

Haematologica

Vol. 79, supplement to no. 2, March-April 1994

Official Organ for the Italian Society of Hematology
and the Italian Society of Experimental Hematology

Editor-in-Chief: Edoardo Ascarì

Ferrata Storti
Foundation



Publication



Il Pensiero Scientifico Editore – Roma

Si ringraziano per la collaborazione la Wellcome Italia e la Fondazione Ferrata Storti

Haematologica

Vol. 79, supplement to no. 2, March-April 1994

SOCIETÀ ITALIANA DI EMATOLOGIA SPERIMENTALE (SIES)
DISCUTIAMONE INSIEME

Firenze, 18 novembre 1993

Meccanismi di crescita delle leucemie mieloidi acute
L'ibridazione in situ nel paziente onco-ematologico

Meccanismi di crescita delle leucemie mieloidi acute

coordinatori: V. Santini, G. Avanzi

MECCANISMI DI CRESCITA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

(coordinatori: V. Santini, G. Avanzi)

MECCANISMI DI CRESCITA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE <i>V. Santini, G. Avanzi</i>pag.	1
ASPETTI PROLIFERATIVI DEI BLASTI DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA <i>A. Tabilio, F. Falzetti, P. Mannoni, M.F. Martelli</i>pag.	3
TRASDUZIONE RETROVIRALE DEL GENE DI GM-CSF IN UNA LINEA DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA GM-CSF-DIPENDENTE (GF-D8) <i>A. Rambaldi, V. Attuati, R. Ravasio, C. Caslini, A. Biondi, T. Barbui, P.G. Pelicci, L. Lanfrancone</i>pag.	4
IL SISTEMA IL-1/IL-1 RECEPTOR NEL CONTROLLO DELLA CRESCITA DI LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE <i>M. Torcia, M. Lucibello, F. Cozzolino</i>pag.	5
THE ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA SPECIFIC PML/RARα PROTEIN INHIBITS DIFFERENTIATION AND PROMOTES SURVIVAL OF MYELOID PRECURSOR CELLS <i>F. Grignani, M. Fagioli, P.F. Ferrucci, L. Tomassoni, D. Rogaia, M. Ruthardt, C. Liberatore, P.G. Pelicci</i>pag.	6
IL CONTROLLO DELLA SOPRAVVIVENZA E DELLA PROLIFERAZIONE IN UNA FAMIGLIA DI LINEE MACROFAGICHE MURINE <i>P. Dello Sbarba</i>pag.	7
PRODUZIONE DI G-CSF IN VITRO DA PARTE DEI LINFOCITI B DEL CENTRO GERMINATIVO E DELLE LORO CONTROPARTI NEOPLASTICHE: MECCANISMI ED IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE <i>A. Corcione, L. Baldi, S. Zupo, S. Roncella, M. Ferrarini, V. Pistoia</i>pag.	8
IMPLICAZIONI CLINICHE DELLE CARATTERISTICHE PROLIFERATIVE DELLA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE <i>M. Danova, A. Riccardi</i>pag.	9

MECCANISMI DI CRESCITA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

VALERIA SANTINI*, GIUSEPPE AVANZI#

*Divisione e Cattedra di Ematologia, Università degli Studi di Firenze; #Istituto di Clinica Medica, Università degli Studi di Novara

La leucemia mieloide acuta (LAM) è una patologia caratterizzata dall'accumulo di cellule emopoietiche immature nel sangue periferico e nel midollo osseo. La proliferazione dei blasti leucemici interferisce con la normale emopoiesi ed il clone neoplastico finisce per soppiantare i precursori midollari non patologici. Quali siano i meccanismi biologici che conferiscono questo vantaggio proliferativo che sono alla base della patologia leucemica rimane un interrogativo fondamentale.

Una pietra miliare nella ematologia sperimentale è stato lo sviluppo, circa 30 anni fa, di tecniche che permettessero la crescita in vitro di cellule emopoietiche. In realtà, fu subito chiaro che blasti leucemici umani non crescevano facilmente in colture primarie in mezzo semisolido (inizialmente agar), ma che era necessario fornire una sorgente di "stimolo". Con l'aggiunta alle colture di feeder leucocitari, fitoemoagglutinina, mezzo condizionato di placenta, sovranatanti di linee tumorali fu possibile ottenere una crescita clonale nella gran parte delle LAM. Tuttavia, solo recentemente, con l'isolamento dei geni per i fattori di crescita emopoietici e la conseguente loro produzione su larga scala si sono potute allestire con successo colture primarie di blasti di LAM, in mezzi semisolidi, ma ancor più in terreni liquidi.

Difatti, è stato dimostrato che interleuchina-3 (IL-3), *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) e *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) possono indurre la sintesi di DNA e/o la formazione di colonie in circa l'80% di casi di LAM. Quando *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) è aggiunto alle colture stimola il 30-50% delle popolazioni di blasti leucemici. La risposta alla eritropoietina è evento più raro, ma non confinato alle eritroleucemie.

Frequentemente, l'uso combinato di tali fattori ha un effetto sinergico sulla crescita. Inoltre, i blasti di LAM proliferano dopo stimolazione con solo *stem cell factor* (SCF) che incrementa anche la crescita indotta dai singoli fattori. I blasti leucemici rispondono ad altri regolatori quali interleuchina (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF- α), *transforming growth factor* (TGF- β) che ne modulano la proliferazione. Assai recentemente, a queste molecole si sono aggiunti la somatostatina e gli *insulin-like growth factors* (IGFs).

Sulla membrana dei blasti di LAM sono presenti recettori per tutti i fattori di crescita sopra citati, la cui affinità non differisce sostanzialmente da quella determinata per precursori normali. Tuttavia, non sempre la presenza di recettori correla con la risposta in vitro al corrispondente fattore di crescita.

Spesso, il numero di recettori per IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-5, IL-6, SCF presenti su cellule di LAM è piuttosto basso rispetto ai normali precursori. Molecole quali TNF- α , però, sono capaci di incrementare il numero di recettori per GM-CSF ed IL-3 sulla superficie dei blasti e contemporaneamente clivare la porzione extramembrana del recettore per il G-CSF. Si spiega così l'azione sinergica di TNF- α con GM-CSF ed IL-3 ed il blocco degli effetti della stimolazione con G-CSF.

Ovviamente, la presenza di recettori funzionanti sui blasti LAM, ha suggerito un loro ruolo nel processo di leucemogenesi. Retrovirus inducenti leucemie, infatti, codificano per proteine

transmembrana (env-mlp) che hanno forti analogie con la superfamiglia dei recettori emopoietici. Questo suggerisce che mutazioni dei geni per i recettori possano essere responsabili dello sviluppo del clone leucemico. L'ipotesi di una auto-attivazione, indipendente dal ligante, come avviene per M-CSF-R non è stata dimostrata su cellule leucemiche, ma potrebbe essere anche questo un meccanismo responsabile della proliferazione leucemica. Certamente, c-fms e c-kit, proto-oncogeni codificanti per recettori emopoietici, sono i candidati ideali per questo tipo di meccanismo di leucemogenesi.

Come si è visto, i blasti di LAM dipendono largamente dai fattori di crescita per la loro proliferazione in vitro. Tali fattori possono essere esogeni, ovvero di produzione paracrina, ma in un certo numero di casi di LAM, è possibile dimostrare una crescita del tutto spontanea. In molti di questi casi, è presente mRNA per GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6 e TNF- α e le corrispondenti proteine sono dosabili nel sovrantante delle colture cellulari. L'aggiunta di anticorpi bloccanti per i vari fattori riesce ad inibire la crescita.

Questa produzione autocrina darebbe dunque luogo ad un loop di stimolazione che renderebbe la cellula leucemica indipendente da induttori esogeni. Come le loro controparti normali, i blasti di LAM possono essere indotti a produrre i trascritti per i fattori di crescita. Principalmente, insieme al TNF- α , esercita tale attività l'IL-1, la quale alimenterebbe il circuito di crescita autocrina delle LAM inducendo il suo stesso trascritto nei blasti e dunque perpetuando la stimolazione alla produzione degli altri fattori.

Sebbene inizialmente vi siano state discussioni sulla frequenza ed il significato della produzione di citochine da parte di blasti di LAM, attualmente si sono accumulate solide evidenze per cui l'autocrinia è indicata come uno dei meccanismi, sia pure non il solo, alla base della proliferazione leucemica.

Benché i blasti leucemici conservino la capacità di rispondere con la proliferazione alla stimolazione dei fattori di crescita, hanno certamente perso le proprietà maturative caratteristiche dei precursori emopoietici normali. Il blocco maturativo delle LAM può essere solo parzialmente ed incompletamente aggirato aggiungendo alle citochine molecole ad azione differenziante (G-CSF+ATRA, MCSF+vit. D3). Esistono, però, LAM con specifiche caratteristiche molecolari che conservano capacità maturativa. La LAM con traslocazione (8;21), in cui il gene coinvolto è AML-1, con attività di fattore di trascrizione, è inducibile a maturazione sia con G-CSF che con IL-5. La leucemia promielocitica t(15;17), in cui il gene coinvolto è PML/RAR α risponde sia in vivo che in vitro alla stimolazione maturativa terminale dell'acido retinoico.

I fattori di crescita proteggono i precursori emopoietici dalla fisiologica apoptosi. Resta da dimostrare quanto una dilazione nella morte cellulare programmata contribuisca alla sopravvivenza del clone leucemico nelle LAM e se questa sia dovuta ad una mancata *down-regulation* del gene bcl-2.

Lo sviluppo del clone leucemico risulta da un insieme di alterazioni molecolari e genetiche che conferiscono un vantaggio selettivo sulle cellule normali. La crescita spontanea in vitro è correlata ad un indice prognostico sfavorevole per le LAM, sia in termini di remissione completa che di sopravvivenza e parrebbe dunque individuare una caratteristica intrinseca di "malignità". Certamente, lo studio in vitro dei meccanismi di crescita dei blasti di LAM può chiarire la patogenesi della malattia ed fornire indicazioni terapeutiche.

