono stati riprodotti, utilizzando nuovi composti antisenso, su un'altra linea linfomatosa umana B t(14;18), utilizzando composti *modificati* fosforotioati atti, per le favorevoli proprietà farmacocinetiche, ad essere utilizzati per sperimentazioni in vivo.

Viene dimostrato l'effetto inibente specifico la crescita tumorale di composti antisenso capaci di interagire con una definita alterazione della sequenza genica.

RUOLO DEI GENI C-MYB E B-MYB NEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE DI CELLULE EMATOPOIETICHE UMANE

M. INTRONA, M. ARSURA

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

L'oncogene v-myb è stato originariamente identificato nei due retrovirus AMV ed E26, che causano rispettivamente leucemie mieloidi o eritroidi nel pollo. Il suo omologo cellulare, c-myb, agisce come attivatore trascrizionale e la sua espressione, ristretta principalmente al tessuto ematopoietico, sembra regolare la proliferazione cellulare.

Recentemente è stato clonato da librerie di cDNA umano un nuovo gene myb relato, b-myb, caratterizzato da una alta omologia di sequenza con il protooncogene c-myb. In particolare la conservazione di alcuni domini strutturali fa ipotizzare per il gene b-myb una attività del fattore trascrizionale, analogamente a quanto dimostrato per il gene c-myb. Inoltre sia il gene b-myb che il gene c-myb sono espressi in modo simile durante la proliferazione di cellule normali e di linee cellulari ematopoietiche.

Abbiamo investigato più direttamente il ruolo dei geni b-myb e c-myb nella proliferazione di linee cellulari ematopoietiche, usando oligonucleotidi antisenso specifici. Diversi oligonucleotidi antisenso, complementari a distinte regioni di questi geni, inibiscono significativamente e in modo dose-dipendente, la proliferazione di tutte le linee mieloidi o linfoidei testate. L'inibizione della proliferazione non si accompagna ad un differenziamento osservabile di linee mieloidi umane U937 e HL60 in macrofagi o in granulociti.

Infine, abbiamo dimostrato che gli oligonucleotidi anti b-myb, sebbene penetrati nel citoplasma delle cellule trattate, non inducono la scomparsa specifica dell'mRNA di b-myb, ma inibiscono la sintesi proteica in vitro. Pertanto suggeriamo che il meccanismo di azione possa essere differente da quello usato dagli oligonucleotidi anti-c-myb.

Inoltre, abbiamo testato un nuovo sistema di trasferimento di DNA esogeno basato sull'endocitosi cellulare mediata dal recettore della transferrina.

I complessi di oligonucleotidi antisenso contenenti coniugati di transferrina-polilisina (hTfpL290) si sono rivelati più efficaci nell'inibire la proliferazione delle linee testate di circa 10 volte rispetto agli oligonucleotidi non complessati.

RUOLO DEGLI OLIGONUCLEOTIDI p53 ANTI-SENSO NEL MODULARE LA CINETICA DI CRESCITA DI PROGENITORI MIDOLLARI NORMALI E LEUCEMICI

F. LANZA, S. MORETTI, A. LATORRACA, D. GANDINI, A. BARDI, S.C. BI, G.L. CASTOLDI, J.M. GOLDMAN*

*Istituto di Ematologia, Università di Ferrara; *LRF Centre for Adult Leukaemia, Hammer-smith Hospital, London, Great Britain*

Allo scopo di definire il ruolo esercitato dal gene soppressore p53 nel promuovere la crisi blastica in corso di LMC, sono stati sintetizzati oligonucleotidi di diversa dimensione (18-24 mer) e specificità, in grado di riconoscere sequenze pre-definite di mRNA sintetizzanti forme sia *wild type* che mutate o troncate della proteina p53. Il modello di studio elaborato nelle cellule staminali e progenitrici mieloidi di pazienti con LMC, si basa sul presupposto che il vantaggio proliferativo e, verosimilmente, l'arresto maturativo delle cellule leucemiche si verifica in conseguenza di un blocco dell'attività inibente la proliferazione della proteina *wild type*, mentre la eventuale formazione della forma mutata della proteina gioca un ruolo trascurabile nei processi di replicazione cellulare. Queste conclusioni sono supportate da valutazioni cinetiche e clonogeniche eseguite dal nostro gruppo in numerose linee cellulari multipotenti e mieloidi derivate da pazienti con LMC in crisi blastica con mutazioni del gene p53 e trattate con oligonucleotidi p53 anti-senso. Diversamente, nei pazienti con LMC in fase cronica con struttura genomica p53 normale, l'incubazione in vitro dei progenitori ematopoietici con oligonucleotidi p53 antisenso induce nella maggior parte dei casi un aumento della cinetica proliferativa e delle capacità clonogeniche valutate mediante dosaggio delle CFU-GM. Una possibile dimostrazione del ruolo iniziante della p53 nell'induzione della crisi blastica di LMC può derivare da studi di manipolazione genica delle cellule progenitrici infettate con un vettore retrovirale recante un costrutto di cDNA di p53 mutata.

