

UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DELL'INSUBRIA
DOTTORATO DI RICERCA
BIOTECNOLOGIE



ANOMALIE CROMOSOMICHE STRUTTURALI
COME CAUSA DI ALTERATA FUNZIONALITA'
GENICA, PIASTRINOPENIA E CONSEGUENTE
SUSCETTIBILITA' ALLO SVILUPPO DI
MIELODISPLASIE E/O LEUCEMIE

Relatore:

Prof. FRANCESCO PASQUALI

Tesi di Dottorato

Dott.ssa

Marletta Cristina

Anno Accademico 2009/2010

CONSIDERAZIONI PERSONALI

La presente tesi è solo l'atto conclusivo di un lungo cammino iniziato il 12 Gennaio 2007: quel giorno misi piede per la prima volta nel Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche. Mi ritrovai da subito circondata da persone competenti, innamorate del proprio lavoro e capaci di trasmettermi la passione per i cromosomi, strane entità, ai più sconosciute, e fino a quel giorno note a me solo attraverso i libri. Da quel lunedì di quasi quattro anni fa ritengo di aver fatto con loro molta strada, ho imparato a conoscere e, a volte, persino a dialogare con i cromosomi (strane cose può fare la scienza!) e soprattutto ho conosciuto e apprezzato molte persone straordinarie: in primo luogo i professori F. Pasquali e F. Lo Curto, quel genere di persone alle quali, data la loro cultura e disponibilità, è sempre stato possibile far riferimento per qualsiasi dubbio o problema. Un ringraziamento super speciale va poi alla Prof.ssa E. Maserati, la mia guida nell'intricato mondo della citogenetica capace di segnalarmi i tanti sbagli commessi ma anche di apprezzare i successi, sostenermi e consigliarmi nelle scelte lavorative e di vita. Grazie poi alla presenza di tre fantastici colleghi, Barbara, Giuseppe e Roberto, il lavoro è diventato giorno dopo giorno un piacere, e tutto quello che oggi so è in gran parte attribuibile a loro. Ma il sentore di trovarsi come a casa, in una grande famiglia, è stato possibile grazie anche alla presenza di Antonella, Cristina, Elena,

Elisa, Giulietta, Lidia, Paola e Silvia: con loro ho condiviso gioie e dolori che in questi quattro anni ho vissuto, rendendo ancor più belle le prime e attenuando i secondi.

Un grazie particolare va poi alla mia famiglia: i miei genitori che hanno sopportato gli scleri e il mio continuo andare e venire, mio fratello che, nonostante gli apparenti modi burberi, si è sempre reso disponibile soprattutto per aiuti di tipo informatico. E poi l'altro Marco della mia vita, presente da poco, ma che spero ci sia il più a lungo possibile, che ha saputo sempre tranquillizzarmi e sostenermi nei momenti più difficili.

RIASSUNTO

Il presente studio è stato effettuato su quattro diversi pazienti portatori di anomalie cromosomiche strutturali sia di natura acquisita che costituzionale. Tutti i riarrangiamenti alterano l'espressione di specifici geni e possono essere causativi delle forme di piastrinopenia da cui i nostri pazienti sono affetti. Ciascuna anomalia è stata indagata con metodi di citogenetica standard, di ibridazione in situ fluorescente (FISH), di comparative genomic hybridization su array (a-CGH) e, laddove necessario, sono state utilizzate tecniche di PCR real-time quantitativa e/o Multipainting.

In dettaglio vengono presentati i seguenti casi:

CASO 1: paziente maschio affetto da anemia aplastica grave con scarsa presenza a livello midollare della componente granulopoietica e la completa assenza di megacariociti.

E' stata evidenziata nel midollo un' anomalia cromosomica clonale a carico di un cromosoma n° 21. L'analisi di FISH effettuata con la sonda informativa CTD-2235K24 ha evidenziato la delezione degli esoni 2-8 di *RUNX1*, mentre le sonde BAC RP11-88N2 e RP11-625E21 hanno mostrato una duplicazione invertita delle bande q22.2 e q22.3, confermata poi anche dall'analisi di a-CGH. È stato dimostrato con esperimenti di real-time PCR quantitativa che l'evento di delezione a carico degli esoni 2-8 del gene *RUNX1* comporta una significativa riduzione nell'espressione del gene

stesso. Tale ipoespressione spiega le condizioni ematologiche del paziente, in particolare la completa assenza di megacariociti, vista la nota importanza di *RUNX1* nella maturazione degli stessi e nella produzione delle piastrine. In prelievi successivi il paziente è andato incontro a una riduzione del clone con il cromosoma der(21) ma ha acquisito un secondo clone caratterizzato da una delezione interstiziale delle braccia lunghe di un cromosoma 13: in particolare la regione interessata (13q13.3-q21.31) risulta da letteratura essere spesso associata a sindromi mielodisplastiche (MDS) e pazienti affetti da MDS con del(13q) hanno una prognosi negativa per l'evoluzione in leucemia.

Questi due cloni sono stati monitorati nel tempo tramite FISH al fine di mantenere sotto controllo la disfunzione midollare ed eventuali sviluppi mielodisplastici/leucemici.

CASO 2: paziente femmina affetta da piastrinopenia cronica.

Su prelievi di midollo, sangue periferico e fibroblasti cutanei è stata riscontrata un'anomalia cromosomica costituzionale a carico di un cromosoma n° 21 caratterizzata da un evento di inversione pericentrica. Analisi di FISH hanno dimostrato rottura del gene *RUNX1* tra il 4° e il 5° esone. L'analisi di a-CGH ha confermato i risultati di FISH e mostrato anche una duplicazione degli esoni 2-3-4 del medesimo gene, una duplicazione della banda 21q22.2 e una grossa regione di delezione terminale di 2,35 Mb. La FISH effettuata con la sonda fosmidica WI2-1915K14 ha confermato la duplicazione

degli esoni 2-3-4 di *RUNX1*, che sono ritenuti sul braccio lungo del cromosoma invertito, e, con la sonda BAC RP11-88N2, la delezione terminale. La Real-time quantitativa ha mostrato una riduzione nell'espressione relativa del gene *RUNX1*. Anche in questo caso gli eventi di rottura e duplicazione, di natura costituzionale, spiegano la piastrinopenia di cui la nostra paziente è affetta.

CASO 3: paziente maschio con fenotipo clinico suggestivo per trombocitopenia amegacariocitica congenita (CAMT) in assenza, però, delle mutazioni del gene *MPL* riconosciute come causa diretta della patologia. La CAMT, come le altre sindromi da insufficienza midollare, potrebbe essere uno stadio pre-leucemico, anche se i casi riportati in letteratura sono assai rari.

E' stata evidenziata un'anomalia cromosomica acquisita a carico di un cromosoma n° 1, caratterizzata da un evento di inversione paracentrica con punti di rottura in p13 e p36. Le analisi di FISH effettuate con sonde BAC informative hanno confermato l'evento di inversione e la presenza di due regioni di delezione prossime ai punti rottura, evidenziate prima solo con l'a-CGH. La Real-time quantitativa ha evidenziato una ridotta espressione del gene *MPL*, il quale non risulta rotto dall'evento di inversione ma solo traslocato in una regione più centromerica dello stesso cromosoma: l'ipotesi di un effetto di posizione sul gene *MPL* potrebbe spiegare il fenotipo simil-CAMT riscontrato nel paziente.

CASO 4: paziente femmina con quadro morfologico del midollo e delle piastrine compatibile con Sindrome di Paris-Trousseau: si tratta di una forma costituzionale di piastrinopenia con inclusione di piastrine caratterizzate da granuli α giganti e causata da delezione terminale di un cromosoma n° 11, in una regione dove è mappato il gene *FLI1* (11q24), causativo della patologia.

Da analisi su midollo è stato evidenziato un cariotipo complesso caratterizzato dalla presenza di un cromosoma derivativo 11 da traslocazione t(3;11)(q21;q25), di un cromosoma derivativo 2 e da monosomia 3. Analisi di MultiFISH e a-CGH hanno meglio chiarito la natura del riarrangiamento. La regione monosomica del cromosoma 11, confermata con FISH con la sonda BAC RP11-744N12, dimostra la perdita clonale di una copia del gene *FLI1*: questo spiega il quadro di piastrinopenia della paziente.

CONCLUSIONI

La rottura del gene *RUNX1* (CASO 1 e 2), la perdita di una copia del gene *FLI1* (CASO 4) e l'effetto di posizione del gene *MPL* (CASO 3) comportano disfunzione midollare. Nei casi 1 e 2 la rottura del gene è causa diretta della piastrinopenia di cui soffrono, poiché questo gene è coinvolto nella maturazione dei megacariociti e nella produzione delle piastrine. La Real-time quantitativa ha dimostrato una riduzione nell'espressione relativa di *RUNX1*. Nel CASO l'effetto di posizione a carico del gene *MPL* è probabilmente causa del fenotipo simil-CAMT del paziente: la Real-time quantitativa ha

confemato una riduzione nell'espressione del gene. Nel CASO 4 un complesso riarrangiamento cromosomico strutturale comporta la perdita clonale di una copia del gene *FLI1*, che è la causa della piastrinopenia della paziente.

INDICE

1. INTRODUZIONE-LE PIASTRINOPENIE	
1.1 Caratteristiche e funzione delle piastrine	pag. 11
1.2 Piastrinopenie	pag. 16
1.3 Piastrinopenie ereditarie	pag. 18
1.4 Geni coinvolti nelle piastrinopenie	pag. 23
2. SCOPO	pag. 29
3. MATERIALI	pag. 30
4. METODI	
4.1 Metodi di coltura cellulare e citogenetica	pag. 33
4.2 Allestimento di preparati per citogenetica e colorazioni	pag. 38
4.3 Metodi di ibridazione in situ fluorescente (FISH)	pag. 41
4.4 Multipainting	pag. 54
4.5 Comparative genomic hybridization (CGH) su microarray (a-CGH)	pag. 57
4.6 Real-time PCR di espressione	pag. 59
5. RISULTATI	pag. 63
6. DISCUSSIONE	pag. 89
7. BIBLIOGRAFIA	pag.99

1.INTRODUZIONE – LE PIASTRINOPENIE

1.1 CARATTERISTICHE E FUNZIONE DELLE PIASTRINE

Le piastrine originano dalla frammentazione del citoplasma dei megacariociti, dando origine al megacarioblasto e successivamente al megacariocita da cui si formano circa da 2.000 a 8.000 piastrine in 3 - 12 ore.

La megacariocitopoiesi e la produzione delle piastrine sono regolate dall'entità della massa piastrinica corporea tramite svariate citochine, alcune delle quali stimolano anche i progenitori eritroidi. Il midollo osseo risponde a questo stimolo aumentando il numero delle piastrine che spesso sono anche di dimensioni superiori al normale. Il loro numero nel sangue circolante è, normalmente, compreso tra 150.000 e 400.000/ μ l (Forestier et al., 1991), rimane fisso durante tutta la vita e la loro sopravvivenza in circolo è di circa una settimana.

Il principale sito di produzione delle piastrine è il midollo osseo a partire dalla seconda metà della gravidanza, mentre, nelle fasi più precoci di sviluppo del feto, la frammentazione dei megacariociti circolanti con liberazione in circolo di piastrine avviene principalmente a livello dei sinusoidi epatici e della microcircolazione placentare (Forestier et al.,1991). Per megacariocitopoiesi si intende un complesso processo biologico che comprende una serie di eventi

cellulari che, iniziati con la cellula staminale pluripotente, portano alla biogenesi delle piastrine da parte dei megacariociti maturi. La cellula staminale indirizzata (committed) in senso megacariocitopoietico è una cellula caratterizzata da un alto potenziale proliferativo.

La megacariocitopoiesi è controllata da diversi fattori ematopoietici, tra i quali, già nella vita fetale, il più importante è la trombopoietina (TPO), anche se un ruolo specifico e selettivo sulla linea megacariocitaria è svolto dall'IL-6 e dall'IL-11 (Norol et al., 1998).

Le piastrine presentano una forma ed un volume piuttosto eterogenei. I cambiamenti di forma dipendono dalle differenti attività: mentre allo stato di "riposo" sono lenticolari, durante il processo di attivazione assumono una forma sferica irregolare che presenta lunghi e sottili pseudopodi.

Il volume dipende dall'età delle piastrine: le piastrine più grandi sono più giovani e quindi metabolicamente e funzionalmente più attive; le piastrine, invecchiando, subiscono un processo di frammentazione e perciò le piastrine più vecchie sono di dimensioni inferiori.

Esistono nell'organismo due "pool rapidamente accessibili" di piastrine: un pool splenico, in equilibrio dinamico con il pool circolante, che trattiene circa il 30% delle piastrine totali e un pool non splenico con sede ignota, forse prevalentemente polmonare.

Le piastrine senescenti o danneggiate vengono rimosse dalle cellule del sistema reticolo endoteliale della milza, del fegato e del midollo osseo.

Le piastrine sono racchiuse da una membrana trilaminare che porta, sulla sua superficie esterna, fibrinogeno e molti altri fattori plasmatici della coagulazione.

Questa membrana citoplasmatica presenta una struttura a doppio strato lipidico in cui si trovano immerse glicoproteine (complessi di carboidrati e proteine) che hanno una fondamentale importanza nel processo emostatico per il loro ruolo di recettori o di proteine adesive; in effetti mediano le più importanti funzioni delle piastrine che sono l'adesione, l'aggregazione e il trasporto delle molecole.

La forma discoidale delle piastrine è mantenuta dal citoscheletro, che è formato dal sistema microtubulare e da quello contrattile costituiti principalmente da proteine quali l'actina, la miosina e la trombostenina.

Nel citoplasma sono presenti alcuni mitocondri e specifiche strutture vescicolari quali: i granuli α (densi), i granuli β e i granuli λ (lisosomi).

Le piastrine sono coinvolte in tre diversi processi biologici:

- ✓ Emostasi
- ✓ Infiammazione
- ✓ Fagocitosi

▪ EMOSTASI E COAGULAZIONE

Quando un vaso sanguigno viene danneggiato una serie di meccanismi vengono messi in azione con il fine di arrestare prima possibile la fuoriuscita di sangue dal vaso; l'arresto della perdita

viene ottenuta tramite un blocco, o tappo emostatico il quale, una volta riparata la parete del vaso, viene rimosso, ripristinando quindi lo status iniziale.

Questa complessa serie di meccanismi che provvedono alla formazione del blocco, all'arresto della perdita, alla riparazione ed alla rimozione del blocco vengono definiti emostasi.

E' possibile suddividere schematicamente il processo emostatico in:

- fase vascolare
- fase piastrinica
- fase plasmatica

Quando il vaso subisce una lesione, le piastrine aderiscono, stimulate dall'esposizione delle fibre collagene e della membrana basale ed influenzate dalla presenza della componente von Willebrand del fattore VIII e della fibronectina.

All'adesione segue l'aggregazione, una reazione totalmente dipendente dalla capacità delle glicoproteine IIb-IIIa di legare il fibrinogeno plasmatico, che avviene seguendo delle fasi ben precise.

Se lo stimolo aggregante esogeno è stato sufficiente, si attiva il metabolismo dell'acido arachidonico ed i granuli centralizzati liberano il loro contenuto (reazione di liberazione); infine, le sostanze contenute nei granuli (ADP, serotonina ecc.) e quelle formate dal metabolismo dell'acido arachidonico (prostaglandine e trombossani) aggregano le piastrine irreversibilmente (aggregazione secondaria: irreversibile).

Il fattore più importante per la progressione e la stabilizzazione del trombo durante la coagulazione è, verosimilmente, la produzione di trombina.

La trombina stessa è sufficiente per stimolare l'ulteriore rilascio di granuli piastrinici e il susseguente richiamo di nuove piastrine.

A mano a mano che la coagulazione procede, per azione della trombina sul fibrinogeno, si forma la fibrina che crea ponti crociati con i recettori del GP2b e del GP3a delle piastrine.

Questi legami stabilizzano l'aggregazione delle piastrine e la loro adesione alla superficie sottostante.

Infine le piastrine, con un meccanismo non chiarito, per opera delle proteine contrattili del citoscheletro, si retraggono.

▪ INFIAMMAZIONE

Oltre a svolgere un ruolo nell'emostasi, le piastrine liberano anche sostanze biologicamente attive che hanno un ruolo nella risposta infiammatoria. Amine vasoattive, quali la serotonina e l'istamina, possono contribuire ad iniziare la risposta infiammatoria; inoltre i neutrofili e i monociti producono sostanze che attivano le piastrine, promuovendone l'aggregazione e inducendo la liberazione di nuove sostanze vasoattive.

▪ FAGOCITOSI

Le piastrine fagocitano batteri e piccole particelle e legano le endotossine collaborando alla detossificazione del plasma. Il

materiale estraneo di piccole dimensioni è fagocitato attraverso il sistema di canali esistente sulla membrana.

1.2 PIASTRINOPENIE

Per piastrinopenia si intende una condizione ematologica in cui il numero di piastrine nel sangue circolante è inferiore a 150.000/ μ l. Nonostante sia uno dei più comuni disordini ematologici del periodo neonatale (lo 0.7% dei neonati ha una conta piastrinica inferiore a $100 \times 10^9/l$; Uhrynowska et al., 1997), è solitamente considerata una manifestazione secondaria di altre patologie o legata a nascite premature e si risolve quando la causa primaria viene meno.

Le cause delle piastrinopenie neonatali possono essere molteplici ma tutte ascrivibili ad uno dei seguenti gruppi:

- **Da diminuita produzione** - E' di origine midollare e può essere associata ad anemia aplastica e a leucopenia (pancitopenia). Si verifica in tutti i casi di depressione midollare dovuta a: infezioni virali, batteriche, parassitarie o micotiche; intossicazioni (per es. da farmaci quali i farmaci citotossici antineoplastici); neoplasie, principalmente linfoma e mieloproliferative, per sostituzione del normale tessuto midollare con le cellule maligne; sindromi mielodisplastiche nelle quali si ha alterata produzione di cellule ematiche da parte di precursori midollari che presentano anomalie morfologiche.

- **Da aumentata distruzione** - Queste sono le piastrinopenie più frequenti ed hanno origine periferica. Poiché non viene compromessa la capacità del midollo osseo di produrre nuove piastrine, è normalmente seguita da una trombocitosi reattiva per stimolazione della trombopoiesi. La distruzione può essere dovuta a difetti intracorporeali o extracorporeali dei quali i più comuni sono quelli immunologici. Le piastrinopenie immunomediate possono essere idiopatiche o possono conseguire all'uso di farmaci, ad infezioni, a vaccini, a tumori, a malattie immunologiche.
- **Da aumentato consumo** - Tipico esempio è rappresentato dalla coagulazione intravascolare disseminata (CID) , le cui cause possono essere molteplici (neoplasia, infezioni o altre).
- **Da alterata distribuzione** - Si intende in questo caso una anormale distribuzione nei differenti pools di una normale massa piastrinica corporea totale e si verifica in caso di ipersplenismo, con aumento del pool splenico e diminuzione di quello circolante. Come detto in precedenza, una attiva trombopoiesi è caratterizzata dalla presenza in circolo anche di piastrine di dimensioni superiori al normale: di conseguenza l'anisocitosi piastrinica (o presenza contemporanea di piastrine di dimensioni diverse) indica normalmente distruzione o consumo di piastrine, mentre la presenza di piastrine di piccole dimensioni indica alterazione della produzione o sequestro.

1.3 PIASTRINOPENIE EREDITARIE

Le piastrinopenie ereditarie rappresentano un gruppo fenotipicamente eterogeneo di malattie caratterizzate da una riduzione nel numero di piastrine circolanti, alcune con l'esclusivo coinvolgimento dei megacariociti e altre forme estese a più tipi cellulari. Nonostante i geni causativi siano stati, nella maggior parte dei casi, identificati, la patofisiologia di questi disordini rimane ancora in gran parte da chiarire.