ASPETTI PROLIFERATIVI DEI BLASTI DI LEUCEMA MIELOIDE ACUTA

A. TABILIO*, F. FALZETTI*, P. MANNONI^o, M.F. MARTELLI*

*Dipartimento di Medicina Clinica, Patologia e Farmacologia, sezione di Ematologia ed Immunologia Clinica, Università di Perugia; ^oInstitute J. Paoli-I Calmettes, Marseille, France

Il sistema emopoietico è, almeno parzialmente, sotto il controllo di varie glicoproteine che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici fino alla produzione delle cellule ematiche, funzionalmente mature. La leucemia acuta mieloide (LAM) è una malattia neoplastica caratterizzata dalla proliferazione non controllata e dalla differenziazione abnorme di un progenitore emopoietico trasformato. Mentre i normali precursori emopoietici richiedono la presenza di specifici fattori per la loro crescita in vitro, le cellule leucemiche mieloidi, oltre a conservare la capacità di essere stimulate da uno specifico fattore, sono in grado di proliferare spontaneamente. In questi casi, le cellule leucemiche formano colonie in ambiente semisolido e proliferano in coltura liquida senza l'aggiunta di specifici fattori oppure di siero. Sono stati osservati almeno quattro distinti comportamenti proliferativi: a) nessuna proliferazione; b) una proliferazione transitoria della durata inferiore a 7 giorni; c) una crescita continua con i maggiori livelli proliferativi al 7° giorno e quindi con un declino progressivo; d) una proliferazione continua che si protrae per alcune settimane.

Uno dei meccanismi con cui la cellula leucemica acquisisce la capacità di proliferare in maniera autonoma è quello della produzione autocrina di uno o più fattori di crescita del sistema emopoietico e di alcune citochine, che favoriscono la crescita cellulare, in forma ed a concentrazioni biologicamente attive. Oggetto della presente relazione sono i risultati ottenuti mediante l'analisi della espressione da parte dei blasti leucemici di mRNA per vari fattori di crescita (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) e citochine (LIF-HILDA, TNF- α , IL-1 α e β , interleuchina 6), della produzione di queste citochine in forma biologicamente attiva e dei rapporti sinergici in senso stimolatorio o inibitorio della proliferazione. Partendo dall'osservazione che il TNF- α può stimolare la proliferazione di colture primarie di blasti leucemici, noi abbiamo ottenuto l'evidenza sperimentale che il TNF è in grado di indurre sia l'espressione del gene per il GM-CSF sia la up-regolazione del suo recettore ad alta affinità in cellule TNF responsive. Vengono inoltre riportati i dati relativi alla valutazione della espressione di alcune di queste molecole in cellule staminali CD34+ normali.

La seconda parte dello studio tende a definire su un'ampia casistica di LAM gli effetti proliferativi o inibitori di CSF (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3) o altre citochine (LIF/HILDA, γ -interferon, TGF- β e TNF- α) in casi in cui la proliferazione spontanea appare assente ed in casi spontaneamente proliferanti.

TRASDUZIONE RETROVIRALE DEL GENE DI GM-CSF IN UNA LINEA DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA GM-CSF-DIPENDENTE (GF-D8)

ALESSANDRO RAMBALDI, VIVIANA ATTUATI, RUDI RAVASIO, CORRADO CASLINI, ANDREA BIONDI, TIZIANO BARBUI, PIER GIUSEPPE PELICCI, LUISA LANFRANCONE
 Divisione di Ematologia Ospedali Riuniti di Bergamo e Istituto Mario Negri di Bergamo; Clinica Pediatrica, Università di Milano; Ospedale S. Gerardo, Monza; Clinica Medica I, Università di Perugia

Una nuova linea di leucemia acuta mieloblastica (GF-D8) è stata ottenuta dal sangue periferico di una paziente di 82 anni. Per morfologia, citochimica e immunofenotipo le cellule GF-D8 sono blasti immaturi. Il cariotipo della linea è 45,XY, -5, 7q-, inv(7) (q31.2q36), 8q+.+8q+, 11q+, 12p-, -15, -17, + marker. La sopravvivenza e la proliferazione di GF-D8 è strettamente dipendente dalla presenza di *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) o interleukina-3 (IL-3) e come atteso, GF-D8 esprime specifici mRNA per la catena α del recettore di GM-CSF e IL-3 così come per la catena β che è comune ad entrambi i recettori. La proliferazione indotta da GM-CSF e IL-3 è dose-dipendente con una crescita significativa osservabile a partire da concentrazioni di 0.01 ng/ml anche in assenza di siero. Mediante *reverse transcription polymerase reaction* (RT-PCR) il gene di GM-CSF è stato amplificato da RNA di linfociti T umani stimolati con PHA, subclonato nel vettore retrovirale LXSN e retrotrasdotto in GF-D8. Mediante selezione in G418 è stata ottenuta una coltura bulk di GF-D8 retrotrasdotte con GM-CSF (GF-D8/GM-CSF). L'effettiva trasduzione del gene di GM-CSF è stata confermata dalle seguenti linee di evidenza: 1) mediante RT-PCR si è evidenziata la presenza di un trascritto GM-CSF specifico, identico a quello dei mononucleati normali stimolati da PHA; 2) mediante Northern Blot si è evidenziata la presenza di elevati livelli di espressione genica di un trascritto chimerico LTR-GM-CSF nelle cellule GF-D8/GM-CSF; 3) il surnatante delle colture GF-D8/GM-CSF è capace di supportare l'attività clonogenica di GF-D8 infettate con il solo vettore retrovirale privo di GM-CSF (GF/D8/SN) così come la linea GF-D8 originale; 4) l'aggiunta di GM-CSF esogeno non è più necessaria per la crescita in vitro di GF-D8/GM-CSF quando le cellule vengono piastrate a densità cellulare sufficiente (3×10^5 cells/mL o più). Al di sotto di tale concentrazione la crescita è marcatamente ridotta a meno che non si aggiunga GM-CSF esogeno. La proliferazione in terreni di coltura semisolidi (agar e metilcellulosa) di GF-D8/GM-CSF è solo parzialmente GM-CSF-indipendente e l'aggiunta di GM-CSF è necessaria per ottenere la più alta attività clonogenica. Poiché la linea originale GF-D8 non dà origine a crescita leucemica in vivo quando inoculata in topi geneticamente immunodeficienti (SCII mice), sono in corso esperimenti tesi a valutare il potenziale tumorigenico della retrotrasduzione di GM-CSF in queste cellule. Questi risultati confermano che circuiti di secrezione autocrina di fattori di crescita emopoietici possono rappresentare un importante cofattore nella selezione di cloni leucemici trasformati e nella loro espansione in vivo.

IL SISTEMA IL-1/IL-1 RECEPTOR NEL CONTROLLO DELLA CRESCITA DI LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

MARIA TORCIA, MARIA LUCIBELLO, FEDERICO COZZOLINO

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

L'interleuchina-1 (IL-1) svolge un ruolo di fattore autocrino di crescita per cellule da leucemia mieloide acuta (LMA), esercitato anche attraverso la capacità di mantenere la sintesi di altre citochine, come il *granulocyte-* ed il *granulocyte-macrophage-CSF*. Stimoli in grado di interferire con l'utilizzazione dell'IL-1 endogena, quali l'antagonista recettoriale dell'IL-1 (IL-1ra), riducono la crescita in vivo delle cellule leucemiche. In questo studio abbiamo analizzato l'effetto del TGF- β , una citochina già nota come inibitore della crescita leucemica, sulla produzione di IL-1ra da parte delle cellule da LMA. Studi di marcatura biosintetica ed immunoprecipitazione dimostrano che il TGF- β induce sintesi e secrezione di IL-1ra in cinque degli otto casi valutati e la determinazione quantitativa in RIA dell'IL-1ra conferma la produzione talora massiva del fattore. L'arresto della crescita indotto in vitro dal TGF- β è abolito, in questi casi, dall'aggiunta nel medium di coltura di anticorpi neutralizzanti anti-IL-1ra. L'analisi citofluorimetrica dei recettori di superficie per IL-1 peraltro non dimostra variazioni quantitative nell'espressione delle due catene recettoriali (p68 e p80). La produzione di IL-1ra sembra pertanto essere l'unico meccanismo in grado di limitare l'utilizzazione dell'IL-1 endogena. Per converso, l'aggiunta di IL-1 esogena abolisce completamente l'espressione in membrana di recettori per TGF- β , il che indica un controllo reciproco dei due sistemi recettoriali. Questi dati suggeriscono che le concentrazioni di IL-1 e TGF- β nel microambiente midollare contribuiscono a determinare il potenziale proliferativo della cellula leucemica.

THE ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA SPECIFIC PML/RARa PROTEIN INHIBITS DIFFERENTIATION AND PROMOTES SURVIVAL OF MYELOID PRECURSOR CELLS

FRANCESCO GRIGNANI, MARTA FAGIOLI, PIER FRANCESCO FERRUCCI, LUCIA TOMASSONI, DANIELA ROGAIA, MARTIN RUTHARDT, CONCETTA LIBERATORE, PIER GIUSEPPE PELICCI
Istituto di Clinica Medica I, Policlinico Monteluce, Perugia University, Perugia

The acute promyelocytic leukemia (APL)-specific chromosome 15;17 translocation leads to the fusion of a newly identified putative transcription factor, PML, and the retinoic acid receptor α (RAR α). The PML locus spans a minimum of 35 kb and is subdivided in 9 exons. We isolated a large number of alternatively spliced PML transcripts that encode 16 PML isoforms. Two groups of isoforms were identified that differed either in their C-terminus region or in the length of their central region, but retained the putative DNA binding and dimerization domains and the serine/proline rich domain. The serine/proline rich domain contains a casein-kinase II phosphorylation site and four repeats of the X-S-P-X consensus that has been identified as the minimum recognition sequence of a new serine/threonine kinase that acts on tyrosine hydroxylase and numerous other substrates *in vitro*. As chromosome 15 breaks at three different sites in the PML locus all PML/RAR α isoforms retain the putative DNA binding and dimerization domains, and lose the serine/proline-rich domain and the variable C-termini. The PML component of the PML/RAR α protein therefore conserves the potential to interact with the PML target genes and to form homo- or heterodimers. However, due to the substitution of the serine/proline rich domain and the normal PML C-terminus by a new C-terminus derived from RAR α , the PML/RAR α chimeric protein would be differently regulated from normal PML protein.