IMPIEGO DI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO PER STUDIARE IL RUOLO DI C-ABL NELLA PROLIFERAZIONE IN VITRO DI PROGENITORI EMPOIETICI NORMALI E DI LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

VITTORIO ROSTI, GAETANO BERGAMASCHI, CLAUDIA LUCOTTI, ANNUNZIATA NOVELLA, MARIO CAZZOLA

Dipartimento Medicina Interna e Terapia Medica, Clinica Medica 2, Università degli Studi di Pavia e IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia

Il proto-oncogene c-abl è localizzato sul cromosoma 9 (banda q34) e codifica per una proteina dotata di attività tirosino-chinasica, il cui significato funzionale non è ancora stato completamente chiarito. È stato recentemente dimostrato che la soppressione dell'espressione di c-abl in progenitori emopoietici midollari umani normali si associa ad una ridotta crescita delle colonie derivate da progenitori granulocitico-macrofagici (CFU-GM), mentre non viene alterata la crescita delle colonie derivate dai progenitori eritroidi (BFU-E e CFU-E). Al fine di chiarire meglio il ruolo funzionale di c-abl nell'emopoiesi umana normale abbiamo usato oligodesossinucleotidi antisenso di 18 basi complementari agli esoni Ia (6.0 kb) e Ib (7.0 kb) dell'mRNA di c-abl, con inizio dal secondo codone di ognuno degli mRNA, per bloccare l'espressione del gene in progenitori emopoietici umani normali midollari. Oligodesossinucleotidi di 18 basi senso, complementari dei due antisenso, sono stati usati come controllo. Cellule CD34 positive derivate da aspirati midollari di soggetti normali, purificate mediante l'impiego di biglie immunomagnetiche, sono state incubate per 17 ore con oligonucleotidi diretti contro i primi due esoni di c-abl alla concentrazione di 15 mM e quindi clonate in metilcellulosa per la valutazione della formazione di colonie. La preincubazione con i due oligomeri ha determinato una inibizione della crescita delle CFU-GM del $41 \pm 8\%$ ($p < 0.01$) mentre la crescita delle CFU-GEMM e delle BFU-E non è stata influenzata da tale pre-incubazione. Nessuna inibizione è stata invece osservata dopo preincubazione con gli oligomeri senso. La soppressione dell'espressione di c-abl in questi stessi progenitori non appariva in grado di determinare la comparsa di apoptosi.

I dati ottenuti: a) confermano, su progenitori emopoietici normali CD34 positivi la precedente osservazione che la soppressione dell'espressione di c-abl determina una riduzione selettiva della proliferazione dei progenitori granulocitico-macrofagici; b) suggeriscono che il meccanismo con cui tale riduzione si determina non è dovuto alla comparsa di apoptosi.

STUDIO DELLE CORRELAZIONI TRA PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO MEDIANTE L'USO DI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

R. MANFREDINI, R. BALESTRI, M. PIZZANELLI, E. TAGLIAFICO*, A. GRANDE*,
P. ZUCCHINI*, S. PAPA*, S. FERRARI
*Istituto di Chimica Biologica, *Centro di Ematologia Sperimentale, Clinica Medica,
Università di Modena*

Da alcuni anni il nostro laboratorio si interessa allo studio delle correlazioni esistenti tra proliferazione e differenziamento in cellule mieloidi; in particolare abbiamo cercato di individuare la reale potenzialità differenziativa di una cellula bloccata nella fase G1 del ciclo cellulare. Questo concetto riveste particolare interesse se si considera che i blasti della leucemia acuta presentano, oltre al blocco maturativo, un blocco proliferativo quasi completo nella fase G1. Come modello sperimentale abbiamo adottato le cellule della linea leucemica HL60, che sono state bloccate in G1 mediante trattamento con un oligomero c-myb antisense. I dati ottenuti hanno dimostrato che le cellule HL60 così hanno perso la capacità di differenziare a granulociti se indotte con AR, il quale peraltro porta esclusivamente a un differenziamento monocitoide. Nessuna interferenza si è invece notata riguardo al differenziamento con vit. D3 o TPA.

Questi risultati hanno fatto supporre l'esistenza di finestre differenziative, cioè di precisi intervalli all'interno del ciclo cellulare dai quali può attivarsi una determinata via differenziativa: dai nostri dati si può supporre ad esempio che la finestra differenziativa granulocitaria sia localizzata dopo la fase M e si estenda fino ad una fase molto iniziale del G1. Il differenziamento monocitario sarebbe invece attivabile da più punti durante il ciclo cellulare, compresa la fase G1. Esisterebbero quindi vari elementi che concorrono alla determinazione della specifica competenza al differenziamento granulocitario. Alcuni dati ottenuti recentemente nel nostro laboratorio su cellule HL60 e blasti di leucemia acuta non sembrano avvalorare l'ipotesi che nella fase G1 la ridotta potenzialità differenziativa sia dovuta ad una *down-regulation* del recettore dell'acido retinoico alfa (RAR α).