La classificazione delle piastrinopenie ereditarie è sempre motivo di dibattito tra gli studiosi e diversi parametri sono stati discussi. I primi tentativi prevedevano l'utilizzo del pattern di trasmissione, ma spesso i medesimi disordini possono essere dominanti, recessivi o dovuti a mutazioni *de novo*. Anche la classificazione basata sui sintomi clinici non risultava utile in quanto forme diverse, sindromiche e non, possono essere causate dalle stesse mutazioni a carico del medesimo gene. Di recente Balduini et al. (2002) hanno proposto una classificazione delle varie forme di piastrinopenie ereditarie basandosi sul volume e la dimensione delle piastrine. Tale metodo presenta diversi vantaggi, tra cui la facilità nel determinare la dimensione piastrinica attraverso semplici osservazioni al microscopio e la quasi totale invariabilità del dato tra patologie appartenenti al medesimo gruppo. Si è così arrivati a suddividere le piastrinopenie in tre diversi sottogruppi:

- **Piastrinopenie con riduzione del volume piastrinico**

Appartengono a questo gruppo di piastrinopenie due diverse forme patologiche riconducibili a mutazioni a carico di uno stesso gene: la sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS) e una forma di trombocitopenia X-linked (XLT). Si tratta di rare malattie causate da mutazioni di un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma X e codificante per la proteina WASp (Villa et al., 1995). Tale proteina di 502 aminoacidi è espressa esclusivamente nelle linee cellulari derivate da progenitori staminali ematopoietici ed è coinvolta nei meccanismi di trasduzione del segnale per la genesi e organizzazione del citoscheletro actinico. I soggetti affetti sono generalmente maschi, poiché le femmine inattivano il cromosoma X mutato (Wengler et al., 1995), e presentano piastrine di numero e volume ridotti per la disorganizzazione del loro apparato citoscheletrico (Shcherbina et al., 2001).

- **Piastrinopenie con normale volume piastrinico**

Disordine piastrinico familiare con predisposizione allo sviluppo di leucemia mieloide acuta (FPD/AML): si tratta di una patologia a trasmissione autosomica dominante dovuta a mutazioni del gene *RUNX1* (anche noto come *CBFA2*, *AML1*, *PEBP2 α B* e localizzato in 21q22.1-22.2) (Song et al., 1999). *RUNX1* è noto per la sua capacità di eterodimerizzare con *CBF β* dando luogo a un complesso trascrizionale coinvolto nei processi ematopoietici (Michaud et al., 2002). I pazienti presentano, quindi, un decremento nel numero dei megacariociti e la tendenza allo sviluppo di leucemie mieloidi acute.

E' infatti noto da tempo che *RUNX1*, mutato o coinvolto in traslocazioni cromosomiche, è causa dello sviluppo di tumori (Miyoshi et al., 1991).

Trombocitopenia congenita amegacariocitica (CAMT): si tratta di una patologia piuttosto rara, con un pattern di trasmissione autosomico recessivo, caratterizzata da riduzione o totale assenza di megacariociti, bassa conta piastrinica, progressiva pancitopenia e, diversamente dalle altre sindromi ematologiche, nessuna anomalia fisica. Le mutazioni a carico del gene *MPL* sono la causa diretta della CAMT (Ihara et al., 1999; Van den Oudenrijn et al., 2000; Ballmaier et al., 2001). Esso è localizzato sul cromosoma 1 in 1p34 e codifica per il recettore di membrana della trombopoietina (TPO). La TPO influenza tutte le tappe dello sviluppo ematopoietico dalla cellula staminale fino alla formazione della piastrina matura, agisce precocemente sui progenitori eritroidi, sebbene solo in combinazione con l'EPO, ed agisce molto sullo sviluppo dei progenitori commissionati verso la linea megacariocitaria. La TPO guida anche la maturazione dei progenitori megacariocitari, ma non sembra essere coinvolta nelle fasi finali della formazione delle piastrine; la sua rimozione infatti dalle colture cellulari non influenza il rilascio delle piastrine.

Trombocitopenia con assenza del radio (TAR): questa forma di trombocitopenia è l'unica sindrome da insufficienza midollare ereditaria diagnosticata esclusivamente nel periodo neonatale, quando ad una marcata trombocitopenia si accompagna l'assenza

bilatelare del radio. Altre anomalie possono anche essere presenti, quali malformazioni strutturali del cuore, difetti renali e ritardo mentale.

La malattia ha una trasmissione autosomica recessiva. Ad oggi non è noto alcun gene causale (Alter, 2005), ma è stato ipotizzato trattarsi di una sindrome da geni contigui, per microdelezione delle braccia lunghe di un cromosoma 1 (Klopocki et al., 2007).

- **Piastrinopenie con aumento del volume piastrinico**

Sindrome di Bernard-Soulier (BSS): si tratta di un disordine a trasmissione recessiva causato da mutazioni nei geni *GPIb α* , *GPIb β* o *GPIX* (Lopez et al., 1998). Essi sono localizzati, rispettivamente, sui cromosomi 17, 22 e 3 e codificano per complessi proteici coinvolti nei meccanismi dell'omeostasi, interagendo con il fattore di von Willebrand o la calmodulina.

Sindrome velocardiofacciale (VCFS): in questa patologia anomalie cardiache e facciali sono associate a una grave piastrinopenia. Il disordine è associato alla delezione della regione 22q11, in cui è anche incluso il gene *GPIb β* , responsabile della BSS (Nakagawa et al., 2001).

Trombocitopenia X-linked (XLT): forma di piastrinopenia associata a talassemia e causata da mutazioni a carico del gene *GATA-1*, localizzato in Xp11.12 e codificante per un fattore di trascrizione della via megacariocitopoietica (Raskind et al., 2000).

Sindrome da piastrine grigie (GPS): si tratta di una rara forma di piastrinopenia in cui le piastrine sono più grandi ma con un

contenuto di granuli α ridotto. Nonostante il gene responsabile sia sconosciuto, è noto che i megacariociti dei soggetti affetti perdono la capacità di produrre i granuli α e disperdono il loro contenuto proteico nello spazio extracellulare midollare dove causano lo sviluppo di mielofibrosi (Drouin et al., 2001).

Sindrome di Paris-Trousseau (PTS): si tratta di una sindrome caratterizzata da piastrinopenia, in cui il 10-15% delle piastrine presenti sono di dimensioni maggiori a causa della presenza di granuli giganti ("giant granules"), derivati dalla fusione dei granuli α , incapaci di rilasciare il loro contenuto dopo stimolazione con trombina. A questa patologia è associata una precisa alterazione citogenetica, identificata per la prima volta da Breton-Gorius et al nel 1995: la delezione di parte del braccio lungo di un cromosoma 11 (11q23.3-11q24.2). In questa sede cromosomica è localizzato il gene *FLI1*, codificante per un importante fattore di trascrizione. FLI1 è, infatti, un partner diretto di RUNX1 e questa interazione, regolata dalla fosforilazione della serina 10 di FLI1, gioca un ruolo fondamentale nella maturazione dei megacariociti e, contemporaneamente, nella repressione del differenziamento in senso eritroide. Sono noti da letteratura casi di soggetti affetti da PTS in cui la regione di delezione è prossima a *FLI1*, non ne causa la perdita in eterozigosi ma ne perturba l'espressione causando il medesimo fenotipo (Favier et al., 2003).

Il fenotipo PTS può essere comunemente sovrapposto a quello della sindrome di Jacobsen (JBS). La JBS presenta un fenotipo più

grave, caratterizzato da piastrinopenia, ritardo mentale, difetti cardiaci e anomalie facciali (Penny LA et al., 1995), ma ad un esame di microscopia elettronica le piastrine mostrano lo stesso aspetto tipico della PTS; inoltre l'analisi citogenetica rivela la presenza di una regione di delezione più grande ma in parte sovrapponibile a quella riscontrata nella PTS (11q23.3-11qter) e all'interno della quale sono presenti diversi geni, tra cui *FLI1* o *Ets-1* (sindrome da geni contigui).

1.4 GENI COINVOLTI NELLA PIASTRINOPOIESI

RUNX1

RUNX1, noto anche come *CBFA2* (Core Binding Factor A2), *PEBP2 α B* (Polyoma Enhancer Binding Protein 2 α Subunit) o *AML1* (Acute Myelogenous Leukemia) appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione che regolano l'espressione di diversi geni dello sviluppo ematopoietico attraverso il dominio RUNT. Questa regione di 128 aminoacidi è altamente conservata tra tutti i membri della famiglia (*RUNX1*, *RUNX2* e *RUNX3*) e media il legame al DNA e l'eterodimerizzazione con CBF β . Tutte e tre le proteine Runx, infatti, riconoscono una sequenza consensus comune del DNA, TGPyGGTPy, e formano un complesso altamente stabile con la proteina CBF β che, pur non prendendo contatto diretto con il DNA, ne aumenta l'affinità per *RUNX1* e recluta altri cofattori del complesso trascrizionale, come Ets, cMyb e p300 (Cohen, 2001; Liu et al., 2006).

Il gene *RUNX1*, localizzato in 21q22.3, è formato da 9 esoni e, in seguito a splicing alternativi, possono esistere fino a 12 isoforme proteiche diverse; come tutti i geni della famiglia RUNX, possiede due promotori, P1 e P2, attivi, rispettivamente, nella vita adulta e embrionale.

L'importanza di *RUNX1* è data dal ruolo critico che esso svolge nello sviluppo delle cellule staminali ematopoietiche ed in particolare è coinvolto in:

- espressione di citochine e relativi recettori della linea mieloide e linfoide
- sviluppo dei linfociti T
- maturazione dei megacariociti e sviluppo delle piastrine

In virtù della capacità di regolare l'omeostasi ematopoietica, non è sorprendente che *RUNX1* sia il più frequente target di traslocazioni cromosomiche nelle leucemie (Osato, 2004) e sia associato a diversi difetti ematologici. Infatti la mutazione genica con ereditarietà dominante dà la già citata FPD/AML, mentre è coinvolto in traslocazioni cromosomiche come:

- AML, di cui il 5-12% è associata a traslocazione t(8;21)(q22;q22)
- LLA, di cui circa il 20% è associata a traslocazione t(12;21)(p13;q22)
- sindromi mielodisplastiche e LMC, tra le quali è possibile trovare, seppur con bassa frequenza, il riarrangiamento t(3;21)(q26;q22)
- disordini mieloidi "therapy-related", a volte associati a t(16;21)(q24;q22)

FLI1

Il protooncogene *FLI1* appartiene alla famiglia di fattori di trascrizione ETS, accomunati dalla presenza di domini "helix-turn-helix" in grado di riconoscere e legare sequenze consensus del DNA ricche in purine, come il motivo GGA(A/T) (Nye et al., 1992).

Il gene umano mappa in 11q24, regione deleta nelle sindromi di Jacobsen e Paris-Trousseau (Breton-Gorius et al., 1995), e gioca un ruolo fondamentale nella vasculogenesi, ematopoiesi e adesione cellulare. Esperimenti su modelli murini dimostrano l'incapacità dell'embrione, in presenza di mutazioni che annullano l'attività di Fli1, di mantenere l'integrità dei vasi dopo l'undicesimo giorno di vita fetale e di procedere con il differenziamento piastrinico dei megacariociti. Il primo effetto è verosimilmente dovuto al ruolo che FLI1 gioca nei meccanismi di adesione cellulare sia delle cellule di supporto ai vasi che delle cellule endoteliali stesse. La dismegacariocitopoiesi e piastrinopenia evidenziate, invece, nei modelli murini, così come in soggetti affetti da sindrome di Jacobsen o Paris-Trousseau, è riconducibile alla capacità di FLI1 di regolare positivamente molti geni specifici per il differenziamento dei megacariociti, come *MPL* (Mignotte et al., 1994).

E' stato di recente dimostrato come FLI1 sia un partner diretto di RUNX1 e che tale interazione dipenda da un evento di defosforilazione della serina 10 di Fli1 durante gli stadi terminali di maturazione dei megacariociti (Fig.1.4.1). Mutazioni a carico di *RUNX1* disabilitano la capacità di interazione con FLI1, causando

un malfunzionamento della piastrinopoiesi e, in alcuni casi, lo sviluppo di sindromi mielodisplastiche.

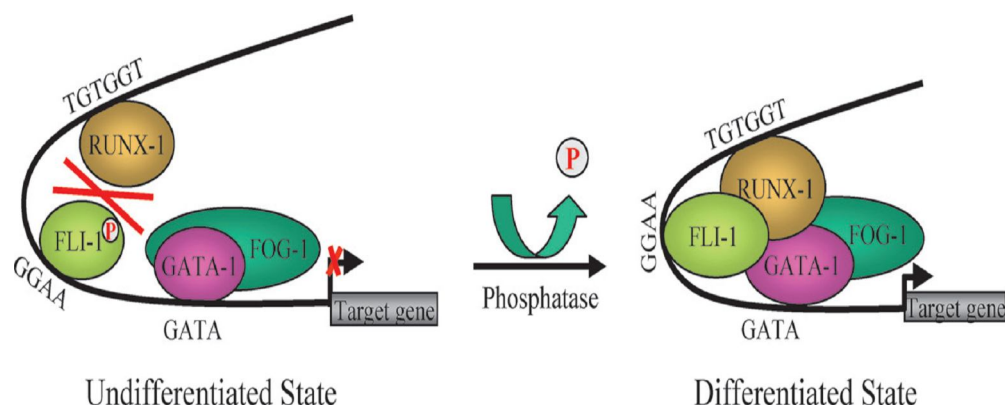


Fig.1.4.1. Modello di interazione defosforilazione-dipendente tra FLI1 e il complesso multiproteico formato da RUNX1/GATA1/FOG1 durante il differenziamento dei megacariociti

MPL

Il gene codificante il recettore della TPO, *c-MPL*, è localizzato sul cromosoma 1p34 ed è composto da 12 esoni (Mignatte et al., 1994). Il recettore Mpl è una proteina transmembrana di 635 aminoacidi che appartiene alla famiglia dei recettori delle citochine ematopoietiche. Il dominio extracitoplasmatico, ricco in cisteine, è simile alla catena beta condivisa dai recettori per IL-3, IL-5 e GM-CSF e presenta, come loro, il dominio altamente conservato WSXWS. Il dominio intracellulare contiene due regioni altamente conservate, denominate Box 1 e Box 2. Mpl sembra funzionare come un omodimero dopo il “binding” del ligando, e non forma

complessi eterologhi con nessuna catena conosciuta. Immediatamente dopo il dominio idrofobico transmembrana di 25 aminoacidi vi è un dominio di trasmissione di 122 aminoacidi altamente conservato, che non presenta una significativa omologia con altre proteine note. Il promotore *mpl* regola la sua espressione sulla superficie cellulare dei precursori megacariocitari, dei megacariociti maturi, delle piastrine e delle cellule staminali emopoietiche e contiene i siti di legame per GATA-1, Ets e Sp1 (Kaushansky et al., 2002).

Il legame della TPO al recettore *c-mpl* determina un rapido incremento del contenuto in fosfotirosina di alcune proteine citoplasmatiche e di membrana, incluso il recettore stesso (Fig.1.4.2). È ormai noto che tale legame sia altamente specifico e univoco.

La trombopoietina è, ad oggi, il più potente stimolatore della piastrinopoiesi noto, avendo la capacità di aumentare da cinque a dieci volte il numero delle piastrine circolanti, intensificando la produzione e la mobilitazione dei megacariociti e dei loro precursori. Modelli murini knock-out per il gene *MPL* sviluppano grave forme di piastrinopenia, con solo il 5-10% di piastrine circolanti, e hanno livelli di TPO significativamente elevati.

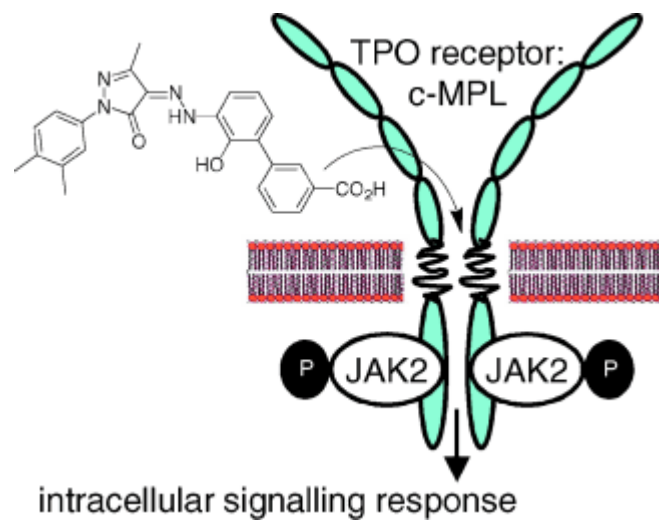


Fig.1.4.2. La TPO stimola l'omodimerizzazione del recettore c-Mpl, determinando un meccanismo di trasduzione del segnale che influenza la sopravvivenza, proliferazione e maturazione cellulare.

2. SCOPO DELLA TESI

Scopo del lavoro di dottorato e oggetto della presente tesi è stato definire, attraverso tecniche di citogenetica standard e molecolare, ed, in particolare, la Comparative Genomic Hybridization (CGH) su microarray (a-CGH), il quadro citogenetico di 4 pazienti affetti da diverse forme di piastrinopenia e portatori di anomalie cromosomiche clonali o costituzionali, con l'intento di chiarire al meglio la natura del riarrangiamento. A questo si aggiunge, poi, il tentativo di correlare l'anomalia cromosomica riscontrata con il fenotipo presente. Le anomalie clonali riscontrate vengono monitorate nel tempo per evidenziare una probabile loro espansione, indice di evoluzione in senso mielodisplastico/leucemico.

3. MATERIALI

Il materiale oggetto del presente studio riguarda 4 pazienti affetti da forme diverse di piastrinopenia, che sono pervenuti presso la sezione di Genetica Medica del Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche dell'Università dell'Insubria per un'analisi cromosomica.

I pazienti, tre italiani e uno straniero, sono stati ricoverati presso l'oncoematologia pediatrica dell'IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo di Pavia.

La paziente 1, nata nel Luglio 2000, presenta alla nascita difetti interventricolari multipli che si risolvono spontaneamente e, fin dall'undicesimo giorno di vita, una piastrinopenia cronica. Dall'anamnesi familiare risulta familiarità per piastrinopenia (nonna paterna e fratelli/sorelle del nonno paterno affetti), e le prime analisi effettuate presso l'Ospedale "Elena d'Aosta" di Napoli nel Settembre 2001 rilevano la presenza di un' inversione di un cromosoma 21, mentre la paziente risulta negativa al test del diepossibutano (DEB) e per le mutazioni di *RUNX1* e *MPL*.

I dati ematologici più significativi alla nascita sono i seguenti:

HB	11,5 g/dl
PLT	$79 \times 10^3/\mu\text{l}$
Linfociti	28,1%

Al paziente 2, nato nell'Agosto 1997, viene effettuata all'età di 7 anni diagnosi di anemia aplastica grave con i seguenti valori ematologici:

RBC	1,66 x 10 ⁶ /μl
HB	5,8 g/dl
PLT	14 x 10 ³ /μl
Linfociti	11,2%

Il paziente è attualmente in sospetta evoluzione mielodislastica e in attesa di trapianto di midollo da donatore compatibile.

Il paziente 3, nato nell' Agosto 2004, presenta dall'età di tre anni una forma di anemia aplastica con fenotipo sospetto per anemia di Fanconi, ma le prime analisi al DEB, effettuato presso il nostro laboratorio, danno esito negativo. La sospetta aplasia midollare e i livelli di TPO elevati suggeriscono ai clinici un fenotipo compatibile con CAMT, in assenza, però, della mutazioni a carico del gene *MPL*, localizzato in 1p34.

I dati ematologici più significativi alla diagnosi sono i seguenti:

RBC	2,07 x 10 ⁶ /μl
HB	6,2 g/dl
PLT	18 x 10 ³ /μl
Linfociti	83,3%

La paziente 4, nata nel Giugno 1972, ha progressivamente sviluppato una pastrinopenia diagnosticata inizialmente come autoimmune e trattata con steroidi prima e immunoglobuline poi. Dal

momento che la risposta è stata nulla, è stata effettuata presso il nostro centro un'analisi citogenetica su midollo. Il quadro morfologico del midollo e delle piastrine è compatibile con Sindrome di Paris-Trousseau.

Gli unici dati ematologici in nostro possesso parlano di piastrinopenia importante e livelli di emoglobina e globuli bianchi normali.

4. METODI

I metodi per le colture cellulari, per l'allestimento dei preparati cromosomici, per la loro analisi, per la FISH e l'a-CGH sono quelli descritti dai protocolli qui sotto riportati in tutti i loro particolari metodologici.