APL is characterized by an expansion of hemopoietic precursors arrested at the promyelocytic stage. The differentiated block can be reversed by retinoic acid, which induces blast differentiation *in vitro* and disease remission in the patients. To investigate the role of the PML/RAR α protein in the pathogenesis of APL, we expressed this protein in U937 myeloid precursor cells, which can be induced to differentiate under the action of different stimuli (vitamin D3, transforming growth factor β and retinoic acid). We showed that PML/RAR α expressing U937 cells: 1) lose the capacity to differentiate when induced by vitamin D3 and transforming growth factor β 1; 2) acquire enhanced sensitivity to the differentiation action of retinoic acid; 3) exhibit a higher growth rate that is accounted for by a reduction in apoptotic cell death. These results represent the first evidence of biological activity of PML/RAR α and recapitulate critical features of the APL phenotype, providing a cellular mechanism to explain the oncogenic action of the fusion protein during promyelocytic leukemogenesis.

IL CONTROLLO DELLA SOPRAVVIVENZA E DELLA PROLIFERAZIONE IN UNA FAMIGLIA DI LINEE MACROFAGICHE MURINE

PERSIO DELLO SBARBA

Istituto di Patologia Generale, Università degli Studi di Firenze

Si è affrontato lo studio del ruolo di alterazioni nella risposta cellulare a fattori di crescita nella trasformazione e nella progressione neoplastica impiegando cellule della linea macrofagica murina BAC.1-2F5, dipendente per la sopravvivenza e la proliferazione in vitro dal fattore di crescita macrofagico specifico M-CSF, e cloni derivati da questa linea mediante trattamento mutagenico e selezione in assenza di M-CSF. La dipendenza dall'M-CSF di 22 cloni mutanti è stata valutata determinandone la proliferazione in presenza o in assenza del fattore, nonché la capacità di rilasciare nel mezzo di coltura fattori capaci di stimolare la proliferazione in modo autocrino.

Sulla base della risposta all'M-CSF, sono stati individuati tre principali fenotipi mutanti: 1) cloni che proliferano in assenza di M-CSF, ma rispondono al fattore con un incremento della velocità di crescita (18 cloni); 2) cloni che proliferano in assenza di M-CSF e non rispondono al fattore (3 cloni); 3) cloni capaci di sopravvivere in assenza di M-CSF, ma la cui proliferazione è completamente dipendente dall'aggiunta del fattore (1 clone).

Due cloni di classe 1 e due cloni di classe 2 producono e rilasciano nel mezzo di coltura M-CSF, la cui neutralizzazione con un antisiero anti-M-CSF non blocca in nessun caso la crescita. Questi dati sembrano indicare che la autocrinia per l'M-CSF non è essenziale nel determinare il fenotipo dei mutanti, e suggeriscono che la perdita della dipendenza dall'M-CSF esogeno dipende piuttosto da alterazioni nei meccanismi di trasduzione o trasmissione dei segnali proliferativi, a livello o a valle del recettore per l'M-CSF.

Lo studio di tali alterazioni è stato affrontato misurando nei cloni mutanti il numero di recettori per l'M-CSF espressi sulla superficie cellulare e stimando la capacità dei recettori di svolgere la loro attività tirosin-fosfochinasi. È risultato che, in generale, in confronto alla linea madre, i mutanti esprimono un ridotto numero di recettori di superficie, ma che questi ultimi sono dotati di normale attività tirosin-chinasi. Lo studio di eventuali correlazioni tra modulazione dell'espressione del recettore per l'M-CSF ed indipendenza dei cloni mutanti da questo fattore è in corso.

I fenotipi compresi nel nostro sistema sperimentale rappresentano vari gradi di trasformazione neoplastica, sui quali si articola la progressione da crescita normalmente regolata a crescita completamente autonoma, quali la acquisizione di indipendenza dai fattori che controllano la sopravvivenza, la capacità di proliferare in assenza di stimoli ambientali e, infine, la perdita della risposta ai regolatori fisiologici della crescita.

PRODUZIONE DI G-CSF IN VITRO DA PARTE DEI LINFOCITI B DEL CENTRO GERMINATIVO E DELLE LORO CONTROPARTI NEOPLASTICHE: MECCANISMI ED IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE

ANNA CORCIONE, LUCIA BALDI, SIMONA ZUPO, SILVIO RONCELLA, MANLIO FERRARINI,
VITO PISTOIA

Laboratorio di Oncologia, Istituto G. Gaslini; Servizio di Immunologia Clinica, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

Studi precedenti hanno dimostrato che i linfociti B normali e leucemici producono in vitro un ampio spettro di citochina quali IL-1 β , GM-CSF, IL-5, M-CSF, TNF- α . In questo lavoro abbiamo investigato la capacità dei linfociti B tonsillari di produrre G-CSF in vitro. Linfociti B purificati sono stati frazionati su gradienti di densità e testati per la capacità di produrre G-CSF in colture a breve termine; le cellule *large*, attivate in vivo, ma non le *small*, quiescenti in vivo, producevano G-CSF mRNA e proteina in assenza di stimoli. In analogia ai linfociti B *small* della tonsilla, le cellule B totali del periferico non producevano G-CSF neppure dopo incubazione con vari stimoli. Esperimenti di frazionamento con palline immunomagnetiche hanno dimostrato che le cellule *large* responsabili della produzione spontanea di G-CSF erano linfociti B del centro germinativo (B-GC) con fenotipo CD10⁺, CD8⁺, CD39⁻, CD23⁻, l'esposizione di B-GC a stimoli capaci di salvare dall'apoptosi (CD40, IL4, CD40+IL4, CD21) induceva un incremento di grado variabile della sintesi di G-CSF, suggerendo una correlazione tra maggiore vitalità cellulare e aumentata sintesi della citochina.

Le cellule B purificate dai linfonodi invasivi di 3 pazienti con linfomi centrofollicolari e 3 linee B tipo Burkitt sintetizzavano spontaneamente G-CSF in vitro, indicando che i linfociti B neoplastici derivati dal centro germinativo mantengono la capacità di produrre G-CSF.

Il significato funzionale della sintesi di G-CSF da parte dei B-GC è per il momento incerto. Alcune ipotesi possono essere formulate: 1) attivazione delle cellule follicolari dendritiche (FDC) e/o dei macrofagi presenti nel centro germinativo; 2) utilizzazione autocrina o paracrina delle citochine da parte dei B-GC o delle cellule B mantellari. La seconda ipotesi, se vera, potrebbe prospettare l'esistenza di nuovi circuiti autocrini per alcune neoplasie B linfocitarie.

IMPLICAZIONI CLINICHE DELLE CARATTERISTICHE PROLIFERATIVE DELLA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE

MARCO DANOVA, ALBERTO RICCARDI

Clinica Medica 2, Cattedra di Oncologia, Università di Pavia e IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Da diversi anni le caratteristiche citocinetiche sono state ritenute importanti, determinanti sia della risposta alla terapia che della sopravvivenza dei pazienti con leucemia acuta non-linfoblastica (LANL), ma i tentativi di confermare sul piano clinico questa ipotesi hanno portato a risultati spesso contraddittori. L'interesse in questo campo è stato rinnovato di recente soprattutto grazie alla messa a punto di nuove metodiche per la determinazione in vitro e in vivo dei parametri di crescita delle cellule leucemiche che ha consentito di approfondire gli studi sul significato prognostico di questi parametri biologici.

Noi abbiamo studiato la cinetica proliferativa delle LANL in vivo, utilizzando la citofluorimetria a flusso multiparametrica ed abbiamo correlato i risultati con la risposta alla terapia e alla sopravvivenza. Sessantacinque pazienti con LANL all'esordio e 15 pazienti con neoplasia solida e midollo non infiltrato hanno ricevuto 250 mg di bromodesossipurina (BUDR) in infusione endovenosa di 15'. La citofluorimetria a flusso (CFM) biparametrica è stata successivamente utilizzata per misurare simultaneamente l'incorporazione di BUDR ed il contenuto di DNA allo scopo di ottenere una serie completa di parametri citocinetici (= BUDR-labeling index, LI; Tempo di sintesi del DNA, TS; Tempo di raddoppiamento potenziale, Tpot). Sugli stessi campioni sono state anche determinate, sempre mediante CFM, la percentuale di blasti positivi all'anticorpo monoclonale PC-10 che riconosce il *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA (e che identifica l'aliquota di cellule proliferanti o frazione di crescita) e quella di cellule positive all'anticorpo S-44 che riconosce l'antigene definito *statina*, espresso dalle cellule in G0. I parametri citocinetici derivati dall'analisi BUDR/DNA sono stati quindi specificamente ricalcolati sul pool di blasti effettivamente proliferante (PCNA-positivo e statina-negativo). Tutti i pazienti inclusi nello studio hanno ricevuto terapia di induzione con vincristina, arabinosylcytosina e daunomicina.

L'attività proliferativa complessiva delle LANL è risultata inferiore a quella del midollo normale ed un Tpot breve è risultato un fattore favorevole sia per l'ottenimento della remissione che per la durata della remissione e per la sopravvivenza. Questo dato però veniva perso in analisi multivariata. Considerando anche frazione di crescita ed aliquota di cellule in G0, l'attività proliferativa della LANL risultava più elevata e più vicina a quella della mielopoiesi normale. Le differenze citocinetiche tra pazienti responsivi e non responsivi e tra pazienti con durata della risposta e sopravvivenza al di sopra e al di sotto dei valori mediani della nostra casistica acquisivano una significatività statistica in analisi univariata ancora più elevata e mantenevano un forte valore prognostico in analisi multivariata.

Questi dati dimostrano la fattibilità clinica di uno studio dettagliato della cinetica proliferativa delle leucos acute mediante l'impiego di nuove metodiche citofluorimetriche e nel contempo, ribadiscono il potenziale valore prognostico dell'attività proliferativa delle LANL.

