

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE CELLULARI E MOLECOLARI

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: Vet/08 Clinica Medica Veterinaria

***IL CANE COME MODELLO ANIMALE SPONTANEO DI PATOLOGIE
NEOPLASTICHE DELL'UOMO: GENE ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED
(ATM) NELLA PREDISPOSIZIONE AL CANCRO ED IMPORTANZA DEI
RIARRANGIMANTI GENICI DEI GENI Ig/TCR PER LA DIAGNOSI E
PROGNOSI DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE***

Presentata da: Dott. Fabio Gentilini

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Lanfranco Masotti

Chair.ma Prof. Monica Forni

Esame finale anno 2009

Sommario

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1 –RUOLO DI ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (<i>ATM</i>) NELLA PREDISPOSIZIONE AL CANCRO.....	8
1.1 PREDISPOSIZIONE GENETICA DELLE NEOPLASIE	8
1.2 FUNZIONI BIOLOGICHE DI <i>ATM</i>	9
1.2.1 Introduzione.....	9
1.2.2 L'intervento dell' <i>ATM</i> nell'individuazione e riparazione del danno cellulare.....	9
1.3 <i>ATM</i> E CANCRO	14
1.3.1 La sindrome ataxia-telangiectasia nell'uomo	14
1.3.2 Mutazioni sul gene <i>ATM</i> nei pazienti A-T e i gruppi di complementazione.....	15
1.3.3 <i>ATM</i> e predisposizione al cancro	16
1.3.4 <i>ATM</i> e cancro al seno	16
1.3.5 Tipi e localizzazione delle mutazioni nei portatori eterozigoti.....	17
1.3.6 Splicing mutation nel gene <i>ATM</i>	19
1.3.7 Correlazioni tra <i>ATM</i> e neoplasie linfoidi	20
1.4 IL CANE COME MODELLO DI PREDISPOSIZIONE AL CANCRO	25
1.5 STRUTTURA ED OBIETTIVI DELLO STUDIO	27
1.6 STUDIO DEL TRASCritto E DELLE SEQUENZE CODIFICANTI DI <i>ATM</i>	28
1.7.1 Materiali & Metodi	35
1.8 CONCLUSIONI.....	49
1.9 BIBLIOGRAFIA.....	49
CAPITOLO 2 – IMPORTANZA DEI RIARRAGIAMENTI GENICI Ig/TCR NELLA DIAGNOSI E PROGnosi DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE NEL CANE.....	54
2.1 GENETICA DELLE IMMUNOGLOBULINE	54
2.1.1 Introduzione.....	54
2.1.2 Struttura molecolare delle Ig e del TCR	54
2.1.2.1 Immunoglobuline (Ig).....	54
2.1.2.2 TCR.....	56
2.1.3 Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR	58
2.1.3.1 Immunoglobuline.....	59
2.1.3.2 TCR.....	60
2.1.4 La diversità immunitaria.....	61
2.1.4.1 Ricombinazione somatica (Riarrangiamento V(D)J)	61
2.1.4.2 Diversità combinatoria.....	64
2.1.4.3 Diversità giunzionale.....	65

2.1.4.3 Diversità somatica (Maturazione dell'affinità).....	69
2.2 DIAGNOSI E PROGnosi MOLECOLARI DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE	71
2.2.1 Introduzione.....	71
2.2.2 Utilizzo delle tecniche molecolari nella diagnosi delle neoplasie linfoproliferative	71
2.2.3 Ricerca della clonalità.....	72
2.2.4. Traslocazioni cromosomiche.....	73
2.2.5 Malattia Residua Minima (MRM).....	76
2.3 LA PCR NELLA DIAGNOSI E NEL MONITORAGGIO DELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE..	77
2.3.1 Introduzione.....	77
2.3.2 Amplificazione dei riarrangiamenti genetici dei recettori antigene-specifici tramite PCR.....	79
2.3.3 Limiti della PCR nella valutazione della clonalità e della MRM.....	83
2.3.4 I riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine	84
2.3.5 Identificazione dei primer consenso per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi B canine	85
2.3.6 Identificazione dei primer per l'amplificazione genica del TCR.....	86
2.3.7 Sensibilità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine.....	87
2.3.8 Specificità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle malattie linfoproliferative canine.....	90
2.3.9 Determinazione della linea di origine delle neoplasie linfoidi mediante scoperta dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici.....	91
2.4 STRUTTURA ED OBIETTIVI DEL PROGETTO.....	93
2.4.1 Diagnosi delle malattie linfoproliferative nella specie canina.....	93
2.4.2 Prognosi mediante valutazione della malattia residua minima delle malattie linfoproliferative della specie canina	104
NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE.....	133

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni la medicina traslazionale che si avvale dell'oncologia comparata ha fornito un impulso notevole alla ricerca biomedica sul cancro. La ricerca integrata utilizza modelli spontanei di neoplasie negli animali domestici ed in particolare negli animali da compagnia come strumento efficace per acquisire nuove informazioni sulla biologia delle neoplasie, per verificare nuove scoperte derivanti dall'oncologia sperimentale in modelli in vivo e per trasferire rapidamente opzioni terapeutiche innovative dallo studio pre-clinico alla sperimentazione clinica sull'uomo.

I motivi di tale rinnovato interesse per l'oncologia comparata sono molteplici. Da un punto di vista epidemiologico, l'incidenza del cancro negli animali domestici è incrementata nelle ultime decadi parallelamente all'incremento osservato nella specie umana. Tale incremento è, almeno in parte, correlato all'incremento dell'attesa di vita degli animali da compagnia conseguente al miglioramento dell'alimentazione nonché all'ampia diffusione e alle innovazioni delle cure veterinarie.

Contestualmente gli animali da compagnia condividono i medesimi ambienti dell'uomo e, come i loro padroni, sono esposti agli stessi contaminanti ambientali.

In molti casi le caratteristiche istologiche delle neoplasie nei *pet* sono sovrapponibili alle rispettive neoplasie umane. Questo è vero ad esempio per i melanomi, i linfomi non-Hodgkin, le leucemie, gli osteosarcomi, i sarcomi dei tessuti molli, i carcinomi della prostata, i carcinomi mammari e della vescica. Anche a livello molecolare, sebbene gli studi di oncologia comparata in questo settore siano ancora limitati, microarray tissutali evidenziano i medesimi pattern di espressione di neoplasie quali gli osteosarcomi. Come le neoplasie umane e diversamente dai modelli sperimentali nei roditori da laboratorio, la biologia delle neoplasie negli animali da compagnia presenta le medesime complessità: il microambiente tumorale è estremamente complesso ed eterogeneo, le cellule neoplastiche interagiscono con un sistema immunitario competente ed acquisiscono rapidamente farmaco resistenza così come le mutazioni somatiche che guidano l'evoluzione neoplastica verso fenotipi più aggressivi e ad elevata capacità di meta statizzazione sono le medesime.

Le informazioni molecolari sulla cancerogenesi negli animali da compagnia sono state rese possibili dal completamento del sequenziamento del genoma canino e dal notevole e rapido incremento delle coperture dei genomi degli altri animali domestici. La variabilità genetica inter-razziale nel cane è di gran lunga maggiore di quella riscontrata nei ceppi di roditori da laboratorio e paragonabile a quella osservata in popolazioni complesse nella specie umana. Di contro, la maggiore omogeneità genetica all'interno delle razze si presta allo studio dell'interazione tra geni e ambiente.

I vantaggi dei modelli spontanei di neoplasie dell'uomo includono anche molti aspetti concernenti la terapia. Solitamente i proprietari degli animali sono fortemente motivati a trattare i propri animali con approcci sperimentali che meglio rispondono all'esigenza di garantire il benessere oltre che di curare la neoplasia. Anche gli aspetti normativi che riguardano la sperimentazione di nuove molecole sono molto meno stringenti di quanto non accada per le sperimentazioni cliniche umane. Contestualmente i dati acquisiti su sperimentazioni animali entrano nei dossier che le industrie farmaceutiche devono comunque produrre per richiedere lo status di "nuovo farmaco sperimentale" (IND). Ancora, sebbene da un punto di vista anatomico e funzionale gli animali da compagnia siano molto simili all'uomo, il comportamento biologico delle neoplasie è estremamente accelerato e gli indicatori di efficacia di farmaci sperimentali possono essere misurati ed acquisiti in tempi molto più ridotti che non nelle sperimentazioni umane. I più rilevanti esempi di farmaci innovativi che hanno enormi potenzialità di essere traslati alla medicina umana dopo essere stati sperimentati con successo nella cura delle neoplasie sono rappresentati dal vaccino anti-melanoma e i farmaci inibitori tirosina-chinasici anti KIT utilizzati per il trattamento del mastocitoma canino e potenzialmente efficaci per il trattamento dei sarcomi GIST con mutazioni c-kit nell'uomo.

Riportiamo integralmente quello che può essere considerato il manifesto della medicina traslazionale e dell'importanza dell'oncologia comparata pubblicato recentemente su Nature Medicine Cancer:

"Naturally occurring cancers in pet dogs and humans share many features, including histological appearance, tumour genetics, molecular targets, biological behaviour and response to conventional therapies. Studying dogs with cancer is likely to provide a valuable perspective that is distinct from that generated by the study of human or rodent cancers alone. The value of this opportunity has been

increasingly recognized in the field of cancer research for the identification of cancer-associated genes, the study of environmental risk factors, understanding tumour biology and progression, and, perhaps most importantly, the evaluation and development of novel cancer therapeutics".(Paoloni e Khanna, Nature reviews, Cancer 2008).

La presente tesi di Dottorato raccoglie i risultati delle ricerche svolte negli ultimi anni in stretta collaborazione con il laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare (BCM) del DIMORFIPA che da anni si occupa di modelli animali di patologie umane.

La tesi si articola in 2 capitoli. Nel primo capitolo sono espone le ricerche condotte per valutare il ruolo delle mutazioni germinali della proteina Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) in una razza canina (razza boxer), che manifesta una evidente, e ben documentata, predisposizione all'insorgenza di neoplasie con particolare riguardo al linfoma, al mastocitoma e alle neoplasie mammarie.

Le mutazioni germinali del locus *ATM* sono studiate da molto tempo nell'uomo. Nel corso del tempo si sono accumulate numerose evidenze scientifiche sul probabile ruolo di tali mutazioni nel predisporre all'insorgenza di alcune neoplasie tra cui la malattie linfoproliferative e le neoplasie mammarie.

Recentemente, tuttavia, alcuni studi non hanno confermato tale associazione (Dombernowsky et al., 2008; Mao et al., 2008). I motivi di tale incertezza possono essere diversi: in primo luogo il cancro, (con alcune infrequenti eccezioni) è una patologia polifattoriale dove il background genetico può giocare un ruolo importante ma dove i fattori ambientali hanno un peso prevalente; in secondo luogo il numero estremamente elevato di tipologie differenti di mutazioni e di differenti ricadute funzionali sulla proteina ATM può complicare notevolmente l'interpretazione dell'effetto di ciascuna; infine, la variabilità genetica nella specie umana rappresenta un limite importante di tutti gli studi di genetica di popolazione tant'è che l'interesse di molti genetisti è rivolto a popolazioni caratterizzate da ridotta variabilità genetica conseguente a fattori sociologici o di isolamento geografico (cd *population isolates*).

Le moderne razze canine si sono originate ed evolute in tempi che da un punto di vista del genetista sono considerati molto recenti e che possiamo fare risalire all'epoca Vittoriana. La pressione selettiva operata dagli allevatori sulla base di caratteristiche fenotipiche morfologiche, funzionali e attitudinali è

avvenuta con ampio ricorso agli accoppiamenti tra consanguinei e all'utilizzo di pochi riproduttori fondatori. Conseguentemente, la variabilità fenotipica e genetica tra le diverse razze è estremamente elevata mentre, al contrario, all'interno di ciascuna razza la variabilità genetica è minima tanto che ciascuna razza può essere considerata un *closed gene pools*. Ad esempio, la variabilità genetica tra le razze canine rappresenta il 27% della variabilità totale della specie canina, contro il 5-10% della variabilità tra le popolazioni umane. Ancora, il range medio di *linkage disequilibrium* è pari a $\approx 2\text{Mb}$ nel cane contro circa 0.28 Mb nell'uomo. (Wayne e Ostrander, 2007).

In considerazione di quanto sopra esposto, il cane si configura come un modello efficace ed estremamente vantaggioso anche da un punto di vista economico per lo studio e la mappatura di malattie complesse come la predisposizione al cancro.

Nel secondo capitolo della presente tesi sono raccolti i risultati degli studi finalizzati alla messa a punto di tecniche molecolari per la diagnosi delle malattie linfoproliferative e per il monitoraggio della malattia residua minima nel cane.

Anche in questo caso la notevole omologia tra cane e uomo nella struttura dei loci delle immunoglobuline e del T cell receptor ha consentito di attingere ampiamente dagli studi condotti nella specie umana con l'obiettivo di definire strategie e tecniche che avessero una ricaduta pratica nella gestione clinica dei cani affetti da linfomi. Tuttavia, poiché il linfoma del cane rappresenta un ottimo modello di studio del linfoma non Hodgkin dell'uomo, la possibilità di utilizzare strumenti molecolari per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti terapeutici rende il modello ancora più attraente per la sperimentazione di nuove molecole. Infine, e come esito non previsto tra i nostri obiettivi, le strategie messe a punto per il cane, proprio in considerazione della sostanziale omologia con la specie umana, si sono rivelate potenzialmente in grado di applicazione anche alla medicina umana in termini di analoga accuratezza ma con minor costo rispetto alle tecniche attualmente utilizzate.

CAPITOLO 1 –RUOLO DI ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (*ATM*) NELLA PREDISPOSIZIONE AL CANCRO

1.1 PREDISPOSIZIONE GENETICA DELLE NEOPLASIE

Il cancro è una patologia eminentemente polifattoriale in cui intervengono numerosi fattori quali esposizione ambientale a tossici, alimentazione, esposizione a raggi UV, fumo di tabacco, virus ed altri che interagiscono con il background genetico individuale. Molte di queste noxe determinano mutazioni somatiche e/o alterazioni epigenetiche che rivestono un ruolo eminente nella cancerogenesi tanto che si può affermare che il cancro è “ una malattia genetica che solo talvolta può essere ereditaria”. Circa il 70% delle neoplasie è considerato sporadico e legato in modo stocastico all’esposizione a fattori di rischio. Nel restante 30% dei casi, le neoplasie sono considerate eredo-familiari. La predisposizione genetica può essere determinata da alleli a bassa penetranza (circa il 20% dei casi) o a penetranza elevata (nel restante 10% dei casi). Esempio paradigmatico è rappresentato dalle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*: complessivamente, nei soggetti *carrier* il rischio cumulativo di sviluppare una neoplasia mammaria entro i 70 anni è del 90% (Nagy et al., 2004; Garber et al.,2005).

Ad oggi sono state descritte oltre 200 sindromi di predisposizione all’insorgenza di neoplasie. La gran parte di queste sindromi sono causate da mutazioni germinali rare o molto rare che, tuttavia, nel complesso rappresentano la causa di una percentuale variabile tra il 5% e il 10% di tutte le neoplasie. Tali mutazioni si verificano a carico di oncogeni, geni oncosoppressori o geni legati alla risposta al danno al DNA. Rientra in quest’ultima categoria la sindrome Ataxia-Telangiectasia (A-T) causata da mutazioni a carico del gene Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*). A-T è una patologia autosomica recessiva a penetranza elevata (100%) e con un’incidenza di circa 1/30000 – 1/100000 individui. Se quindi non vi è alcun dubbio che i soggetti con mutazioni in omozigosi siano predisposti all’insorgenza di neoplasie, il dibattito è aperto sulla possibilità che mutazioni in eterozigosi possano aumentare la suscettibilità al cancro.

1.2 FUNZIONI BIOLOGICHE DI ATM

1.2.1 Introduzione

ATM rappresenta un importante fattore di rilevazione del danno a carico del DNA. Si trova, infatti, al vertice di una serie di *pathways* che coinvolgono diverse proteine e che hanno come finalità la regolazione del ciclo cellulare e la riparazione del danno alla doppia elica.

1.2.2 L'intervento dell'ATM nell'individuazione e riparazione del danno cellulare

Alcuni dei punti più importanti di controllo del ciclo cellulare sono innescati dal danno al DNA.

Uno dei tipi di danno a cui le cellule sono più sensibili è la rottura della doppia elica. Tale tipo di danno è classicamente indotto dalle radiazioni ionizzanti (IR) o, in alternativa, da alcuni farmaci chemioterapici, dai radicali liberi dell'ossigeno e dallo stress meccanico a carico dei cromosomi (Khanna e Jackson, 2001). Le mutazioni del DNA, indipendentemente dall'azione di fattori mutageni, sono eventi piuttosto frequenti durante la replicazione. Il DNA danneggiato è riconosciuto e legato da un complesso di proteine che attivano vie di segnale che possono portare al blocco cellulare e alla riparazione del danno oppure, se questo non è possibile, all'apoptosi.

Il processo di riparazione del danno da rottura del doppio filamento rappresenta un evento molto delicato per la cellula. Una riparazione errata del danno può condurre alla perdita o all'amplificazione di materiale cromosomico o, in alcuni casi, a traslocazioni di ampi segmenti genici. Questi eventi possono condurre allo sviluppo di una neoplasia nel caso in cui, ad esempio, il segmento cromosomico delecto codifichi per un fattore di soppressione tumorale oppure nell'eventualità che venga amplificata una regione che contiene l'informazione per la produzione di una oncoproteina (Khanna e Jackson, 2001).

Il controllo del danno del DNA a doppio filamento coinvolge di solito tre gruppi di proteine; le proteine che, riconoscendo il danno al DNA; agiscono da sensori, le proteine trasduttrici, le quali vengono attivate dai sensori e amplificano il segnale agendo, a loro volta, sul gruppo successivo di proteine; e le proteine effettrici, che eseguono le azioni necessarie alla riparazione del danno (figura 1.2.2.1).

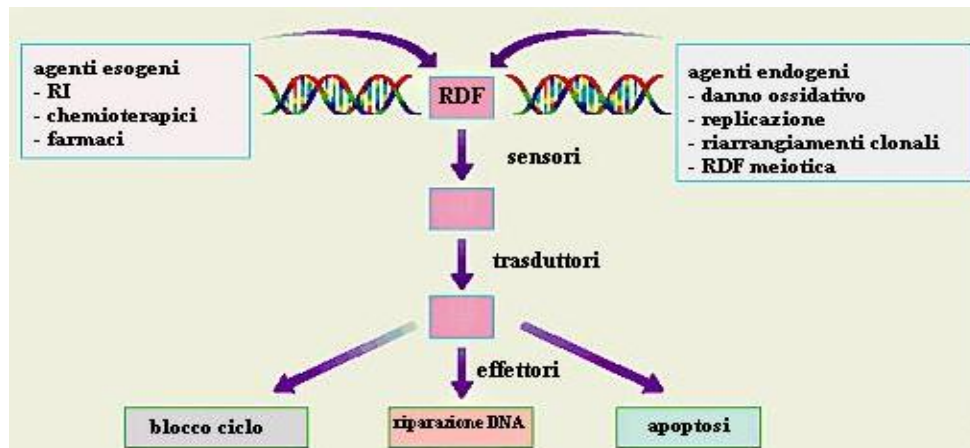


Figura 1.2.2.I: Proteine coinvolte nella riparazione del danno al DNA. Da Khanna e Jackson, 2001 modificato.