4.1 METODI DI CULTURA CELLULARE E CITOGENETICA

ALLESTIMENTO DELLE COLTURE DA MIDOLLO OSSEO (MO)

Per ogni campione sono state allestite sterilmente 3 preparazioni:

- un preparato diretto
- una coltura a 24 ore
- una coltura a 48 ore

Reagenti:

- provetta sterile, riempita con 5 ml di terreno per colture cromosomiche non stimolate preparato secondo protocollo, sotto cappa, mantenendo le condizioni di sterilità.
- colchicina (concentrazione iniziale: 10 µg/ml in Hank's Balanced Salts - Irvine Scientific)
- KCl 0.56%, 0.075M (2.8 g di KCl in 500 ml di acqua distillata)
- miscela Ibraimov (95 ml acqua distillata + 5 ml acido acetico glaciale)
- fissativo (alcol metilico:acido acetico 3:1)

Terreno per colture da MO:

- 400 ml di RPMI 1640
- 100 ml di FCS (siero fetale bovino)
- 15 ml di antibiotici (penicillina e streptomina)
- 5 ml di eparina

Metodica:

- portare la provetta con il terreno a temperatura ambiente
- inoculare sterilmente 0.5 ml di aspirato midollare (la quantità può variare a seconda della cellularità dell'aspirato midollare) e dopo averlo risospeso incubare a 37°C fino al momento del processamento
- al termine dell'incubazione aggiungere 20 µL di colchicina 0.01 γ/µL e mantenere in termostato per 45'. La colchicina determina l'arresto del ciclo cellulare impedendo la formazione delle fibre del fuso mitotico, poiché causa l'inibizione della polimerizzazione delle stesse.

Processamento:

- al termine dell'incubazione centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
- eliminare il surnatante
- risospendere il pellet con energia e dispensare 5 ml di soluzione ipotonica KCl 0.56%
- mantenere le cellule in soluzione ipotonica per 15 minuti a

- temperatura ambiente
- centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
 - eliminare il surnatante
 - risospendere il pellet e dispensare 5ml di miscela Ibraimov
 - centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
 - eliminare il surnatante
 - risospendere il pellet in 5 ml di fissativo fresco
 - chiudere ermeticamente la provetta
 - riporre in frigorifero ed attendere almeno 24 ore prima di strisciare i vetrini

ALLESTIMENTO DELLE COLTURE DA SANGUE PERIFERICO (SP)

Reagenti:

- provetta sterile, riempita con 5 ml di terreno per colture cromosomiche non stimulate, preparato secondo protocollo, sotto cappa, mantenendo le condizioni di sterilità.
- provetta CHROMOSOME KIT-P CELBIO contenente 5 ml di terreno addizionato con fitoemagglutinina
- colchicina (concentrazione iniziale: 10 µg/ml in Hank's Balanced Salts – Irvine Scientific)
- KCl 0.56%, 0.075M (2.8 g di KCl in 500 ml di acqua distillata)
- miscela Ibraimov (95 ml acqua distillata + 5 ml acido acetico glaciale)

- miscela Ibraimov modificata (92 ml acqua distillata + 5 ml acido acetico glaciale + 3 ml metanolo)
- fissativo (alcol metilico:acido acetico 3:1)
- diepossibutano (1 ml = 1 g) da diluire due volte per ottenere una concentrazione finale di 0.1 μ /ml

Terreno per colture cromosomiche non stimolate:

- 400 ml di RPMI 1640
- 100 ml di FCS (siero fetale bovino)
- 15 ml di antibiotici (penicillina e streptomicina)
- 5 ml di eparina

Terreno per colture cromosomiche stimolate:

- 400 ml di RPMI 1640
- 100 ml di FCS (siero fetale bovino)
- 15 ml di PHA (fitoemoagglutinina) (Irvine Scientific)
- 5 ml di eparina
- 15 ml di antibiotici (penicillina e streptomicina)

Metodica:

- portare le provette con i due diversi terreni di coltura a temperatura ambiente
- aggiungere 0.5 ml di sangue periferico intero alle provette contenenti il terreno per colture non stimolate e alla provetta CHROMOSOME KIT-P CELBIO
- agitare le provette e collocarle sul lato piano in un termostato

- a 37°C. La fitoemagglutinina contenuta in CHROMOSOME KIT-P CELBIO stimolerà i linfociti T, cellule che normalmente non si dividono, ad entrare in mitosi.
- al termine dell'incubazione aggiungere 20 µL di colchicina 0.01 γ/µL e mantenere in termostato per 1 ora e 30 minuti.

Processamento:

Le colture di sangue non stimolate subiscono un processamento analogo al sangue midollare mentre le colture stimolate (SP-PHA) vengono processate secondo la seguente metodica:

- al termine dell'incubazione centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
- eliminare il surnatante
- risospendere il pellet e dispensare 5 ml di soluzione ipotonica KCl 0.56%
- mantenere le cellule in soluzione ipotonica per 7 minuti a temperatura ambiente
- centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
- eliminare il surnatante
- risospendere il pellet e dispensare 5 ml di miscela Ibraimov modificata
- centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm
- eliminare il surnatante
- risospendere il pellet in 5 ml di fissativo fresco
- chiudere ermeticamente la provetta

- riporre in frigorifero ed attendere almeno 24 ore prima di strisciare i vetrini

4.2 ALLESTIMENTO DI PREPARATI PER CITOGENETICA E COLORAZIONI

Preparazione dei vetrini:

- trascorse le 24 ore in fissativo, centrifugare i campioni a 2000 rpm per 5 minuti
- lavare il pellet con fissativo fresco e risospenderlo in 1-2 ml di fissativo a seconda della sua densità
- sgrassare i vetrini tenendoli in alcol etilico freddo per almeno 1 ora e lavandoli con acqua distillata al momento
- strisciare il preparato tenendo il vetrino inclinato di 45° e soffiando per distendere le mitosi
- lasciare asciugare e controllare il vetrino al microscopio a contrasto di fase per assicurarsi di aver strisciato in maniera omogenea

TECNICHE DI BANDEGGIO

Per poter osservare i preparati cromosomici è necessario colorarli. Nel nostro caso abbiamo deciso di colorare prima i preparati in Giemsa per poter reperire le metafasi e di eseguire successivamente, sugli stessi preparati, il bandeggio QFQ con

mostarda di Quinacrina .

Colorazione con Giemsa:

- preparare una soluzione di Giemsa al 10% (10 ml Giemsa in 90 ml di acqua distillata)
- filtrare con carta bibula
- porre i vetrini in soluzione per 10 minuti
- lavare in acqua corrente
- lasciare asciugare tutta la notte
- montare con coprioggetto
- osservare al microscopio

Bandeggio QFQ:

Per questa colorazione viene utilizzato un colorante fluorescente, la mostarda di Quinacrina, che ha un'alta affinità per le zone di DNA ricche di timina ed adenina alle quali si lega, alternando così, lungo il cromosoma, zone fluorescenti a zone scure con un bandeggio tipico. Le bande risultanti sono caratteristiche di ogni cromosoma per cui ne permettono la loro identificazione e classificazione in un cariotipo.

Reagenti:

- soluzione tampone Mc Ilvane
 - soluzione A: 21 g acido citrico
(C(OH)(COOH)(CH₂COOH)₂·H₂O) / 1 L acqua distillata

- soluzione B: 35.6 g sodio fosfato bibasico diidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) / 1 L acqua distillata

La soluzione deve avere pH 7 e deve essere conservata in frigorifero a +4°C

- soluzione di mostarda di Quinacrina
 - soluzione madre 1000 γ /ml: diluire 100 mg di mostarda di Quinacrina in 100ml di acqua distillata
 - soluzione d'uso 50 γ /ml: diluire la soluzione madre 1:20 in tampone Mc Ilvaine in modo da ottenere un soluzione alla concentrazione 50 γ /ml a pH 6.8

La soluzione madre si conserva a lungo mentre la soluzione d'uso può essere utilizzata per 10 - 15 giorni.

Entrambe le soluzioni vanno conservate in frigorifero a 4°C al riparo dalla luce.

Metodica:

- scolorare il vetrino precedentemente colorato in Giemsa tramite scala alcolica decrescente (alcol etilico assoluto, alcol etilico 70%, alcol etilico 50%) fino a completa reidratazione
- porre in tampone Mc Ilvaine per 5 minuti
- eliminare l'eccesso di tampone dal vetrino tramite carta bibula
- immergere il vetrino nella soluzione d'uso di Quinacrina per un tempo compreso fra le 2 e le 24 ore
- sciacquare il vetrino in tampone Mc Ilvaine

- montare il vetrino lasciando un sottile strato di tampone Mc Ilvaine fra esso ed il coprioggetto
- sigillare il coprioggetto evitando la formazione di bolle d'aria

I vetrini sono stati osservati con il microscopio a fluorescenza Leica mediante opportuno filtro (la Quinacrina emette fluorescenza se eccitata alla lunghezza d'onda di 400-440 nm), e le metafasi sono state acquisite ed analizzate tramite il programma Leica Chantal Human Q-B.

4.3 METODI DI IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE

L'ibridazione in situ fluorescente (FISH) è una tecnica che consente la localizzazione di una specifica sequenza di DNA su preparati fissati di cromosomi, nuclei interfasicci e sezioni di tessuto, ottenuti da qualsiasi tipo di materiale biologico (sangue, biopsie, liquido amniotico), sia esso fresco o crioconservato. Essa possiede diverse qualità tra cui versatilità, sensibilità e relativo basso costo. Indipendentemente dal tipo di sonda e dalla natura del preparato la FISH prevede alcuni passaggi cruciali:

- 1 *invecchiamento*: l'invecchiamento dei preparati in soluzioni saline poco concentrate, data l'azione stabilizzante dei cationi monovalenti nei confronti del DNA, può servire ad incrementare l'accessibilità della sonda ai siti bersaglio.
- 2 *denaturazione della sonda e del DNA bersaglio*: le condizioni di denaturazione devono essere sempre ben controllate e

adeguate, di volta in volta, al tipo di sonda e al tipo di preparato. Ciò può essere ottenuto, in genere, agendo sulla temperatura (tra i 70 e gli 80°C) o sul tempo di denaturazione, dai 2 ai 5 minuti, ma non sul pH che deve rimanere neutro. E' molto frequente l'uso di soluzioni denaturanti contenenti la formammide, che riducono la stabilità termica della doppia elica rompendo i legami ad idrogeno, in modo da non dover ricorrere a temperature troppo elevate. Pertanto un altro parametro su cui è possibile agire per favorire l'ibridazione è la concentrazione dell'agente denaturante (Tucker, 1995).

- 3 *ibridazione*: l'ibridazione dipende dalla capacità del DNA denaturato di appaiarsi con l'elica complementare, in un ambiente appena al di sotto del punto di fusione. Fondamentali sono le condizioni di stringenza alle quali avviene la formazione delle molecole ibride (eteroduplex sonda-bersaglio); maggiori sono le condizioni di stringenza (bassa concentrazione di sali, elevata temperatura, presenza di agenti denaturanti) minore è la probabilità di mantenere eteroduplex contenenti appaiamenti errati. Tenendo invariato il pH(=7) e la concentrazione salina, le condizioni d'ibridazione vengono controllate agendo sulla percentuale di formammide e sulla temperatura. In questo modo tutte le reazioni d'ibridazione vengono fatte avvenire in un range di temperatura che varia da 37° a 45°C con percentuali di

formammide che vanno dal 50 al 70%.

- 4 *lavaggio* : la sonda marcata può ibridare in maniera non completa con sequenze che presentano un minor grado d'omologia. Il risultato è un ibrido meno stabile rispetto ad uno perfettamente accoppiato. Essi possono essere dissociati intervenendo sulla temperatura e sul tempo di lavaggio o sulla composizione della soluzione di lavaggio.

Volendo verificare la presenza di anomalie cromosomiche clonali e acquisite nei 4 pazienti, abbiamo utilizzato le seguenti sonde commerciali:

- ETO-AML1: riconosce il gene di fusione *ETO/AML1*, generato dalla traslocazione 8;21, che coinvolge in particolare la regione contenente il gene *ETO* sul cromosoma 8, marcata con fluorocromo rosso, e quella contenente il gene *AML1 (RUNX1)* sul cromosoma 21, marcato con fluorocromo verde (Vysis)
- Whole Chromosome Probe 21: riconosce l'intero cromosoma 21, marcata con fluorocromo verde (Aquarius - Cytocell)
- 21qter: riconosce le regioni telomeriche del cromosoma 21, marcata con fluorocromo verde (Aquarius - Cytocell)

Sono state, inoltre, utilizzate le seguenti sonde BAC e fosmidiche:

SONDE PER FISH PAZIENTE 1	
CTD-2349F18	Riconosce il promotore e il primo esone del gene <i>RUNX1</i>
CTD-2235K24	Riconosce gli esoni 2-8 del gene <i>RUNX1</i>
WI2-542L2	Riconosce esoni 7-8 del gene <i>RUNX1</i>
RP11-468N22	Riconosce la regione 21q22.11-22.12, a monte del gene <i>RUNX1</i>
WI2-605D9	Riconosce gli esoni 2-5 del gene <i>RUNX1</i>
WI2-847D7	Riconosce gli esoni 6-7 del gene <i>RUNX1</i>
WI2-1915K14	Riconosce gli esoni 2-3-4 del gene <i>RUNX1</i>
RP11-88N2	Riconosce la regione 21q22.3, a valle del gene <i>RUNX1</i>
CTD-2532E17	Unica sonda BAC disponibile sul braccio corto del romosoma 21, riconosce la regione 21p11.2-11.1
SONDE PER FISH PAZIENTE 2	
CTD-2235K24	Riconosce gli esoni 2-8 del gene <i>RUNX1</i>
CTD-2349F18	Riconosce il promotore e il primo esone del gene <i>RUNX1</i>
RP11-625E21	Riconosce la banda 21q22.2, a valle del gene <i>RUNX1</i>
RP11-88N2	Riconosce la regione 21q22.3, a valle del gene <i>RUNX1</i>
RP11-79G23	Riconosce la regione 21q21.3, a monte del gene <i>RUNX1</i>
R11-203G22	Riconosce la regione 21q22.12, a monte del gene <i>RUNX1</i>
SONDE PER FISH PAZIENTE 3	
RP11-90B12	Riconosce la regione 1p34.2, centromerica rispetto al gene <i>MPL</i>
RP11-113C10	Riconosce la regione 1p34.2, telomerica rispetto al gene <i>MPL</i>
RP11-46G23	Riconosce la regione 1p12
RP11-125P23	Riconosce la regione 1p12
RP11-206H22	Riconosce la regione 1p11.2
RP11-467K11	Riconosce la regione 1p36.32
RP11-372C15	Riconosce la regione 1p36.31
RP11-690E2	Riconosce la regione 1p36.23
SONDE PER FISH PAZIENTE 4	
RP11-1152N24	Riconosce la regione 2q36.1
CTC-774G23	Riconosce la regione 3p12.3
RP11-744N12	Riconosce la regione 11q24.3 (gene <i>FLI1</i>)

Protocolli FISH per sonde commerciali:

I protocolli eseguiti per effettuare FISH con sonde commerciali vengono forniti dalle stesse ditte specializzate presso le quali comperiamo le sonde stesse (VYsis; Aquarius-Cytocell).

Analisi dell'immagine

I preparati sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza (Leica DMRA) provvisto di diversi filtri, specifici per ogni fluorocromo, in grado di rilevare intervalli specifici di lunghezze d'onda.

L'analisi viene effettuata con un software di elaborazione d'immagine (Q-FISH Leica Imaging Systems Ltd.).

Protocolli FISH per sonde BAC:

Preparazione delle soluzioni

- 20X SSC pH=7

Sciogliere 87,65 g di NaCl e 44,1 g di Sodio citrato in 500 ml di H₂O distillata

Sterilizzato in autoclave a 125°C per 20'

- PBS pH=7,5

Sciogliere 1,155 g di Na₂HPO₄·12H₂O, 0,1 g di KCl, 4,00 g di NaCl e 0,1 g di KH₂PO₄ anidro in 500 ml di H₂O distillata

- Soluzione A = 4X SSC + 2,5% Tween20

800 ml di H₂O distillata + 200 ml di 20 x SSC + 25 µl di Tween
20

- NFM 10% Stock Solution = Not Fat Milk

10g NFM in 100ml acqua distillata

Procedimento: abbiamo aggiunto all'NFM inizialmente solo 80ml di acqua, lo abbiamo lasciato a 60°C in un bagnetto per 20' in modo da facilitare lo scioglimento, dopodiché abbiamo portato al volume finale di 100ml.

Questa soluzione è stata divisa in 3 provettoni e centrifugata a 5000 rpm per 20'. Abbiamo filtrato il surnatante mediante carta bibula posizionata all'interno di un imbuto (eliminare il pellet). Il surnatante così filtrato è stato conservato in aliquote da 5ml e conservato in freezer a -20°C.

- P.I. = 4 x SSC / 5% NFM

2 ml 20 x SSC + 3 ml di H₂O distillata + 5 ml di NFM (10%)

- BLOCKING SOLUTION

5 ml di NFM + 0,67 ml di BSA 3% + 2 ml di 20XSSC + 2,33 ml di H₂O

- 70% FORMAMIDE / 2XSSC = Soluzione Denaturazione vetrini

70 ml di Formamide + 10 ml di 20xSSC + 20 ml di H₂O distillata

pH=7 misurato a freddo

- FORMAMIDE / 1XSSC = Soluzione Lavaggi Post Ibridazione

50 ml di Formamide + 5 ml di 20xSSC + 45 ml di H₂O distillata

- Anticorpi per il rilevamento e l'amplificazione del segnale

a) Monoclonal anti-digoxigenin

coniugato con FITC, purified mouse immunoglobulin, clone DI-22 (SIGMA-ALDRICH CO)

Concentrazione d'uso 2µl Anticorpo/198µl PI, 100µl/vetrino

b) Anti-Mouse IgG (Whole molecule)

Developed in rabbit

FITC-conjugated

SIGMA

Concentrazione d'uso 2µl Anticorpo/198µl PI, 100µl/vetrino

c) Sheep Anti-Rabbit IgG

FITC-conjugated

[F(Ab')₂ Fragments]

Secondari antibody

CHEMICON

Concentrazione d'uso 2µl Anticorpo/198µl PI, 100µl/vetrino

d) Texas Red Avidin DCS

Concentrazione d'uso: 2 mg/ml

Vector Laboratories

e) Anti Avidina in Goat Biotinata

Soluzione madre: sciogliere 0.5 mg in 1 ml di H₂O distillata sterile

Conservare a -20°C

Preparazione dei vetrini

Per la preparazione dei vetrini abbiamo usato vetrini precedentemente lavati e sgrassati in alcol etilico su cui strisciare il pellet dei campioni processati. La quantità di gocce da aggiungere dipende dalla concentrazione del pellet. Abbiamo aliquoteato 5 μ l di sospensione cellulare su 3 aree del vetrino sgrassato; passato velocemente il vetrino sulla fiamma di un becco bunsen e lasciato asciugare all'aria. Importante è osservare il vetrino strisciato al microscopio a contrasto di fase, per quantificare le metafasi disponibili e la loro qualità (i cromosomi devono apparire ben separati e liberi da citoplasma mentre i nuclei interfascici integri e in numero discreto). Questi sono elementi fondamentali per una buona riuscita della FISH.

Cromosomi troppo neri con translucenza (ricchi d'acqua), oppure di colore grigio sbiadito (parzialmente denaturati) non sono ottimali per una buona ibridazione.

Abbiamo successivamente trattato i vetrini in soluzione salina 2XSSC a 37°C per 30 minuti.

Questo tipo di metodica predispone il preparato ad una ottimale denaturazione, proteggendolo da una sovra denaturazione. I vetrini strisciati da più di 48h non necessitano di tale procedura.

Abbiamo lasciato asciugare i vetrini, poi li abbiamo disidratati in scala crescente di alcol etilico 70%-85%-100% per 2 minuti a temperatura ambiente e fatti asciugare all'aria. Per far evaporare completamente l'alcol abbiamo messo i vetrini per un paio di minuti

su una piastra riscaldata a 37°C.