L'ibridazione in situ nel paziente onco-ematologico

coordinatori: P. Bernasconi, A. Cuneo

IBRIDAZIONE IN SITU NEL PAZIENTE ONCO-EMATOLOGICO

(coordinatori: P. Bernasconi, A. Cuneo)

IBRIDAZIONE IN SITU: DEFINIZIONE, METODICHE, APPLICAZIONI E LIMITI <i>A. Cuneo, G. Castoldi</i>	<i>pag.</i>	15
STUDIO DELLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE NUMERICHE E STRUTTURALI NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE <i>I. Wlodarska</i>	<i>pag.</i>	19
DEFINIZIONE DEL CLONE NEOPLASTICO NELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE <i>C. Mecucci</i>	<i>pag.</i>	20
ANALISI DELLA t(15;17) NELLA LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU <i>L. Longo, P.G. Pelicci</i>	<i>pag.</i>	21
TRISOMIA 8 NELLA LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA VALUTATA CON L'IBRIDIZZAZIONE IN SITU NON RADIOATTIVA <i>M. Sessarego, G. Fugazza, R. Bruzzone, F. Patrone</i>	<i>pag.</i>	22
LA TRISOMIA 7 CARATTERIZZA UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI LINFOCITI UMANI CHE INFILTRANO I TUMORI RENALI <i>P. Dal Cin</i>	<i>pag.</i>	23
L'IBRIDAZIONE IN SITU PER DOCUMENTARE IL CHIMERISMO E L'ORIGINE DELLA RECIDIVA NEL TRAPIANTO ALLOGENICO DI MIDOLLO OSSEO <i>P. Bernasconi, M. Boni, P.M. Cavigliano, D. Troletti, F. Passamonti, A. Nozza, E.P. Alessandrino, D. Caldera, M. Bonfichi, C. Bernasconi</i>	<i>pag.</i>	24
IDENTIFICAZIONE DI PROGENITORI EMOPOIETICI PHILADELPHIA-NEGATIVI IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA MEDIANTE IBRIDIZZAZIONE IN SITU IN FLUORESCENZA <i>C. Carlo Stella, G. Piovani, D. Garau, V. Rizzoli</i>	<i>pag.</i>	28
PERSISTENZA DI UN CLONE CARATTERIZZATO DA TRISOMIA 8 IN UN CASO DI LMC-PH+ IN REMISSIONE CITOGENETICA <i>G. Rege-Cambrin, P. Scaravaglio, A. Guerrasio, T. Guglielmelli, G. Saglio</i>	<i>pag.</i>	30
RIARRANGIAMENTO DEL CROMOSOMA 3q21-q26 NELLE EMOPATIE MIELOIDI. STUDIO MEDIANTE TECNICA FISH <i>P. Temperani, F. Giacobbi, G. Gandini, S. Volinia, G. Emilia</i>	<i>pag.</i>	31
RT/BCR IN SITU NELLA LMC: UNA NUOVA METODICA PER EVIDENZIARE LA PRESENZA INTRACELLULARE DI mRNA IBRIDO <i>N. Testoni, G. Martinelli, P. Farabegoli, M. Buzzi, S. Pelliconi, D. Raspadori, M. Salvucci, A. Zaccaria, S. Tura</i>	<i>pag.</i>	32
IMPIEGO DELL'IBRIDAZIONE IN SITU NELLO STUDIO DEI LINFOMI A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE E DELLA MALATTIA DI HODGKIN: DIFFERENTE INCIDENZA DI EBER2 <i>S. Pileri, S. Poggi, E. Sabbatini, G. Melilli, M. Benni, A. de Vivo</i>	<i>pag.</i>	33

IBRIDAZIONE IN SITU: DEFINIZIONE, METODICHE, APPLICAZIONI E LIMITI

ANTONIO CUNEO, GIANLUIGI CASTOLDI
Istituto di Ematologia, Università di Ferrara

Lo studio del cariotipo delle cellule neoplastiche riveste grande importanza nella diagnosi e nella sub-classificazione delle emopatie, nella selezione della risposta terapeutica.

La tecnica di citogenetica convenzionale, basata sull'arresto in profase o metafase delle cellule in divisione, sulla loro ipotonizzazione e sul bandeggio delle figure mitotiche ottenute, spesso risente negativamente dei seguenti fattori:

1. basso indice mitotico della popolazione neoplastica con scarso numero di mitosi analizzabili;
2. qualità sub-ottimale della preparazione cromosomica;
3. impossibilità di riconoscere il citotipo della metafase in esame.

Questi fattori precludono talora una esatta definizione del cariotipo.

Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante, unitamente all'affinamento di metodiche di rilevazione non-radioattive hanno consentito di affiancare alla citogenetica classica tecniche quali la ibridazione in situ fluorescente (FISH), che consentono una analisi più accurata di determinate anomalie cromosomiche.

Definizione e metodiche

La FISH è una tecnica che consente di rilevare il legame di una sonda di DNA ad una sequenza bersaglio di DNA genomico su cellule in metafase e su nuclei in interfase appositamente preparato su un normale vetrino.

Esistono in commercio numerosi tipi di sonde. Le più importanti nella citogenetica ematologica sono le seguenti:

- a) sonde riconoscenti sequenze ripetitive del DNA satellite o altre sequenze ripetute localizzate nella regione paracentromerica di un cromosoma. Questo tipo di sonda è essenzialmente impiegato per lo studio delle anomalie numeriche. Essendo le sequenze bersaglio ripetute, il rapporto segnale/disturbo è molto vantaggioso.
- b) sonde riconoscenti sequenze di DNA specifiche; vengono impiegate per dimostrare la delezione di un gene e per lo studio di traslocazioni che comportano la giustapposizione di sequenze normalmente disposte su cromosomi diversi;
- c) sonde riconoscenti diverse sequenze disposte lungo un intero cromosoma o lungo una banda di un cromosoma; vengono impiegate principalmente per evidenziare un intero cromosoma o una sua banda nell'analisi di riarrangiamenti complessi.

Le tecniche di ibridazione in situ si fondano essenzialmente sui seguenti passaggi:

1) preparazione del vetrino

Il materiale cellulare deve essere adeguatamente fissato. Classicamente si impiegano preparazioni cromosomiche (di nuova preparazione o invecchiate) costituite da cellule fissate in metanolo acetico (3:1). Possono essere anche utilizzate preparazioni citologiche ed istologiche.

Il vetrino viene trattato con RNAsi ed enzimi proteolitici al fine, rispettivamente, di mini-

mizzare il legame della sonda all'RNA e di migliorare la accessibilità della sonda stessa al DNA cromosomico e nucleare;

2) preparazione della sonda

Per la visualizzazione del legame col DNA bersaglio, la sonda viene modificata mediante la *nick translation* che consiste in una reazione catalizzata che consente la incorporazione nella sonda di nucleotidi marcati (biotinati o digoxigenati). La sonda di DNA deve avere una lunghezza di 50-400 bp per una buona accessibilità alle sequenze complementari del DNA bersaglio;

3) denaturazione del DNA cellulare e della sonda

Per permettere l'allineamento ed il legame della sonda alle sequenze complementari del DNA bersaglio entrambi i tipi di DNA devono trovarsi come singola catena. Allo scopo si esegue la denaturazione sfruttando il calore e la formamide in soluzione salina;

4) ibridazione

Il vetrino viene incubato con la miscela contenente la sonda biotinata lungo una notte. La sonda si legherà specificamente al DNA bersaglio e, con legame meno forte, ad altre sequenze genomiche che presentano un certo grado di omologia col DNA bersaglio (legame aspecifico).

Successivamente a questa incubazione si procede alla rimozione della sonda legata aspecificamente mediante ripetuti lavaggi.

Entrambi questi passaggi, cruciali per ottenere un buon rapporto tra segnale specifico e segnale aspecifico, vengono condotti in condizioni sperimentali di "stringenza" (*stringency*) adeguate per ciascun tipo di sonda e di preparato impiegato.

La "stringenza" dipende da diversi fattori, tra cui i più importanti sono rappresentati dalla concentrazione di formamide e salina e dal calore. Variando questi fattori durante il passaggio di ibridazione e durante i lavaggi post-ibridazione si determinano condizioni di bassa o elevata stringenza ottenendo così, rispettivamente, un segnale più intenso con un maggiore grado di specificità o un segnale più debole, ma più "pulito";

5) rilevazione del segnale

Questo passaggio sfrutta la capacità dell'avidina fluoresceinata di legarsi alla sonda biotinata. Si procede in genere ad una o più amplificazioni sfruttando un monoclonale anti-avidina biotinato ed un secondo strato di avidina fluorescente.

Sono oggi in commercio alcune sonde direttamente fluoresceinate che consentono di risparmiare i passaggi di amplificazione.

Sono anche disponibili tecniche di rilevazione immunoenzimatiche.

Applicazioni

La possibilità di visualizzare con metodiche non-radioattive la presenza di determinate sequenze di DNA o di RNA su preparazioni cromosomiche, su nuclei in interfase, su preparati citologici ed istologici si presta ovviamente ad un numero di applicazioni che vanno dalla mappatura del genoma umano, allo studio dell'espressione genica, alla microbiologia e virologia, alla diagnostica prenatale ed alla citogenetica delle neoplasie.

Limitatamente alla citogenetica ematologica i principali impieghi della FISH sono:

Studio delle trisomie e monosomie nelle cellule in metafase e nei nuclei in interfase

Valutando con una sonda riconscente sequenze ripetitive paracentromeriche di un cromosoma, il soggetto normale presenta due spot fluorescenti nel nucleo in interfase in oltre il 95% delle cellule. Cellule con un solo segnale (falsa monosomia) sono in genere rinvenute in percentuale inferiore al 4%, mentre cellule con tre segnali (falsa trisomia) sono rinvenute inferiori all'1%.

Studio delle traslocazioni

Viene visualizzata la giustapposizione di sequenze normalmente disposte su cromosomi diversi. Ad esempio nella traslocazione t(9;22) il gene bcr ed il gene abl possono essere riconosciuti da due sonde rispettivamente biotinate e digoxigenate. Impiegando come sistemi di rilevazione fluorocromi diversi (ad esempio rodamina e fluoresceina) si dimostra la giustapposizione dei due segnali di colore diverso lungo il cromosoma 22 e la presenza dei due segnali accoppiati nel nucleo in interfase.

Studio dei riarrangiamenti cromosomici complessi

Vengono sfruttati diversi tipi di sonda scelti sulla base delle indicazioni dell'analisi citogenetica convenzionale.