Esistono due vie di riparazione al danno della doppia elica, che si attivano in momenti diversi del ciclo. La riparazione per ricombinazione omologa (Homologous recombination repair, HRR), ripara il danno al DNA durante la fine della fase S ed in fase G2 operando sui due cromatidi omologhi; la riparazione per unione delle estremità non omologhe (non-homologous end-joining, NHEJ) interviene, invece, in fase G1 e nei primi momenti della fase S (Lavin et al., 2005).

Nella HRR le estremità del DNA danneggiato vengono prima di tutto tagliate in direzione 5'-3' da nucleasi. La risultante estremità 3' del singolo filamento invade la doppia elica di DNA non danneggiato del cromatide omologo e viene estesa dall'azione di una DNA polimerasi, che copia le informazioni dall'emi-elica del filamento intatto. Contemporaneamente l'altra emielica del filamento di DNA intatto invade a sua volta il segmento danneggiato. Tramite l'azione di una ligasi le estremità dei vari frammenti vengono unite in modo da riformare due doppie eliche intatte (figura 1.2.2.II).

A differenza della HRR, la NHEJ non richiede la presenza di un doppio filamento omologo non danneggiato. In questo processo le due estremità del doppio filamento danneggiato vengono semplicemente legate assieme. Per questo motivo la NHEJ può più frequentemente portare ad errori, come la perdita o introduzione di brevi sequenze di basi (figura 1.2.2.II).

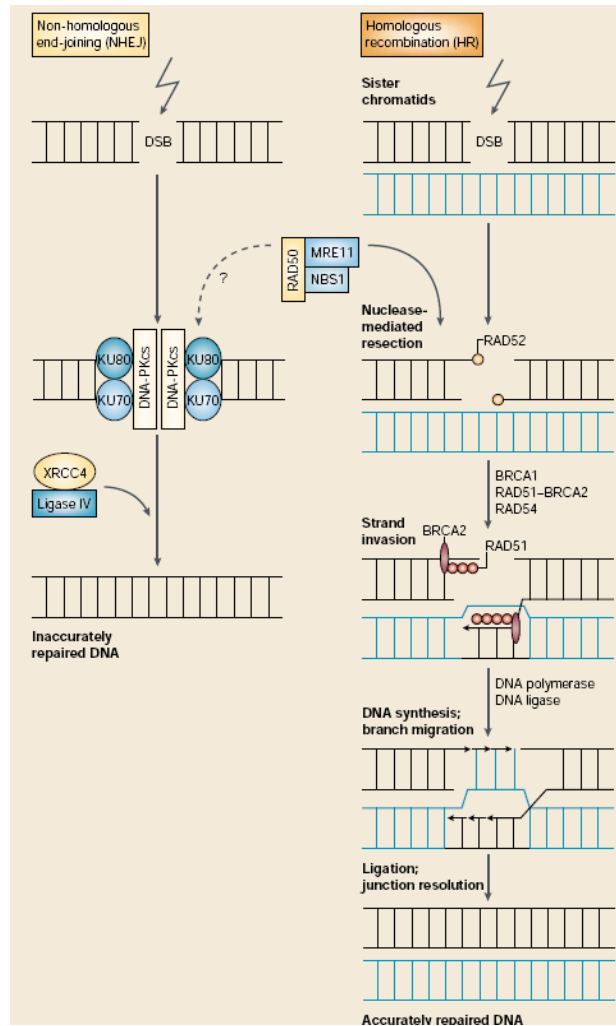


Figura 1.2.2.II: Vie di riparazione del danno al doppio filamento (Shiloh, 2003)

Il blocco del ciclo cellulare e la riparazione del danno vengono operati da proteine effettrici. La loro azione è subordinata ai sensori, che riconoscono il danno al DNA.

Una delle più importanti proteine sensore specifica per la rottura del doppio filamento è ATM.

ATM è una chinasi del peso molecolare di 370 kDa ed è normalmente associata al DNA. Nelle cellule con DNA integro si presenta in forma dimerica inattiva in cui il dominio catalitico di ogni monomero entra in contatto con un sito di fosforilazione dell'altro monomero, rappresentato da una serina in posizione 1981. La rottura del DNA comporta un'alterazione della cromatina che determina l'autofosforilazione intermolecolare del dimero di ATM. Il dominio catalitico di ogni monomero fosforila, cioè, la serina del corrispettivo determinando la scissione del dimero e quindi attivandolo. Il monomero di ATM attivo, agisce poi sui substrati (Bakkenist e Kastan, 2003). Goodarzi e collaboratori

hanno dimostrato che la fosfatasi PP2A modula ed in particolare inibisce l'autofosforilazione di ATM in assenza di danno alla doppia elica (Goodarzi et al., 2004)

E' stato osservato che, anche in seguito ad un lieve danno al DNA con un numero esiguo di punti di rottura della doppia elica, si ha una rapida e imponente autofosforilazione di diverse unità di ATM. Questo ha fatto supporre che la rottura del doppio filamento causi delle modificazioni nel nucleo, le quali sono rilevate da ATM anche a distanza. E' stato dimostrato, inoltre, che ATM non è sensibile soltanto alle rotture del doppio filamento di DNA, ma anche alle alterazioni strutturali della cromatina e dei cromosomi, che determinano una rapida e diffusa fosforilazione della proteina (Bakkenist e Kastan, 2003).

Esiste un'altra proteina sensore che agisce in sinergia con ATM. Tale proteina, chiamata *ATM-related protein* (ATR), opera in modo ridondante con ATM, sebbene sembri essere più specifica di quest'ultima nell'individuare dei danni al DNA causati dai raggi ultravioletti e comunque nel non riconoscere i medesimi substrati di ATM (Khanna e Jackson, 2001 ;Shiloh, 2003) (Figura 1.2.2.III).

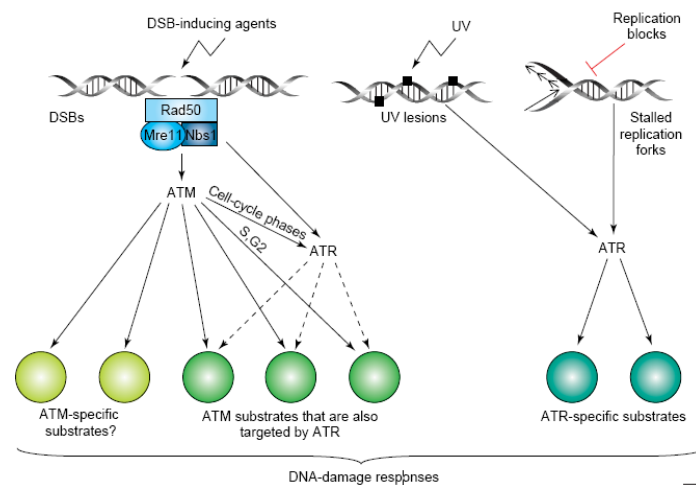


Figura 1.2.2.III: Sia ATM che ATR sono attivate in caso di danno al doppio filamento. In alcune fasi del ciclo cellulare l'attivazione di ATM è, tuttavia a monte di ATR

Una volta resa attiva, ATM fosforila una serie di substrati, che intervengono sul blocco del ciclo cellulare e sulla riparazione del danno.

Le proteine più importanti sulle quali ATM agisce sono rappresentate da p53 e da Chk2 e Chk1, che bloccano il ciclo cellulare. ATM fosforila, inoltre, una serie di altre proteine, come Brca1, il complesso

NBS1-Rad50-Mre11 e c-Abl che, agendo anche sulla proteina Rad51, si attivano per riparare il danno subito dalla doppia elica (Khanna e Jackson, 2001 ; Shiloh et al.,2004) (figura 1.2.2.IV).

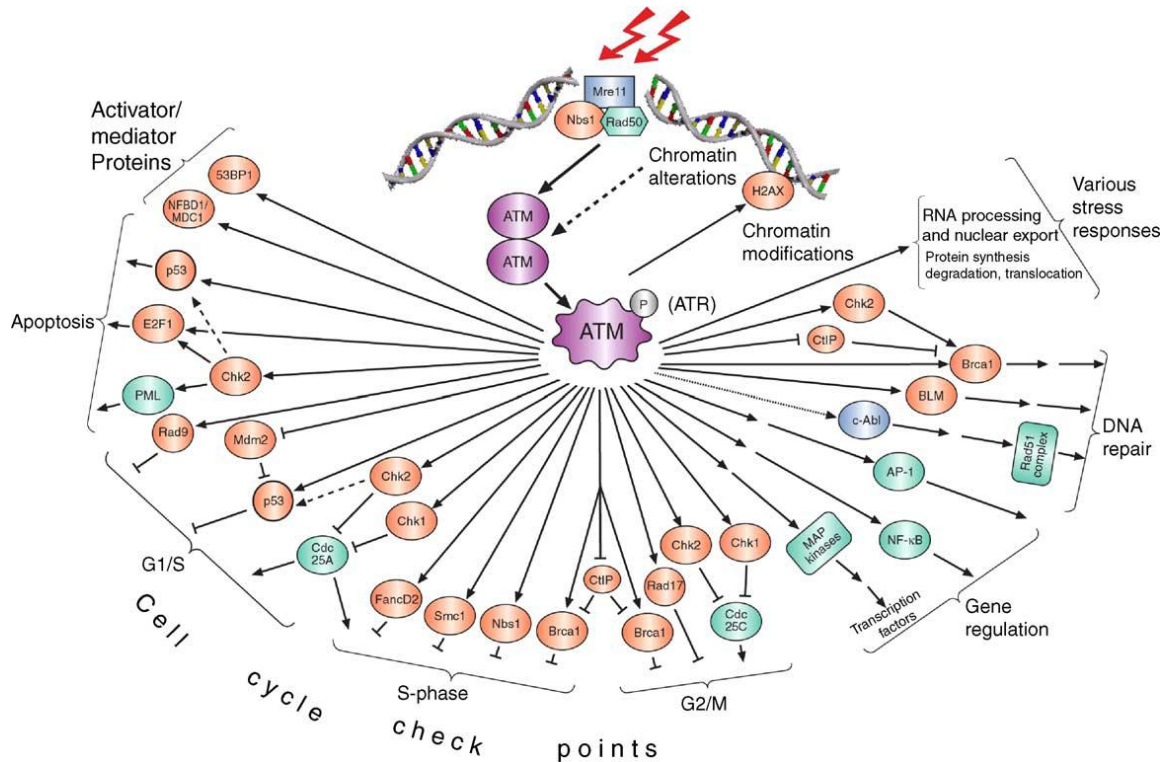


Figura 1.2.2.IV: Ruolo di ATM nella risposta al danno del DNA. (Shiloh et al, 2004).

ATM svolge, inoltre, un ruolo di modulazione dell'apoptosi, fosforilando p53, che, oltre a determinare il blocco del ciclo cellulare, può anche attivare l'apoptosi quando la riparazione del DNA non sia possibile (Banin et al., 1998; Canman et al. 1998).

Recentemente è stata anche individuata una correlazione tra ATM e Bcl2. E' stato infatti ipotizzato che ATM e p53 rappresentino un sistema di sorveglianza per modulare gli effetti della sovraespressione di Bcl2 in alcuni tipi di neoplasia, come il tumore al seno della donna e i carcinomi polmonari e vescicali. In tali condizioni una attenuazione della funzione di ATM avrebbe un effetto permissivo sulla sovraespressione della Bcl2 e promuoverebbe la progressione del tumore (Zhang et al., 2006).

1.3 ATM E CANCRO

1.3.1 La sindrome ataxia-telangiectasia nell'uomo

L'ataxia-telangiectasia (A-T) è una rara malattia ereditaria autosomica recessiva attualmente riscontrata soltanto nell'uomo e che non trova un modello animale nel cane.

L'A-T presenta un complesso fenotipo caratterizzato da una varietà di sintomi e lesioni multiorganiche (figura 1.3.1.I).

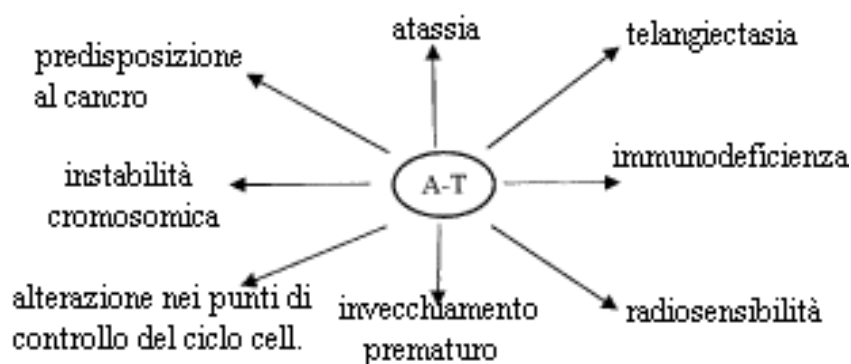


Figura 1.3.1.I: Fenotipo della sindrome A-T. Da Khanna et al., 2001 modificato.

I pazienti A-T sviluppano precocemente atassia cerebellare provocata dalla progressiva degenerazione della corteccia che coinvolge le cellule di Purkinje. La causa di questa degenerazione resta attualmente non chiarita, ma sembra possa essere imputabile ad un'aumentata sensibilità delle cellule al danno ossidativo conseguente all'assenza di ATM (Khanna et al., 2001).

Per frequenza, il secondo sintomo sviluppato in questa malattia è la telangiectasia dei vasi ematici, la cui causa può essere riferita, come per l'ataxia, al danno indotto dai radicali liberi dell'ossigeno.

La sindrome include inoltre immunodeficienza, con frequenti infezioni polmonari, predisposizione alle neoplasie e sensibilità alle radiazioni ionizzanti (Khanna et al., 2001).

Tutti questi sintomi sono correlati alle funzioni che la proteina ATM svolge all'interno della cellula. Come spiegato nel capitolo precedente, infatti, ATM viene attivata dalla rottura del doppio filamento di DNA, che può essere causato da varie noxe, come le radiazioni ionizzanti o lo stress ossidativo. In seguito a tale evento la proteina modula una serie di fattori che influenzano il ciclo cellulare e la

riparazione del danno. Le mutazioni a carico del gene ATM possono, quindi, comportare una mancata o alterata attività della proteina ATM responsabile degli effetti sopra presentati.

Per quanto riguarda l'immunodeficienza, tuttavia, la patogenesi è ancora incerta. Essa compare in un terzo dei pazienti A-T e sembra essere causata da un difetto nella differenziazione dei linfociti B senza alterazioni nella ricombinazione del V(D) J.

L'aberrazione dell'identificazione del danno al DNA nei pazienti A-T può comportare anche instabilità cromosomica e predisposizione al cancro. I soggetti A-T giovani sviluppano precocemente leucemie e linfomi, mentre i pazienti più anziani sono maggiormente predisposti a neoplasie non linfoidi, come tumori al seno o allo stomaco e, occasionalmente, leucemia prolinfocitica a cellule T (Khanna et al., 2001).

1.3.2 Mutazioni sul gene ATM nei pazienti A-T e i gruppi di complementazione

Nei pazienti A-T sono state documentate più di 400 mutazioni distribuite su tutto il gene.

Ad eccezione dei soggetti che discendono da famiglie dove è presente un certo grado di consanguineità, in cui la malattia è causata da mutazione in omozigosi (malattia autosomica recessiva) i pazienti A-T sono molto più frequentemente degli eterozigoti composti (*compound heterozygotes*). Questi soggetti presentano, cioè, due differenti mutazioni con perdita di funzione sui due alleli del gene ATM; entrambe le copie del gene sono cioè mutate, ma ogni copia presenta una mutazione differente.

Più del 70 % di queste mutazioni comportano l'interruzione precoce della proteina (*truncating mutations*), che risulta, pertanto, inattiva (Thompson et al., 2005). Il restante 30 % è rappresentato da mutazioni puntiformi definite *missense*: un gruppo di mutazioni che include sostituzioni di aminoacidi, brevi inserzioni di basi azotate e mutazioni del sito di *splicing*. Le mutazioni *missense* determinano la trascrizione di una proteina completa, ma dal funzionamento nullo o anomalo (Concannon, 2002).

Lo studio della trasmissione del fenotipo A-T ha permesso di identificare per questa malattia quattro gruppi di complementazione, A, C, D ed E (Savitsky et al., 1995).

1.3.3 ATM e predisposizione al cancro

Nell'uomo i soggetti eterozigoti per mutazioni al gene ATM non mostrano il fenotipo A-T e vengono detti portatori eterozigoti.

Questi pazienti, normalmente parenti di persone A-T, non sviluppano la malattia, ma, è stato dimostrato fin dai primi anni 70 che presentano un aumento nell'incidenza di neoplasie. Lo spettro di malignità osservato nei consanguinei dei pazienti A-T è diverso da quello caratteristico dei soggetti A-T (soprattutto leucemie e linfomi) ed è rappresentato principalmente da tumori solidi in sedi diverse (Concannon, 2002)

1.3.4 ATM e cancro al seno

La predisposizione al cancro nei parenti dei pazienti A-T è particolarmente evidente nelle madri di tali soggetti. Queste donne sviluppano neoplasie al seno con un'incidenza di due-tre volte superiore rispetto la popolazione normale (Cavaciuti et al., 2005) ed il rischio è maggiore nei soggetti giovani con età inferiore a 45 anni (Thompson et al., 2005) (Andrieu et al., 2005).

Di tutte le neoplasie a cui sono soggetti i portatori eterozigoti di mutazioni di ATM, infatti, il cancro al seno è la più rappresentata (Thompson et al., 2005).

I tipi di mutazioni individuate nei portatori eterozigoti sono le stesse rappresentate nei pazienti A-T (*truncating* e *missense mutation*).

Tra queste le mutazioni *missense* sembrano essere più rappresentate nelle pazienti che sviluppano cancro al seno, mentre le mutazioni *truncating* risultano meno frequenti (Concannon, 2002). Uno studio più recente ha osservato che qualsiasi mutazione con perdita di funzione di ATM conferisce un rischio sostanziale di insorgenza del tumore al seno (Thompson et al., 2005).

Le mutazioni *truncating* si concentrano in quattro siti della proteina ATM; tre di questi coincidono con importanti domini proteici rappresentati dal sito di legame con la p53 e la BRCA1 in posizione N-terminale, con il dominio di interazione con la β -adapina e infine con il dominio catalitico C-terminale (figura 1.3.4.I).