Mini preparazione di DNA di BAC da E. Coli

Le colture di cellule di E.coli contenenti i cloni BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sono state allestite come segue:

- α) Abbiamo strisciato le cellule su di una piastra LB-Agar (triptone 10 g/l, *yeast extract* 5g/l, NaCl 5 g/l + 14 g/l Agar) contenente ampicillina (100 μ g/ml finale) e lasciate crescere a 37°C o/n.
- β) Abbiamo inoculato una singola colonia in 50 ml di terreno LB (triptone 10 g/l, *yeast extract* 5g/l, NaCl 5 g/l) contenente l'opportuno antibiotico; per il genere BAC: Cloramfenicolo (12.5 μ g/ml finale) e lasciata crescere a 37°C in agitazione *overnight*.
- χ) Abbiamo estratto il DNA utilizzando il KIT commerciale BAC Phase Prep (Sigma)

Marcatura della sonda per Nick-Translation

La marcatura delle sonde per reazione di *Nick Translation* si basa sulla capacità della DNasi I di introdurre dei tagli "random" (nicks) a livello di un singolo filamento di DNA e sulla conseguente capacità esonucleasica 5'-3' della DNA Polimerasi I di E. coli di riparare tali "nicks", ripolimerizzando per un certo tratto il DNA in direzione 5'-3'. Se nel buffer sono quindi presenti dei nucleotidi marcati, essi verranno incorporati nel DNA. Come nucleotidi marcati abbiamo

utilizzato la Biotina-16-dUTP (Roche *Biochemicals*) oppure la Digossigenina-11-dUTP (Roche *Biochemicals*), i quali vengono incorporati in ragione del 35% rispetto al loro competitore naturale, il dTTP.

Per le reazioni di *Nick Translation*, abbiamo utilizzato il kit commerciale NICK TRANSLATION KIT (Roche *Biochemicals*). Essa è composta da una soluzione glicerolica 10x di DNasi I/DNA Polimerasi I, dal buffer 10x di reazione specifico per la miscela enzimatica e dai nucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) separati.

Abbiamo allestito le reazioni come segue:

2,5 µl di dATP

2,5 µl di dCTP

2,5 µl di dGTP

0,8 µl di dTTP

0,7 µl di biotin-16-dUTP (oppure Digoxigenin-11-dUTP)

1,0 µl di TE 1X

2,0 µl di Reaction Buffer

6,0µl Soluzione acquosa di DNA BAC, per una quantità compresa tra 100 ng e 1 µg.

2,0 µl Miscela enzimatica Dnasi I/DNA Polimerasi

20 µl

Abbiamo incubato le reazioni a +15°C per 2 ore

- A reazione ultimata, abbiamo aggiunto 2 µl di EDTA 0,2 M per bloccare l'azione degli enzimi.

- Abbiamo aggiunto ora un eccesso di 20-60 volte di *DNA Cot-1 (Roche Biochemicals)* (generalmente si usa un eccesso di BAC) e un eccesso di *DNA Salmon Sperm* in modo che la quantità totale di DNA presente sia di 30 µg per ogni vetrino che si intende ibridare. La frazione di DNA genomico umano che costituisce il DNA Cot-1 consiste di elementi ripetitivi interspersi e servirà per saturare le eventuali sequenze ripetute contenute nella sonda, che potrebbero fornire falsi segnali, mentre il secondo servirà a saturare il supporto di ibridazione.
- Abbiamo aggiunto successivamente 1/10 del volume di NaCl 5M, aggiungere 2-3 volumi di etanolo 100%, miscelare e incubare a –80°C per 1 ora.
- Abbiamo centrifugato a 20.000 x g per 30'
- Abbiamo eliminato il sopranatante e aggiunto 150-200 µl di Etanolo 70%.
- Abbiamo centrifugato nuovamente a 20.000 x g per 15' quindi eliminato il sopranatante (lasciare asciugare bene il *pellet* di DNA).
- Abbiamo accuratamente risospeso la sonda nella MIX di ibridazione così composta: Formamide 50%, SSC 2x, Dextran solfato 10%. Abbiamo calcolato un volume di 30 µl per ogni vetrino da ibridare. Le sonde sono conservate a –20°C

Denaturazione e ibridazione

Le sonde BAC necessitano un tempo di denaturazione di 10' ad una temperatura di 70°C ed un preannealing di 37°C per 1,30h , mentre i vetrini sono stati denaturati a 72°C per 5 minuti in una soluzione di 70% formamide in 2XSSC. I vetrini sottoposti all'ibridazione dopo la denaturazione sono stati disidratati eseguendo nuovamente la scala alcolica 70%-85%-100% a temperatura ambiente per 2' in ciascuna soluzione; abbiamo lasciato asciugare i vetrini. Ora sono pronti per l'ibridazione.

Quando entrambi i DNA sono stati denaturati, su ogni vetrino abbiamo distribuito 20µl di sonda , coperto con parafilm e messo in una camera umida a 37°C per un tempo di ibridazione di 16-17 ore.

Rilevamento ed amplificazione del segnale

Le sonde BAC, necessitano rilevamento ed amplificazione del segnale. Per le FISH con sonde marcate solo in Digossigenina abbiamo eseguito tre cicli di amplificazione come segue:

- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'
- 100µl PI / vetrino a 37°C per 15' (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'
- porre 100µl di anti-DIG / vetrino per 60' a 37°C (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di anti-Mouse / vetrino per 45' a 37°C (camera umida, termostato)

- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di anti-Rabbit / vetrino per 45' a 37°C (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- Immergere i vetrini nella soluzione 1x PBS per 2'

Infine abbiamo colorato i vetrini con Diaminofenilindolo (DAPI) per riconoscere i cromosomi e con Ioduro di Propidio come controcolorazione che ci ha permesso di evidenziare il segnale fluorescente.

Per le FISH con sonde marcate sia in Digossigenina che in Biotina abbiamo eseguito il seguente protocollo di amplificazione del segnale:

- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'
- 100µl Blocking Solution / vetrino a 37°C per 15' (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'
- porre 100µl di Avidina-Texas Red / vetrino per 30' a 37°C (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di GAAB + anti-DIG / vetrino per 45' a 37°C (camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di Avidina-Texas Red + anti-Mouse / vetrino per 45' a 37°C (camera umida, termostato)

- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di GAAB + anti-Rabbit / vetrino per 45' a 37°C
(camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- porre 100µl di Avidina-Texas Red / vetrino per 45' a 37°C
(camera umida, termostato)
- Immergere i vetrini nella soluzione A per 5'; tre volte
- Immergere i vetrini nella soluzione 1x PBS per 2'

Infine abbiamo colorato i vetrini con Diaminofenilindolo (DAPI) per riconoscere i cromosomi.

Abbiamo osservato i preparati con un microscopio a fluorescenza (Leica DMRA) provvisto di diversi filtri, specifici per ogni fluorocromo, in grado di rilevare intervalli specifici di lunghezze d'onda.

Abbiamo infine effettuato l'analisi con un software di elaborazione d'immagine (Q-FISH Leica Imaging System Ltd.).

4.4 MULTIPAINING

Preparazione vetrino

- Strisciare e lasciare a T.A. overnight

Oppure

- Invecchiare in stufa a 90°C x 10'
- Mettere in una vaschetta con 2XSSC a 37°C x 30-60'

- EtOH 70% x 1', 85% x 1', 100% x 1'

Pretrattamento enzimatico

- mettere 20 µl di RNase working solution per un coprioggetto 22x22 in camera umida a 37°C x 30'
 - RNase soluzione madre:
10 mg/ml RNase A DNase free in 2XSSC. Aliquote da 10 µl a -20°C
 - RNase working solution:
Scongellare l'aliquota ed aggiungere 990 µl di 2XSSC
- togliere il coprioggetto e lavare in 2XSSC 2 volte x 5'. In alternativa mettere i vetrini in una vaschetta, aggiungere 2XSSC e agitare qualche secondo, svuotare la vaschetta e ripetere l'operazione
- mettere i vetrini in pepsin working solution a 37°C x 5'
 - pepsin soluzione madre (10%):
0,1 g di pepsina in 1 ml di acqua a 37°C. aliquote da 35 µl a -20°C
 - pepsin working solution (0.005%):
scongellare l'aliquota e aggiungere 69,3 ml di acqua e 0.7 ml di HCl 1N riscaldati a 37°C
- lavare in PBS1X 2 volte x 5'. In alternativa mettere i vetrini in una vaschetta, aggiungere PBS1X e agitare qualche secondo, svuotare la vaschetta e ripetere l'operazione
- mettere i vetrini in formaldeide fixation solution x 2' a T.A.
 - formaldeide fixation solution:

57,6 ml acqua + 3.5 ml MgCl₂ 1M + 7 ml 10XPBS +1.89 ml formaldeide 37%

- lavare in PBS1X 2 volte x 5'. In alternativa mettere i vetrini in una vaschetta, aggiungere PBS1X e agitare qualche secondo, svuotare la vaschetta e ripetere l'operazione
- EtOH 70% x 1', 85% x 1', 100% x 1'
- asciugare all'aria

Denaturazione vetrino

- denaturare in 70% formammide/2XSSC a 72°C x 2'
- etOH 70% x 1', 85% x 1', 100% x 1'
- mettere su piastra a 45-50°C per far evaporare l'etOH e procedere immediatamente con l'ibridazione

Ibridazione

- mettere 10 µl di sonda in un'eppendorf
- denaturare a bagnomaria a 72°C x 5'
- mettere la sonda sul vetrino con coprioggetto 22x22
- colla
- camera umida 37°C x 12-18 h

Lavaggi

- 0.4XSSC/0.3%NP40 a 72°C x 2'
- 2XSSC/0.1%NP40 a T.A. x 5" – 1'
- asciugare all'aria al buio

DAPI

4.5 COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH) SU MICROARRAY (aCGH)

Per gli esperimenti di aCGH abbiamo utilizzato DNA estratto da sangue midollare. I metodi per l'estrazione del DNA e la preparazione dei campioni che abbiamo utilizzato per l'array sono quelli descritti dai protocolli forniti dalla ditta Agilent: essi prevedono le seguenti fasi:

- Purificazione di DNA totale, metodo DNAeasy

Questo protocollo è disegnato dalla Qiagen per la purificazione del DNA totale da sangue animale o da cellule in coltura.

- Protocollo Agilent per analisi di DNA genomico basato su "CGH su array di oligonucleotidi"

Si usano 0,5 µg di DNA genomico iniziale. Bisogna usare la stessa quantità di DNA per il test e per il controllo nella fase di digestione e restrizione.

Formato microarray: 1x244K microarray

DNA genomico di partenza: da 0,5 µg a 3,0 µg

Volume di DNA genomico: 20,2 µL

- Marcatura fluorescente del DNA

Il kit PLUS di marcatura del DNA genomico di Agilent utilizza primers casuali (random) e il frammento exo-Klenow della DNA polimerasi di E. Coli (privo di attività esonucleasica) per marcare differenzialmente i campioni di DNA con nucleotidi

marcati in fluorescenza.

Per l'applicazione di Oligo aCGH di Agilent il test viene marcato con un colore e il controllo con un altro colore, la polarità della marcatura è scelta dallo sperimentatore.

Cianina 3-dUTP e cianina 5-dUTP sono fotosensibili perciò durante il processo di marcatura va limitata l'esposizione alla luce.

- Pulizia del DNA genomico marcato
- Preparazione del DNA marcato per l'ibridazione
- Ibridazione su microarray

Ogni microarray è stampato sul lato del vetrino che presenta la scritta Agilent (lato attivo), il lato opposto (inattivo) presenta il codice a barre numerico.

Il campione per l'ibridazione è applicato direttamente sul lato del vetrino di copertura (gasket slide) che presenta la guarnizione sul quale poi verrà sistemato il vetrino in modo da avere il campione a contatto con il lato attivo.

Dobbiamo assicurare l'unione a "sandwich" dei vetriini con la camera SureHyb. Ruotare più volte l'apparato in modo da bagnare la superficie e verificare la mobilità delle bolle d'aria e porre la camera così composta in un fornello rotatorio a 65°C per 40 ore.

- Lavaggio microarray

Protocollo per il lavaggio in un ambiente in cui i livelli di ozono superano le 5 ppb (parti per milione). Cy5 infatti risulta

suscettibile alla degradazione da ozono.

Al fine di minimizzare l'impatto di ossidanti sulla rilevazione del segnale abbiamo analizzato immediatamente i vetrini utilizzando lo scanner Agilent.

- Acquisizione dell'immagine mediante scanner Agilent G2565BA

Lo scanner acquisisce la fluorescenza del DNA che ha ibridato gli spot mediante due fasci laser a 550 nm e 650 nm. Abbiamo analizzato l'immagine generata con gli spot fluorescenti mediante software Agilent Feature Extraction il quale attribuisce la griglia elettronica appropriata e calcola i valori delle fluorescenze per ogni singolo canale.

I files prodotti sono in seguito analizzati dal software CGH Analytics il quale posiziona ogni singolo spot sul cromosoma di appartenenza e calcola la variazione della fluorescenza dalla media, che, con opportuni algoritmi proprietari, permette di evidenziare eventuali aberrazioni e CNVs.

4.6 REAL TIME PCR DI ESPRESSIONE

La PCR real-time permette di monitorare l'amplificazione di una sequenza desiderata ad ogni ciclo termico. Tale monitoraggio è effettuato mediante la misurazione della fluorescenza legata al DNA prodotto in ogni ciclo che, quindi, è proporzionale alla quantità di

DNA presente in quel particolare ciclo stesso. La fluorescenza del DNA è prodotta da molecole intercalanti presenti nel buffer (es: il SYBR green) o da sonde fluorescenti specifiche per l'amplicone prodotto (es: Sonda Taqman). Essendo, inoltre, l'amplificazione del DNA mediante PCR una reazione che produce nuove molecole di DNA in maniera esponenziale, sapere ad ogni ciclo la quantità di DNA prodotta, permette di estrapolare la quantità di DNA utilizzato come template all'inizio della reazione, a differenza della reazione di PCR con termociclatori convenzionali nella quale la reazione raggiunge un plateau finale che non permette, quindi, di risalire alla quantità di template di partenza.

Misurare la quantità di un trascritto di mRNA prevede di retrotrascrivere tutto l'RNA estratto dalle cellule in cDNA in modo che possa essere amplificato mediante PCR. Inoltre, non è possibile misurare la quantità di un trascritto in maniera assoluta in quanto l'espressione di un gene non è mai costante, anche tra cellule dello stesso tipo e dipende da numerosi e complessi fattori metabolici. Di conseguenza si effettua una misura relativa della quantità di trascritto, relativizzando il trascritto del/dei gene/i di interesse rispetto ad uno o più geni espressi in tutte le cellule, la cui variabilità di espressione tra individui e tra tessuti diversi risulta essere minima. Tali geni di riferimento prendono il nome di geni "house-keeping".

La relativizzazione dell'espressione del gene di interesse rispetto ad un gene house keeping si effettua preparando reazioni di real-time

PCR (dopo retrotrascrizione) sia per il/i paziente/i che per i controlli utilizzando specifiche coppie di primers per il gene di interesse e quelli house keeping. Ogni coppia di primers prevede, inoltre, la presenza della relativa sonda taqman per la misura della quantità dell'amplicone prodotto. L'unico fattore costante è la quantità di cDNA per ogni paziente o controllo utilizzato in ciascuna reazione. Ogni amplicone gene-specifico, quindi, è visualizzabile come una curva di fluorescenza prodotta ad ogni ciclo termico. La differenza tra la curva di amplificazione del gene in studio rispetto ad un gene house keeping permette di calcolare il valore di espressione relativa del gene in studio rispetto all'house keeping. Tale valore è calcolato sia per i pazienti che per i controlli e posti in un grafico.

Protocollo

- il sangue midollare del paziente e dei controlli è stato posto immediatamente dopo il prelievo in un tubo contenente una soluzione di conservazione (Pax-gene Tubes – Qiagen) e incubato per almeno 2 ore a temperatura ambiente. La conservazione dei tubi è stata effettuata a -80°C fino all'estrazione dell'RNA
- l'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata mediante kit commerciale a colonnine Pax-Gene RNA tubes (Qiagen)
- l'integrità dell'RNA è stata valutata su gel di agarosio 1,2% in TAE

- 1 µg di RNA è stato retrotrascritto in cDNA con il kit Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

Ogni reazione di real-time PCR è stata effettuata in triplicato per ciascun gene e per ciascun paziente/controllo.

I primers/sonde utilizzati (Applied Biosystems – Life Technologies Carlsbad, California – USA) sono i seguenti:

Hs01003267_m1 (*HPRT1*)

Hs00824723_m1 (*UBC*)

Hs99999903_m1 (*ACTB*)

Hs00180489_m1 (*MPL*)

RUNX1-EXO1-FW

RUNX1-EXO4-RW

RUNX1-EXO3-FW

RUNX1-EXO4-RW

RUNX1-EXO4 dupinv-FW

RUNX1-EXO3 dupinv-RW

RUNX1-EXO7-RW

I tre geni house keeping (*HPRT1*, *UBC*, *ACTB*) sono stati precedentemente testati in espressione relativa rispetto ad *MPL* e *RUNX1* solo sui controlli sani per verificare quale fosse tra loro quello con la minore variabilità di espressione intra-controlli. E' risultato che *HPRT1* e *UBC* sono i più stabili e sono stati scelti come geni house keeping di riferimento per la relativizzazione rispettivamente con *MPL* e *RUNX1*.

5. RISULTATI

PAZIENTE 1

I risultati della prima analisi cromosomica effettuata su prelievo di MO, SP e biopsia cutanea hanno da subito evidenziato la presenza di un'anomalia cromosomica costituzionale a carico di un cromosoma 21 (Fig. 5.1).

Abbiamo deciso di definire meglio l'anomalia cromosomica presente: essa è caratterizzata da un evento di inversione pericentrica che rompe la sequenza genica di *RUNX1* in una regione posta tra l'esone 2 e l'esone 5. Tale risultato è stato ottenuto mediante l'allestimento di esperimenti di FISH utilizzando appropriate sonde, in particolare:

- CTD-2349F18 che contiene il promotore e il primo esone di *RUNX1*
- CTD-2235K24 che contiene gli esoni 2-8 di *RUNX1*
- *ETO-AML1* che evidenzia la traslocazione tra il gene *ETO*, sul cromosoma 8, e *RUNX1*
- whole chromosome painting 21
- WI2-542L2 che contiene gli esoni 7-8 di *RUNX1*
- RP11-468N22 che contiene la regione a monte di *RUNX1*
- WI2-605D9 (ex 2-5) + WI2-847D7 (ex 6-7)

- CTD-2532E17 che mappa in 21p11.2-p11.1
- 21qter (21qter Subtelomere Specific Probe-Aquarius Cytocell) che riconosce le regioni subtelomeriche del cromosoma 21

I risultati sono stati i seguenti:

- la sonda CTD-2349F18 mostra la presenza di un segnale di posizione e dimensione normale sul braccio lungo del der(21)
- le sonde CTD-2235K24 e *ETO-AML1* mostrano due segnali posti sulle braccia lunghe e sulle braccia corte del der(21) (Fig. 5.2)
- il painting del 21 ha mostrato che il der(21) è tutto materiale del cromosoma 21
- le sonde WI2-542L2, RP11-468N22 (Fig. 5.3) e WI2-847D7 (Fig. 5.4) mostrano un solo segnale spostato però sul braccio corto del der(21)
- la sonda WI2-605D9 mostra due segnali posti sulle braccia lunghe e sulle braccia corte del der(21) (Fig. 5.4)
- la sonda CTD-2532E17, che mappa in 21p11.2-p11.1, mostra la presenza del segnale sul cromosoma 21 riarrangiato, ma traslocato sul braccio lungo dello stesso in posizione prossimale al centromero (Fig. 5.5)
- la sonda commerciale che riconosce le regioni subtelomeriche del cromosoma 21 presenta segnali di normalità anche sul der(21)

Esperimenti di real-time PCR hanno confermato l'ipoespressione di *RUNX1*.