Di largo impiego in questo tipo di analisi sono le sonde riconscenti regioni disposte in sequenza lungo un intero cromosoma (*chromosome painting*) o lungo una intera banda che consentono di dimostrare la partecipazione di un determinato cromosoma o di parte di esso nella composizione di un marcatore complesso.

Studio della malattia minima residua

Questo tipo di approccio si fonda sulla possibilità di analizzare rapidamente un grande numero di cellule in interfase in pazienti in remissione qualora questi abbiano dimostrato la presenza alla diagnosi di aneuploidia o traslocazioni per le quali siano disponibili sonde adeguate. Gli studi sono stati eseguiti in prevalenza in pazienti affetti da trisomia in quanto la tecnica è in questi casi molto sensibile.

Un ulteriore affinamento deriva dalla possibilità di identificare la cellula in esame mediante colorazione immunologica del fenotipo di membrana o mediante preventiva localizzazione della cellula a morfologia sospetta su vetrino colorato con miscela panottica e successiva rilocizzazione della stessa cellula dopo l'esperimento di ibridizzazione.

È ovviamente possibile monitorare mediante FISH i pazienti trapiantati con donatori di sesso diverso.

Rilevazione della amplificazione genica

Impiegando sonde riconscenti sequenze di geni possibilmente amplificati in determinate forme tumorali (ad esempio l'oncogene ERBB2 nel carcinoma mammario) si può dimostrare la effettiva amplificazione qualora l'esperimento di FISH metta in evidenza segnali multipli.

Vantaggi e limiti della FISH

Una disamina delle potenzialità della FISH in ematologia non può prescindere dalla considerazione di fondo che questa tecnica affianca la citogenetica classica, ma non può sostituirla. Infatti la FISH può essere applicata qualora si conosca, sulla base dei risultati dell'analisi citogenetica, cosa andare a cercare.

I principali vantaggi derivanti dalla applicazione della FISH sono qui riassunti:

- possibilità di analizzare la presenza di una determinata anomalia nel nucleo in interfase in tutte le neoplasie con basso indice mitotico, eliminando il problema della scarsità di metafasi analizzabili. La FISH ha trovato ad oggi ampia applicazione nello studio della leucemia linfatica cronica, ove questa tecnica consente di dimostrare la presenza di trisomia 12 in pazienti normali all'analisi citogenetica.

La sensibilità della FISH è generalmente elevata: occorre notare tuttavia che fino ad un 10% di cellule in interfase può mostrare falsa monosomia nel soggetto normale. Ciò impone cautela nell'impiego di questa tecnica nello studio della malattia minima residua di soggetti portatori di delezione parziale o totale di un cromosoma.

L'introduzione in commercio di sonde riconscenti le sequenze geniche coinvolte nelle principali traslocazioni consentirà una larga applicazione di questa tecnica nello studio e nel monitoraggio clinico delle leucosmi acute e nei linfomi;

- possibilità di analizzare rapidamente un grande numero di cellule in interfase. Non viene eliminato, qualora si vogliano analizzare cellule in metafase, il problema del gettito mitotico e della ricerca microscopica della metafase; analizzatori di immagine possono essere di aiuto in questa fase;

- possibilità di visualizzare direttamente su preparato citologico o istologico la presenza di una determinata anomalia cromosomica numerica in cellule riconoscibile mediante colorazione immunocitochimica. Questa applicazione non è di semplice ed immediata esecuzione.

In conclusione, la FISH rappresenta una metodica di grande utilità, in grado di migliorare la sensibilità degli studi citogenetici e di permettere una più esatta definizione del cariotipo della cellula neoplastica.

Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante e dei sistemi automatizzati di visualizzazione forniranno nei prossimi anni le sonde necessarie per la analisi di molte anomalie cromosomiche e garantiranno il possibile impiego simultaneo di sonde multiple coniugate a fluorocromi diversi.

Grazie a questi progressi la FISH, che ha già iniziato ad espandere la sua potenzialità applicativa dal campo della ricerca sperimentale a quello della pratica clinica, affiancherà la citogenetica classica nella diagnosi e nel monitoraggio citogenetico delle malattie neoplastiche di pertinenza ematologica.

STUDIO DELLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE NUMERICHE E STRUTTURALI NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE

IWONA WLODARSKA

Center for Human Genetics, Catholic University of Leuven, Belgium

La tecnica citogenetica convenzionale presenta limiti interpretativi legati al potere risolutivo del bandeggio ed alla necessità della presenza di cellule in mitosi.

Lo sviluppo delle tecniche di ibridazione di sequenze di DNA ai cromosomi in metafase ed ai nuclei in interfase ha consentito di affiancare l'ibridazione in situ (FISH) alla citogenetica convenzionale nella definizione del cariotipo delle neoplasie ematologiche.

Oggi sono disponibili per la FISH i cosiddetti *cosmid probes*, probes da YAC (*yeast artificial chromosomes*), miscele di probes riconoscenti diverse sequenze dislocate lungo un intero cromosoma (ottenute da *whole chromosome libraries*) oltre a sonde di DNA specifiche per le regioni paracentromeriche di ciascun autosoma.

La FISH si presta molto bene dunque alla 1) definizione esatta del punto di rottura delle traslocazioni, 2) alla rilevazione e definizione di anomalie strutturali, quali gli isocromosomi, i cromosomi ad anello, cromosomi marcatori complessi, *homogeneously staining regions* (HSR); 3) allo studio delle anomalie numeriche.

Recentemente l'applicazione combinata della tecnica FISH e della marcatura immunologica del fenotipo di membrana ha inoltre permesso di visualizzare direttamente il citotipo della cellula in esame.

Queste diverse applicazioni della FISH verranno illustrate con esempi relativi allo studio da noi condotto su cellule leucemiche e linfomatose, confermando l'importanza di questa tecnica nello studio e nel monitoraggio clinico delle aberrazioni cromosomiche nelle neoplasie ematologiche.

DEFINIZIONE DEL CLONE NEOPLASTICO NELLE SINDROMI MIELODI-SPLASTICHE

CRISTINA MECUCCI

Dipartimento di Medicina Clinica, Patologia e Farmacologia, sez. di Ematologia ed Immunologia Clinica, Policlinico Monteluce, Perugia

La presenza di anomalie citogenetiche è determinante ai fini della diagnosi di sindrome mielodiplastica in presenza di un midollo dismorfico per una o più serie ematopoietiche.

La lista della anomalie cariotipiche ricorrenti nelle sindromi mielodisplastiche, sia apparentemente primitive che insorgenti dopo esposizione a tossici, include aberrazioni numeriche (trisomie e monosomie) e strutturali, in particolar modo delezioni, ma anche traslocazioni.

Studi preliminari, con metodiche di ibridazione in situ non radioattiva nelle sindromi mielodisplastiche, indicano alcune utili applicazioni a complemento della citogenetica convenzionale:

- possibilità di delimitare i punti di rottura cromosomici in maniera più precisa di quanto ottenuto con le metodiche di bandeggio (traslocazione 1;7);
- monitoraggio anche nei nuclei in interfase delle anomalie numeriche specifiche (trisomia 8; monosomia 7);
- studio dei cloni multipli e della loro fluttuazione citogenetiche nelle diverse fasi della malattia, indipendentemente dal trattamento.

ANALISI DELLA t(15;17) NELLA LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU

LETIZIA LONGO, PIER GIUSEPPE PELICCI

Istituto di Clinica Medica I, Policlinico Monteluce, Perugia

Fino ad oggi una serie di anomalie cromosomiche sono state identificate come anomalie acquisite in disordini ematologici correlate con specifiche caratteristiche cliniche, morfologiche ed immunofenotipiche. L'analisi citogenetica svolge un importante ruolo nella diagnosi clinica e nella prognosi di pazienti ematologici. Comunque, uno studio citogenetico convenzionale, talvolta, non può fornire informazioni complete solo sulla base dell'interpretazione del bandeggio cromosomico. La tecnica di ibridazione in situ ha permesso di superare alcune difficoltà dell'analisi citogenetica.

Mediante esperimenti di ibridazione in situ radioattiva abbiamo studiato finemente il punto di rottura sul cromosoma 17, della traslocazione 15;17, specifica delle leucemie acute promielocitiche (LAP).

La regione cromosomica del 17 coinvolta nella rottura è la banda q11-21. In questa banda cromosomica sono localizzati molti geni potenzialmente coinvolti nella traslocazione: c-erbA-1, c-erbB-2, G-CSF, RARa ed MPO, ed il nostro scopo era di identificare i geni più vicini al punto di rottura.

Prima di tutto, sono stati selezionati dei casi di leucemie mieloidi acute (LMA) con riarrangiamenti del cromosoma 17 nella banda q11-21. Mediante esperimenti di ibridazione in situ ogni gene suddetto è stato localizzato su questi mutanti citogenetici. In questo modo siamo riusciti ad identificare la posizione relativa dei geni rispetto al punto di rottura e stabilire quindi che i due geni a cavallo della rottura sono: c-erbB-2, centromerico, e RARa, telomerico. Con esperimenti di Southern blot si è poi stabilito che il gene rotto dalla traslocazione è RARa.

Esperimenti di ibridazione in situ su preparati cromosomici sono stati essenziali anche per stabilire la presenza di una micro-traslocazione, citogeneticamente non identificabile, in alcuni casi di LAP con cariotipo normale. Per questo studio è stata adoperata una tecnica di ibridazione in situ non radioattiva, che prevede l'uso di sostanze fluorescenti per stabilire la localizzazione di un gene. Questa metodica, estremamente più sensibile di quella radioattiva, ha permesso di identificare la presenza del gene RARa sul cromosoma 15 e del gene PML sul cromosoma 17 in due casi di LAP con cariotipo normale. Questa analisi è stata confermata anche a livello molecolare.

TRISOMIA 8 NELLA LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA VALUTATA CON L'IBRIDIZZAZIONE IN SITU NON RADIOATTIVA

MARIO SESSAREGO, GIUSEPPINA FUGAZZA, ROBERTO BRUZZONE, FRANCO PATRONE

Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo di patologie clonali caratterizzate da emopoiesi inefficace con cellularità midollare elevata e pancitopenia periferica. La natura clonale delle MDS è stata dimostrata con diverse modalità (citogenetica, isoenzimi della G6PD, analisi di RFLP, ecc.); tuttavia è ancora oggetto di discussione se il clone anormale tragga origine da una *stem cell* totipotente o se l'evento mutazionale possa coinvolgere un progenitore già *committed*.