Un fattore che maggiormente determina lo sviluppo di cancro al seno non sembra essere rappresentato, perciò, dal tipo di mutazione di cui questi pazienti sono portatori, ma dalla localizzazione di tali alterazioni e in particolare delle *truncating mutation* (Cavaciuti et al., 2005)

La causa dell'aumento del rischio di sviluppare cancro al seno in presenza di queste mutazioni potrebbe essere associata all'assenza o all'alterazione di alcuni particolari domini di legame nella proteina ATM troncata (Andrieu et al., 2005).

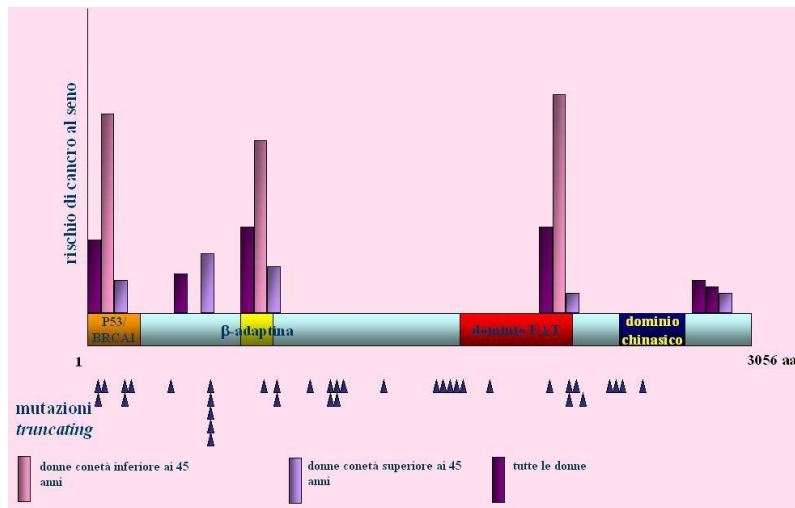


Figura 1.3.4.I: Rischio di sviluppare cancro al seno in relazione alla lunghezza della proteina ATM risultante da mutazioni *truncating*. Le frecce blu indicano la localizzazione delle mutazioni *truncating*. Il grafico indica che c'è una maggiore probabilità di sviluppare neoplasia per le donne giovani portatrici di mutazioni a carico dei domini attivi della proteina. Da Cavaciuti et al., 2005 modificato.

Mentre è chiaro che una proteina troncata codificata da una mutazione *truncating* non può essere funzionante, non è ancora certo come le mutazioni *missense* possano alterare l'attività della proteina.

Sembra, tuttavia, che l'allele portatore della mutazione codifichi per una forma di proteina che agisce da inibitore dominante negativo nei confronti della proteina ATM prodotta dall'allele sano. In questo modo ne modulerebbe l'effetto e impedirebbe l'azione (Cavaciuti et al., 2005).

1.3.5 Tipi e localizzazione delle mutazioni nei portatori eterozigoti

Negli ultimi anni sono state identificate numerosissime mutazioni a carico di ATM e si è tentato di correlare il tipo e la localizzazione al rischio di insorgenza del cancro.

Gatti et al., 1999 e Meyn, 1999 hanno proposto di suddividere la popolazione in due gruppi in base al tipo di mutazione di cui sono portatori. Il primo gruppo comprende i soggetti eterozigoti per *truncating mutation* (trun) su un allele ed un allele wild type (genotipo ATM trun/w) e l'altro gruppo comprende i portatori eterozigoti per *missense mutation* (mis) ed un allele sano (genotipo ATM mis/w).

Le mutazioni *truncating* determinano la formazione di una proteina instabile, presente in piccole quantità nella cellula. I soggetti ATM trun/w possiedono quindi il 50% di ATM wild type ed il 50% di proteina alterata; il loro fenotipo sarà perciò simile a quello delle persone normali. Pazienti omozigoti ATM trun/trun o eterozigoti composti probabilmente svilupperanno la malattia clinica poiché mancano completamente della proteina ATM.

Alcune mutazioni *missense*, codificano per proteine complete e stabili, ma funzionalmente anomale, rappresentate in concentrazioni normali all'interno della cellula. Come descritto precedentemente queste proteine competono probabilmente con la forma non mutata alterandone il funzionamento.

La perdita di funzionalità nei pazienti ATM mis/w sembra essere più grave rispetto a quella sviluppata dai pazienti ATM trun/w. Questo fa ipotizzare che mutazioni *missense* portate in eterozigosi comportino un rischio di sviluppare neoplasie maggiore rispetto agli eterozigoti per mutazioni *truncating* (Khanna, 2000).

Uno studio più recente ha, invece, proposto una classificazione differente delle mutazioni di ATM, che sono state divise in tre gruppi:

- a – sostituzioni di basi azotate che portano alla formazione di codoni di stop con conseguente mancata espressione della proteina da parte dell'allele mutato;
- b – delezioni più o meno grandi che fanno esprimere una proteina priva di attività chinasi;
- c – mutazioni *missense* che portano alla trascrizione di un'ATM con attività chinasi ridotta.

A differenza di quanto sostenuto da Gatti et al., 1999 e da Meyn, 1999, però, non è stata qui osservata una correlazione tra il tipo di mutazione e lo sviluppo di neoplasie. Inoltre una minore incidenza di cancro al seno si è riscontrata nelle pazienti portatrici di mutazioni del gruppo c, in totale contrasto con quanto evidenziato precedentemente (Thompson et al., 2005).

Come per il tipo di mutazione, anche la localizzazione di queste sul gene non sembra essere correlata all'aumento del rischio di sviluppare neoplasie, fatta eccezione per il cancro al seno. Sono state riscontrate, infatti, numerose mutazioni distribuite su tutta la proteina, senza particolare concentrazione di queste in siti specifici (figura 1.3.5.I) (Cavaciuti et al., 2005).

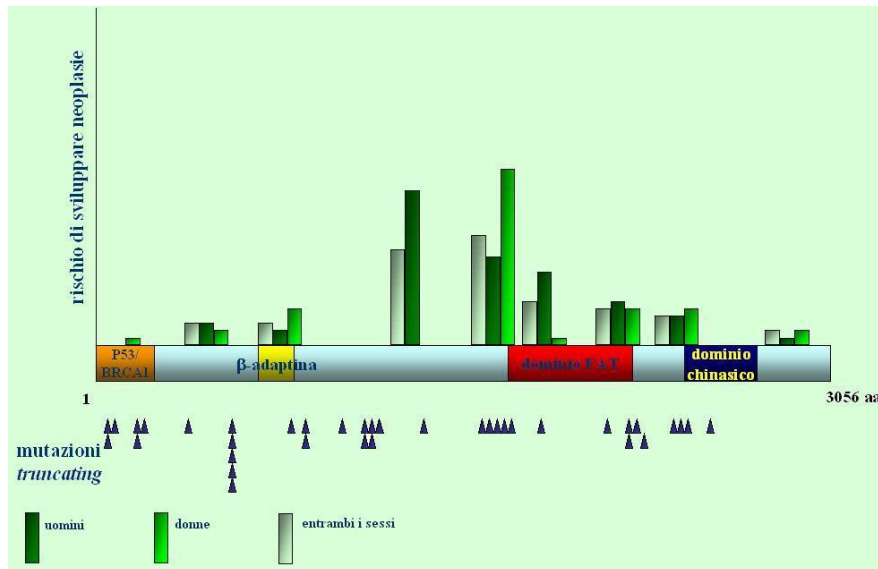


Figura 1.3.5.I: Rischio di sviluppare neoplasie in sedi differenti dal seno in relazione alla lunghezza della proteina ATM risultante da mutazioni *truncating*. Le frecce blu indicano la localizzazione delle mutazioni *truncating*. Da Cavaciuti et al., 2005 modificato.

1.3.6 Splicing mutation nel gene ATM

Lo *splicing* nucleare rappresenta un evento fondamentale nella trascrizione dell'mRNA. Il trascritto primario ottenuto per opera dell'RNA polimerasi inizialmente è costituito sia dagli esoni che dagli introni. Perché l'RNA maturi gli introni, cioè le sequenze non codificanti, devono essere tagliati e i rimanenti esoni ricongiunti in maniera ordinata. Questo processo avviene a livello dei cosiddetti siti di *splicing*, brevi sequenze molto ben conservate negli animali superiori rappresentate da GT e AG e situate rispettivamente all'inizio ed al termine di ogni introne nella giunzione tra introne ed esone.

Mutazioni a carico di questi due punti o la formazioni di siti di *splicing* alternativi possono avere delle ripercussioni sull'espressione della proteina e, nel caso specifico dell'ATM, possono causare la sindrome A-T.

Lo studio del gene ATM nei pazienti A-T nell'uomo hanno permesso di identificare quattro sottotipi di *splicing mutation*.

Le *splicing mutation* classiche (tipo I) determinano la delezione di interi esoni durante il processo di maturazione dell'RNA.

Le *splicing mutation* non classiche tipo II (pseudoesoniche) avvengono all'interno di un introne con la formazioni di una nuova coppia di siti di *splicing* e l'inserzione di uno pseudoesone tra due esoni normali.

Le *splicing mutation* non classiche tipo III (esoniche) comprendono mutazioni che si verificano nella regione codificante, per cui si crea un nuovo sito di *splicing* all'interno di un esone, con la conseguente perdita di parte di esso. Questo tipo di mutazioni possono facilmente essere interpretate come *missense mutation*, ma mentre queste ultime sono associate all'aumentato rischio di sviluppare neoplasie o ad una forma di A-T lieve, le *splicing mutation* normalmente inducono la sindrome nella forma classica.

Infine le *splicing mutation* non classiche tipo IV (introniche) si verificano sul sito di *splicing* intronico e conseguentemente viene riconosciuto un nuovo sito di *splicing* all'interno dell'esone e portano anch'esse ad una sua parziale perdita. Le piccole delezioni di esoni che si hanno nelle mutazioni tipo IV non permettono di esprimere a pieno la malattia e sono associate ad una sua forma più lieve non riconoscibile come fenotipo A-T (Eng et al., 2004).

1.3.7 Correlazioni tra ATM e neoplasie linfoidi

Diversi studi condotti in medicina umana hanno dimostrato che ATM è coinvolta nello sviluppo di alcuni sottotipi di linfomi sporadici e leucemie. Mutazioni *missense* e mutazioni che portano alla perdita di attività di ATM sono correlate alla leucemia prolinfocitica T-cellulare (T-LPL), al linfoma a cellule mantellari (LCM) ed alla leucemia linfocitica cronica B-cellulare (B-LLC) (Gronbæk et al., 2002). Inoltre esistono delle correlazioni tra mutazioni al gene ATM e altri sottotipi di neoplasie linfoidi meno diffusi. Infatti in pazienti A-T sono stati osservati linfomi centroblastici B-cellulari, mentre soggetti con delezioni emizigoti sul locus 11q23 di ATM hanno sviluppato linfomi sporadici diffusi a grandi cellule B (LDGCB), linfomi centrollicolari (LF) e leucemie linfoblastiche acute (LLA). Infine linfomi non-

Hodgkin sono stati correlati a mutazioni *missense* sempre localizzate sul gene ATM (Gronbæk et al., 2002). Non è stata invece riscontrata alcuna mutazione in un gruppo di pazienti portatori di linfoma periferico T-cellulare (LPT).

Questi risultati evidenziano la relazione esistente tra mutazioni di ATM e neoplasie linfoidi, con la restrizione, però, a leucemie e linfomi di tipo B-cellulare. Mentre le neoplasie T-cellulari non sembrano attualmente correlabili con alterazioni a carico di questo gene, con l'eccezione della leucemia prolinfocitica T-cellulare (Gronbæk et al., 2002).

La relazione tra ATM e linfoma è stata particolarmente studiata nel linfoma a cellule mantellari (LCM). Il LCM è un sottotipo specifico di linfoma non-Hodgkin che deriva da cellule B CD5⁺ situate nei follicoli primari o nella zona mantellare dei follicoli secondari. La caratteristica citogenetica dell'LCM è la traslocazione cromosomica t(11;14)(q13;q32), che è considerata cruciale per lo sviluppo della neoplasia (Schaffner et al., 2000; Stilgenbauer et al., 2000).

Questa traslocazione porta ad una giustapposizione del gene della ciclina D1 (CCND1) con gli elementi di controllo trascrizionale del locus della catena pesante delle immunoglobuline con conseguente sovraespressione del gene CCND1. Poiché la ciclina D1 rappresenta una delle proteine chiave che regolano la transizione tra le fasi G1 ed S del ciclo cellulare, la sua sovraespressione potrebbe, pertanto, svolgere un ruolo fondamentale nella patogenesi del LCM.

Studi sperimentali sul condotti nel topo evidenziano, però, che la sovraespressione della ciclina D1 non è sufficiente da sola a determinare l'insorgenza della neoplasia e, quindi, che sono necessari meccanismi addizionali (Schaffner et al., 2000).

In pazienti portatori di LCM sono state infatti evidenziate altre aberrazioni cromosomiche, la più comune delle quali è rappresentata dalla delezione della regione 11q22-23, che corrisponde al locus del gene ATM. Nei pazienti portatori di questa delezione monoallelica sono spesso contemporaneamente presenti delle alterazioni nella sequenza dell'allele mantenuto, che viene perciò inattivato (Schaffner et al., 2000).

Il tipo di mutazioni riscontrate su ATM nei casi di LCM è piuttosto caratteristico e si esprime con una terminazione precoce della proteina, che risulta troncata e mancante del dominio chinasi. In ogni caso tutte le mutazioni individuate nei portatori di LCM determinano l'inattivazione di ATM.

Questi risultati indicano che l'inattivazione dell'ATM rappresenta un evento frequente nell'insorgenza del LCM (Camacho et al., 2002).

Inoltre, il fatto che alterazioni di ATM intervengano con la stessa frequenza sia in forme classiche di LCM che in forme di LCM blastoide e che non siano associate al comportamento clinico della malattia, induce ad ipotizzare che tali alterazioni rappresentino un evento precoce o predisponente in queste neoplasie (Fernández et al., 2005).

1.3.8 Mutazioni somatiche di ATM nei tessuti neoplastici

Le alterazioni sul gene ATM finora descritte sono mutazioni germinali, cioè, presenti in tutte le cellule e tessuti dell'organismo, che l'individuo possiede dalla nascita e che sono perciò ereditabili. La maggior parte degli studi condotti su ATM fanno riferimento a popolazioni selezionate di individui imparentati con pazienti A-T. Per questo motivo le indagini genetiche sono state svolte su campioni di tessuto sano, generalmente sangue, per individuare mutazioni trasmissibili in modo ereditario.

Molto meno studiate sono, invece, le mutazioni somatiche di ATM nei tessuti neoplastici. Questo tipo di mutazioni non si riscontra nelle cellule sane dell'organismo, non è presente dalla nascita e quindi non è trasmissibile alla prole, ma si sviluppa *ex novo* nel tessuto neoplastico ed in alcuni casi può rappresentare la causa della proliferazione tumorale.

Attualmente ricerche di mutazioni somatiche del gene ATM sono state condotte su due tipi tumorali, il cancro al seno della donna e la leucemia prolinfocitica T-cellulare (T-LPL), in quanto maggiormente riscontrate nelle famiglie dei pazienti A-T.

Per quanto riguarda il cancro al seno, uno studio condotto da Vorechovsky et al., 1996 su 38 campioni di tessuto tumorale non selezionati, non ha permesso di rilevare nessuna mutazione somatica. Anche nel DNA ematico di questi stessi pazienti non sono state trovate alterazioni che portassero all'inattivazione della proteina ATM. Uno studio successivo condotto da Feng et al., 2003 su 58 tumori mammari nella donna ha permesso di individuare sedici varianti geniche, tra cui undici varianti *missense* già conosciute, una nuova mutazione non-senso, quattro nuove varianti *missense* e nessuna mutazione di *splicing*. Tutte queste varianti somatiche erano però presenti anche nel DNA germinale. Non rappresentavano perciò una mutazione introdotta *ex novo* nel tessuto tumorale.

Questi risultati hanno fatto ipotizzare che mutazioni germinali in un gene correlato allo sviluppo di neoplasie, come ATM, possano conferire al paziente che ne è portatore un rischio significativo di insorgenza di tumori, ma che in generale le mutazioni somatiche di questi geni siano, invece, infrequenti nel tessuto neoplastico, come è stato provato per BRCA1, un altro gene di soppressione tumorale (Vorechovsky et al., 1996).

Il fatto che soggetti portatori di mutazioni germinali di ATM sviluppino cancro al seno più frequentemente della popolazione normale induce a pensare che tali mutazioni con perdita di funzione della proteina rendano il tessuto mammario sano maggiormente suscettibile di trasformazione neoplastica. Allo stesso tempo, però, l'assenza di mutazioni somatiche nella maggior parte di tumori mammari studiati rende poco probabile che ATM giochi un ruolo diretto e strettamente indispensabile nella progressione neoplastica di questo tipo di tumore (Feng et al., 2003).

I risultati riportati per la leucemia prolinfocitica T-cellulare (T-LPL) sono invece differenti. Questo tipo di patologia è una rara neoplasia linfoide generalmente associata ad una elevata conta nello striscio ematico di linfociti atipici, con un fenotipo "post-timico", a cui si accompagnano linfadenopatia, splenomegalia, lesioni cutanee ed un decorso clinico aggressivo. Studi epidemiologici sottolineano la forte predisposizione dei pazienti A-T a sviluppare leucemie, compresa la T-LPL. Inoltre è stata evidenziata una relazione tra la T-LPL e la sindrome ataxia-telangiectasia (A-T) basata sul fatto che il 10% dei pazienti A-T possiedono un'aberrazione della popolazione linfoide T-cellulare, chiamata proliferazione clonale A-T (ATPC). I linfociti che proliferano nella ATPC presentano diverse similitudini con la T-LPL da un punto di vista morfologico, immunologico, citogenetica e molecolare, sebbene nella ATPC non si osservi linfocitosi o evidenza clinica di malignità. In alcuni casi la ATPC può progredire nella T-LPL e questo fa supporre che la ATPC rappresenti uno stadio preleucemico della T-LPL (Stoppa-Lyonnet et al., 1998).

Essendo evidente che ATM rappresenta un gene di soppressione tumorale per la T-LPL, sono stati condotti diversi studi volti ad individuare la presenza di mutazioni in tale gene, tentando inoltre di discriminare la natura germinale o somatica di queste varianti.