MODULAZIONE IN VIVO DEL GENE UMANO DELLA MULTIDRUG RESISTANCE CON OLIGONUCLEOTIDE CAPACI DI FORMARE TRIPLA ELICA DI DNA

B. SCAGGIANTE*, A. MICHELUTTI^o, C. MORASSUTTI*, M. BACCARANI^o,
F. QUADRIFOGLIO*

**Cattedra di Biologia Molecolare, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche; ^oCattedra di Ematologia, Dipartimento di Ricerche Cliniche e Morfologiche, Università di Udine*

Lo sviluppo della resistenza pleiotropica ai farmaci chemioterapici (MDR), è spesso associato all'aumento dell'espressione di una glicoproteina di membrana, gP170, codificata nell'uomo dal gene MDR1. Tra gli oligonucleotidi (ODN) sintetizzati, uno denominato 1D (27-mer) ha dimostrato in vitro di poter formare strutture a tripla elica con una sequenza posta nella regione codificante di MDR-1. La somministrazione di un'unica dose di 10 μ M di 1D a colture di LoVo DX e di CEM-VLB100, ha portato ad una riduzione specifica dell'mRNA di MDR1 pari al 50% dei controlli non trattati o trattati ripetutamente un ODN di controllo del 40% i livelli di amplificazione del gene MDR1. Inoltre, 1D ha dimostrato di esercitare un selettivo effetto citotossico dose-dipendente sia in linee parentali sensibili: nessun effetto è stato osservato sulla crescita delle stesse trattate con ODN di controllo o antisense. Tale effetto non è stato rilevato in analoghi trattamenti sia con 1D che con ODN di controllo su cellule normali. Questi risultati indicano che 1D può potenzialmente e specificamente inibire l'espressione del gene MDR1 e modificare il fenotipo MDR. Invece, il selettivo effetto citotossico di 1D non sembra essere direttamente correlato con l'espressione di MDR1 e potrebbe essere dovuto all'interferenza di 1D con meccanismi propri della crescita neoplastica.

ANTISENSE RNA TO HCMV UL44 (DNA POLYMERASE ACCESSORY PROTEIN) INHIBITS VIRAL REPLICATION

A. RIPALTI, F. CAMPANINI, M.C. BOCCUNI, Q. RUAN, M.P. LANDINI
Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina, Università di Bologna

Human cytomegalovirus (HCMV) can cause a broad range of clinical illness in the immunocompromised subjects such as AIDS patients or transplant recipients, and is also a major contributor to congenital disease.

Our understanding of the function of the large number of human CMV gene products has come from limited sequence and positional similarity to known genes of other herpesviruses, from limited similarity to cellular gene products and from direct characterization of isolated CMV genes and their products. With only 32 of the over 200 CMV ORFs having any significant sequence similarity to those of HSV-1, VZV or EBV, the function of most CMV gene products will await direct analysis. Since direct mutagenesis studies for HCMV are hampered by difficulties in obtaining viral mutants, we adopted an antisense messenger RNA (asRNA) strategy to study gene function in HCMV.

As an initial target for our approach we choose the product of the open reading frame HCMV UL44, which is a DNA binding protein (DBP) with a molecular weight of 52kd (DBP52). It has been suggested that this protein might be essential for any minimal HCMV origin replication system as it has been demonstrated for the Herpes simplex virus type 1 homologue, DBP51.

Since the intracellular expression of an antivirally active gene may lead to resistance of the expressing cell against virus infection or to inhibition of virus replication, we have inserted the sequence coding for a fragment of UL44 (n. 604-1302) in an antisense orientation, under the control of the IE1 promoter/enhancer region of HCMV in a eucaryotic vector expressing the neomycin resistance gene, pRC/CMV. The construct was used to permanently transfect U373-MG cells (a human astrocytoma cell line) and the resulting cell lines (U373-asUL44) were studied for virus replication, and for expression levels of DBP52. A control cell line was established by transfecting U373-GM cells with DNA of the vector alone (U373-pRC/CMV). When transformed cells were infected with the Towne strain of HCMV, inhibition of viral replication was observed, together with a strong decrease in DBP52 expression in U373- asUL44 as compared to both virus titre and expression of DB52 in U373- pRC/CMV.

This work demonstrates the usefulness of antisense RNA technology for studying HCMV gene function, and offers a model for gene therapy in other human viruses, based on autologous stimulation of antisense RNA expression.