Come conclusione del nostro lavoro è stato messo a punto un esperimento di a-CGH su DNA estratto da MO. Il risultato ottenuto permette di evidenziare come, oltre all'evento di inversione (non visibile in un esperimento di array perchè non comporta perdita o acquisto di materiale genico), sia avvenuto anche una duplicazione a carico degli esoni 2-4 di *RUNX1*, una delezione in 21q22.3 delle dimensioni di circa 2,35 Mb e una duplicazione in q22.2 di una regione di 37,5 Kb contenente il gene *WRB* (tryptophan rich basic protein) (Fig. 5.6).

Per confermare i risultati di array sono state allestite le analisi di FISH con le seguenti sonde:

- WI2-1915K14 che riconosce gli esoni 2-3-4 di *RUNX1*
- RP11-88N2 che mappa in 21q22.3

I risultati sono stati i seguenti:

- la sonda WI2-1915K14, che riconosce gli esoni 2-3-4 di *RUNX1*, mostra la presenza del segnale sul derivativo 21 (der(21)), ma di dimensioni maggiori rispetto al cromosoma normale (Fig. 5.7)
- la sonda RP11-88N2, che mappa in 21q22.3, risulta essere assente sul der(21) (Fig. 5.8)

Su vetrini ottenuti dal processamento di campioni di MO della paziente è stata effettuata la colorazione specifica per le regioni ? (NOR) che ha permesso di escludere un loro coinvolgimento nell'evento di inversione, mantenendo questi la loro posizione originale.

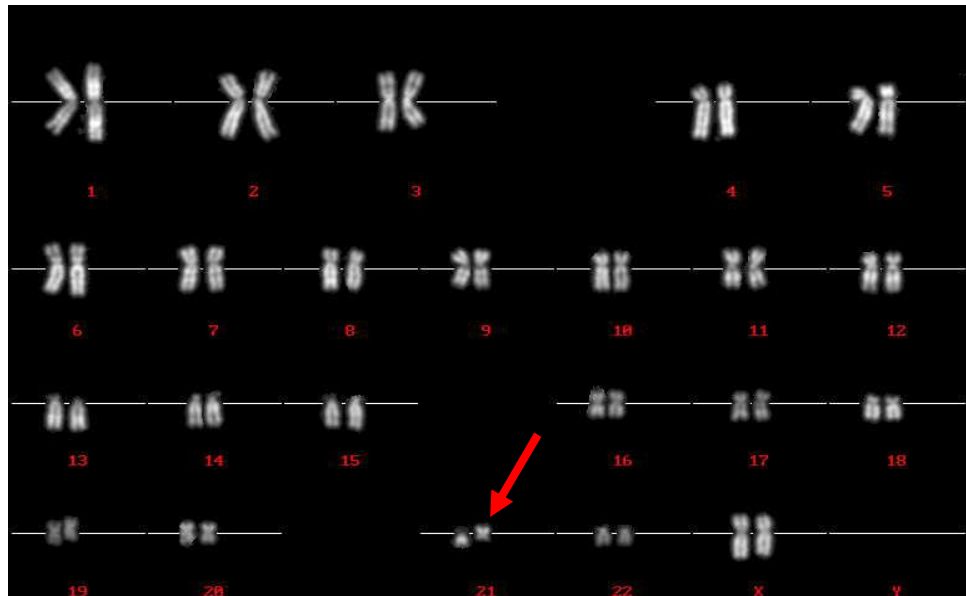


Fig. 5.1. Cariotipo da metafase su MO della paziente 1: 46,XX,inv(21)(p11.2q22.1)

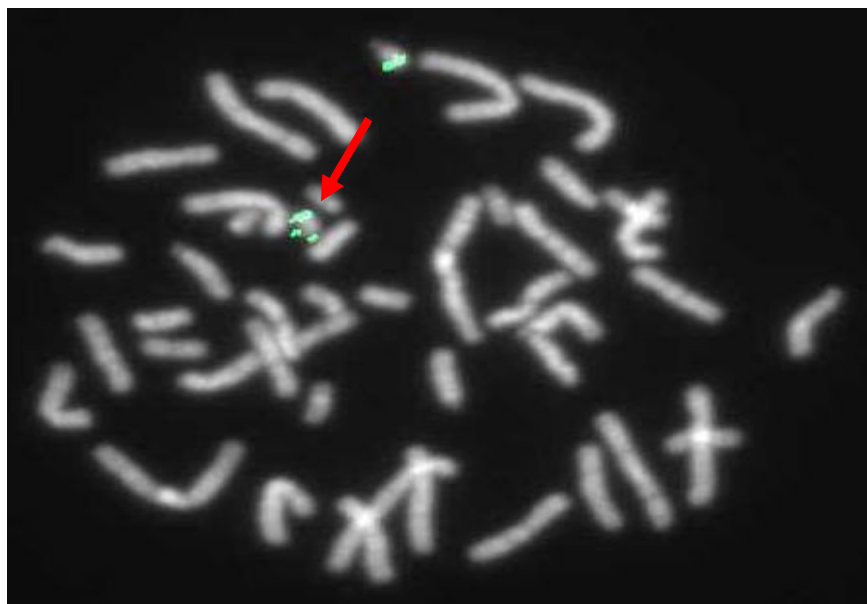


Fig. 5.2 FISH su metafase da MO del paziente 1 con sonda BAC CTD-2235K24

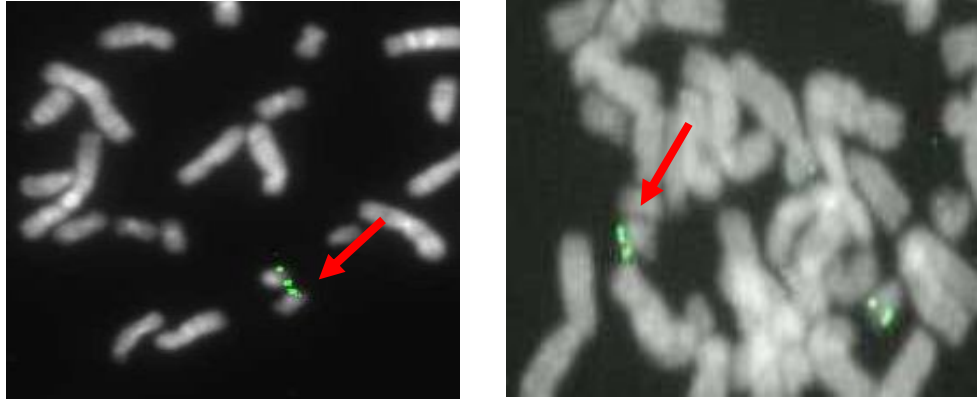


Fig. 5.3 FISH su metafasi da MO del paziente 1 con sonde BAC WI2-542L2 (sinistra) e RP11-468N22 (destra)

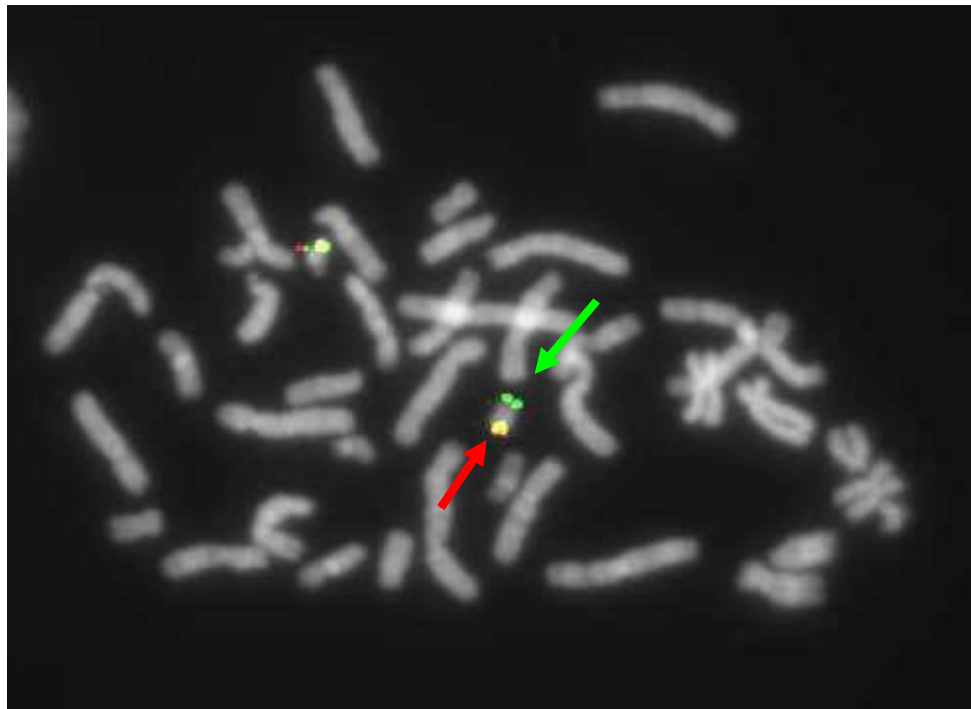


Fig. 5.4 FISH su metafase da MO del paziente 1 con sonde BAC WI2-605D9 (G) + WI2-847D7 (R)

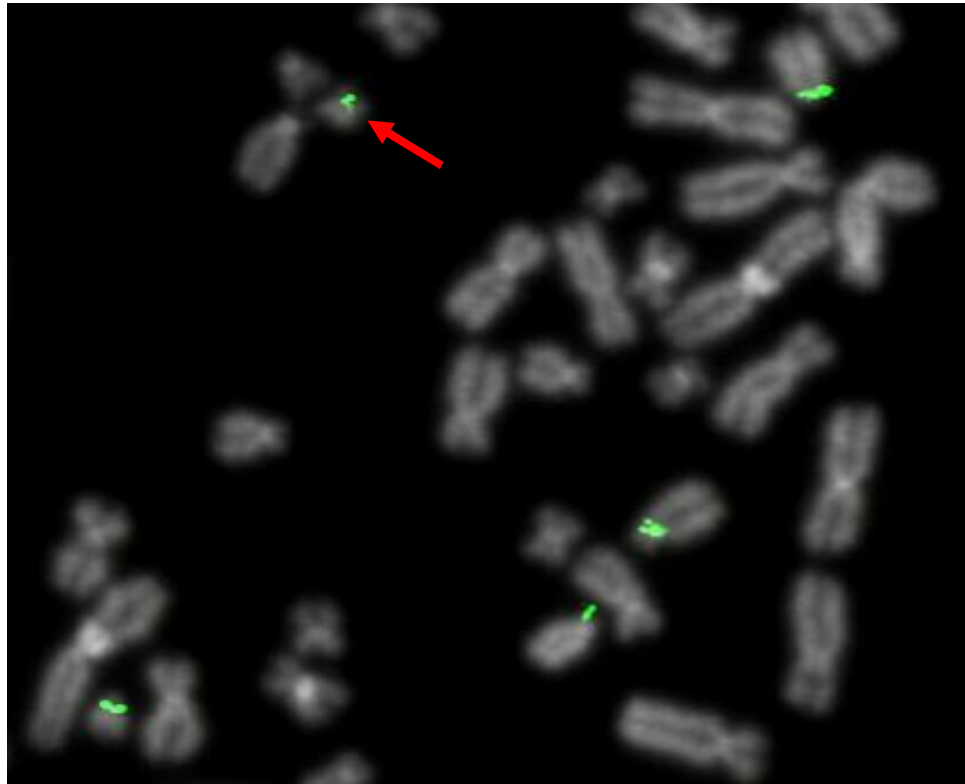


Fig. 5.5 FISH su metafase da MO del paziente 1 con sonda BAC CTD-2532E17

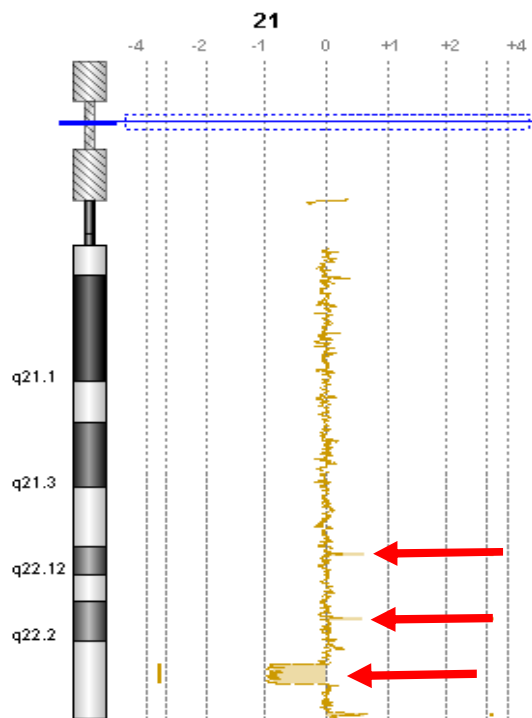


Fig. 5.6 Profilo di a-CGH di un cromosoma 21 della paziente 1

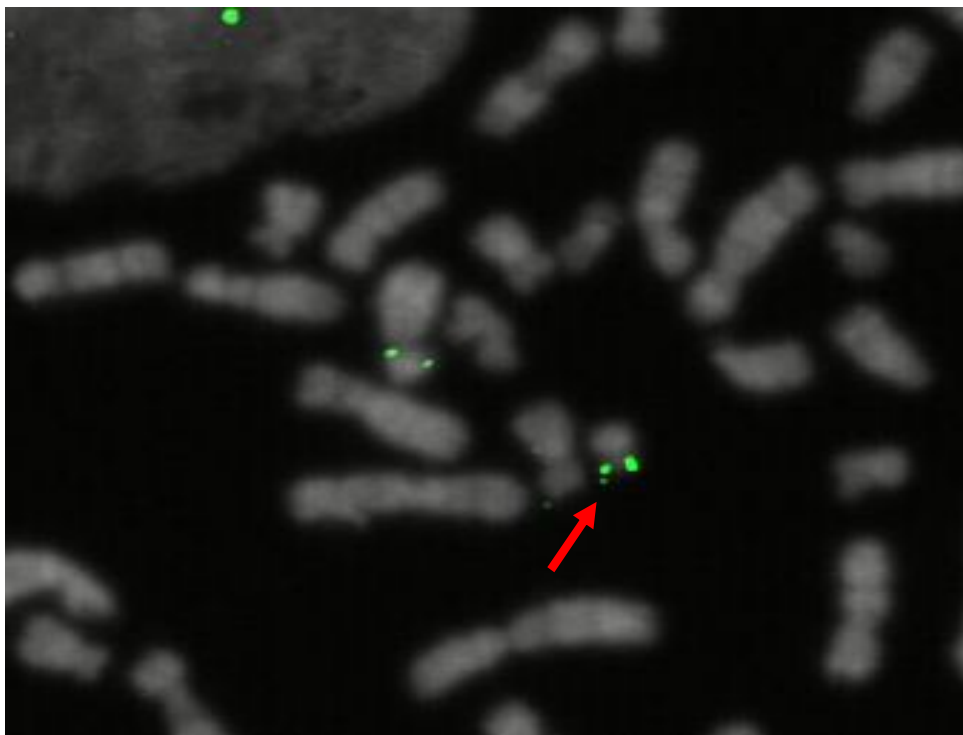


Fig. 5.7 FISH su metafase da MO del paziente 1 con sonda fosmidica W12-1915K14

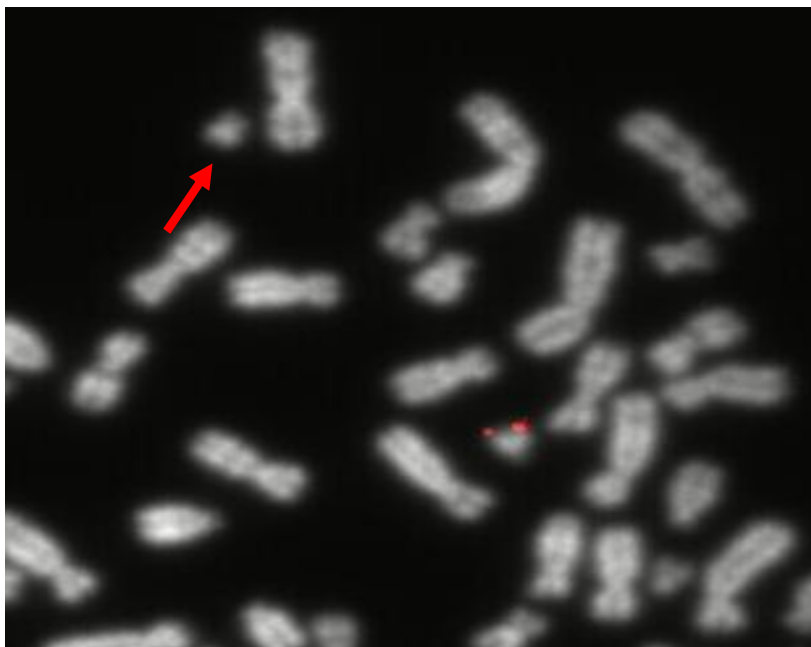


Fig. 5.8 FISH su metafase da MO del paziente 1 con sonda BAC RP11-88N2

PAZIENTE 2

I risultati della prima analisi cromosomica effettuata su MO hanno evidenziato la presenza di un'anomalia cromosomica clonale acquisita a carico di un cromosoma 21 (Fig. 5.9).

Per indagare la natura dell'anomalia sono state allestite le analisi di FISH con le seguenti sonde:

- *ETO-AML1* che evidenzia la traslocazione tra il gene *ETO*, sul cromosoma 8, e *RUNX1*
- whole chromosome painting 21
- CTD-2235K24 che contiene gli esoni 2-8 di *RUNX1*
- CTD-2349F18 che contiene il promotore e il primo esone di *RUNX1*
- RP11-88N2 (21q22.3) + RP11-625E21 (21q22.2), dual color, che riconoscono regioni telomeriche rispetto a *RUNX1*
- RP11-79G23 (21q21.3) + RP11-203G22 (21q22.12), dual color, che riconoscono, rispettivamente, regioni centromeriche e telomeriche rispetto a *RUNX1*
- 21qter (21qter Subtelomere Specific Probe-Aquarius Cytocell) che riconosce le regioni subtelomeriche del cromosoma 21

I risultati sono stati i seguenti:

- la sonda *ETO-AML1* mostra il segnale relativo al gene *RUNX1* di dimensioni inferiori sul 21 riarrangiato rispetto al cromosoma 21 normale
- il painting del 21 ha dimostrato che il der(21) è formato esclusivamente da materiale del cromosoma 21
- la sonda CTD-2235K24 risulta essere completamente assente nel der(21) (Fig. 5.1.1)
- la sonda CTD-2349F18 mostra un segnale di dimensioni inferiori sul der(21) rispetto al cromosoma normale
- le sonde RP11-88N2 e RP11-625E21, dual color, mostrano entrambe un segnale duplicato e invertito sul der(21) (Fig. 5.1.2)
- le sonde RP11-79G23 e RP11-203G22, dual color, mostrano segnali normali su entrambi i cromosomi
- i subtelomeri mantengono le loro posizioni originali anche sul der(21)

Dopo aver definito l'origine del cromosoma 21 anomalo, il follow up del paziente è stato eseguito con analisi di citogenetica standard e su tutti i campioni di SP e MO è stata eseguita la FISH con la sonda informativa CTD-2235K24, utilizzata come marker per evidenziare e quantificare la presenza del clone con il der(21).

Esperimenti di real-time PCR hanno confermato una evidente

ipoespressione di RUNX1 (Fig. 5.1.3).

Nel corso del follow up di questo clone ci si è accorti della presenza di una delezione interstiziale a carico delle braccia lunghe di un cromosoma 13, confermata con FISH su nuclei interfasici tramite l'utilizzo della sonda RP11-1001I7 che mappa in 13q14.2 (Fig. 5.1.4). Questa sonda è stata utilizzata anche sulle analisi successive confermando sempre anche la presenza di questo secondo clone.

In questo modo è stato possibile seguire nel tempo l'andamento dei due cloni sia con tecniche di citogenetica standard sia con tecniche di FISH che hanno permesso di evidenziare come le due anomalie cromosomiche non siano mai presenti nelle stesse cellule e abbiano, anzi, uno sviluppo ed un andamento temporale differente.

Anche su questo paziente è stato eseguito un esperimento di a-CGH utilizzando la piattaforma Agilent 244K .