Luo et al., 1998 hanno analizzato una serie di campioni di DNA ottenuti da tessuto neoplastico in pazienti portatori di T-LPL; in circa la metà di tali campioni sono state riscontrate mutazioni. In questo

caso non è stato condotto uno studio comparativo sul DNA germinale, ma, mentre nei pazienti A-T portatori di T-LPL le varianti germinali del gene ATM sono rappresentate soprattutto da mutazioni *truncating*, in questo caso Luo et al. hanno riscontrato soprattutto mutazioni di tipo *missense* localizzate in residui conservati del dominio chinasi, che conducevano a sostituzione di aminoacidi. Questa osservazione fa supporre che tali nuove mutazioni rappresentino varianti somatiche piuttosto che germinali.

Uno studio differente condotto su tessuto neoplastico ha evidenziato la presenza di alterazioni strutturali della proteina ATM in tutti i campioni prelevati da soggetti portatori di T-LPL. Inoltre alcune di queste mutazioni (due variazioni di aminoacidi: L2890V e E2139G) sono state individuate in quattro campioni di tessuto neoplastico, ma non nei campioni degli stessi soggetti in fase di remissione a testimonianza dell'origine somatica (Yuille et al., 1998).

Stoppa-Lyonnet et al., 1998 hanno confermato la natura somatica di differenti mutazioni presenti nel tessuto neoplastico di tre soggetti portatori di T-LPL. Il primo di questi individui era portatore di una delezione *in-frame* sull'esone 46 di ATM; il secondo soggetto possedeva una sostituzione di un aminoacido R2486G, entrambe queste mutazioni erano associate alla mancanza di espressione della proteina; nel terzo paziente era stata individuata una proteina ATM con delezioni a livello di dominio chinasi, di *leucine zipper* e del dominio di legame con c-Abl.

La presenza di mutazioni somatiche del gene ATM è stata osservata, oltre che nella T-LPL, anche in disordini linfoproliferativi B-cellulari; in particolare nella leucemia linfocitica cronica B-cellulare (B-LLC). Alcuni pazienti portatori di B-LLC, infatti, possiedono mutazioni puntiformi nelle cellule tumorali, ma non nelle cellule normali, ad indicare la natura somatica di tali mutazioni. In questi soggetti l'ATM sembra rappresentare il gene di soppressione tumorale la cui inattivazione è responsabile del decorso aggressivo della B-CLL (Schaffner et al., 1999).

1.4 IL CANE COME MODELLO DI PREDISPOSIZIONE AL CANCRO

Nella parte sperimentale di questa tesi è stato condotto uno studio del gene ATM in una popolazione selezionata comprendente soggetti di razza canina boxer. Tale scelta è stata operata perché è noto che tale razza è particolarmente predisposta allo sviluppo di neoplasie (Howard e Nielsen, 1965).

Diversi studi svolti sui cani hanno evidenziato una prevalenza maggiore di neoplasie in soggetti appartenenti a razze pure, piuttosto che nei meticci. Questa osservazione suggerisce che esiste un'influenza genetica nello sviluppo di tumori, e la trasmissibilità di tale predisposizione può essere favorita, nella specie canina, dalle pratiche di allevamento e di sviluppo delle razze operate nel settore zootecnico (Dorn, 1967).

Diverse ricerche svolte sulla popolazione canina indicano che nella razza boxer vi è un'elevata incidenza di neoplasie localizzate in diversi distretti organici. Sono stati riscontrati tumori del tessuto cutaneo, vascolare, endocrino, nervoso, linfoide, testicolare e a livello di cavità orale. In particolare nel boxer, come in tutte le razze brachicefaliche, vi è una incidenza doppia di neoplasie cutanee. fra cui il mastocitoma. Altre neoplasie con incidenza maggiore nella razza boxer sono rappresentate dal chemodectoma, dalle neoplasie linfoidi e dai tumori cerebrali (Howard e Nielsen, 1965).

Inoltre i cani di razza boxer possiedono un'età media di insorgenza della neoplasia minore rispetto ai soggetti di razza differente.

Una delle neoplasie più rappresentate nei boxer è il mastocitoma la cui incidenza è 10 volte maggiore rispetto alle altre razze. Inoltre si riscontrano frequentemente mastocitomi multipli, spesso localizzati in distretti organici non in rapporto tra loro, indicando l'origine multicentrica delle neoformazioni piuttosto che la loro metastatizzazione.

Allo stesso modo anche l'istiocitoma insorge con una frequenza elevata in questa razza canina, mentre tra le neoplasie della cavità orale, gli epulidi sono riscontrati 6 volte più frequentemente nei boxer rispetto gli altri cani (Howard e Nielsen, 1965).

A questi si sommano i tumori del sistema endocrino, come i chemodectomi e i carcinomi tiroidei, le neoplasie primitive cerebrali e i tumori linfoproliferativi, primi fra tutti leucemie e linfomi (Dorn et al., 1970).

Nei soggetti di sesso femminile il cancro mammario è il tipo di neoplasia più rappresentato. Ne influenzano lo sviluppo diversi fattori, come l'età, lo stato funzionale della ghiandola mammaria, la situazione endocrina e la razza del soggetto (Moulton et al., 1970).

In uno studio retrospettivo su una popolazione di cani appartenenti a diverse razze pure e di meticci, infatti, Schneider e collaboratori (1969) hanno individuato una predisposizione di razza specifica allo sviluppo di tumori mammari. In tale ricerca i boxer si pongono ai primi posti per quanto riguarda il rischio di sviluppare cancro alla mammella.

1.5 STRUTTURA ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio si pone l'obiettivo di stabilire il ruolo delle mutazioni germinali del gene *ATM* nella predisposizione all'insorgenza di neoplasie nella specie canina. Le razze canine presentano una omogeneità genetica particolarmente spiccata e conseguente alla spinta selettiva operata sui caratteri fenotipici nel corso del tempo. Da un punto di vista della genetica di popolazione, l'omogeneità rappresenta un indubbio vantaggio per valutare l'influenza che varianti alleliche determinano in particolare su aspetti fenotipici complessi quale la predisposizione all'insorgenza di patologie polifattoriali quali il cancro.

Al contrario, lo studio genetico nel cane è limitato dalla ridotta disponibilità di informazioni disponibili su database pubblici. Sebbene, il sequenziamento completo del genoma canino sia stato completato, e l'assemblaggio attualmente disponibile copra la quasi totalità dello stesso, il confronto con la mole di informazioni disponibili non solo per l'uomo ma anche per molte altre specie animali evidenzia un minor contenuto informativo dei database pubblici. L'annotazione automatica computazionale del genoma canino ha consentito di individuare loci putativi di gran parte dei geni. Tuttavia, questi dati computazionali sono, per forza di cose, incompleti e soprattutto necessitano di evidenza sperimentali dirette. Non a caso, le sequenze di riferimento di geni canini di cui siano disponibili evidenze dirette sono incommensurabilmente più limitate rispetto all'uomo.

Queste premesse sono indispensabili per comprendere l'articolazione del presente studio. La struttura del progetto è stata definita su 2 studi che sono stati condotti contemporaneamente. In primo luogo, il primo obiettivo è stato quello di studiare il definire il trascritto primario di *ATM* comprensivo delle sequenze 5' UTR (leader sequenze) e 3'UTR. Obiettivo primario di questa parte dello studio era di identificare il *transcription start site* e di conseguenza la regione del promotore del gene così come di definire le sequenze codificanti della principale *ORF*. In questa fase del progetto non è invece stata condotta alcuna valutazione sull'espressione di isoforme differenti in diversi contesti tissutali.

Le informazioni sulle sequenze codificanti sono state utilizzate per valutare il significato funzionale dello studio mutazionale condotto a partire da DNA genomico di un congruo numero di soggetti appartenenti alla razza boxer. Studio genomico mutazionale che rappresenta il secondo filone di indagine e di cui verranno esposti in questa sede solo dati preliminari.

1.6 STUDIO DEL TRASCritto E DELLE SEQUENZE CODIFICANTI DI ATM

1.6.1 Indagine preliminare *in silico*

L'indagine *in silico* di ATM canino (*cATM*) è stata condotta utilizzando Database pubblici ed in particolare NCBI ([www.ncbi.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), ed ensembl (www.ensembl.org/dog). Nell'assemblaggio canino 2.0 *cATM* è annotato su una regione del CFA cromosoma 5 sintenica con il cromosoma 11 dell'uomo. Tutte le sequenze di riferimento disponibili al momento dell'analisi *in silico* contenevano annotazioni ottenute mediante calcolo computazionale. In analogia all'uomo erano riportate 2 isoforme principali: Isoforma 1 completa ed isoforma 2 mancante della parte N terminale della proteina. Integrando le informazioni dei database sopra citati e di un ulteriore database, è stato possibile individuare i polimorfismi noti (Tabella). Anche in questo caso, i polimorfismi erano stati annotati sulla base del confronto computazionale automatico ottenuto da WGS dei differenti sequenziamenti completi di cane (1 boxer, 1 doberman pinscher). La quasi totalità dei polimorfismi facevano riferimento a sequenze introniche. In rari casi i polimorfismi erano localizzati su sequenze codificanti, ed in quest'ultimo caso le varianti erano sinonime. Nel complesso, l'analisi *in silico* ha evidenziato 1 solo polimorfismo non sinonimo su ATM.

In ultimo, sono state ottenute le sequenze codificanti e gli esoni predetti anch'essi ottenuti per analisi computazionale automatica. Tutti i dati disponibili su database sono stati quindi utilizzati per la programmazione del software di analisi Seqscape V2.5 (Applied Biosystem).

1.6.2 - Studio del trascritto primario di ATM.

1.6.2.1 – Campioni

Il soggetto utilizzato per lo studio del trascritto primario e del mRNA è un cane meticcio femmina di 11 anni. La cagna è ospitata presso le strutture dipartimentali ed è sottoposta periodicamente a visite ed analisi cliniche. La cartella clinica completa del soggetto è disponibile sui database elettronici del Dipartimento Clinico Veterinaria. Dalla cartella clinica si può evincere che la cagna non ha mai sofferto di patologie neoplastiche.

1.6.2.2 – Pubblicazione relativa contenente Materiali&metodi, risultati e discussione.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Technical Report

Complete sequencing of full-length canine ataxia telangiectasia mutated mRNA and characterization of its putative promoter

Fabio Gentilini^{a,*}, Maria Elena Turba^b, Monica Forni^c, Stefano Cinotti^a^a Veterinary Clinical Department, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano Emilia, Bologna, Italy^b Genefast Srl, 41051 Castelnuovo Rangone, Modena, Italy^c Department of Veterinary Morphophysiology and Animal Production, DIMORFIPA, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano Emilia, Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2008

Received in revised form 21 November 2008

Accepted 1 December 2008

Keywords:

Dogs

ATM

mRNA

Sequence variants

Promoter

ABSTRACT

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein is considered a "caretaker" of the genome integrity and a defective ATM has been correlated with increased cancer risk in human beings. In an effort to explore the reliability of dog as a spontaneous animal model of genetic susceptibility to lymphoid malignancies, we have carried out the complete sequencing of the canine *ATM* mRNA. 5' RACE analysis and sequencing were used to obtain the full-length canine cDNA. The transcription start site was found at CFA5: 27307661 (Dog Genome assembly 2.0, release 49). Two exons were found in the 5'UTR. A putative TATA-less bi-directional promoter region was found in the region 5' upstream of the cap site. The core promoter harbours different conserved regulatory motifs: CREB, CCAAT boxes (NF-binding sites), Sp1, AP-2, GCF, XRE, Ets, Cre and c-Myb.

The major ORF, corresponding to the ortholog human and pig *ATM* isoform 1, has 64 exons and codes a protein of 3056 aa. The homology between dog and human *ATM* at the aa level was 89% identities–93% positives, even higher than the homology between pig and human. When compared with the canine genomic sequences, 3 sequence variants yielding to aa substitution were found.

Canine *ATM* is highly conserved and may represent a candidate gene to evaluate lymphoid malignancies predisposition in dogs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is a nuclear protein kinase which plays a pivotal role in maintaining genome stability (Shiloh, 2003). Double strand breaks induce autophosphorylation at Serine 1981 of inactive ATM dimers generating active monomers which trigger a multitude of downstream events aimed at restoring DNA damage (Shiloh, 2003). In humans, homozygous mutations of *ATM* locus are responsible of genomic instability syndromes as ataxia-telangiectasia (A-T) characterized also by immune dysfunctions and cancer predisposition

(Khanna, 2000). In particular, either germ-line or somatic *ATM* gene mutations were found to be involved in lymphomagenesis (Gumy-Pause et al., 2004). Animal models of *ATM* deficiencies are, so far, represented by *ATM*-knockout mice (Gueven et al., 2006). Interestingly, in *ATM*^{-/-} mice the lymphoid malignancies and immune dysfunctions but not other phenotypic features as growth retardation and infertility could be prevented by reducing the homologous recombination (Treuner et al., 2004). In the same animal model, also bone marrow transplantation restored immune functions and prevented lymphoma (Bagley et al., 2004). Recently, Rogatcheva et al. (2007) have proposed the pig as a possible alternative spontaneous animal model.

* Corresponding author. Tel.: +39 051 2097978; fax: +39 051 2097593.
E-mail address: fabio.gentilini@unibo.it (F. Gentilini).

With the aim of evaluating the dog as A-T deficiency animal model we have sequenced and characterized the full-length canine *ATM* cDNA.

Total RNA was extracted from 10 ml of fresh blood withdrawn from a 10 years old mixed-breed female dog and collected in K₃EDTA tubes. Then, total RNA was purified using the RNeasy mini kit (Qiagen) following manufacturers' instructions with the DNase I digestion step. Two µg of total RNA were used to obtain the 5' ends using the Generacer™ kit (Invitrogen) following manufacturers' instructions. mRNA was reverse transcribed in two distinct RT reactions using Generacer™ random primers and oligodT primers using SuperScript™ III RT.

The entire predicted mRNA of canine *ATM* retrieved by Ensembl database (Dog Genome assembly 2.0, release 49) was used to design primer pairs which covered the complete coding sequence (CDS) with overlapping PCR fragments using the Beacon Designer v3.0 software (Table 1). The cDNA obtained with random primers was amplified with a semi-nested PCR using the 5' forward Generacer primer and a reverse gene specific primer designed on the predicted exon 4 of canine *ATM* (RevClonEx6) in the first PCR round and the 5' forward Generacer nested primer and the RevClonEx6 in the second PCR round. The semi-nested PCR product was

inserted into the Strataclone Vector™ and then used to transform chemically competent cells (StrataClone™ SoloPack® Competent Cells, Stratagene). The plasmid DNA containing the cloned 5' end of *ATM* was purified from 8 independent clones. The random primers RT cDNA was used as template for PCR reactions from 5'UTR to exon 52 while oligodT primers RT cDNA for the remaining exons and 3'UTR.

PCR conditions were set up on an Ep-gradient S thermalcycler (Eppendorf). PCR reactions were carried out using 0.4 µM each of forward and reverse primer, 2.5 µl of 10× PCR buffer (Invitrogen), 2 mM Mg, 0.25 µM dNTPs (Invitrogen), 1 U/reaction of Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen) in 25 µl PCR mixture. PCR cycling conditions were 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, 50–60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final extension step of 72 °C for 5 min (Table 2). PCR products were separated in 1.5% agarose gel, visualized after staining with ethidium bromide and purified using commercial kits (Perfectprep purification, Eppendorf, CloneWell 0.8% SYBR Safe gels, Invitrogen). The purified amplicons were sequenced using Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystem), purified with Centri-Sep columns (Applied Biosystem) and electrophoresed on ABI Prism 310 sequencer after denaturation with HiDi Formamide

Table 1

Primers used in the study for amplifying overlapping PCR fragments of canine *ATM* transcript.

Forward primer	Sequence 5'–3'	Reverse primer	Sequence 5'–3'	Amplicon size (bp)	Annealing T °C
5' GRnested	ggacactgacatggactgaaggagta	Clon5'_Rex6	tacagtgcctcctataaacggcaccatta	893	60
5' GR	cgactggagcagcagacactga				
5' GRnested	ggacactgacatggactgaaggagta	Rex2_5'UTR	gcgaggattatgacagagagacagg	367	58
Fex2_5'UTR	cccgactctggaatctctactgg	Rex3/4	ctcaactcttctctctgtctgtagc	274	56
Fex3	tctgcttattgtctgcctcaac	Rex6	cagctccataaacggcaccatta	398	54
Fex6	cgccagactaaaatgtcaagaactc	Rex8	aggaagatgataaacgctgtaagatg	385	55
Fex7	ggattctttccaaggctattcag	Rex9	tatccgcatcaactcaatcaag	425	53
Fex8	gcatcatccaaagggagccaaaacc	Rex11	cccatgtctgctgtgaggtagaagc	481	58.5
Fex10	agatttctcagtcttactaccacac	R11_3'	tgcttgaattatagctccaagtaaac	450	54
Fex10/11	gtgccttggttacagattacaac	Rex12	gtaagagccatttcaataatcc	517	51
Fex12	gaacagagatggagcagaatgta	R15/16	acactgcatcagagactggctt	599	55
Fex15	actacagatgcagagccttatcc	Rex18	gcccagcagggaaactcactgaatag	468	56
Fex17	cctgcgattgtgacatcaaacg	Rex20	cttctcaggaagcctcctcaaacg	464	55
Fex19	tgctcgaccctagtaaatctctcc	Rex23/24	ctggaataactattgattgactctgc	491	55
Fex23	tgggctattcttaattgtatggg	Fex25	agagctgagaacctgaacattgg	401	51
Fex25	agagctgagaacctgaacattgg	Rex27	gcaatggacttcactcaaaaacg	407	56
Fex26	ttttactaaactacaaaatgtgagg	Rex29	acatgtgatggaatgaggtgg	445	51
Fex28	gagattgtgtgagattgtgatgacc	Rex31	acgacacatccatgaaacgagaag	439	56
Fex30	aaagtgccttaggaggcctgg	Rex32	ccttaagacatcatggtcaggaaaag	357	55
Fex31	ttctcctgtgtgtgacctgtaagc	Rex33/34	ccattatgccatctcggggtatcc	463	58.5
Fex33	aggctggaagctggaagatgct	Rex36	tcccagaaactatgctcacttctgtg	425	58
Fex35	tcatacattgacctcctgaaataac	Rex39	gtgtctgaaacaattagtgagaatcc	494	53
Fex38	aagatacaaatgagctcggagaacc	Rex41	gctgtattctgcttctctcctc	397	55
Fex40	gctcagctctgtccgctcactttac	Rex44	gctcccactgcatgttctccacg	496	60
Fex44	gaattgggactctgcatattctctc	Rex47	atggcctctggaactgaaatc	462	55
Fex47	tcagtcagggataggcaaccatc	Rex48/49	aaggcttaggtcgggatcattctg	423	56
Fex48	gcctcaatgatttcaagcaaatg	Rex50/51	ccgctgaaccttactgtgtatc	408	53
Fex50	attacgatggagaagcagatgatgaac	Rex52	gcagccaactgtcatgatgagag	466	56
Fex51	tggatattcctcttctctctctgg	Rex53	tctactctcttctgctcctctgg	300	58
Fex53	tctagaattcaatggagcacc	Rex55	tttagtattggtgctgtctgctg	330	54
Fex54	ttgatgcccctcagtggaagac	Rex58	tgttgacaagaactcacaataggg	451	56
Fex58	tttctcagcgaagcggggtctc	Rex61	tgccatccatccacaatatctctg	481	58
Fex59	aatttcagcagtttccgttac	Rex63	agaggattcatagctcagtcaaac	418	51
Fex61	aatcctccatctcctgaaacagttcc	Rex64	agtcgctgagatgtttgggtcc	450	58
Fex64	aagaaggaacggtgctcagtg	R1_3'UTR	tggtagtagaagtagcagcatgaag	349	56
F_3'UTR	accatccaacagactttgtatagg	R2_3'UTR	accagcagtttctctctctcc	311	54

Table 2
Sequence variants of canine *ATM* transcript.