Noi abbiamo analizzato 6 controlli e 3 casi di leucemia mielomonocitica cronica (LMMC) con trisomia 8 (+8), con la tecnica della FISH applicata su cellule midollari (metafasi e nuclei in interfase) e su strisci di sangue periferico, preparati in modo tale da poter confrontare la morfologia e la presenza di 2 o 3 cromosomi 8.

La +8 è risultata essere presente nel 92, 70 e 60% rispettivamente con la citogenetica su metafasi di cellule midollari. Tale percentuale è stata sostanzialmente confermata con la FISH analizzando sia metafasi che nuclei in interfase (500 per caso). I preparati di sangue periferico sono fissati con metanolo e colorati con Giemsa, montati in tampone fosfato; vengono fotografati alcuni campi significativi e registrate le coordinate; sono poi trattati per la FISH (utilizzando α -8), ma non controcolorati con lo ioduro di propidio. Vengono poi riesaminate le cellule osservate in Giemsa. Sono state analizzate 40, 58 e 62 cellule per ciascun caso.

I risultati possono essere così sintetizzati:

1. i linfociti sono sempre risultati disomici;
2. neutrofili e monociti possono essere disomici o trisomici 8;
3. morfologicamente non sono evidenti differenze fra cellule con 2 o 3 cromosomi 8. Quindi la +8 non ostacola una normale differenziazione cellulare sino a neutrofilo e monocita maturo;
4. fra neutrofili e monociti non sono state osservate diverse percentuali di +8.

In conclusione quindi questi dati suggeriscono che se è vero che le SMD sono una *stem cell disease*, l'acquisizione della +8 avviene a carico di una cellula *committed* in senso mielomonocitario.

LA TRISOMIA 7 CARATTERIZZA UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI LINFOCITI UMANI CHE INFILTRANO I TUMORI RENALI

PAOLA DAL CIN

Centre for Human Genetics, Catholic University of Leuven, Belgium

L'analisi citogenetica ha dimostrato la presenza di anomalie cromosomiche in quasi tutti i tipi istologici di tumore renale. Anomalie cromosomiche specifiche sono associate e distinguono due particolari tipi istologici di carcinoma renale, il carcinoma papillare ed quello non-papillare.

Tuttavia, è possibile incontrare in entrambi i tipi di carcinoma cloni cellulari caratterizzati esclusivamente dalla presenza di trisomia 7. La presenza di questo clone è rilevabile anche in campioni cellulari ottenuti dal tessuto sano circondante il tumore.

Al fine di una identificazione del tipo cellulare recante la trisomia 7 nei tumori renali, abbiamo eseguito una ibridazione in situ non-radioattiva su sezioni istologiche, mettendo in evidenza una popolazione di piccole cellule mononucleate a morfologia linfocitaria con tre segnali, un dato indicativo della presenza della trisomia 7 nelle cellule infiammatorie infiltranti il tumore.

Studiando mediante FISH una popolazione cellulare arricchita mediante separazione su Ficoll o mediante separazione immunomagnetica con anticorpi anti-CD3 ed anti-CD4, abbiamo potuto documentare come la gran parte di queste cellule presentasse la trisomia 7.

La prova finale della natura linfocitaria delle cellule recanti trisomia 7 nei pazienti affetti da tumore renale è derivata da esperimenti di doppia marcatura del fenotipo di membrana con anticorpi anti CD4 e colorazione nucleare mediante FISH.

Linfociti CD4⁺ con trisomia 7 sono stati anche rinvenuti in sospensioni cellulari ottenute da tessuto timico normale.

Questi dati indicano la presenza di un fenomeno biologico di significato ignoto per cui una anomalia cromosomica numerica rappresenterebbe un fenomeno associato alle normali difese dell'organismo contro i tumori renali. In alternativa, la trisomia 7 potrebbe rappresentare un segnale di sofferenza cellulare in seguito alla secrezione da parte delle cellule tumorali di citochine.

L'IBRIDAZIONE IN SITU PER DOCUMENTARE IL CHIMERISMO E L'ORIGINE DELLA RECIDIVA NEL TRAPIANTO ALLOGENICO DI MIDOLLO OSSEO

P. BERNASCONI, M. BONI, P.M. CAVIGLIANO, D. TROLETTI, F. PASSAMONTI, A. NOZZA,
E.P. ALESSANDRINO, D. CALDERA, M. BONFICHI, C. BERNASCONI
Istituto di Ematologia, Università di Pavia e IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia

L'ibridazione in situ con sonde molecolari fluoresceinate (FISH) è una metodica di recente introduzione, che consente di eseguire l'analisi citogenetica anche su cellule in interfase (*interphase cytogenetics*) e di identificare specifici cromosomi nelle cellule in metafase. La FISH presenta quindi stretti rapporti sia con la citogenetica classica che con la biologia molecolare. Come quest'ultima infatti, si fonda sul principio che una sequenza di DNA a singolo filamento forma un legame stabile con una sequenza di DNA (sonda molecolare) a lei complementare. Nella FISH il DNA bersaglio, attaccato ad un substrato è costituito dal DNA nucleare della cellula in interfase o in metafase. Dopo la denaturazione e con l'ibridazione il legame che si forma tra DNA bersaglio e DNA della sonda, in precedenza marcata con biotina o digossina, viene evidenziato con avidina coniugata con fluoresceina (FITC) o con antidigossina coniugata con rodamina.

La FISH è una metodica destinata ad assumere un'importanza sempre maggiore perché è rapida, presenta una elevata sensibilità e specificità, consente di esaminare parecchie cellule comprese quelle giunte al termine della differenziazione, permette di correlare il dato citogenetico con quello morfologico, può essere adattata a sistemi automatici, identifica cromosomi marcatori quando utilizza sonde specifiche per l'intero cromosoma.

Da queste premesse si comprende come la FISH, applicata all'analisi di sospensioni cellulari midollari prelevate a pazienti affetti da leucemie o linfomi con marcatori specifici possa ridurre il numero delle analisi citogenetiche complete, garantendo una maggiore sensibilità dei risultati rispetto alla classica analisi cromosomica. Infatti, quest'ultima, potrà essere condotta solo all'esordio per identificare l'anomalia cromosomica specifica, successivamente si potrà impiegare la sola FISH che consentirà di monitorare la malattia e quindi valutare l'efficacia di un particolare regime terapeutico.

Attualmente, oltre a sonde molecolari centromeriche, sono disponibili sequenze nucleotidiche complementari a quelle dei punti di rottura delle più frequenti traslocazioni cromosomiche presenti nelle leucemie e nei linfomi. Ad esempio nei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC) ed in terapia con α -interferone è ora possibile monitorare il clone Ph' positivo utilizzando due sonde, una marcata con biotina complementare all'estremità 3' dell'oncogene ABL e l'altra marcata con digossina complementare all'estremità 5' di BCR. L'avvenuta ibridazione tra sonda 3' ABL e DNA bersaglio sarà indicata da un segnale verde (se si utilizza avidina coniugata con FITC), mentre quella tra sonda 5' BCR e DNA complementare da un segnale rosso (se si utilizza anti-digossina marcata con rodamina). Le cellule normali presenteranno quattro segnali distinti (due rossi e due verdi), quelle leucemiche due segnali separati (uno rosso ed uno verde) e due riuniti (rosso-verde).

È ora possibile applicare la FISH con doppia marcatura anche nella leucemia acuta promielocitica (LAP).

Presso il nostro laboratorio sono stati sino ad ora esaminati quattro pazienti affetti da LAP e sottoposti ad allotrapianto di midollo osseo. La FISH è stata condotta con due sonde molecolari, una marcata con biotina complementare alla sequenza di DNA localizzata a livello del punto di rottura del cromosoma 15 (banda 15q22), l'altra marcata con digossina complementare alla sequenza nucleotidica mappata a livello di rottura del cromosoma 17 (banda 17q21). L'avvenuto legame tra sonda e DNA complementare è indicato nel primo caso da un segnale verde mentre nel secondo caso da un segnale rosso. Anche qui, come già per la LMC, le cellule leucemiche presentano due segnali separati (uno rosso e uno verde) e due riuniti (doppio segnale rosso-verde). Uno solo dei quattro pazienti sinora studiati ha mostrato la sovrapposizione di rosso e verde nell'1.5% delle cellule midollari e quindi la persistenza del clone leucemico a quattro mesi dal trapianto allogenico. Tutti e quattro presentavano un'analisi cromosomica normale, se condotta con le modalità convenzionali. Dati recenti indicano che la FISH è in grado di dimostrare una cellula leucemica o linfomatosa su 10^2 - 10^3 cellule esaminate; possiede quindi una sensibilità inferiore a quella della *polymerase chain reaction* (PCR) (una cellula su 10^5 - 10^6 esaminate). Quest'ultima però, a differenza della FISH, non permette di correlare il dato citogenetico con quello morfologico, e non consente quindi di identificare la cellula neoplastica direttamente sullo striscio di sangue midollare o periferico. Tuttavia, la FISH con doppio tracciante può dare aspetti falsi positivi, in quanto per conformazione spaziale della cellula le due sonde possono sembrare sovrapposte. Presso il nostro laboratorio questa eventualità è stata quantificata eseguendo la FISH con doppia marcatura sugli strisci di sangue periferico di soggetti sani. L'incidenza di cellule che sembravano possedere il doppio segnale è stata dello 0.5%.