L'esperimento è stato eseguito su DNA estratto da MO e il risultato è il seguente (Fig. 5.1.5):

- la regione di un cromosoma 13 posta tra le bande q13.3 e q21.31 risulta essere deleta (36806311-62951424)
- il profilo di array del cromosoma 21 mostra la duplicazione delle regioni terminali comprese tra i nucleotidi 36500235-46855884, ma non è stata rilevata alcuna delezione nella regione di *RUNX1*.

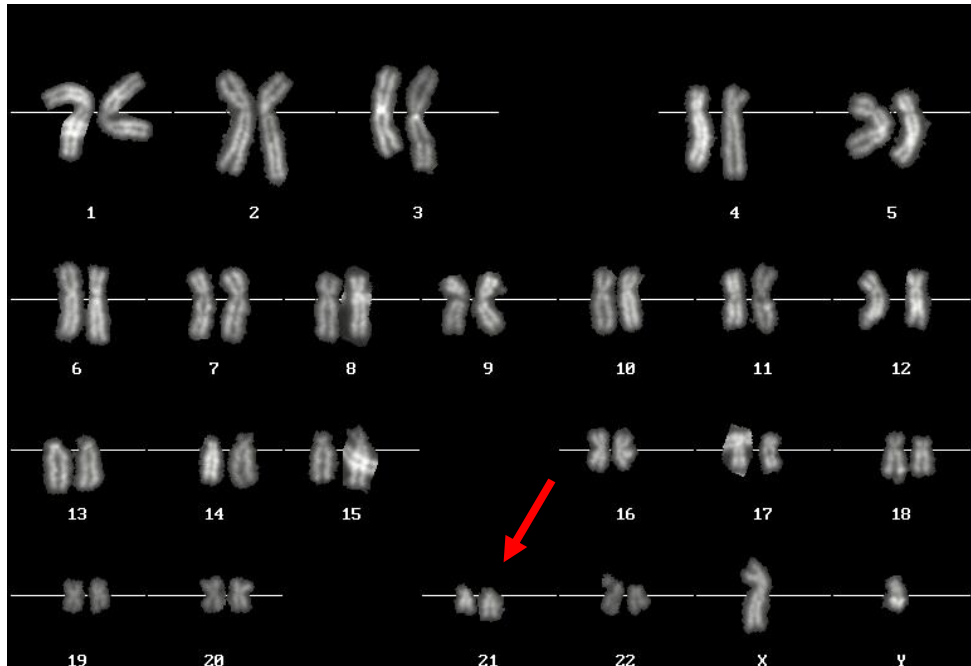


Fig. 5.9. Cariotipo da metafase su MO del paziente 2: 46,XY,der(21)

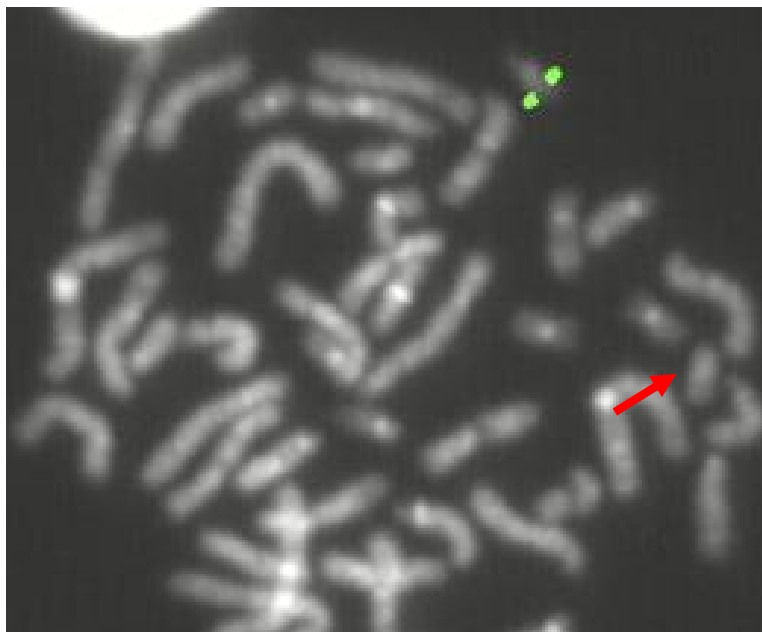


Fig. 5.1.1 FISH su metafase da MO del paziente 2 con sonda BAC CTD-2235K24

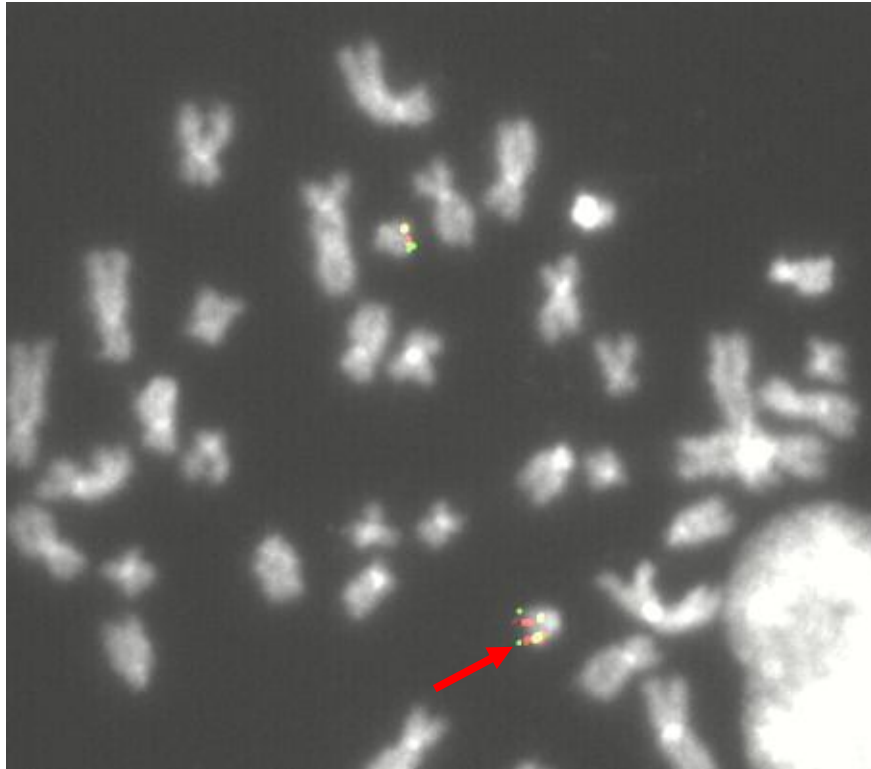


Fig. 5.1.2 FISH su metafase da MO del paziente 2 con sonde BAC RP11-88N2 (R) + RP11-625E21 (G)

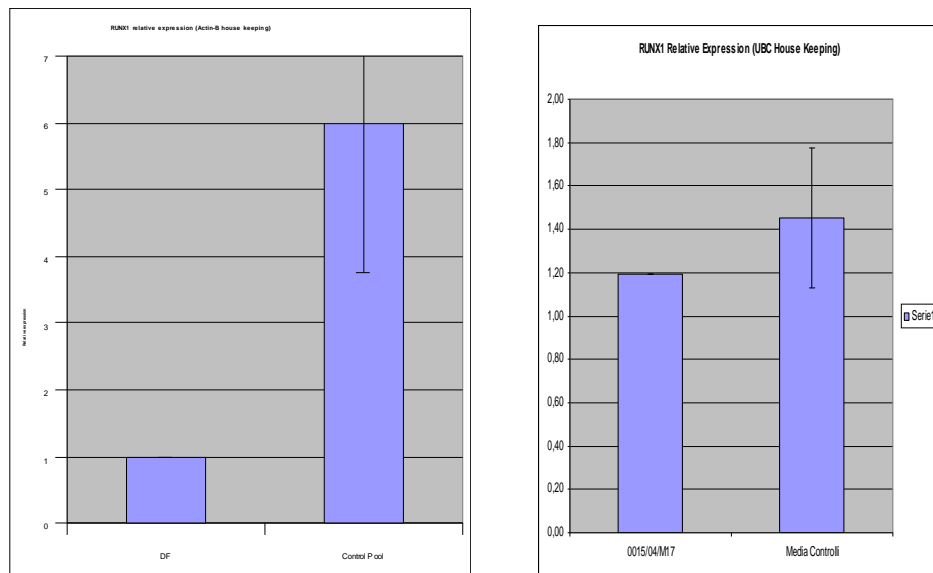


Fig. 5.1.3 Profili di Real-time PCR di espressione su MO del paziente 2, eseguiti nel Maggio 2006 (sinistra) e nel Novembre 2008 (destra)

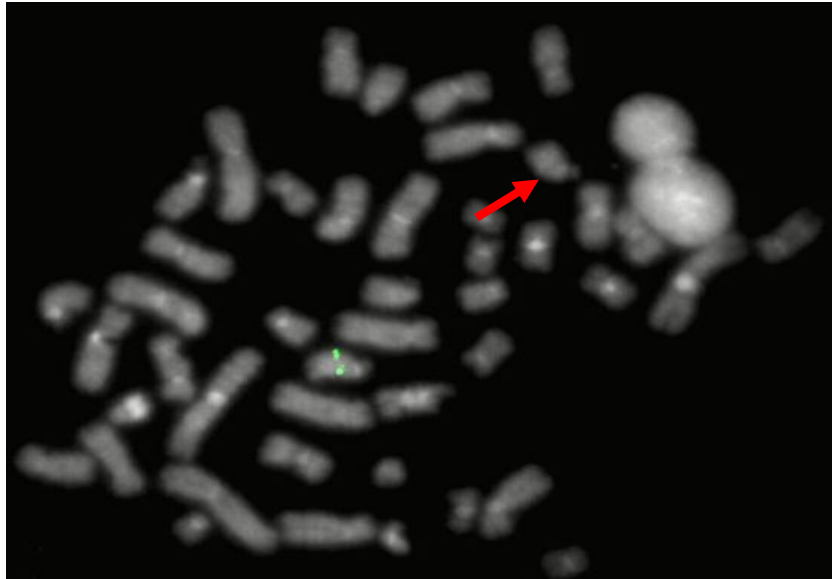


Fig. 5.1.4. FISH su metafase da MO del paziente 2 con sonda BAC RP11-100117

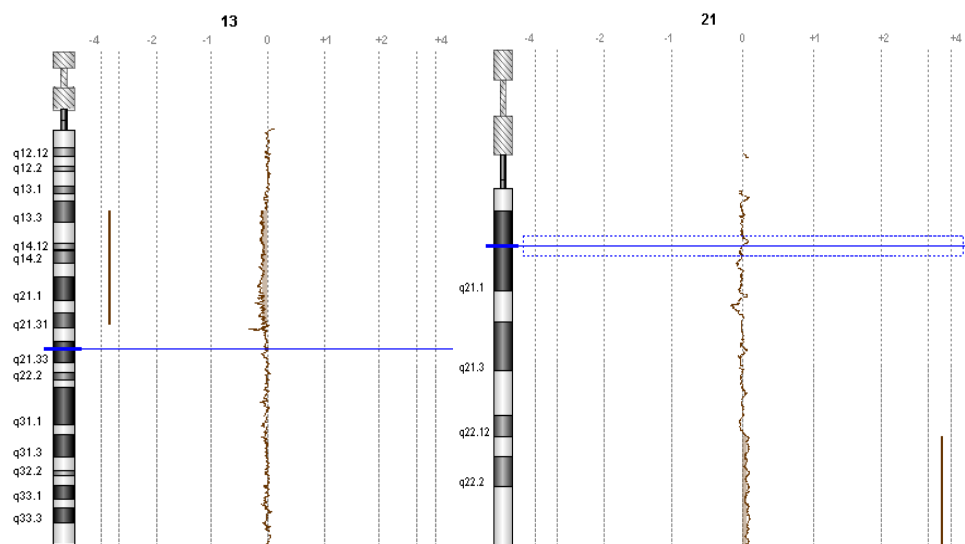


Fig. 5.1.5 Profilo di a-CGH di un cromosoma 13 e di un cromosoma 21 del paziente 2

PAZIENTE 3

Nell' Agosto 2007 è pervenuto alla nostra attenzione un paziente di 3 anni d'età con una diagnosi di anemia iporigenerativa e sospetta anemia di Fanconi. Sono state condotte analisi di citogenetica standard su un campione di SP, che ha rilevato un cariotipo normale, e uno di MO che ha dato, invece, il seguente risultato: 46,XY,inv(1)(p13p36)/46,XY. Su 15 metafasi analizzate, infatti, 12 evidenziano la presenza di un cromosoma 1 invertito, in particolare l'inversione paracentrica non altera la morfologia del cromosoma ma modifica il pattern di bandeggio delle braccia corte (Fig. 5.1.6).

Tale risultato viene ripetuto nei successivi sette prelievi di MO: il clone anomalo risulta sempre preponderante rispetto a cellule con cariotipo normale.

Accanto a tali risultati si affiancano i pareri dei clinici presso cui è in cura il bambino che suggeriscono la presenza di un fenotipo simil-CAMT. Il nostro paziente, però, pur presentando un quadro clinico suggestivo per CAMT e livelli ematici di TPO circolante elevati, non ha nessuna delle mutazioni note nel gene *MPL*.

Per indagare meglio la natura dell'inversione e capire se e come *MPL* fosse coinvolto nell'evento e nello sviluppo di un fenotipo CAMT è stata allestita la FISH con le seguenti sonde:

- RP11-90B12 (1p34.2) + RP11-113C10 (1p34.2), dual color, che riconoscono, rispettivamente, la regione immediatamente precedente e successiva di *MPL*.

Il risultato ha mostrato la fusione delle due sonde anche sul der(1) ma il segnale è spostato in posizione più centromerica rispetto a quello presente sul cromosoma 1 normale (Fig. 5.1.7).

Anche su questo paziente è stato eseguito un esperimento di a-CGH utilizzando la piattaforma Agilent 244K.

L'esperimento è stato eseguito su DNA estratto da MO e il risultato è stato il seguente (Fig. 5.1.8):

- nella banda 1p12, in prossimità del punto di rottura più centromerico dell'inversione, è presente una regione di delezione di 350kb
- nella banda 1p36.31, in prossimità del punto di rottura più telomerico dell'inversione, è presente una regione di delezione di 1,65Mb

Per confermare i risultati di a-CGH sono state allestite le FISH con le seguenti sonde:

- RP11-46G23 (1p12), che riconosce la regione immediatamente precedente alla delezione più centromerica
- RP11-125P23 (1p12), che riconosce la regione deleta prossima al centromero
- RP11-206H22 (1p11.2), che riconosce la regione immediatamente successiva alla delezione più centromerica
- RP11-467K11 (1p36.32), che riconosce la regione

immediatamente precedente alla delezione più telomerica

- RP11-372C15 (1p36.31), che riconosce la regione deleta prossima al telomero
- RP11-690E2 (1p36.23), che riconosce la regione immediatamente successiva alla delezione più telomerica

I risultati sono stati i seguenti:

- la sonda RP11-46G23, posizionata appena prima della delezione centromerica, mostra segnali di uguali dimensioni ma risulta essere più spostata verso il telomero sull'inv(1) (Fig. 5.1.9)
- la sonda RP11-125P23, posizionata all'interno della regione deleta, permane nella stessa posizione ma ha dimensioni minori sul inv(1) (Fig. 5.2)
- la sonda RP11-206H22, posizionata dopo la delezione centromerica, mantiene la stessa posizione e dimensione sui due cromosomi 1
- la sonda RP11-467K11, posizionata appena prima della delezione telomerica, mantiene la stessa posizione e dimensione sui due cromosomi 1
- la sonda RP11-372C15, posizionata all'interno della regione deleta, risulta assente sull'inv(1) (Fig. 5.2.1)
- la sonda RP11-690E2, posizionata dopo la delezione telomerica, mantiene la stessa dimensione sui due cromosomi 1 ma risulta

essere più spostata verso il centromero sull'inv(1) (Fig. 5.2.2)

E' stato, inoltre, messo a punto un 'esperimento di real-time PCR di espressione su RNA per definire l'espressione di MPL. L'esperimento ha evidenziato una drastica riduzione nell'espressione relativa del gene *MPL* rispetto ad un pool di controlli di soggetti sani (Fig. 5.2.3).



Fig. 5.1.6. Cariotipo da metafase su MO del paziente 3: 46,XY,inv1(p13;p36)

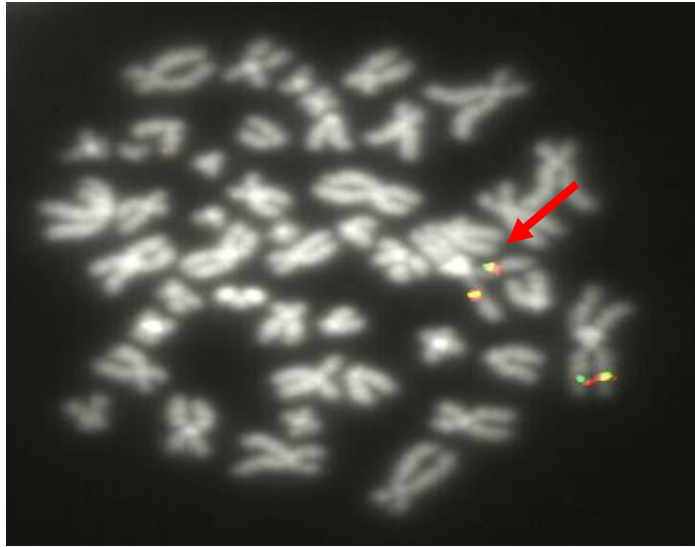


Fig. 5.1.7 FISH su metafase da MO del paziente 2 con sonde BAC RP11-113C10 (R) + RP11-90B12 (G)

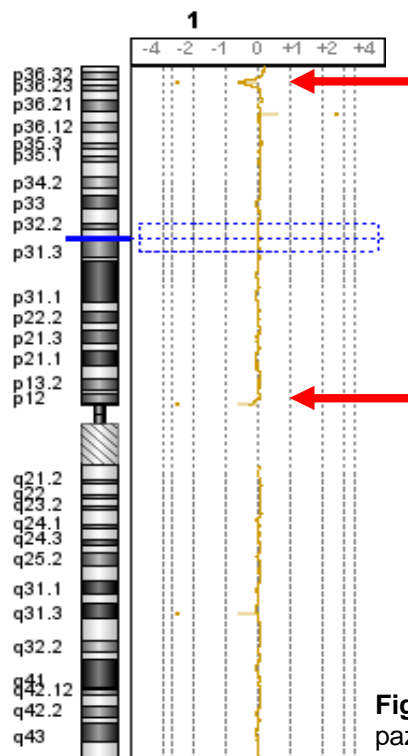


Fig. 5.1.8 Profilo di a-CGH di un cromosoma 1 del paziente 3

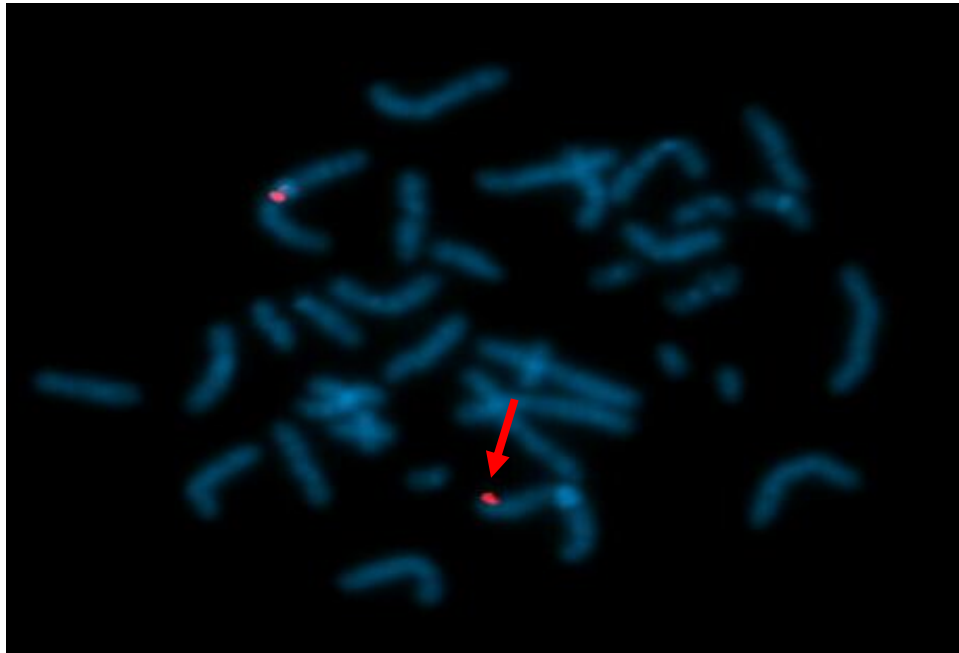


Fig. 5.1.9 FISH su metafase da MO del paziente 3 con sonda BAC RP11-46G23

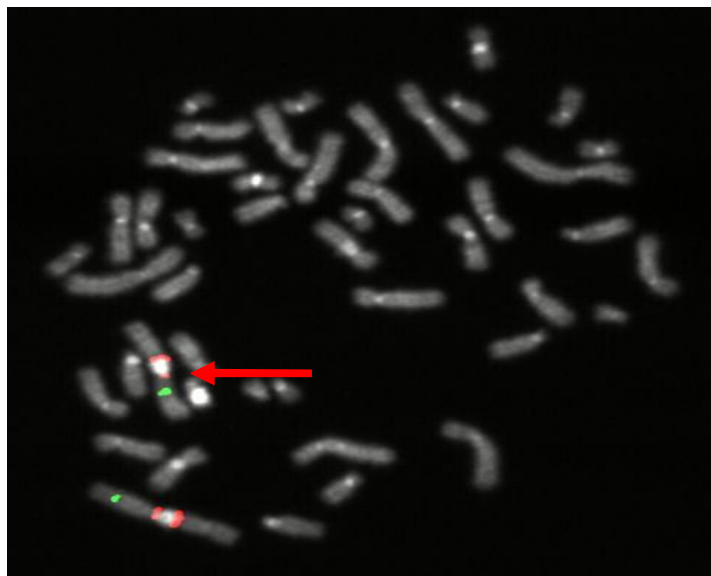


Fig. 5.2 FISH su metafase da MO del paziente 3 con sonde BAC RP11-125P23
(R) + RP11-90B12 (G)