5'UTR/CDS/3'UTR	Sequence variant ID	Zygoty	aa change	refSNP ID
5'UTR–exon 1	c.-416A > G	Heterozygous		
5'UTR–exon 1	c.-269C > T	Homozygous		
5'UTR–exon 1	c.-251G > A	Heterozygous		rs24195296
CDS–exon 7	c.504C > T	Heterozygous		
CDS–exon 9	c.1050G > A	Heterozygous		
CDS–exon 19	c.2694G > A	Heterozygous		
CDS–exon 25	c.3431A > T	Heterozygous	p.1144His > Leu	
CDS–exon 31	c.4476C > T	Heterozygous		
CDS–exon 36	c.5267T > C	Homozygous	p.1756Met > Thr	rs24154550
CDS–exon 40	c.5847T > C	Heterozygous		rs24212611
CDS–exon 53	c.7782T > C	Heterozygous		
CDS–exon 56	c.8145C > T	Heterozygous		rs24220999
CDS–exon 57	c.8211G > A	Heterozygous		
CDS–exon 58	c.8352G > T	Heterozygous	p.2784Glu > Asp	

(Applied Biosystem) at 95 °C for 5 min. Sequences were assembled and analyzed with Seqscape v2.5 software (Applied Biosystem).

The putative promoter region and regulatory motifs were predicted by analyzing the 700 bp region 5' upstream from the cap site with the Proscan software V1.7 (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/) (Prestridge, 1995) and "MOTIF" software (<http://motif.genome.jp>). The putative PolyA signal sites were predicted using PolyA (<http://www.softberry.com/>). Finally, the predictors PhD-SNP (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/>) and PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) were used to evaluate the possible effects of non-synonymous polymorphisms.

The complete CDS of canine *ATM* was included in a 9984 bp cDNA transcript (EU770574). The major ORF, corresponding to the ortholog human and pig *ATM* isoform 1, has 64 exons and codes a protein of 3056 aa. Based on the genomic sequences, all exon–intron boundaries follow the GT-AG rule with the exception of a GA 5' donor site at intron 1–2. Canine CDS showed high homology with human and pig orthologs. Homologies at the aa level are 89% identities – 93% positives and 87% identities – 93% positives with human and pig, respectively. The cloned 5' end full-length fragment of cDNA spanned from the transcription start site to exon 6. The putative translation start codon, corresponding to the N-terminus of human isoform 1, was found in exon 3 and was accurately predicted in XP_536585.2. Two additional exons which were not predicted and annotated in the Dog Genome assembly were found in the 439 bp 5'UTR sequence. Two further in-frame methionine (Met) codons were located 3' downstream in exon 5 and 6. In pig, N-terminus alternatively spliced *ATM* transcripts were shown to lack normal AUG codon in exon 3. Such transcripts showed an in-frame Met-codon in exon 5 which yield an N-terminus lacking the substrate binding domain (Rogatcheva et al., 2007). Similarly, in dogs the N-terminus substrate binding domain is coded in exon 5 upstream from the in-frame AUG codon yielding the possibility of an *ATM* defective protein variant.

By blasting the 5'UTR sequence against the Dog Genome assembly, the transcriptional start site was found

on the reverse strand at CFA5: 27307661 in a region syntenic with human chromosome 11. A putative TATA-less bi-directional promoter region was found in the 371 bp region upstream of the translation start site. The core promoter harbours different conserved regulatory motifs: CREB, CCAAT boxes (NF-binding sites), Sp1, AP-2, GCF, XRE, Ets, Cre and c-Myb. Divergent promoters usually drive transcription of two different genes in both directions on plus and minus strands. The human and pig *ATM* promoters span the intergenic region between *ATM* and *NPAT*. A predicted *NPAT* locus was annotated also in the Dog Genome assembly. Bi-directional promoters are frequently characterized by paucity or even absence of TATA elements, colocalization of CpG islands and specific subsets of transcription factors binding site such as CCAAT boxes, Ets and Sp1 (Trinklein et al., 2004; Collins et al., 2007). These characteristics and highly conserved cis-regulatory elements of the putative canine promoter emphasize the similarity with human and pig *ATM* locus structure.

Many sequence variants (SVs) were found in the mRNA and confirmed at the gDNA level (Table 2). Three SVs were located in the leader exon 1 and the others in the CDS. Three SVs were non synonymous. Four SVs were annotated on public databases (Table 2). Computational analysis predicted a neutral changes in the case of p.1756Met > Thr and p.2784Glu > Asp while a possibly damaging effect were predicted for p.1144His > Leu.

The 3'UTR of canine *ATM* transcript was only partially sequenced. Beyond the UGA stop codon an additional 374 bp fragment of 3'UTR was sequenced. By evaluating the genomic sequences retrieved from public database, the first potential Poly A sites were identified at nt 1381 after the stop codon although the highest scores were obtained by AAUAAA signals at positions 11294, 11793 and 12135 nt. These sites would originate transcripts ranging from 11.7 to 12.6 kb.

Based on the high homology with the human counterpart with regard to similarity of promoter and overall gene structure, the canine *ATM* could be considered a good candidate gene for evaluating breed-related predisposition to lymphoid malignancies and more in general the dog as a spontaneous animal model of *ATM* deficiency.

Acknowledgement

This work was entirely supported by grant from the “Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna”.

References

- Bagley, J., Cortes, M.L., Breakefield, X.O., Iacomini, J., 2004. Bone marrow transplantation restores immune system function and prevents lymphoma in *Atm*-deficient mice. *Blood* 104, 572–578.
- Collins, P.J., Kobayashi, Y., Nguyen, L., Trinklein, N.D., Myers, R.M., 2007. The *ets*-related transcription factor GABP directs bidirectional transcription. *PLoS Genet.* 3, e208 doi:10.1371/journal.pgen.0030208.
- Gueven, N., Luff, J., Peng, C., Hosokawa, K., Bottle, S.E., Lavin, M.F., 2006. Dramatic extension of tumor latency and correction of neurobehavioral phenotype in *Atm*-mutant mice with a nitroxide antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 992–1000.
- Gumy-Pause, F., Wacker, P., Sappino, A.P., 2004. *ATM* gene and lymphoid malignancies. *Leukemia* 18, 238–242.
- Khanna, K.K., 2000. Cancer risk and the *ATM* gene: a continuing debate. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 795–802.
- Prestridge, D.S., 1995. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J. Mol. Biol.* 249, 923–932.
- Rogatcheva, M.B., Fritz, K.L., Rund, L.A., Pollock, C.B., Beever, J.E., Counter, C.M., Schook, L.B., 2007. Characterization of the porcine *ATM* gene: towards the generation of a novel non-murine animal model for Ataxia-Telangiectasia. *Gene* 405, 27–35.
- Shiloh, Y., 2003. *ATM* and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 155–168.
- Trinklein, N.D., Aldred, S.F., Hartman, S.J., Schroeder, D.I., Otilar, R.P., Myers, R.M., 2004. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* 14, 62–66.
- Treuner, K., Helton, R., Barlow, C., 2004. Loss of *Rad52* partially rescues tumorigenesis and T-cell maturation in *Atm*-deficient mice. *Oncogene* 23, 4655–4661.

1.6.2.2 Integrazione dei risultati della pubblicazione

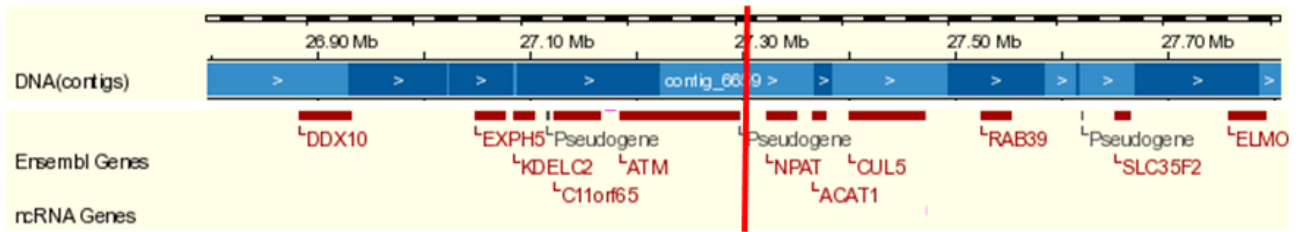


Figura 1.6.2.2.I: Risultato del Blast delle sequenze 5'UTR di ATM e localizzazione del trascrption start site in corrispondenza della regione intergenica ATM/NPAT

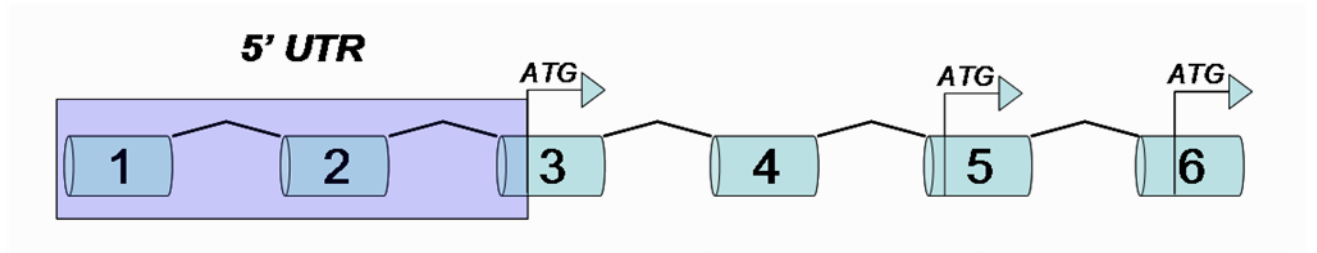


Figura 1.6.2.2.II: Illustrazione schematica dell'estremità 5' clonata di ATM. Sono indicate le sequenze 5' UTR, il codone ATG codificante la metionina dell'isoforma ortologa dell'isoforma 1 dell'uomo, nonché i successivi codoni ATG in frame.

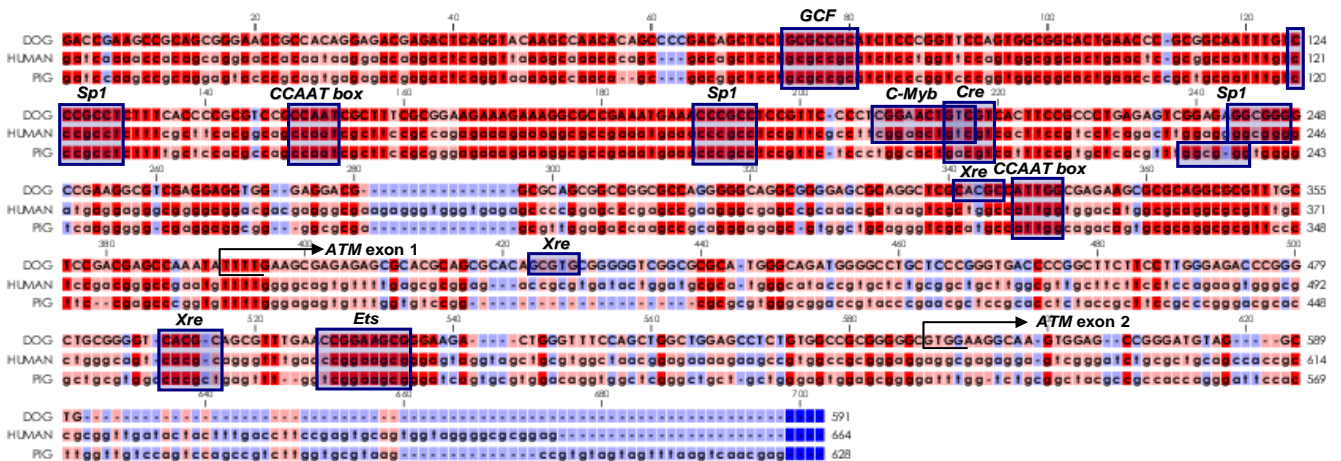


Figura 1.6.2.2.III: Allineamento delle sequenze del promotore di ATM di cane, uomo e suino. Sono evidenziati le principali sequenze regolatrici della regione del promotore.

1.7 STUDIO MUTAZIONALE DELLE SEQUENZE GENOMICHE DI ATM

1.7.1 Materiali & Metodi

1.7.1.1 Campioni

In questo studio sono stati analizzati i campioni di DNA ottenuti da una popolazione selezionata di cani di razza boxer pervenuti presso il Dipartimento Clinico Veterinario nel periodo compreso tra l'anno 2000 e l'anno 2007. Sono stati inclusi nello studio campioni provenienti da 49 cani di razza boxer di cui 22 maschi e 27 femmine per i quali era stata posta diagnosi citologica o istologica di neoplasia in atto o pregressa. Oltre a questa popolazione è stato ulteriormente incluso un gruppo di controllo rappresentato da 6 cani di razza boxer e 5 cani di altra razza, di sesso maschile e femminile, con un'età compresa tra i 5 e i 10 anni clinicamente sani e senza riferimenti clinici o anamnestici di neoplasie in atto o pregresse.

Il materiale da cui è stato ottenuto il DNA è stato rappresentato in quasi tutti i casi da sangue in EDTA; quando questo non fosse stato disponibile, sono stati utilizzati, come fonte di DNA, strisci ematici colorati di sangue periferico o campioni di siero stoccato a -20°C. Non sono mai state impiegate come matrici le biopsie di tessuto tumorale o i preparati citologici su vetrino; questo tipo di scelta è stato fatto in quanto lo studio era mirato ad individuare mutazioni germinali e non mutazioni somatiche.

I tipi di neoplasie erano ripartiti come segue: mastocitoma 28.6%, neoplasia mammarie 26.6%, linfoma 16.3% e altre neoplasie (istiocitoma, emangiosarcoma, carcinoma tiroideo, adontameloblastoma, pilo tricoma, osteosarcoma, sarcoma dei tessuti molli, semonoma, meningioma, leiomioma, basalioma, emangiopericitoma, melanocitoma, Leydigoma) 28.6%.

1.7.1.2 Purificazione acidi nucleici

1.7.1.2a *Salting out*. I campioni per cui era disponibile il sangue in EDTA sono stati sottoposti ad estrazione del DNA secondo un protocollo di *salting out* ricavato dalla bibliografia e modificato (D'Ambrosio e Pascale, 1997). Cinquecento µl di sangue intero in EDTA sono stati posti in un tubo tipo falcon da 15 ml. Sono stati aggiunti 3 volumi (1,5 ml) di soluzione di lisi per gli eritrociti (TTAB 9g/l

Hemolyzing Reagent, Roche) mescolando per inversione diverse volte. I tubi da 15ml sono stati centrifugati 3 volte a 3000 rpm per 5 min.; ogni volta è stato eliminato il supernatante lasciando integro il pellet. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 400 µl di soluzione di lisi (Tris HCl pH7,6 1M, NaCl 5M, EDTA 0,5M). Successivamente sono stati aggiunti 200 µl di SDS 10% e 10µl di proteinasi K 20mg/ml. I tubi sono stati vigorosamente vortexati per 15 secondi e lasciati incubare o/n a 37°C. Sono stati aggiunti 200µl di soluzione satura di NaCl ed i campioni sono stati agitati vigorosamente per circa 15 sec. I campioni sono stati poi centrifugati 15 min. a 3000 rpm. Il surnatante è stato trasferito in un tubo da 1,5 ml e il DNA precipitato aggiungendo 0.8ml di etanolo 100% e mantenuto a -20°C. Il DNA è stato recuperato utilizzando una pipetta capillare sigillata sulla fiamma. Il DNA è stato lavato immergendo la pipetta in etanolo 70% e poi eluito immergendo la pipetta in 300µl di TE. Il DNA così eluito è stato lasciato a reidrattare per 2 ore prima della quantificazione e dello stoccaggio a -2°C.

1.7.1.2b Estrazione mediante kit forensi per matrici degradate

Nei campioni per cui non era disponibile il sangue intero in EDTA, il DNA è stato ottenuto dagli strisci ematologici tramite raschiamento con lama da bisturi del materiale fissato ed eventualmente colorato e successiva estrazione con kit commerciale (ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit, Invitrogen®). A tal fine, al materiale ottenuto per raschiamento di ogni campione è stata aggiunta la mix di lisi (1ml di ChargeSwitch® Lysis Buffer e 10µl di proteinasi K) ponendo attenzione che tutto il materiale prelevato fosse completamente immerso nella soluzione di lisi. Il tubo è stato agitato mediante vortex per circa 15 sec e incubato 1h a 55°C. Al termine dell'incubazione il tubo è stato centrifugato per 30 sec a 8000 rpm e il surnatante trasferito in un'altra provetta tipo eppendorf. Quindi 200µl di ChargeSwitch® Purification Buffer sono stati aggiunti al surnatante del lisato avendo cura di mescolare il tutto mediante la pipetta. Sono poi stati aggiunti al campione 20µl ChargeSwitch® Magnetic Beads, precedentemente risospeso per agitazione, al campione e si è provveduto a vortexare il tutto per 15 sec. circa. Il tubo è stato poi lasciato ad incubare a RT per circa 5 min. per consentire al DNA di adsorbirsi alle beads magnetiche. I tubi sono stati poi posti nel supporto magnetico (MagnaRack™) e lasciati riposare per circa 1 min. in attesa che i beads magnetici formassero un pellet. Senza rimuovere la provetta dal MagnaRack™, si è provveduto a recuperare ed eliminare il surnatante,

facendo attenzione a non disturbare il pellet di granuli con il puntale della pipetta. Le provette sono state successivamente rimosse dal supporto magnetico e a ciascun campione sono stati aggiunti 500µl di ChargeSwitch® Wash Buffer. Ciascuna provetta è stata agitata con vortex e reinserita nel supporto magnetico per circa 1 minuto o comunque fino alla formazione del pellet, dopodiché il surnatante è stato eliminato. I passaggi di lavaggio del pellet di beads magnetiche è stato ripetuto 2 volte. Si è poi provveduto all'eluizione del DNA aggiungendo al pellet 150µl di ChargeSwitch® Elution Buffer avendo cura di mescolare delicatamente e lasciando ad incubare per circa 5 minuti. La provetta è stata reinserita sul supporto magnetico, lasciata incubare 1 minuto per consentire che si riformasse il pellet e il surnatante contenente il DNA rimosso avendo cura di non toccare il pellet con il puntale della pipetta e trasferito in una nuova provetta.