Per le caratteristiche descritte, la FISH può essere utilizzata con vantaggio nel trapianto di midollo osseo allogenico o autologo per valutare la qualità della remissione nei pazienti che all'esordio presentano un'anomalia cromosomica specifica. Nell'allotrapianto inoltre la FISH dimostra l'attecchimento molto precocemente, valuta il chimerismo e stabilisce l'origine di una eventuale recidiva. Sino ad ora questi requisiti erano posseduti solo dalla citogenetica classica e dalla biologia molecolare. La prima utilizza il polimorfismo cromosomico o i cromosomi del sesso a seconda che donatore e ricevente siano di sesso uguale o diverso; la seconda utilizza invece la diversità di lunghezza dei frammenti di DNA, ottenuti dopo digestione enzimatica con endonucleasi, per distinguere le cellule del donatore da quelle del ricevente. Entrambe le metodiche sono però scarsamente sensibili quando si tratta di studiare popolazioni cellulari miste (14). La citogenetica classica valuta solo la quota di cellule proliferanti e quindi non esamina l'intera popolazione cellulare midollare, studiata invece dalla FISH. Questo limite dell'analisi citogenetica sembra anche responsabile dell'erronea interpretazione dell'origine di una recidiva post-trapianto nei casi in cui donatore e ricevente sono di sesso diverso. Le recidive che secondo la classica analisi cromosomica sembrerebbero avvenute nelle cellule del donatore, sono invece legate ad una ripresa del clone leucemico del paziente, come dimostrato dalla FISH.

Per questi motivi nel nostro laboratorio abbiamo applicato la FISH con sonda centromerica biotinilata specifica per il cromosoma y, in pazienti affetti da differenti malattie ematologiche che hanno ricevuto la sospensione cellulare midollare da un donatore di sesso diverso. Le analisi sono state eseguite a 10-20 giorni dal trapianto e successivamente ogni mese. Sono stati sinora esaminati 14 pazienti, dieci maschi e quattro femmine. In 12 pazienti il donatore è stato

un fratello/sorella, nei rimanenti 2 casi un volontario non consanguineo. I nostri dati indicano che quando la coppia donatore/ricevente è femmina/maschio la sensibilità della metodica è dello 0.1% (viene identificata una cellula maschile su mille esaminate), mentre nel caso inverso è del 5%, perché alcune sequenze del cromosoma y sono condivise dagli autosomi.

In 10 pazienti è stato possibile documentare l'avvenuto attecchimento dopo un tempo mediano dal trapianto di 13 giorni (intervallo 12-18 giorni). Cinque dei 10 pazienti di sesso maschile sono tuttora in remissione completa (RC); tre con tessuto emopoietico costituito esclusivamente da cellule femminili, come indicato dalla FISH e dalla citogenetica; in un quarto paziente abbiamo invece osservato una discrepanza fra i risultati ottenuti dalle due metodiche: la FISH ha identificato lo 0.1% di cellule maschili, mentre l'analisi cromosomica ha mostrato solo mitosi femminili.

L'ultimo dei cinque pazienti in RC, affetto da anemia aplastica, è particolarmente interessante, avendo presentato una buona correlazione tra percentuale di cellule marcate dalla sonda specifica per il cromosoma y, dato citogenetico e parametri ematologici. In particolare a 6 mesi dal trapianto la FISH ha mostrato che la quota di cellule positive per il cromosoma y, che fino ad allora si aggirava intorno al 10%, è risalita fino al 72%. All'analisi citogenetica il 47% delle cellule presentava un cariotipo maschile; contemporaneamente sul piano clinico il paziente aveva sviluppato una pancitopenia ed una biopsia osteomidollare aveva documentato una grave ipoplasia midollare. Si riprese allora il trattamento con ciclosporina e si incrementò il dosaggio dei corticosteroidi.

Nei mesi successivi la quota di cellule positive per il cromosoma y, determinata dalla FISH, si attestava sul 48-54% con buona corrispondenza con il dato citogenetico; persisteva la grave ipoplasia midollare. A 12 mesi dal trapianto, però, la FISH ha fissato la percentuale di cellule maschili intorno al 5% e l'analisi cromosomica ha mostrato solo mitosi femminili; inoltre, si è ottenuta la normalizzazione dei valori emocromocitometrici ed una nuova biopsia osteomidollare ha documentato una buona ripopolazione cellulare midollare.

Dei restanti 5 pazienti di sesso maschile, 2 sono deceduti per infezioni e 3 sono ricaduti. Nei primi 2 pazienti con leucopenia persistente, sino a 72 giorni dal trapianto in un caso, la FISH è stata l'unica metodica a documentare l'attecchimento. In 2 dei 3 pazienti recidivati la FISH ha fissato la quota di cellule midollari contenenti l'y intorno allo 0.6% ed all'8% rispettivamente, mentre nel terzo, affetto da leucemia acuta linfoide (LAL), tutte le cellule midollari sono risultate y-negative. In tutti e tre questi pazienti l'analisi citogenetica ha mostrato l'esclusiva presenza di cellule a cariotipo femminile nel midollo.

Un paziente con quota stabile di cellule midollari maschili alla FISH, è recidivato in sede extramidollare; il tessuto neoplastico era costituito solo da cellule marcate dalla sonda specifica per il cromosoma y. In un secondo paziente la FISH ha mostrato un progressivo aumento delle cellule midollari maschili e la citogenetica ha documentato la ricomparsa del clone iperdiploide già identificato alla diagnosi. L'ultimo paziente, quello affetto da LAL, ha sviluppato una meningosi leucemica e tutte le cellule del liquor cerebrospinale contenevano il cromosoma y come indicato dalla FISH.

Per quanto riguarda le 4 pazienti di sesso femminile, tre sono attualmente in RC con una quota di cellule marcate dalla sonda cromosoma y-specifica pari all'1%, 0.2% e 0.1% rispettivamente (percentuali corrette tenendo un *cut-off* del 5%) a 2, 13, 16 mesi dal trapianto. La FISH ha documentato l'avvenuto attecchimento anche nella quarta paziente che è però dece-

duta per GvHD acuta di grado II a localizzazione cutanea ed intestinale.

In conclusione, la FISH documenta l'attecchimento molto più precocemente delle altre metodiche oggi disponibili, valuta il chimerismo e l'origine della recidiva più correttamente della citogenetica classica perché consente di esaminare l'intera popolazione cellulare midollare.

IDENTIFICAZIONE DI PROGENITORI EMPOIETICI PHILADELPHIA-NEGATIVI IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA MEDIANTE IBRIDIZZAZIONE IN SITU IN FLUORESCENZA

CARMELO CARLO STELLA, GIOVANNA PIOVANI, DANIELA GARAU, VITTORIO RIZZOLI
Cattedra di Ematologia, Centro Trapianti di Midollo Osseo, Parma

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una malattia della cellula staminale caratterizzata dalla coesistenza di progenitori Philadelphia-positivi (Ph-pos) e Ph-negativi (Ph-neg). Scopo del presente lavoro è stato di valutare, mediante citogenetica convenzionale e ibridizzazione in situ in fluorescenza (FISH), la presenza del cromosoma Ph in colonie CD34+ di pazienti (n=7) con LMC.

Per la FISH è stato utilizzato un probe biotilinato (Oncor, Gaithersburg, Md, USA) che ibridizza l'oncogene abl. Per verificare la localizzazione cromosomica di abl, il probe è supplementato di DNA biotilinato che ibridizza le sequenze ripetitive AATGG della regione pericentrica del cromosoma 9.

Dopo trattamento con colchicina, singole colonie venivano aspirate, trasferite in multipiastre da 96 pozzetti, incubate (25 min, 37°C) in KCl (0.075 M) e fissate in metanolo/acido acetico (4:1). Ciascuna colonia, risospesa in PBS veniva trasferita su vetrino e lasciata aderire. Dopo trattamento con etanolo (100%, 60 min), i vetrini venivano immersi (10 min) in HCl (0.1 M)/Triton X-100 (0.5%) e quindi in SSC 2X. La denaturazione del DNA (70°C) e SSC 2X, era seguita da deidratazione in etanolo freddo (80, 90, 100%). I vetrini venivano quindi incubati (16 h, 37°C) con 10 µl di miscela di ibridizzazione (50% formamide, 10% destrano solfato, 2x SSC), 10 µl di DNA di sperma di salmone (500 mg/ml) o 10 µl di DNA di placenta umana (500 mg/ml) e 10 µl di probe anti-abl (10 µg/ml) biotilinato. Dopo l'ibridizzazione veniva eseguito un lavaggio in formamide (50%) e SSC 2x (43°C, 20 min) e due lavaggi in SSC 2x (4 min, 37°C).

L'ibridizzazione veniva rivelata mediante avidina-FITC. Il segnale di fluorescenza era amplificato mediante incubazione con anticorpo anti-avidina biotilinato seguito da avidina/FITC. I vetrini, controcolorati con ioduro di propidio, erano esaminati mediante microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiophot).

L'arricchimento di cellule CD34+ mediante immunoaderenza permetteva di ottenere frazioni cellulari altamente purificate (cellule CD34+ = 74%). Il numero medio (\pm ESM) di colonie generate da 10.000 cellule CD34+, stroma-aderenti era di 888 ± 188 (controllo) e 570 ± 258 (mafosfamide). Il risultato dell'analisi di colonie mediante citogenetica convenzionale e FISH non ha evidenziato discrepanze, fornendo uguali percentuali di progenitori Ph-neg. Peraltro, l'analisi mediante FISH ha permesso di analizzare i progenitori emopoietici di un caso di LMC Ph-neg, ma portatore del riarrangiamento bcr-abl all'esame del DNA.

La frazione stroma-aderente CD34+ conteneva $38 \pm 14\%$ (controllo) e $56 \pm 18\%$ (mafosfamide) ($p \leq .025$) progenitori Ph-neg. In tre su sette casi, nella frazione stroma-aderente, CD34+, trattata con mafosfamide è stata dimostrata esclusivamente la presenza di progenitori Ph-neg.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che: 1) è possibile svelare mediante FISH il riarrangiamento dell'oncogene abl in progenitori emopoietici di pazienti con LMC Ph-pos e Ph-neg; 2) tale approccio può essere efficacemente utilizzato sia dopo manipolazioni cellulari in vitro

che dopo trapianto di midollo; 3) la FISH eseguita su cellule clonate in vitro consente di quantificare l'emopoiesi normale e quella leucemica a diversi livelli ontogenetici e di identificare la filiera differenziativa di appartenenza delle cellule analizzate.