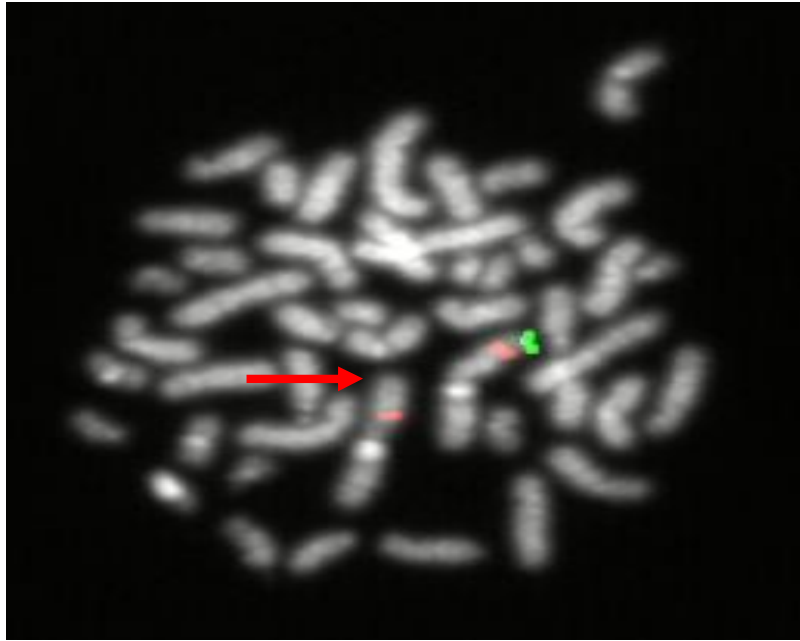


Fig. 5.2.1 FISH su metafase da MO del paziente 3 con sonde BAC RP11-113C10 (R) + RP11-372C15 (G)

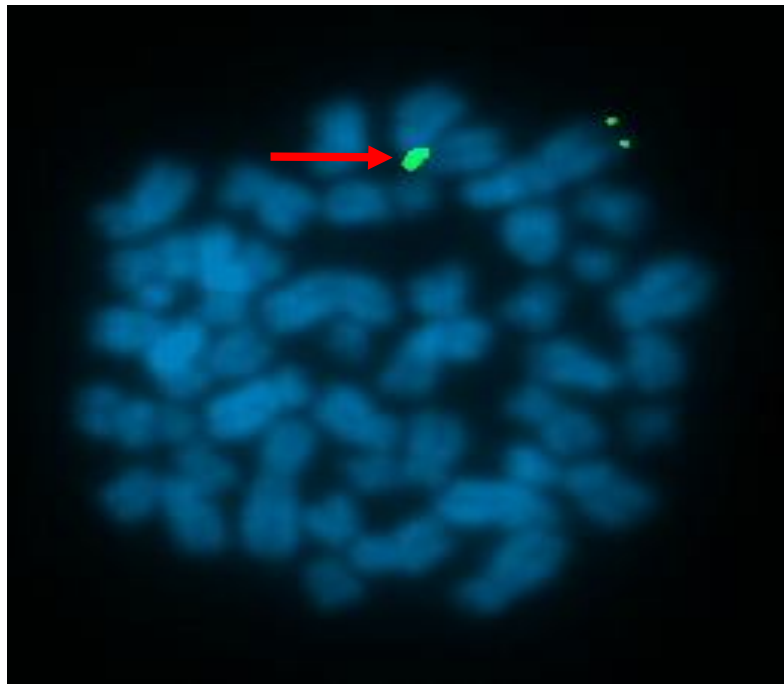


Fig. 5.2.2 FISH su metafase da MO del paziente 3 con sonda BAC RP11-690E2

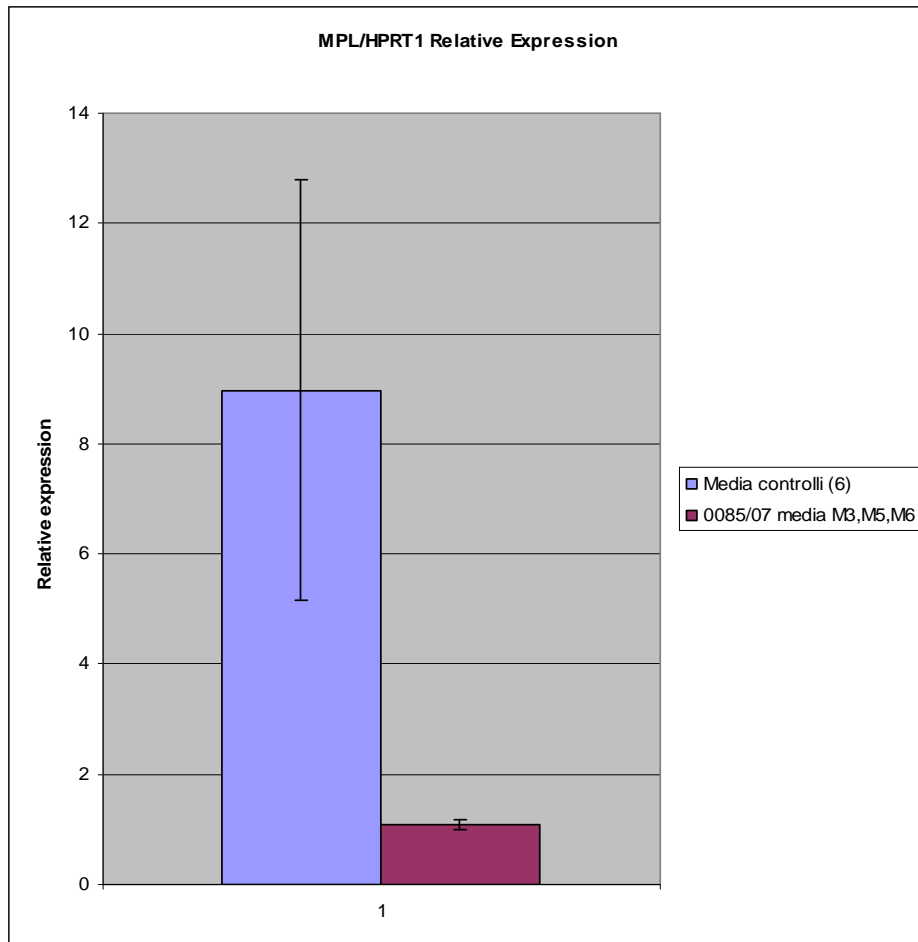


Fig. 5.2.3 Profilo di Real-time PCR di espressione su MO del paziente 3

PAZIENTE 4

Nel Giugno del 2009 è pervenuta alla nostra attenzione una paziente, nata nel Giugno 1972, affetta da Sindrome di Paris-Trousseau. Tale sindrome è caratterizzata da una grave forma di piastrinopenia e delezione interstiziale delle braccia lunghe di un cromosoma numero 11. In questa regione deleta risiede il gene *FLI1* la cui perdita è associata alle condizioni ematologiche riscontrate sempre nei soggetti affetti.

Nella paziente il cariotipo segnalato era il seguente:

45,XX,der(2),-3,der(11)

a cui erano associate le seguenti regioni di monosomia:

2q37 → 2qter

3p14 → 3q13

11q25 → 11qter

Tale risultato, sviluppato presso la Clinica Medica di Pavia, non chiarisce completamente le manifestazioni cliniche del soggetto, in quanto la regione terminale del cromosoma 11 deleta, seppur molto vicina, non comprende la banda 11q24.3 in cui il gene *FLI1* è mappato che quindi risulterebbe essere presente in duplice copia.

Nel Giugno 2009 viene effettuata, presso il nostro laboratorio un'analisi di citogenetica convenzionale su un prelievo di SP. Il risultato è stato il seguente: 45,XX,der(2)t(2;3)(q31;p12),-3,der(11)t(3;11)(q21;q25)/46,XX (Fig. 5.2.4). Tale indagine ha meglio specificato il cariotipo, ha chiarito la natura delle traslocazioni avvenute ma non ha permesso di postulare la delezione di *FLI1*, da noi attesa.

Anche su questo paziente è stato eseguito un esperimento di a-CGH utilizzando la piattaforma Agilent 244K. Tale analisi, effettuata su DNA estratto da un prelievo di MO, ha permesso di definire in maniera precisa gli sbilanciamenti presenti con i rispettivi punti di rottura. L'esperimento ha mostrato le seguenti regioni di monosomia (Fig. 5.2.5):

- monosomia di parte del braccio lungo di un cromosoma 2 da 2q36.1 a 2qter (221960583-242690037)

- monosomia di parte del braccio corto di un cromosoma 3 da 3p12.3 a 3p11 (77438852-90391757)
- monosomia di parte del braccio lungo di un cromosoma 11 da 11q14.3 a 11qter (91175044-134432324)

Il cariotipo è, quindi, il seguente:

45,XX,der(2)t(2;3)(q36.1;p12.3),-

3,der(11)t(3;11)(q11.2;q14.3)/46,XX.

Per confermare i risultati di a-CGH sono state allestite le FISH con le seguenti sonde:

- RP11-1152N24 (2q36.1) + CTC-774G23 (3p12.3), dual color, che sono localizzate all'interno delle regioni di delezione sul braccio lungo del cromosoma 2 e sul braccio corto del cromosoma 3
- RP11-744N12 (11q24.3) che riconosce il gene *FLI1*

I risultati sono stati i seguenti:

- le sonde RP11-1152N24 e CTC-774G23 mostrano la presenza di un segnale di fusione con dimensioni ridotte solo sul cromosoma derivativo 2 (Fig. 5.2.6)
- la sonda RP11-744N12 mostra l'assenza del segnale sul cromosoma der(11) in circa il 64% dei nuclei analizzati (Fig. 5.2.7)

Per chiarire in maniera definitiva il complesso riarrangiamento

presente nella maggior parte delle cellule della paziente è stato messo a punto un esperimento di Multipainting (Fig. 5.2.8). Il risultato ottenuto ha confermato la traslocazione di parte del cromosoma 3 sulle braccia lunghe di un nn 2 e 11 e la parziale monosomia della regione terminale delle braccia lunghe di un nn 2 e 11.

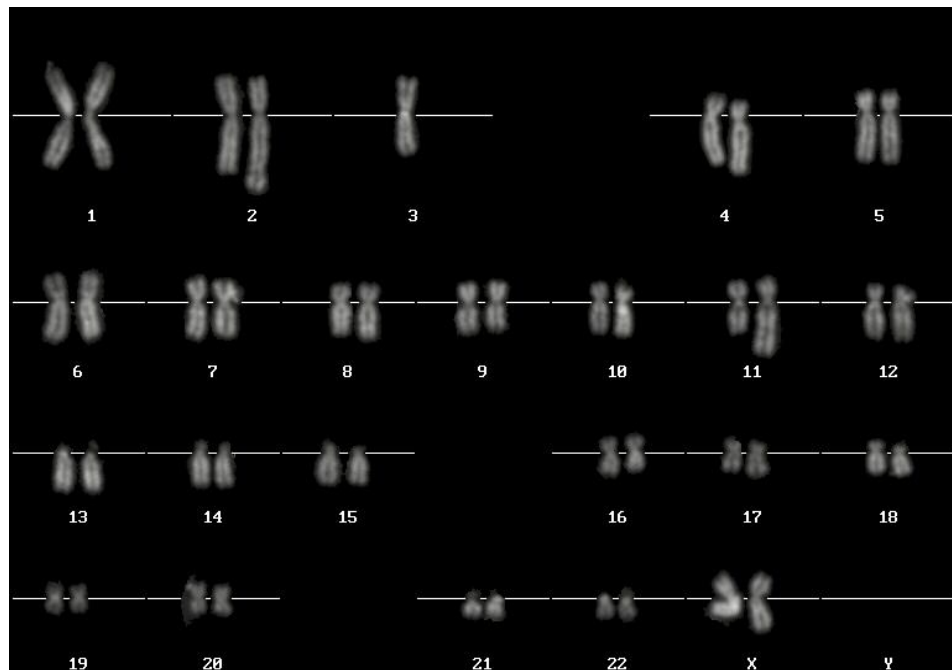


Fig. 5.2.4. Cariotipo da metafase su MO della paziente 4:
45,XX,der(2)t(2;3)(q31;p12),-3,der(11)t(3;11)(q21;q25)/46,XX

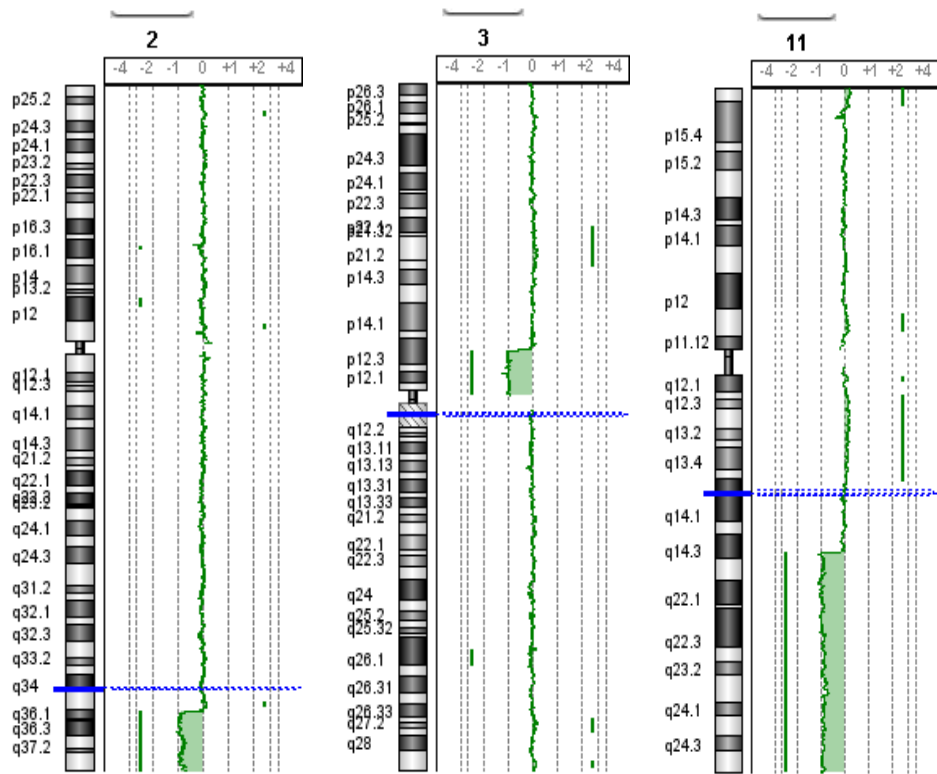


Fig. 5.2.5 Profilo di a-CGH di un cromosoma 2, 3 e 11 della paziente 4

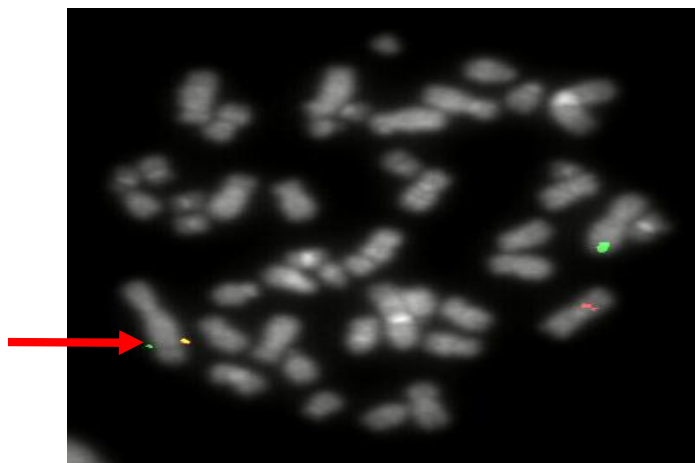


Fig. 5.2.6 FISH su metafase da MO della paziente 4 con sonde BAC CTC-774G23 (R) + RP11-1152N24 (G)

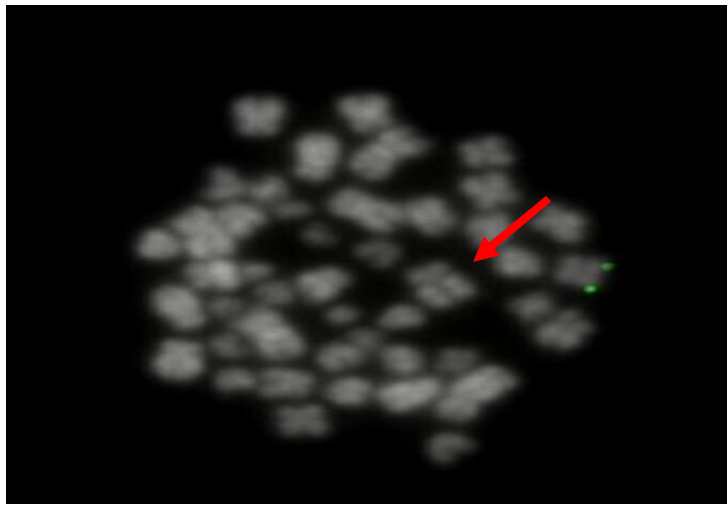


Fig. 5.2.7 FISH su metafase da MO della paziente 4 con sonda BAC RP11-744N12

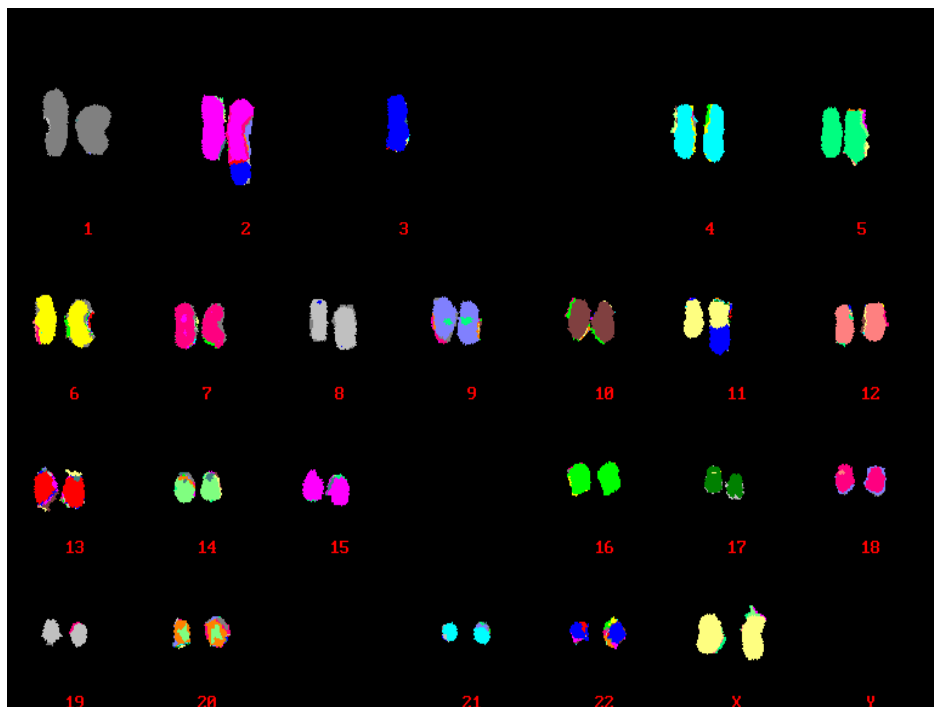


Fig. 5.2.8 Multipainting su metafase da MO della paziente 4

6.DISCUSSIONE

I quattro pazienti presentati in questa tesi dimostrano che le anomalie cromosomiche strutturali sia costituzionali che acquisite possono portare ad una trombocitopenia/anemia aplastica attraverso un effetto genico in assenza di un quadro mielodisplastico.