1.7.1.2c Estrazione di DNA mediante kit da siero

Qualora nemmeno i preparati ematologici fossero stati disponibili si è proceduto all'estrazione del DNA da siero tramite kit commerciale (QIAamp DNA mini kit, Qiagen®, protocollo "Blood and Body Fluid Spin Protocol"). Brevemente, 20µl di proteinasi K sono stati posti sul fondo di una provetta da 1.5 ml a cui sono poi stati aggiunti 200µl di siero e 200µl di buffer AL avendo cura di agitare vigorosamente con vortex per 15 sec. La provetta è stata lasciata incubare 10 minuti a 56°C. Successivamente sono stati aggiunti 200µl di etanolo 100% e la provetta è stata agitata con vortex per 15 sec. La soluzione così ottenuta è stata trasferita su una colonnina ad affinità precedentemente montata su una provetta da 2 ml. Il DNA è stato adsorbito alla colonnina mediante centrifugazione a 8000 rpm per 1 min. Il filtrato è stato eliminato e la colonnina rimontata sulla provetta di raccolta. La membrana è stata lavata 2 volte, la prima aggiungendo buffer AW1 e centrifugando 1 minuto a 8000 rpm e la seconda aggiungendo buffer AW2 e centrifugando a 14000 rpm per 5 min. Per eliminare completamente il buffer AW2 ed asciugare la membrana è stata eseguita una ulteriore centrifugazione a vuoto a 14000 rpm per 2 min. Infine, la colonnina è stata montata su una nuova provetta da 1.5 ml e il DNA eluito dalla membrana aggiungendo 200µl di Buffer AE e centrifugando 5 min a 8000 rpm.

1.7.1.3 WGA – Whole genome amplification di DNA ottenuto da matrici degradate

I campioni rappresentati da matrici biologiche complesse (strisci ematici colorati) per i quali è stato utilizzato un metodo di estrazione forense ma che non hanno, comunque, originato bande visibili o che hanno originato bande di debole intensità sono stati ulteriormente processati. In particolare, il gDNA di partenza di questi campioni è stato sottoposto a purificazione tramite kit commerciale (QIAamp DNA mini kit, Qiagen®, protocollo “*Cleanup of Genomic DNA*”) e successivamente l'intero DNA genomico è stato amplificato con la tecnica di *Whole genomic amplification* (WGA) (REPLI-g Mini Kit, Qiagen®, protocollo “*Amplification of purified Genomic DNA Using the REPLI-g Mini Kit*”). I campioni sottoposti a WGA sono stati poi utilizzati per il normale protocollo di PCR.

Per l'esecuzione del WGA sono stati preliminarmente preparati quantità sufficienti di Buffer D1 e Buffer N1 per il numero totale di reazioni di amplificazione. Nel caso di 15 reazioni WGA, i due buffer sono stati così ricostituiti: Buffer D1: 5 µl di Buffer DLB +35µl di acqua da biologia molecolare; Buffer N1: 8µl di stop solution + 72µl di acqua da biologia molecolare. Dopo aver preparato i buffer, 2,5µl di templatato di gDNA sono stati posti in una provetta da micro centrifuga. Sono stati aggiunti 2,5µl di Buffer D1 seguito da agitazione in vortex e breve centrifugazione. I campioni sono stati lasciati ad incubare a RT per circa 3 min, quindi sono stati aggiunti 5µl di Buffer N1 seguito da agitazione con vortex e breve centrifugazione. Ai 10 µl di gDNA denaturato sono stati aggiunti 40 µl di mix di reazione precedentemente preparata con 1µl di REPLI-g Mini DNA Polymerase, 29µl di REPLI-g Mini Reaction Buffer e 10µl di acqua da biologia molecolare. I campioni sono stati incubati 16 ore a 30°C ed infine la REPLI-g Mini DNA Polymerase inattivata termicamente a 65°C per 3 min.

La tecnica WGA consente di riprodurre con un elevato grado di confidenza la sequenza completa di DNA presente nel campione in esame. In questo modo è possibile recuperare campioni di DNA esigui o particolarmente preziosi replicando diverse volte la sequenza di partenza.

La tecnica di amplificazione da noi utilizzata si basa sulla *multiple displacement amplification* (MDA), che utilizza un particolare tipo di DNA polimerasi (Φ 29) e *random primer* resistenti all'azione esonucleasica della polimerasi (Dean et al., 2002).

L'*annealing* di tipo random operato da questi *primer* sul doppio filamento di DNA è sufficiente ad ottenere un *priming* iniziale che viene successivamente seguito da un distacco dei due filamenti di DNA, i quali potranno essere amplificati in modo esponenziale. Questo scalzamento (*displacement*) dei due filamenti è operato dalla stessa DNA polimerasi $\Phi 29$, che possiede un elevato potere di legame con il templatato di DNA. Questi fattori consentono di ottenere l'amplificazione del DNA senza l'utilizzo di elevate temperature per indurre la denaturazione del doppio filamento (tutto il processo di amplificazione avviene a +30°C); tale caratteristica rappresenta una condizione fondamentale per conservare al meglio il templatato ed evitare danneggiamenti indotti dall'effetto termico (Dean et al., 2002; Hosono et al., 2003).

La tecnica WGA consente di ottenere un'amplificazione di 10.000 volte o più del templatato di partenza, con un elevato grado di fedeltà rispetto la sequenza iniziale. La DNA polimerasi $\Phi 29$, infatti, possiede una ridotta frequenza di errore (1 nucleotide su 10^6 - 10^7) e l'accumulo di errori dopo un'amplificazione di 10.000 volte del DNA è soltanto di una mutazione ogni 3×10^6 nucleotidi (Hosono et al., 2003).

Per queste ragioni la tecnica WGA tramite MDA assicura una qualità sufficientemente alta per la maggior parte delle applicazioni genetiche successive come la PCR quantitativa, la genotipizzazione del polimorfismo dei singoli nucleotidi (*single nucleotide polymorphism*, SNP), l'analisi tramite *Southern blot* dei frammenti di restrizione e la mappatura dei cromosomi (Dean et al., 2002; Hosono et al., 2003).

1.7.1.4 Disegno dei primer e amplificazione dei *target*

I primer oligonucleotidici per l'amplificazione PCR degli esoni N terminali di *ATM* canino sono stati disegnati utilizzando il software Beacon Designer v3.0. Come target sono stati utilizzati gli esoni da 3 a 11. I primer sono stati scelti sulle sequenze introniche fiancheggianti in modo da includere i siti di splicing predetti nel prodotto di amplificazione ad eccezione dell'esone 11 che è stato amplificato con 2 coppie di primer ed in cui il primer *reverse* della prima coppia ed il *forward* della seconda coppia sono stati disegnati sulle sequenze esoniche. La tabella sottostante riporta le sequenze dei primer, le relative T di annealing calcolate e le dimensioni attese dell'amplicone.

Esone	Primer Forward	Primer Reverse	T di annealing	Dimensione amplificato (bp)
3	gatcataatatgcctgtaattg	aacataggaatgggttgc	48,7	255
4	agtgtatgattggcaaccattcc	caaggtacaacacgttataaggagc	51,9	277
5	aaaagccctaatagcattctaagc	tcttaacatattctgactgaactc	50,1	497
6	gagcgaatgcatgagttggc	tgcaaggacacttaggggata	53,6	391
7	aagtcgaatcaggaccttaag	gaactgatactttcttgggaatc	48,6	395
8	tgcttcagtgccatttttc	gaagcaaattcaaaacagcaaa	49,7	336
9	caccttaacacctgaatgg	ctcagtaaaaggaaactaatgg	50,5	303
10	attactcttgctctatgaactccc	ttctactggaggcctgtgag	52,4	366
11a	ggatgttgtaagggtgctatgctc	ttccatgaggcatcgtaaca	49,5	231
11b	caaccagttaatatcaaaatatcc	ggaagaaaagaaatatttacctctaca	49,2	421

Tabella 1.7.1.4.I: primer impiegati per l'amplificazione degli esoni predetti dell'estremo n terminale di ATM canino

1.7.1.5 Screening mutazionale SSCP

Gli amplificati sono stati sottoposti ad un iniziale *screening* mutazionale tramite la metodica *single-stranded conformation polymorphism* SSCP (polimorfismo della conformazione dei filamenti singoli), alla quale è seguito il sequenziamento diretto dei campioni che presentavano *pattern* di migrazione differenti da quello prevalente "*wild type*".

I campioni per i quali si erano evidenziate bande spurie all'elettroforesi su gel di agarosio, la banda prevalente è stata purificata da gel tramite kit commerciale (PerfectPrep® Gel Cleanup, Eppendorf, protocollo fornito dal produttore). Il prodotto purificato è stato poi processato in modo analogo agli altri campioni.

L'SSCP prevede la separazione su gel di DNA denaturato a singolo filamento. Il DNA a singolo filamento assume all'interno di un gel non denaturante una struttura secondaria determinata dalla propria sequenza nucleotidica. La migrazione elettroforetica pertanto consente di differenziare filamenti di DNA che a parità di peso molecolare presentano sequenze differenti (Martins-Lopes et al., 2001). La tecnica è sufficientemente sensibile da consentire di individuare mutazioni puntiformi. (Nataraj et al., 1999).

La sensibilità della tecnica SSCP è inversamente proporzionale alla dimensione del frammento di amplificato sottoposto ad analisi, maggiori sono le dimensioni del frammento e minore è la probabilità di rilevare mutazioni puntiformi. Sequenze con dimensioni superiori a 400 bp non sono analizzabili.

Altre variabili che possono influenzare l'efficacia della metodica SSCP sono la composizione della matrice del gel, la composizione del buffer di corsa (compresa la forza ionica ed il pH), la temperatura del gel durante l'elettroforesi, la concentrazione del DNA in esame e il contenuto in G+C del frammento (Sunnucks et al., 2000).

Per queste ragioni il protocollo SSCP deve essere il più possibile standardizzato, poiché la sua riproducibilità è essenziale per ottenere dei risultati attendibili.

I *pattern* di bande tipicamente riscontrabili in un gel SSCP non denaturante nel caso in cui il DNA in esame sia del materiale genomico sono due:

- la presenza di due bande con velocità di corsa differente ascrivibili ai due singoli filamenti di DNA in un soggetto omozigote per un determinato gene;
- la presenza di quattro bande generate da una eterozigosi per un determinato gene

Il protocollo SSCP da noi utilizzato ha previsto l'utilizzo di un gel non denaturante di acrilamide (Mutation Detection Acrylamide Solution 2X®, Sigma) alla concentrazione di 0.5 X, tamponata con TBE 0.6 X e polimerizzata con aggiunta di ammonio persolfato (Ammonium persulfate, Sigma®) e TEMED, (Sigma®Aldrich). Per 100 ml di acrilamide è stata utilizzata la seguente ricetta: 25 ml di acrilamide, 11.7 ml di TBE 5 X, 67.5 ml di acqua per HPLC. I reagenti sono stati agitati delicatamente e successivamente sono stati aggiunti 400 µl di ammonio persolfato preparato fresco e 40 µl di TEMED. La soluzione così ottenuta è stata versata nelle cassette precedentemente allestite sull'apposito supporto. I pettini destinati a formare i pozzetti di caricamento sono stati alloggiati nelle cassette e il gel è stato lasciato a polimerizzare a temperatura ambiente per almeno 1 ora. Tolti i pettini, le cassette sono state alloggiare nella cella verticale di elettroforesi (Mini-Protean® II Electrophoresis Cell, BIO-RAD) ed il buffer di corsa (TBE alla concentrazione di 0.6 X). è stato addizionato nelle apposite vasche della cella. Al prodotto PCR (2 µl) sono stati addizionati 9 µl di una soluzione di caricamento (stop solution) costituita da: 95 % di formamide (Formamide, Sigma®), 10 mM NaOH, 0.25% di bromofenolo blu (Bromophenol Blue, Sigma®) e 0.25% di xilene cianolo (Xilene Cyanol, Sigma®). La

soluzione così ottenuta è stata riscaldata a 94°C per 7 min per ottenere la denaturazione del DNA e immediatamente posta in ghiaccio in attesa del caricamento. Infine, 3-5 µl di DNA denaturato sono stati caricato sul gel di poliacrilamide della dimensione di 7cmx8cmx0,75mm precedentemente preparato. Il gel è stato poi sottoposto ad elettroforesi per un tempo di 1ora e 30 minuti a 180 V ed alla temperatura di +4°C tramite cella elettroforetica. Al termine dell'elettroforesi il gel è stato colorato per 40 minuti con una soluzione di Sybr Green II 1X (10 µl di SYBR® GREEN II concentrato in 100 ml di TBE 1X). Al termine della colorazione il gel è stato osservato al transilluminatore.

In questo modo sono stati selezionati tutti i soggetti che possedevano un pattern all'SSCP che si differenziasse dal pattern più frequentemente osservato (*wild type*); questi campioni sono stati quindi selezionati per il sequenziamento diretto.

1.7.1.6 Clivaggio mediante endonucleasi di restrizione

In relazione alla loro dimensione alcuni esoni non si prestavano ad essere sottoposti alla metodica SSCP, poiché l'amplificato da noi ottenuto possedeva delle dimensioni superiori alle 350 paia di basi. Tali campioni sono stati perciò sottoposti a clivaggio enzimatico tramite specifici enzimi di restrizione (New England Biolab) in modo da ridurre la lunghezza del filamento di DNA (tabella 1.7.1.6.I). Il prodotto così ottenuto è stato successivamente sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio per separare i due prodotti del clivaggio. Le due bande sono state quindi recuperate tramite incisione del gel con lama da bisturi e purificate con kit commerciale (PerfectPrep® Gel Cleanup, Eppendorf, protocollo fornito dal produttore) in modo da ottenere frammenti di DNA di dimensioni idonee ad essere sottoposto ad SSCP.

Amplificato relativo ad esone:	Enzima di restrizione:
Esone 5	Mbo II
Esone 6	Hha I
Esone 7	Sph I
Esone 11b	Hha I

Tabella 1.7.1.6.I: Enzimi di restrizione utilizzati per il clivaggio degli amplificati con lunghezza superiore alle 350 paia di basi.

La reazione è stata ottenuta in 20 μl di mix, utilizzando 2 μl di Buffer di reazione 10X (diverso per i diversi enzimi), 0,2 μl di BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 μl di DNA, 0,5 μl dell'enzima di restrizione e 16,3 μl di acqua da biologia molecolare. La mix di reazione è stata posta in incubazione a 37°C per 4h.

1.7.1.7– Sequenziamento diretto

Tutti i campioni selezionati tramite SSCP sono stati sottoposti a purificazione con kit commerciale (PerfectPrep® Gel Cleanup, Eppendorf, GenElute™ PCR Clean-up Kit, Sigma Aldrich) e sottoposti a sequenziamento diretto.

I campioni purificati sono stati amplificati mediante *cycle-sequencing* utilizzando gli stessi primer di PCR in presenza di terminatori marcati con fluorofori. (*Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems*). La miscela di reazione di sequenziamento è era così composta 2 μl di Cycle mix 2x, 1 μl di Buffer 10 X, 0,35 μl di primer 5 pmol/ μl , 5,65 μl di acqua ed 1 μl di purificato di PCR. La reazione di sequenziamento è stata condotta con una fase iniziale a 96°C per 1 min seguita da 30 cicli di 96°C per 10 sec e 48-53°C per 5 sec e 60°C per 4min. La mix è stata successivamente purificata mediante centri-sep® (Princeton separations, Applied Biosystem) e il purificato analizzato su sequenziatore automatico ABI PRISM® 310 (Applied Biosystem) provvisto di capillare da 46 cm e diametro 50 μm riempito con polimero POP-4 (Applied Biosystems). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante l'uso di uno specifico software: Sequencing Analysis version 5.2 (Applied Biosystems).

1.7.1.8– Assemblaggio ed analisi delle sequenze

Le sequenze ottenute sono stati poi sottoposte a *resequencing* e validazione delle mutazioni mediante software SeqScape v2.5 (Applied Biosystem).

1.7.2 Risultati

1.7.2.1 – Matrici ed amplificazione dei *target*

Sul totale dei 60 campioni utilizzati nello studio è stato possibile recuperare il sangue in EDTA in 44 soggetti, per i quali si è proceduto all'estrazione del DNA secondo il protocollo di *Salting out*. L'analisi spettrofotometrica con lettura dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm ha consentito di accertare un'adeguata quantità di DNA ($37 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 26$; media \pm SD) e un buon grado di purezza del gDNA in tutti i casi ($.1.73 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0.2$; media \pm SD).

In 5 soggetti, per i quali non era disponibile il sangue, il DNA è stato ottenuto da siero tramite kit commerciale; tale protocollo ha consentito di isolare idoneamente il materiale genomico e di ottenere adeguati prodotti di amplificazione in tutti i casi.

Per i restanti 11 soggetti si è ottenuto il DNA mediante kit commerciale forense dai preparati ematologici fissati e colorati su vetrino. Poiché il materiale estratto si è rivelato insufficiente a ottenere adeguati prodotti di amplificazione, in tutti i casi il gDNA è stato sottoposto a WGA. Dopo WGA è stato possibile ottenere quantità adeguate di DNA da sottoporre alle ulteriori analisi.

Per ogni coppia di primer disegnati, sono state messe a punto le migliori condizioni di PCR (concentrazioni dei reagenti, tempi relativi ad ogni fase in termociclatore, temperature di *annealing*).

Complessivamente sono state eseguite 10 reazioni PCR per ognuno dei 60 campioni. Tutte le 600 PCR hanno originato un prodotto che è stato evidenziato su gel di agarosio.

In 25 casi si è evidenziata una banda addizionale, non attesa, con differente peso molecolare (figura 1.7.2.1.I). In questi casi, l'amplificato da sottoporre alle analisi SSCP e sequenziamento diretto è stato ottenuto per escissione delle bande e purificazione.

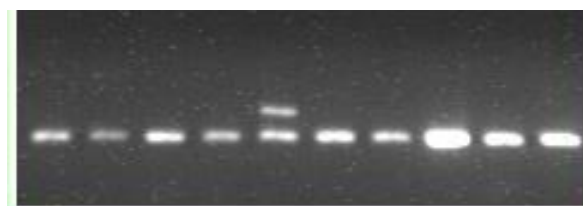


Figura 1.7.2.1.I: Esempio di visualizzazione dei prodotti PCR su gel di agarosio. Nel quinto campione da sinistra è presente una banda addizionale non attesa.