PERSISTENZA DI UN CLONE CARATTERIZZATO DA TRISOMIA 8 IN UN CASO DI LMC-Ph⁺ IN REMISSIONE CITOGENETICA

G. REGE-CAMBRIN, P. SCARAVAGLIO, A. GUERRASIO, T. GUGLIEMELLI, G. SAGLIO

Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

La terapia con α -interferone (α -IFN) può indurre una remissione citogenetica nel 10-20% dei pazienti affetti da LMC Ph⁺; tuttavia, la PCR dimostra la persistenza di malattia residua nella pressoché totalità di questi casi. Un paziente affetto da LMC Ph⁺ è stato trattato per un anno con IFN, ottenendo una remissione citogenetica completa. A 18 mesi dalla sospensione del trattamento compariva un clone minoritario, con trisomia 8 addizionale, che dimostrava fluttuazioni spontanee nel tempo. Dopo chemioterapia ad alte dosi, seguita da IFN, si otteneva una nuova remissione citogenetica con persistente positività alla PCR. Utilizzando una sonda per il DNA centromerico del cromosoma 8, la FISH dimostrava la presenza di tre segnali nel 6% dei nuclei interfascici. Questo caso dimostra come nella LMC Ph⁺ la FISH possa fornire un dato quantitativo di sensibilità intermedia tra la citogenetica e la PCR nell'analisi della malattia residua, con il vantaggio di poter evidenziare fenomeni di evoluzione clonale quali anomalie cromosomiche addizionali.

RIARRANGIAMENTO DEL CROMOSOMA 3q21-q26 NELLE EMOPATIE MIELOIDI. STUDIO MEDIANTE TECNICA FISH

P. TEMPERANI, F. GIACOBBI, G. GANDINI, S. VOLINIA, G. EMILIA

Clinica Medica II, Università di Modena

Negli ultimi anni sono state descritte alterazioni strutturali del cromosoma 3 a livello delle bande q21-q26, in sindromi mielodisplastiche (SMD), leucemie mieloidi croniche (LMC) ed acute (LMA). Il tratto q21-q26 può essere coinvolto in inversioni, traslocazioni reciproche e delezioni. La ricorrenza di tali riarrangiamenti suggerisce la presenza in quella sede di sequenze geniche implicate nella tumorigenesi; di qui la necessità di precisare il locus di mappatura di sequenze geniche note e non note, distribuite nella regione 3q21-q26 e di indagarne l'eventuale coinvolgimento nella alterazione cromosomica. Abbiamo studiato 1 caso di LMA-M4, 1 caso di mielofibrosi idiopatica (MFI) e 3 casi di LMC in f.a. e c.b. con inv(3q); 1 caso di LMA-M5b con t(3;3) ed 1 caso di linfoma centrocitico con t(3q;?).

Allo scopo sono state utilizzate alcune sonde che identificano: a) l'intero cromosoma 3, *painting 3*, per verificare i dati della citogenetica classica; b) il gene che codifica per il recettore della transferrina (RTf), mappato in 3q26qter; c) un segmento cromosomico di 2 Mb della regione distale 3q clonato in cromosoma artificiale di lievito (YAC H10), come possibile nuovo mezzo di indagine delle alterazioni 3q. Con la sonda *painting 3* si è confermato che nelle inversioni è interessato il solo cromosoma 3; nelle traslocazioni 3;3 sono coinvolti entrambi ed esclusivamente i cromosomi 3 e nella t(3;?) il cromosoma ricevente non è un 3, ma un altro da identificare. Con la sonda per il gene RTf è stata effettuata una sub-localizzazione in 3q28-q29 rispetto al dato dell'HGM in q26-qter, il segnale nelle inversioni e traslocazioni mantiene il locus nativo confermando da un lato la reciprocità della traslocazione e la localizzazione del *breakpoint*, dall'altro il non coinvolgimento del gene RTf in questi riarrangiamenti. Con la sonda YAC H10 è stato precisato il locus di mappatura, in q27q28, su linfociti normali e dimostrato che il segmento non è coinvolto nelle diverse alterazioni 3q studiate, confermando il punto di rottura in q26. La metodica FISH si è rivelata utile per:

- confermare il coinvolgimento esclusivo del cromosoma 3 nelle alterazioni 3q delle patologie mieloidi, mentre nel linfoma – oltre ad un punto di rottura diverso (3q28) – vi è uno scambio con un altro autosoma;
- precisare i punti di rottura identificati con la citogenetica classica;
- escludere il coinvolgimento del gene RTf e un possibile ruolo della transferrina nella patogenesi delle patologie mieloidi caratterizzate da un riarrangiamento 3q21-q26.

RT/BCR IN SITU NELLA LMC: UNA NUOVA METODICA PER EVIDENZIARE LA PRESENZA INTRACELLULARE DI mRNA IBRIDO

NICOLETTA TESTONI, GIOVANNI MARTINELLI, PATRIZIA FARABEGOLI, MARINA BUZZI, SUSANNA PELLICONI, DONATELLA RASPADORI, MARZIA SALVUCCI, ALFONSO ZACCARIA, SANTE TURA
Istituto di Ematologia "L. & A. Seragnoli", Università di Bologna

Viene descritta una metodica per l'identificazione di mRNA ibrido bcr/abl intracellulare, di pazienti con leucemia mieloide cronica. Le cellule vengono fissate e permeabilizzate, l'mRNA retrotrascritto in cDNA ed il cDNA amplificato mediante PCR.

Vengono utilizzati per la PCR primers specifici fluorescinati e la rilevazione può essere eseguita al microscopio a fluorescenza o al citofluorimetro. Le cellule vengono anche controcolorate con ioduro di propidio, per mostrare la localizzazione citoplasmatica del segnale fluorescinato. La morfologia cellulare è discretamente conservata dopo RT/PCR ed è visibile la localizzazione intracitoplasmatica del DNA prodotto amplificato. Finora sono state eseguite prove su prelievi di midollo osseo sia di pazienti con LMC Ph+ sia di individui sani (donatori di midollo osseo). Gli esperimenti per ora eseguiti dimostrano la validità e la specificità di tale metodica. Ulteriori studi sono in corso per dimostrare la possibilità di evidenziare la malattia minima residua in pazienti con LMC Ph+ sia in terapia con α -interferone sia sottoposti a trapianto di midollo osseo autologo e allogenico.

IMPIEGO DELL'IBRIDAZIONE IN SITU NELLO STUDIO DEI LINFOMI A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE E DELLA MALATTIA DI HODGKIN: DIFFERENTE INCIDENZA DI EBER2

S. PILERI, S. POGGI, E. SABATTINI, G. MELILLI, M. BENNI, A. DE VIVO

Sezione di Istologia Emolinfopatologica, Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli"; servizio di Anatomia Patologica, Università di Bologna

Il linfoma a grandi cellule anaplastiche (LGCA) costituisce un'entità di recente identificazione, la quale condivide alcune caratteristiche morfologiche e fenotipiche con le cellule neoplastiche (CRS) della malattia di Hodgkin (MH)). Diversi studi hanno dimostrato come il LGCA comprenda alcuna sottovarietà istologiche, le quali pur possedendo simile dettaglio citologico, costante espressione del CD30 e varia combinazione degli antigeni B- e T-associati differiscono per aspetti architetturali, per la ricchezza in cellule giganti o per un'esuberante popolazione macrofagica di accompagnamento). Fra tali sottovarietà particolare rilievo ha quella Hodgkin-simile (LGCA-HS), la quale si caratterizza: sotto il profilo clinico, per il costante interessamento del mediastino; sotto quello istopatologico, per la presenza di noduli, costituiti da blasti e circondati da grossolani tralci fibrosi.

A causa delle modalità di presentazione e dalle caratteristiche architetturali (nodularità e sclerosi), il LGCA-HS è stato certamente in passato inserito nell'ambito delle varietà aggressive della MH a sclerosi nodulare e come tale viene, tuttora, diagnosticato in alcuni Centri degli Stati Uniti.

Il suo riconoscimento come linfoma non-Hodgkin sembra, tuttavia, opportuno in considerazione della buona risposta ai protocolli di terza generazione per i linfomi ad alto grado di malignità, osservata da alcuni Gruppi cooperatori europei. Poichè esistono alcune resistenze ad accettare il concetto che il LGCA-HS costituisca di fatto una patologia separata dalla MH, abbiamo intrapreso uno studio volto a confrontare alcuni aspetti biologici delle cellule neoplastiche nella MH e nel LGCA-HS. L'analisi fenotipica ha evidenziato soltanto come il LGCA-HS esprima la molecola CD15 in un numero di casi più basso rispetto alla MH, essendo le restanti caratteristiche (espressione del CD30, frequente assenza del CD45, eventuale presenza di antigeni B- e T-associati) rappresentate in maniera simile nei due processi. Di notevole rilievo sono apparsi, invece, i dati emersi dall'analisi molecolare. In particolare, si è provveduto ad esaminare le sezioni da materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina, relative a 19 casi di MH a sclerosi nodulare di tipo I o a cellularità mista ed 28 LGCA, in massima parte del tipo HS, con una tecnica di ibridazione in situ, basata sull'impiego di una sonda oligonucleotidica fluorescinata diretta contro EBER2 e dell'immunofosfatasi alcalina quale sistema di rilevazione. In tale maniera, si è inteso valutare l'incidenza di tale *latent gene product* dell'EBV nel LGCA, specie del tipo HS, in raffronto alla MH, nella quale esso è stato riportato essere presente in un numero rilevante di casi. Da tale ricerca emerge una significativa differenza fra MH e LGCA-HS: infatti, analogamente a quanto apprezzato da altri, nella prima si nota positività della CRS nel 50% dei casi, nel secondo – invece – si rileva la presenza di EBER2 nel 17% soltanto delle biopsie esaminate. Quest'ultimo dato è del tutto sovrapponibile a quanto rilevato nella varietà comune del LGCA da Stein et al V° International Conference on Malignant Lymphomas, Lugano, 1993 e da Knowles et al., i quali riportano rispettivamente valori del

16% e del 18%. La nostra osservazione, per quanto preliminare, sembra suggerire che, per ciò che concerne i rapporti con l'EBV, il LGCA-HS differisce dalla MH, comportandosi come la varietà comune del LGCA.

Realizzato con fondi AIRC e CNR – Progetto finalizzato ACRO

Direttore responsabile: Prof. Edoardo Ascari
Autorizzazione del Tribunale di Pavia n. 63 del 5 marzo 1955
Stampa: Arti Grafiche Tris – Roma, via A. Dulceri, 126-128



Finito di stampare nel mese di aprile 1994