Infatti nel **paziente 1** l'analisi cromosomica aveva evidenziato la presenza di un cromosoma 21 anomalo nelle cellule del sangue, del midollo e della cute in tutte le metafasi analizzate: quindi si è dimostrato che si tratta di un'anomalia costituzionale.

In seguito ai risultati di FISH ottenuti con l'utilizzo di sonde informative è stato possibile definire in modo esauriente come è costituito il cromosoma 21 anomalo, der(21). L'unica sonda usata che dà segnale nella localizzazione normale sul der(21) è la CTD-2349F18: questo indica che il promotore e il primo esone di *RUNX1* non sono coinvolti nell'evento di inversione. Di risultato diverso sono, invece, le ibridazioni effettuate con le sonde RP11-468N22, WI2-542L2 e WI2-847D7: tutte e tre, infatti, mostrano un unico segnale posto non più sulle braccia lunghe del der(21), bensì sulle braccia corte dello stesso. Tale risultato permette di ipotizzare che il primo evento di rottura avvenga nella regione posta tra il centromero e i satelliti, come dimostrato anche dalla tecnica di colorazione NOR.

Di particolare rilevanza sono, poi, i risultati delle FISH con le sonde CTD-2235K24 e WI2-605D9: i loro segnali, infatti, sono presenti sia sulle braccia corte che sulle braccia lunghe del der(21), permettendo di dedurre che il secondo evento di rottura sia avvenuto all'interno della regione riconosciuta da entrambe le sonde, ovvero tra gli esoni 2 e 5 di *RUNX1*.

L'a-CGH permette di evidenziare come, oltre all'inversione (non rilevabile in un esperimento di array perchè non comporta perdita o acquisto di materiale cromosomico), sia avvenuto anche un fenomeno di duplicazione a carico degli esoni 2-4 di *RUNX1*, poi confermata con l'utilizzo di una sonda fosmidica informativa.

Il cromosoma anomalo presenta anche una grossa regione di delezione in 21q22.3 delle dimensioni di circa 2,35 Mb, evidenziata prima per a-CGH e confermata poi per FISH con la sonda RP11-88N2.

Un altro dato importante che permette di chiarire i punti di rottura dell'inversione è stato ottenuto mediante FISH con l'unica sonda informativa disponibile che mappa sul braccio corto del cromosoma 21: il risultato evidenzia che un punto di rottura è avvenuto tra la sonda CTD-2532E17 e la regione dei NOR e l'altro sul braccio lungo tra il 4° e il 5° esone di *RUNX1*, mentre le sequenze subtelomeriche permangono nella loro posizione originale. Quindi si è riusciti a definire esattamente la natura del der(21): 46,XX,der inv dup del (21), con inversione con punti di rottura p11.2 e q22.1, delezione in 21q22.3 e duplicazione all'interno della banda q22.1.

I risultati di real-time PCR per l'analisi dell'espressione del gene *RUNX1* dimostrano una riduzione apprezzabile della sua espressione.

L'anomalia cromosomica strutturale costituzionale che coinvolge il cromosoma 21 e in modo specifico il gene *RUNX1* interrompendone la sequenza è comunque da considerarsi la causa principale della piastrinopenia di cui la nostra paziente è affetta.

Nel **paziente 2** è presente una anomalia cromosomica clonale acquisita a carico di un cromosoma 21 nel MO al momento della diagnosi di anemia aplastica grave, e successivamente ha luogo la comparsa di un nuovo clone con una delezione interstiziale delle braccia lunghe di un 13, int del(13)(q?). La FISH con la sonda commerciale *ETO-AML1 (RUNX1)* che ha mostrato sul cromosoma der(21) una riduzione in intensità del segnale relativo al gene *RUNX1* e indicato quindi una sua parziale delezione. Tale delezione è stata poi confermata con la FISH con la sonda CTD-2235K24 che mostrava la completa perdita degli esoni 2-8 di *RUNX1*, mentre la sonda CTD-2349F18 mostrava, con un segnale di intensità minore rispetto al normale, la parziale presenza di parte della sequenza del promotore e del primo esone di *RUNX1*. Si dimostra quindi che è presente una regione di delezione a carico del gene *RUNX1*.

Per meglio chiarire la struttura del der(21) si è deciso di analizzare con esperimenti di FISH dual color le regioni fiancheggianti *RUNX1* con le sonde RP11-88N2, RP11-625E21, RP11-79G23 e RP11-203G22. Le prime due, telomeriche rispetto a *RUNX1*, sono risultate

duplicate ed invertite rispetto alle loro posizioni normali, mentre le altre due, una centromerica e l'altra telomerica rispetto a *RUNX1*, sono risultate in posizione normale.

Quindi sono avvenuti nel MO del paziente due riarrangiamenti indipendenti:

- delezione degli esoni 2-8 di *RUNX1* che spiegano le condizioni ematologiche del paziente, in particolare la quasi completa assenza di megacariociti, e duplicazione invertita delle bande cromosomiche poste tra *RUNX1* e le regioni subtelomeriche (q22.2 e q22.3);
- delezione interstiziale di parte delle braccia lunghe di un cromosoma 13 tra le bande q13.3 e q21.31, comparsa successivamente al clone con il der(21) ed indipendentemente dal primo clone anomalo.

Il monitoraggio del clone con il der(21), presente nel 2004 all'esordio, è stato eseguito mediante FISH con la sonda informativa CTD-2235K24 ed ha evidenziato una consistenza non costante nel tempo: tra il novembre 2004 e il dicembre 2005 il clone si è espanso fino al 50% dei nuclei analizzati, per poi regredire nelle analisi successive.

Nel 2007, quando si è effettuata l'a-CGH su DNA di MO e la FISH su nuclei interfascici mostrava un 9% di nuclei anomali, la delezione degli esoni 2-8 di *RUNX1* non è stata rilevata, mentre la duplicazione terminale è stata evidenziata. Il motivo di ciò è che l'a-CGH in presenza di mosaicismo a basso livello è più sensibile nel

riconoscere le parziali trisomie rispetto alle parziali monosomie. La real-time PCR di espressione, effettuata sul prelievo del 2006 ha mostrato una riduzione significativa dell'espressione relativa di *RUNX1*, rispetto ad un pool di controlli di soggetti sani *age-matched*, mentre la FISH mostrava il 41% di cellule anomale. La real-time PCR ripetuta sul MO del 2008, quando la FISH evidenziava solo il 5% di nuclei anomali, ha dato anche qui risultati di espressione concordanti con la FISH: infatti non è stata evidenziata una riduzione significativa di espressione.

In sostanza è stata dimostrata la delezione degli esoni 2-8 del gene *RUNX1*, con una significativa riduzione dell'espressione del gene stesso. Tale ipo-espressione spiega le condizioni ematologiche del paziente, in particolare la quasi completa assenza di megacariociti.

Nel Marzo del 2007, accanto al clone con il der(21) si è rilevato un secondo clone indipendente con una delezione interstiziale di un cromosoma 13. I risultati di FISH dual color con le sonde informative CTD-2235K24 e RP11-1001I7, specifiche per svelare l'anomalia del 21 e quella del 13, mostrano che al diminuire in percentuale del clone con il der(21), vi è un aumento del clone con il del(13q) che passa dal 5,8% nel marzo 2007 al 32% nel novembre 2008.

All'esordio la diagnosi fatta era di anemia aplastica grave e l'anomalia del 21 spiegava la patologia presente, mentre nel momento in cui si è riscontrato il secondo clone con la delezione del(13)(q13.3-q21.31), che è spesso associato a sindrome mielodisplastica (Look, 2005; Trost et al., 2006) si è sospettata una

reale evoluzione in mielodisplasia.

Esiste letteratura che afferma che in pazienti con MDS il del(13q) è un indice di rischio per l'evoluzione in leucemia (Heerema et al., 2000): è quindi opportuno seguire l'andamento temporale dei due cloni.

Nel **paziente 3** una diagnosi di trombocitopenia congenita amegacariocitica (CAMT, OMIM #604498) è stata posta solo dopo le indagini citogenetiche: la CAMT è una patologia piuttosto rara caratterizzata da riduzione o totale assenza di megacariociti, bassa conta piastrinica, progressiva pancitopenia. I megacariociti dei soggetti affetti risultano totalmente incapaci di rispondere all'azione della trombopoietina (TPO) in quanto portatori in tutti i casi riportati in letteratura di mutazioni in omozigosi o eterozigoti composta del gene *MPL*, localizzato in 1p34, che codifica per il recettore della TPO. Il nostro paziente, però, pur presentando un quadro clinico suggestivo per CAMT e livelli ematici di TPO circolante elevati, non ha nessuna delle mutazioni note nel gene *MPL*.

L'analisi cromosomica ha evidenziato un'inversione paracentrica di un cromosoma numero 1, confermata poi per FISH utilizzando le sonde RP11-90B12 e RP11-113C10. Queste due sonde, fiancheggianti il gene *MPL* locato in 1p34, dimostrano l'integrità del gene stesso e al contempo il suo coinvolgimento nell'inversione, con uno spostamento della sequenza di *MPL* in una regione più prossima al centromero sul cromosoma invertito.

L'a-CGH, ha identificato due delezioni: la prima localizzata in

1p36.23-1p36.32 di 1,65 Mb e la seconda molto piccola in 1p12-cen di 350Kb. Le successive FISH, mediante l'uso di sonde specifiche, hanno completato l'analisi confermando il dato di a-CGH. La real-time PCR per l'analisi di espressione di *MPL* ha dimostrato un'espressione ridotta.

Il caso qui presentato dimostra alcuni punti di assoluta novità in letteratura:

- una malattia come la CAMT, generalmente dovuta a mutazione genica, si può sviluppare come conseguenza di una anomalia cromosomica di struttura clonale, per via di un effetto genico specifico;
- un effetto che si può chiamare “di posizione” può portare all'effetto genico di cui si è detto, anche ad una certa distanza dai siti del riarrangiamento strutturale: anche se nel caso qui presentato non è possibile spiegare nel dettaglio i meccanismi di questo effetto di posizione, appare ancora più difficile immaginare la pura coincidenza del difetto di funzione del gene *MPL*, localizzato sul cromosoma 1, nel midollo con la presenza dell'anomalia strutturale acquisita clonale del cromosoma 1 riscontrata;
- il modello del caso qui presentato ha d'altra parte riscontro in casi in qualche modo simili, come i pazienti 1 e 2 qui riportati, che presentano anomalie strutturali del cromosoma 21 con effetto sul gene *RUNX1* e conseguente insufficienza midollare: si

può quindi trattare di un modello di notevole importanza nella patogenesi di condizioni midollari a significato pre-leucemico.

Nella **paziente 4** era presente una forma di progressiva piastrinopenia con quadro morfologico midollare e piastrinico compatibile con la Sindrome di Paris-Trousseau. Tale forma di piastrinopenia, caratterizzata dal 10-15% di piastrine di dimensioni maggiori a causa della presenza di granuli giganti (“giant granules”), derivati dalla fusione dei granuli α , incapaci di rilasciare il loro contenuto dopo stimolazione con trombina, è causata nei casi descritti in letteratura da una delezione di parte del braccio lungo di un cromosoma 11 (11q23.3-11q24.2) dove è localizzato il gene *FLI1*, codificante per un importante fattore di trascrizione.

L'analisi cromosomica della paziente, che era stata già effettuata presso altro centro, aveva mostrato un cariotipo complesso, che è stato poi definito con tecniche di citogenetica standard e molecolare e con l'a-CGH, con anomalie strutturali acquisite, clonali. Si evidenziava:

- monosomia di parte del braccio lungo di un cromosoma 2 da 2q36.1 a 2qter;
- monosomia di parte del braccio corto di un cromosoma 3 da 3p12.3 a 3p11;
- monosomia di parte del braccio lungo di un cromosoma 11 da 11q14.3 a 11qter.

La FISH sul campione midollare della paziente ha confermato la presenza della traslocazione complessa che coinvolge i cromosomi 2, 3 e 11 e l'utilizzo della sonda BAC RP11-744N12 ha dimostrato la perdita clonale di una copia del gene *FLI1*. Questa anomalia acquisita spiega quindi il fenotipo piastrinico della paziente e la presenza della forma di Paris-Trousseau, che in tutti i casi noti è invece dovuta a delezione costituzionale. Ne consegue l'importanza di monitorare lo sviluppo del clone anomalo nel tempo, in parallelo con il controllo della disfunzione midollare, al momento unilineare e senza implicazioni immediate mielodisplastiche/leucemiche.

Concludendo, al di là della novità scientifica dei casi qui riportati e della loro valenza in relazione alla patogenesi di trombocitopenie e aplasie/ipoplasie midollari, lo studio dei quattro casi riportati in questa tesi permette di introdurre alcuni concetti fondamentali rilevanti per la pratica clinica e una gestione dei pazienti la più corretta possibile:

- è stato dimostrato che anomalie cromosomiche strutturali, costituzionali o acquisite, possono avere un effetto sull'espressione di geni, che è causa di una specifica condizione ematologica, trombocitopenia o anemia aplastica nei casi qui presentati;
- qualora l'anomalia sia clonale (CASI 2, 3 e 4) è importante il suo monitoraggio nel tempo attraverso tecniche rapide e poco costose che permettono di rilevare l'anomalia, perché,

benché non siano note le cause specifiche che in ogni paziente determinano l'insorgenza di MDS o di AML, è certo che la presenza e lo sviluppo di cloni anomali sono importanti per l'evoluzione. Analisi cromosomiche e FISH devono essere la routine in questo monitoraggio.

- accanto a tali analisi di routine, l'a-CGH può risultare fondamentale per la individuazione e la definizione di riarrangiamenti sbilanciati, altrimenti non diagnosticabili: la sua introduzione nel monitoraggio è certamente auspicabile.

7. BIBLIOGRAFIA

Alkhouri N, Ericson S. *Aplastic anemia: review of etiology and treatment.* Hospital Physician 1999: 46-52.

Alter P. B. *Bone marrow failure: a child is not just a small adult (but a adult can have a childhood disease).* Haematology 2005; 1: 96-103.

Bagby GC, Meyers G. *Bone marrow failure as a risk factor for clonal evolution: prospects for leukemia prevention.* Am Society of Hematol 2007: 40-46.

Balduini CL, Iolascon A, Savoia A. *Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy.* Haematologica 2002; 87 (8): 860-880.

Ballmaier M, Germshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K. *C-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.* Blood 2001; 97: 139-146.

Breton-Gorius J, Guichard J, Cherif D, Berger R, Debili N, Vainchenker W, Douay L. *A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet*

α-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. Blood 1995; 85 (7): 1805-1814.

Cohen Jr MM. *Perspectives on RUNX1 genes: an update.* Am J of Med Genet 2009; 149A: 2629-2646.

Drouin A, Favier R, Massè JM, Debili N, Schmitt A, Elbim C, Guichard J, Adam M, Gougerot-Pocidal MA, Cramer EM. *Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome.* Blood 2001; 98 (5): 1382-1391.

Favier R, Jondeau K, Boutard P, Grossfeld P, Reinert P, Jones C, Bertoni F, Cramer EM. *Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases.* Thromb Haemost 2003; 90: 893-897.

Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP. *Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood.* Blood 1991; 77 (11): 2360-2363.

Göhring G, Karow A, Steinemann D, Wilkens L, Lichter P, Zeidler C, Niemeyer C, Welte K, Schlegelberger B. *Chromosomal aberrations in congenital bone marrow failure disorders-an early indicator for leukemogenesis?* Ann Hematol 2007; 86: 733-739.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. *World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting- airlie house, Virginia, November 1997.* J Clinical Oncology 1999; 17 (12): 3835-3849.

Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A. *Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia.* Immunity 2000; 13: 167-177.

Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson RJ, Nachman JB, Reaman GH, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom BC, Gaynon PS, Uckun FM. *Abnormalities of chromosoma bands 13q12 to 13q14 in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* J Clin Oncology 2000; 18 (22): 3837-3844.

Hohifeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD, Daffos F. *Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5,194 fetal blood samplings.* Blood 1994; 84 (6): 1851-1856.

Huang H, Yu M, Akie TE, Moran TB, Woo AJ, Tu N, Waldon Z, Lin YY, Steen H, Cantor AB. *Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development.*

Mol Cell Biology 2009; 29 (5): 4103-4115.

Ihara K, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good AR, Hara T. *Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.* P Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3132-3136.

Look AT. *Molecular pathogenesis of MDS.* Hematology 2005; 156-160.

Kaur G, Jalagudugula G, Mao G, Rao AK. *RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-lipoxygenase gene (ALOX12): studies in human RUNX1 haplodeficiency.* Blood 2010; 115 (15): 3128-3135.

Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Balley MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC. *Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin.* Nature 1994; 369: 568-571.

Kaushansky K. *Mpl and the hematopoietic stem cell.* Leukemia 2002; 16: 738-739.

Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. *Hematopoietic*

stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. Proc. Nat. Acad Sci. USA 1998; 95: 1195-1200.

Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. *Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome.* Am J Hum Genet 2007; 80 (2): 232-240

Mignotte V, Vigon I, Boucher de Crèvecœur E, Romèò PH, Lemarchandel V, Chrétien S. *Structure and trascription of the human c-mpl gene (MPL).* Genomics 1994; 20 (1): 5-12.

Montanè E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Puig R, García N, Laporte JR. *Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study.* Haematologica 2008; 93 (4): 518-523.

Osato M. *Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX1 leukemia.* Oncogene 2004; 23 (24): 4284-4296.

Penny LA, Dell'Aquila M, Jones MC, Bergoffen J, Cunniff C, Fryns JP, Grace E, Graham JM Jr, Kousseff B, Mattina T. *Clinical and molecular characterization of patients with distal 11q deletions.*

Am J Hum Genet 1995; 56 (3): 676-683.

Satoh Y, Matsumura I, Tnaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y. *AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells.* J Biol Chemistry 2008; 283 (44): 30045-30056.

Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL. *Role of c-mpl in early hematopoiesis.* Blood 1998; 92 (1): 4-10.

Trost D, Hildebrandt B, Beier M, Müller N, Germing U, Royer-Pokora B. *Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.* Cancer Genet and Cytogenet 2006; 165: 51-63.

Uhrynowska M, Maslanka K, Zupanska B. *Neonatal thrombocytopenia: incidence, serological and clinical observations.* Am J Perinatol 1997; 14 (7): 415-418.

Van Den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Peters M, Faulkner LB, De Haas M, Von Dem Borne AEGK. *Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.* Br J Haematol 2000; 110: 441-

448.

Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, Bing DH.

Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. Blood 1995; 85 (9): 2471-2477.

Young NS, Kaufman DW. *The epidemiology of acquired aplastic anemia.* Haematologica 2008; 93 (4): 489-492.

Zuffardi O, Bonaglia M, Ciccone R, Giorda R. *Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements??* Clin Genet 2009; 75: 505-513.