1.7.2.2 – Screening SSCP

I 600 amplificati sottoposti ad SSCP hanno permesso di individuare un pattern predominante (*wild type*) per ogni esone. In tale contesto sono quindi stati isolati tutti i campioni che possedevano un

pattern patologico, riconducibile alla presenza di bande addizionali rispetto a quelle riscontrate nel *wild type* (figura 1.7.2.2.I).

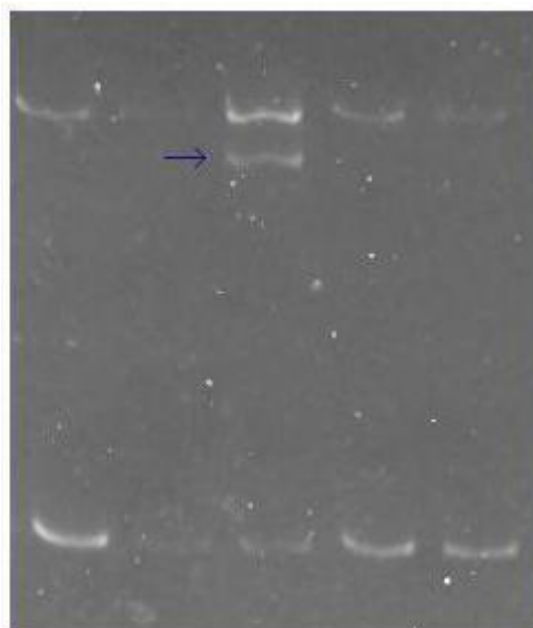


Figura 1.7.2.2.I: Esempio dei pattern SSCP ottenuti . Il pattern *wild type* è rappresentato dalla doppia banda, mentre nella terza corsia da sinistra appare una terza addizionale indicata dalla freccia.

Mediante analisi SSCP è stato possibile individuare complessivamente 21 campioni con pattern non “*wild type*”. Tali campioni, insieme ad un campione con pattern “*wild type*” per ciascun esone, sono stati successivamente purificati e sequenziati.

Nonostante questi risultati, la tecnica SSCP così come applicata ha rivelato una scarsa sensibilità.

Infatti, il sequenziamento diretto di 16 amplificati, con *pattern wild-type* all’analisi SSCP, ha evidenziato complessivamente 7 *sequence variants* sia in omozigosi che in eterozigosi.

1.7.2.3- Analisi delle varianti alleliche individuate

Il sequenziamento diretto dei 21 campioni ha consentito di evidenziare l’effettiva presenza di 4 mutazioni (caso da 1 a 4; figure 1.7.2.3.I,II,III).

La maggior parte delle *sequence variants* individuate erano localizzate sugli introni fiancheggianti sul lato 5’ e 3’ senza interessare il sito di splicing accettore e donatore. In misura minore le *sequence variants* erano rappresentate da SNP sinonimi. In 1 caso, inoltre, (caso 5) è stata evidenziata un’ampia

inserzione di circa 300 bp in grado di determinare l'alterazione della cornice di lettura e la comparsa di un codone di arresto prematura.

Caso 1 Sostituzione C>T localizzata nel 5' UTR nell'introne2-3. La localizzazione genomica è CFA5 27302092. Il polimorfismo era già annotato su Database pubblici come rs24286505. Il polimorfismo è stato identificato in eterozigosi in 4 soggetti (figura 1.7.2.3.I). Fanno riferimento a questo locus una serie di varianti di sequenza non evidenziate da SSCP.

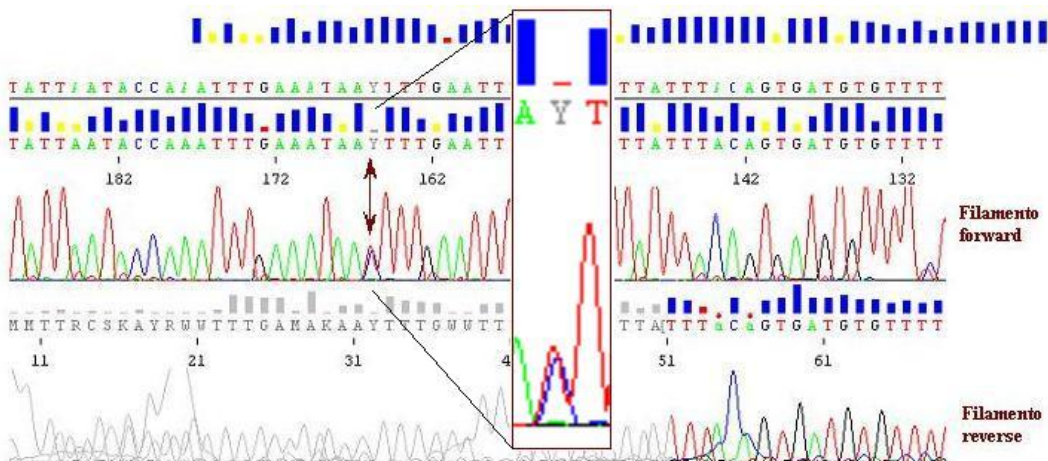


Figura I.7.2.3.I

Caso 2 Sostituzione c.1050G>A localizzata in corrispondenza dell'esone 9 (esone 7 predetto). Il polimorfismo è sinonimo ed è localizzato sul terzo nucleotide del codone dell'Alanina (GCR). Il polimorfismo non era annotato sui database pubblici. In un soggetto era presente in omozigosi in 2 soggetti in eterozigosi (figura 1.7.2.3.II).

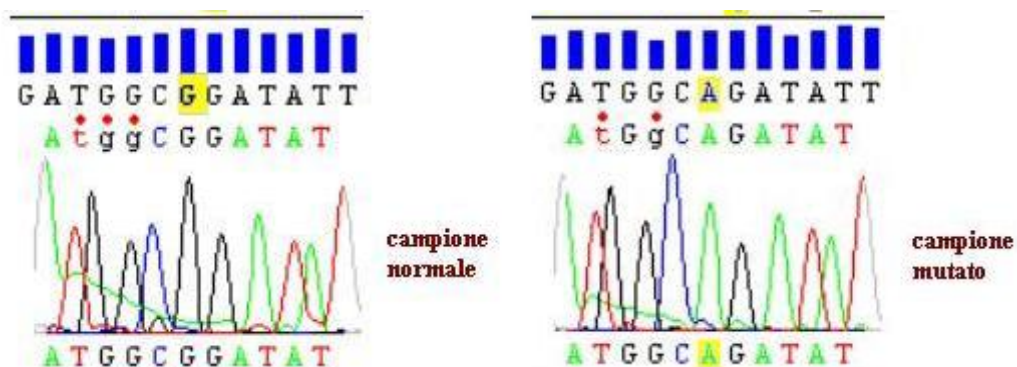


Figura 1.7.2.3.II

Caso 3 c.1235+48A>G oppure CFA5 g.27281863A>G. La variante allelica era presente in omozigosi in 1 soggetto ed in eterozigosi in 1 soggetto. La sostituzione inserisce un potenziale sito di splicing GT 48 nucleotidi 5' al normale sito di splicing (figura 1.7.2.3.III).

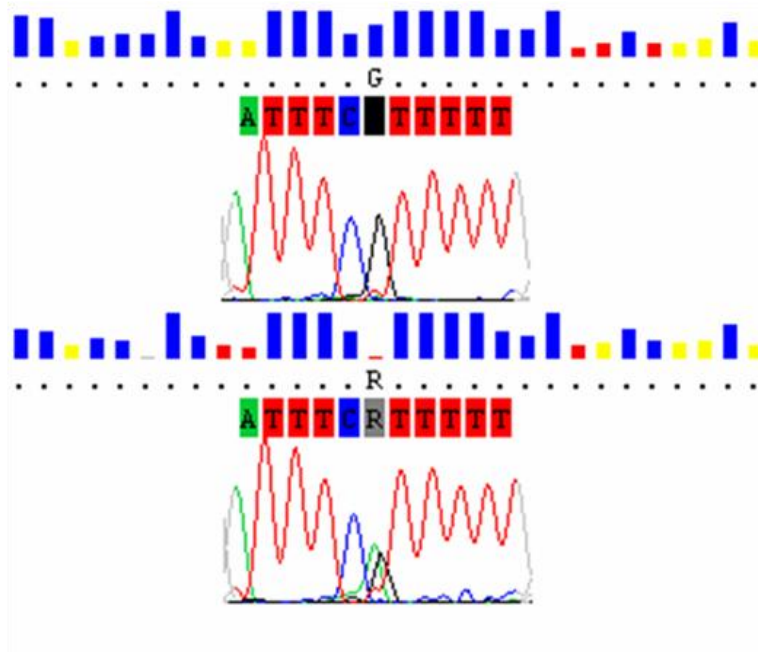


Figura 1.7.2.3.III:

Caso 4 Quarto tipo di mutazione. Sostituzione in omozigosi di un'adenina con una guanina. Questo comporta la sostituzione aminoacidica di una isoleucina (I) con una valina (V).

Caso 5 In un campione si è osservata un' ampia inserzione/delezione (*indel*) di 163 nt iniziante nell'introne 10-11 ed estendentisi ampiamente nell'esone 11. Gli estremi dell'inserzione presentavano una breve sequenza di 7 nt ripetuta in modo inverso. Non sono state eseguiti ulteriori conferme della mutazione. Non è stato pertanto possibile accertare se l' *indel* sia presente in omozigosi o eterozigoti (figura 1.7.2.3.IV).

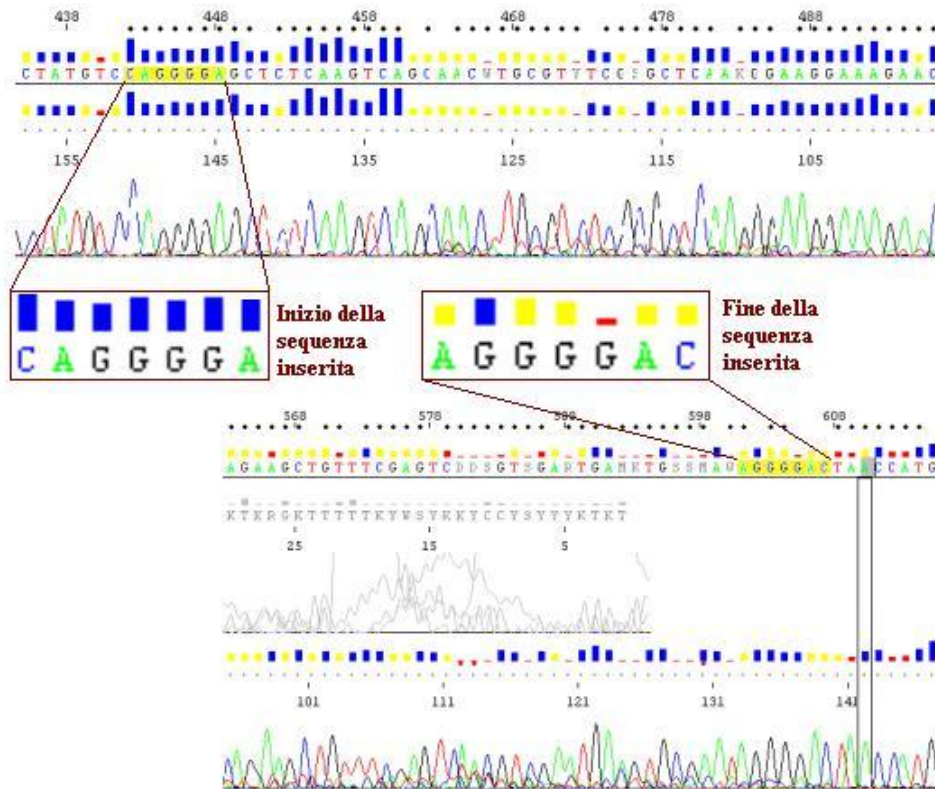


Figura 1.7.2.3.IV

Il campione che presentava l' *indel* a carico dell'introne 10-11 e esone 11 mostrava inoltre una sostituzione in eterozigosi c.1370G>A *missense*. La sostituzione aminoacidica corrispondente p.Arg457Gln è solo teorica poiché influenzata da un'eventuale *frameshift* della cornice di lettura causata dalla *indel* (figura 1.7.2.3.V).

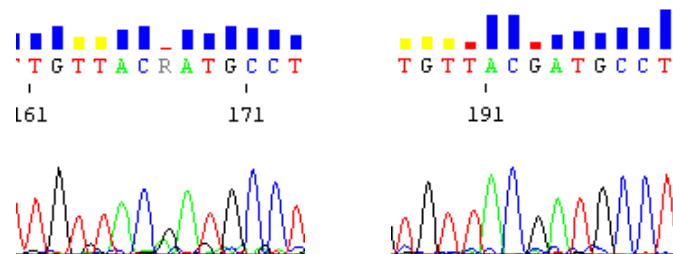


Figura 1.7.2.3.V

1.8 CONCLUSIONI

I risultati sopra esposti compendiano i dati preliminari sullo studio mutazionale del gene *ATM* canino e si riferiscono all'analisi delle sequenze esoniche dell'estremità N-terminale di ATM. Nella regione considerata è presente il dominio legante p53 e segnali di localizzazione nucleare (KRKK) essenziali per la localizzazione nucleare e l'associazione con la cromatina di ATM (Young et al., 2006). Mutazioni *missense* delle regioni codificanti o in corrispondenza dei siti di *splicing* possono determinare importanti ricadute funzionali.

Il numero limitato di dati ottenuti ad oggi non consente di formulare alcun tipo di valutazione di tipo epidemiologico sulla stima del rischio. Infatti, il progetto è solo in fase iniziale e sarà sviluppato cercando di aggredire le criticità emerse. In particolare il numero di soggetti inclusi nello studio non è congruo con gli obiettivi prefissati. Per tale motivo, sono stati ulteriormente raccolte le matrici biologiche (sangue, siero) di circa 280 soggetti di razza boxer visitati presso il Dipartimento Clinico Veterinario sia negli anni precedenti il 2000 sia successivamente al 2007. Tra questi, in 85 casi è stato possibile accertare una diagnosi di neoplasia.

Un ulteriore fattore critico si è dimostrato lo *screening* mutazionale. La tecnica *SSCP* non ha rivelato sufficiente sensibilità, non è di semplice esecuzione e, nelle modalità con cui è stata eseguita, presenta costi non irrilevanti.

Recentemente sono state messe a punto tecniche di sequenziamento ultramassivo che possono prestarsi all'analisi mutazionale *high-throuput* di un numero consistente di campioni in tempi estremamente ridotti e con costi contenuti in termini di materiali di consumo. Poiché, tuttavia, le strumentazioni occorrenti non sono disponibili presso il nostro Ateneo, nell'ambito del progetto si cercheranno di avviare in un prossimo futuro collaborazioni con centri di ricerca in grado di svolgere tali analisi.

1.9 BIBLIOGRAFIA

1. Andrieu N, Cavaciuti E, Laugé A, Ossian K, Janin N, Hall J, Stoppa-Lyonnet D. Ataxia-telangiectasia genes and breast cancer risk in a French family study. *J Dairy Res.* 2005;72 Spec No:73-80.

2. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003;421:499-506.
3. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998 11;281:1674-1677.
4. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998 11;281:1677-1679.
5. Camacho E, Hernández L, Hernández S, Tort F, Bellosillo B, Beà S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernández PL, Campo E. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood*. 2002;99:238-244.
6. Cavaciuti E, Laugé A, Janin N, Ossian K, Hall J, Stoppa-Lyonnet D, Andrieu N. Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42:1-9.
7. Concannon P. ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat Genet*. 2002;32:89-90.
8. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:5261-5266.
9. Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol*. 2008;26:3057-3062.
10. Dorn CR. The epidemiology of cancer in animals. *Calif Med*. 1967;107:481-489.
11. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R. The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol*. 1970;36:403-415.
12. Eng L, Coutinho G, Nahas S, Yeo G, Tanouye R, Babaei M, Dörk T, Burge C, Gatti RA. Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM Gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths. *Hum Mutat*. 2004;23:67-76.

13. Feng J, Yan J, Chen J, Schlake G, Jiang Z, Buzin CH, Sommer SS, Dritschilo A. Absence of somatic ATM missense mutations in 58 mammary carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;145:179-182.
14. Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol.* 2005;23:6364-6369.
15. Garber JE, Offit K.J. Hereditary cancer predisposition syndromes. *Clin Oncol.* 2005;23:276-292.
16. Gatti RA, Tward A, Concannon P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab.* 1999;68:419-423.
17. Grønbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldborg P. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2002;100:1430-1437.
18. Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 2004;23:4451-4461.
19. Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, Du Y, Sun Z, Wu X, Du J, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res.* 2003;13:954-964.
20. Howard EB, Nielsen SW. Neoplasia of the boxer dog. *Am J Vet Res.* 1965;26:1121-1131.
21. Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:795-802.
22. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27:247-254.
23. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ.* 2001;8:1052-1065.
24. Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.* 2005;569:123-132.

25. Luo L, Lu FM, Hart S, Foroni L, Rabbani H, Hammarström L, Yuille MR, Catovsky D, Webster AD, Vorechovský I. Ataxia-telangiectasia and T-cell leukemias: no evidence for somatic ATM mutation in sporadic T-ALL or for hypermethylation of the ATM-NPAT/E14 bidirectional promoter in T-PLL. *Cancer Res.* 1998;58:2293-2297. Erratum in: *Cancer Res* 1998;58:3488.
26. Mao JH, Wu D, DelRosario R, Castellanos A, Balmain A, Perez-Losada J. Atm heterozygosity does not increase tumor susceptibility to ionizing radiation alone or in a p53 heterozygous background. *Oncogene.* 2008;27:6596-6600.
27. Martins-Lopes P, Zhang H, Koebner R. Detection of Single Nucleotide Mutations in Wheat Using Single Strand Conformation Polymorphism Gels. *Plant Molecular Biology Reporter* 2001;19:159-162.
28. Meyn MS. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet.* 1999;55:289-304.
29. Moulton JE, Taylor DO, Dorn CR, Andersen AC. Canine mammary tumors. *Pathol Vet.* 1970;7:289-320.
30. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene.* 2004; 23:6445-6470.
31. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995;268:1749-1753.
32. Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2773-2778.
33. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:748-753
34. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43:1249-1261.

35. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003 3:155-168.
36. Shiloh Y, Andegeko Y, Tsarfaty I. In search of drug treatment for genetic defects in the DNA damage response: the example of ataxia-telangiectasia. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:295-305.
37. Stilgenbauer S, Schaffner C, Winkler D, Ott G, Leupolt E, Bentz M, Möller P, Müller-Hermelink HK, James MR, Lichter P, Döhner H. The ATM gene in the pathogenesis of mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:127-130.
38. Stoppa-Lyonnet D, Soulier J, Laugé A, Dastot H, Garand R, Sigaux F, Stern MH. Inactivation of the ATM gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood*. 1998;91:3920-3926.
39. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. 2000;9:1699-1710.
40. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:813-822.
41. Vorechovský I, Rasio D, Luo L, Monaco C, Hammarström L, Webster AD, Zaloudik J, Barbanti-Brodani G, James M, Russo G, Croce CM, Negrini M. The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res*. 1996;56:2726-2732.
42. Yuille MA, Coignet LJ, Abraham SM, Yaqub F, Luo L, Matutes E, Brito-Babapulle V, Vorechovský I, Dyer MJ, Catovsky D. ATM is usually rearranged in T-cell prolymphocytic leukaemia. *Oncogene*. 1998;16:789-796.
43. Zhang J, Lahti JM, Bruce A, He L, Parihar K, Fan C, Grenet J, Liu L, Kidd VJ, Cormier S, Tang D. Identification of an ataxia telangiectasia-mutated protein mediated surveillance system to regulate Bcl-2 overexpression. *Oncogene*. 2006;25:5601-5611.

CAPITOLO 2 – IMPORTANZA DEI RIARRAGIAMENTI GENICI Ig/TCR NELLA DIAGNOSI E PROGNOSI DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE NEL CANE

(tratto e modificato dalla Tesi di Dottorato della Dr.ssa Claudia Calzolari “Diagnosi e prognosi molecolare nel linfoma canino”, Dottorato di ricerca in Diagnostica collaterale in medicina interna veterinaria” ciclo XIX previa autorizzazione scritta dell’autrice; vedi NOTA SUL DIRITTO D’AUTORE)

2.1 GENETICA DELLE IMMUNOGLOBULINE

2.1.1 Introduzione

Fin dai primi anni settanta, quando diversi studi evidenziarono l’omologia esistente nelle regioni variabili delle catene pesanti delle immunoglobuline tra l’uomo ed alcune specie animali, è stata postulata l’ipotesi di una conservazione nella struttura proteica e di conseguenza nella struttura genica del sistema immunitario (Kehloe e Capra, 1972; Machalonis e Schulter, 1988; Richards e Nelson, 2000). Anche se gli studi si concentrarono soprattutto sulle specie da laboratorio è stata ampiamente documentata la notevole similitudine e la conservazione dell’organizzazione genetica tra le varie specie di mammiferi (Tutter e Ribbler, 1989). A fronte di queste conoscenze, tuttavia, l’organizzazione e la regolazione dei loci genici che codificano per i recettori antigene-specifici, risulta poco conosciuta in Medicina Veterinaria, probabilmente perché recente è l’acquisizione del genoma canino completo. Per i motivi suddetti, nei paragrafi successivi si farà riferimento alla bibliografia umana, e dove possibile, allo stato dell’arte nella medicina veterinaria con particolare riferimento alla specie canina, oggetto di questo studio.

2.1.2 Struttura molecolare delle Ig e del TCR

2.1.2.1 Immunoglobuline (Ig)

Le immunoglobuline sono proteine tetrameriche costituite da due catene polipeptidiche pesanti (H) identiche e da due catene polipeptidiche leggere (L) identiche (Lewin, 2006).

Interazioni non covalenti e ponti di-solfuro uniscono tra loro le due catene pesanti e ciascuna catena leggera alla catena pesante, generando la classica forma ad Y dell’immunoglobulina (Modiano, 2000).

Le catene leggere e quelle pesanti hanno in comune lo stesso tipo generale di organizzazione; ciascuna catena consiste di due regioni principali: la regione variabile (regione V) N-terminale e la regione costante (regione C) C-terminale (Lewin, 2006). Regioni corrispondenti delle catene pesanti e leggere si associano per generare domini che si ripetono più volte: 2 volte nelle catene leggere e 4 o 5 volte nelle catene pesanti. (Lewin, 2006; Morrison e Neuberger, 2001).

Il dominio localizzato all'estremità N-terminale delle catene pesanti e delle catene leggere è chiamato dominio variabile o dominio V poiché è costituito da una sequenza aminoacidica che differisce significativamente tra le singole immunoglobuline conferendo loro un'enorme versatilità; tale dominio è, in effetti, responsabile del riconoscimento dell'antigene (Lewin, 2006).

All'interno di ciascun dominio variabile (VH e VL) la massima variabilità non è distribuita uniformemente, ma è concentrata in tre regioni ipervariabili.

Si tratta di sei segmenti polipeptidici, tre appartenenti alla catena leggera, denominati L1, L2 e L3 e tre appartenenti alla catena pesante: H1, H2 ed H3 (Modiano, 2000).

Questi segmenti formano una superficie complementare rispetto alla struttura tridimensionale dell'antigene destinato a legarsi; per questo sono più comunemente chiamati regioni di complementarità o CDRs (*Complementarity Determining Regions*: CDR1, CDR2 e CDR3) (Modiano, 2000).

Tra le tre regioni ipervariabili CDR sono intercalate altre quattro regioni di minore variabilità aminoacidica denominate regioni strutturali o *Framework Regions* (FRI, FRII, FRIII e FRIV).

Nelle rimanenti regioni della catena leggera e della catena pesante, le sequenze aminoacidiche sono sostanzialmente identiche tra le immunoglobuline appartenenti alla stessa classe o isotipo; per questa ragione si parla di domini costanti (C).

Vi è un dominio costante della catena leggera (CL) e 3 domini costanti della catena pesante (CH1, CH2, CH3), numerati a partire dall'estremità aminica; le IgM e le IgE, che hanno catene pesanti più lunghe, presentano un ulteriore dominio CH4.

Le catene leggere possono essere di due tipi: lambda (λ) o kappa (κ).

Ogni classe immunoglobulinica può presentare catene leggere di tipo κ oppure di tipo λ ma le singole immunoglobuline non presentano mai contemporaneamente una catena di un tipo ed una di un altro (Lewin, 2006).

In condizioni normali, nell'uomo, l'espressione delle catene leggere κ e λ nelle Ig è in rapporto di equilibrio (Rezuke et al, 1997), mentre nel cane l'espressione di λ predomina su κ (Arun et al; 1996).

I linfociti B presentano sulla superficie cellulare un recettore, chiamato B-Cell Receptor (BCR), con le stesse caratteristiche strutturali delle immunoglobuline che verranno prodotte dalla cellula dopo il riconoscimento dell'antigene da parte di questo recettore (Jung et al, 2006). (Figura 2.1.2.I)

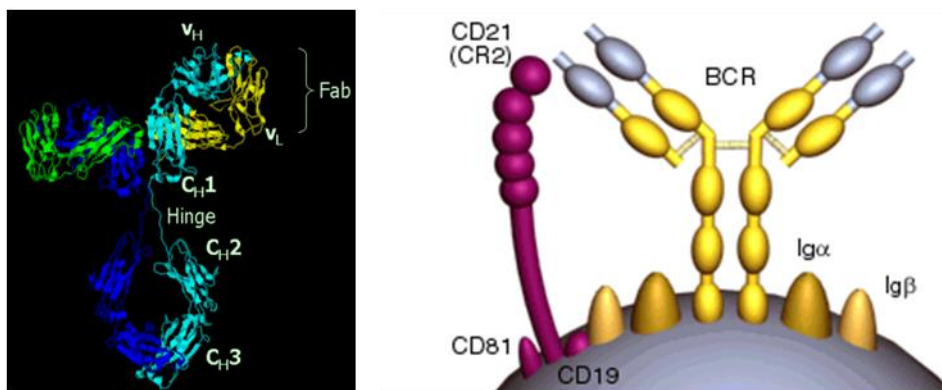


Figura 2.1.2.I: sx) Struttura cristallografica di un'immunoglobulina con la classica forma a Y; dx) Struttura tridimensionale del B-cell Receptor sulla superficie di un linfocita

2.1.2.2 TCR

Il TCR è un complesso proteico posto sulla superficie cellulare dei linfociti T dove, insieme ad altre strutture proteiche e co-recettori, costituisce il complesso recettoriale T (*T-cell receptor complex*). Il TCR è responsabile del riconoscimento dell'antigene ed ha una struttura molto simile a quella delle immunoglobuline: è costituito da due catene polipeptidiche legate da ponti di-zolfo, ciascuna caratterizzata da una porzione variabile, una porzione costante e da un sito di legame per l'antigene, dato dall'unione dei due domini a livello della regione variabile. Nella maggior parte dei linfociti T circolanti (95%) le due catene polipeptidiche sono rappresentate dalle catene α e β , nei rimanenti 5% dalle catene γ e δ (Medeiros e Carr, 1999; Lewin, 2006).

Il TCR è costituito da 3 domini: un dominio extracellulare rappresentato dalle regioni costanti e variabili delle due catene; un dominio intracellulare formato dalle due code delle catene e un dominio trans-membrana dove sono presenti aminoacidi carichi positivamente. (Figura 2.1.2.II).

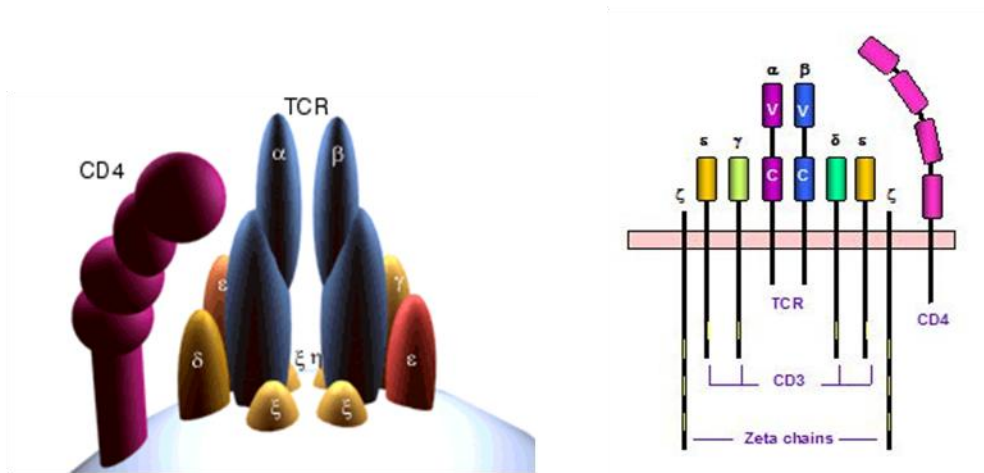


Figura 2.1.2.II: sx) Struttura tridimensionale del TCR sulla superficie di un linfocita T helper; dx) Domini del TCR. Evidenza dei domini transmembranari ed intramembranari e struttura del CD3 e del CD4

Come le immunoglobuline, il TCR presenta a livello del sito di riconoscimento per l'antigene, tre regioni ipervariabili, anch'esse denominate regioni di complementarità e caratterizzate da una particolare disposizione che rispecchia la loro funzione: le regioni CDR1 e CDR2 (una per ciascuna catena del TCR) hanno una localizzazione più periferica, mentre le due regioni CDR3, dotate di una maggiore variabilità antigenica, sono localizzate al centro della tasca di legame.

Il complesso recettoriale T è inoltre costituito da un complesso proteico di membrana chiamato CD3 (cd complesso di segnalazione). Tale struttura proteica viene attivata dal legame tra antigene e TCR e rappresenta il modo con cui il recettore segnala all'interno della cellula di aver riconosciuto l'antigene (Lewin, 2006). Il CD3 è costituito da quattro proteine di tre tipi diversi (γ , δ , ϵ) associate in eterodimeri ($\gamma\epsilon$ e $\delta\epsilon$) che interagiscono con il TCR a livello dei domini transmembranari tramite aminoacidi carichi negativamente. Il complesso CD3 è costituito anche da due catene chiamate η e ζ che si associano a formare l'omodimero ζ - ζ (nell'80% dei casi) o l'eterodimero η - ζ (nel 20% dei casi), contenuto interamente a livello intracitoplasmatico ed avente un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale. La proteina ζ svolge infatti il ruolo di proteina effettrice del complesso CD3 (Morrison e Neuberger, 2001; Lewin, 2006).

I co-recettori CD4 o CD8 completano il complesso recettoriale T. Tali strutture proteiche associate al TCR compaiono tardivamente durante lo sviluppo linfocitario ed identificano le due classi dei linfociti T: la molecola CD4 identifica le cellule T con funzione helper, il CD8, quelle con funzione citotossica. Il linfociti T helper coadiuvano sia la risposta immunitaria umorale che cellulo-mediata, riconoscendo l'antigene se presentato nel contesto di una molecola MHC di classe II. Il linfocita T citotossico o killer, richiede per il riconoscimento, la presentazione dell'antigene associato ad una proteina MHC di classe I.

Alcuni TCR $\gamma\delta$ non presentano i co-recettori CD4 o CD8 e sembrano poter legare l'antigene direttamente, senza presentazione da parte delle molecole MHC (Richards e Nelson, 2000).

2.1.3 Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR

È un assioma dei genetisti che la costituzione genetica di un organismo creata dalla combinazione di spermatozoi e uova, sia ereditata da tutte le cellule somatiche e non subisca dei cambiamenti di contenuto del DNA; in effetti, l'acquisizione dei diversi fenotipi delle cellule somatiche avviene attraverso un controllo differenziale dell'espressione genica (Lewin, 2006).

La struttura genetica delle cellule del sistema immunitario rappresenta una situazione del tutto eccezionale, in cui il contenuto del genoma cambia, quando la ricombinazione crea geni attivi nei linfociti.

L'organizzazione genetica del sistema immunitario è costituita da una serie di famiglie di geni correlati, detta superfamiglia di geni delle immunoglobuline (di cui fanno parte sia il TCR che le immunoglobuline), la cui struttura è molto simile: si tratta di geni V e di geni C che codificano per i domini V e C del polipeptide finale. Tale schema genetico viene detto schema della linea germinale, ed è proprio di tutte le cellule somatiche e della linea germinale dei linfociti. Nel contesto di tali famiglie, gene significa una sequenza di DNA che codifica per una parte distinta del polipeptide finale (Lewin, 2006); quindi i geni V codificano per le regioni variabili ed i geni C per le regioni costanti, ma nessuno dei due tipi di geni è espresso come unità indipendente. In effetti sebbene lo schema della linea germinale sia posseduto da tutte le cellule, soltanto nei linfociti, l'espressione genica avviene quando i geni V sono uniti ai geni C per creare un'unità di espressione che codifica un polipeptide, catena

pesante o leggera che sia. Tale processo di ricombinazione porta quindi ad un avvicinamento fisico tra due segmenti V e C, creando un unico gene attivo i cui esoni corrispondono esattamente ai domini funzionali della proteina. Per questo motivo, si parla di segmenti genici V e C piuttosto che di geni V e C. Esistono numerosi segmenti V che possono essere combinati con i segmenti C (inferiori di numero) per generare polipeptidi molto diversi tra loro.

2.1.3.1 Immunoglobuline

Nell'uomo, i geni per le immunoglobuline sono organizzati in tre loci separati: un locus genico codificante per tutti i tipi di catene pesanti (locus H) e due loci per le catene leggere (loci λ e κ), situati su tre cromosomi diversi (il locus H, sul cromosoma 14, il locus κ sul cromosoma 2 ed il locus λ , sul cromosoma 22) (Matsuda et al, 1998). Nel cane, il locus genico H è stato identificato sul cromosoma 8 (Tamura et al, 2006).

Nell'uomo e nel cane, il dominio variabile delle catene leggere (λ e κ) è codificato dal segmento genico V e da un ulteriore segmento genico chiamato J (da joining) che connette il segmento V al segmento C. Per la catena pesante, la regione variabile viene codificata da tre segmenti genici: oltre ai segmenti genici V e J (denominati VH e JH per distinguerli da quelli della catena leggera VL e JL), è presente un terzo segmento chiamato DH (da Diversity), interposto a VH e JH (Modiano, 2000; Lewin, 2006).

Ad una distanza 3' variabile rispetto ai segmenti genici V sono posti i geni delle regioni costanti (C); negli animali, il locus della catena leggera κ ha un singolo gene C, λ possiede da 3 a 6 geni C, mentre i geni per le catene pesanti dei diversi isotipi (IgM, IgD, IgG o IgE) sono organizzati in una serie di tandem il cui ordine è diverso in ogni specie animale (Modiano, 2000).

I segmenti genici V delle tre famiglie delle immunoglobuline (λ , κ , e H,) hanno un'organizzazione simile: il primo esone (chiamato esone leader) codifica per la cosiddetta sequenza segnale (peptide leader) che è coinvolta nel trasferimento della catena polipeptidica tradotta a livello ribosomiale, nel lume del reticolo endoplasmatico. Il secondo esone del segmento V, separato dal primo da un breve introne, codifica per la maggior parte della regione variabile. La parte rimanente della regione variabile è codificata dal segmento D (solo nella famiglia H) e dal segmento J (in tutte e tre le famiglie); infine, il segmento J è separato tramite sequenze introniche dal segmento C, terzo esone del gene attivo (Lewin, 2006) (Figura 2.1.3.I).

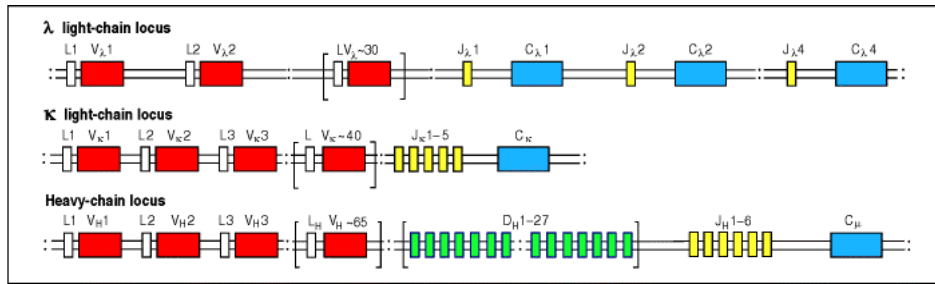


Figura 2.1.3.I.: Organizzazione dei loci delle catene leggere e della catena pesante delle immunoglobuline umane: Da Immunobiology. Garland publishing 2001

2.1.3.2 TCR

L'organizzazione dei geni TCR prevede 4 loci, ognuno dei quali codifica per una singola catena polipeptidica α , β , γ o δ ; i loci α e δ sono localizzati sul cromosoma 14, mentre i loci β e γ , sul cromosoma 7 (Wilson et al, 2001). Nel cane è stato recentemente identificato il locus genico TCR γ , localizzato sul cromosoma 18 (Yagihara et al, 2007). Tali loci, mostrano una notevole somiglianza con quelli delle immunoglobuline. Il locus TCR α come il locus Ig κ , è costituito da segmenti V separati da un gruppo di segmenti J che precede un singolo segmento C (Lewin, 2006). L'organizzazione del locus TCR β assomiglia a quella del locus H: i segmenti V sono seguiti da due complessi DJC chiamati D1J1D1 e D2J2D2. Ogni complesso contiene un segmento D ed un segmento C, ma, il primo gruppo contiene 6 segmenti genici J (JB1 group) ed il secondo ne contiene 7 (JB2 group) (Rezuke et al, 1997). (Figura 2.1.3.II).

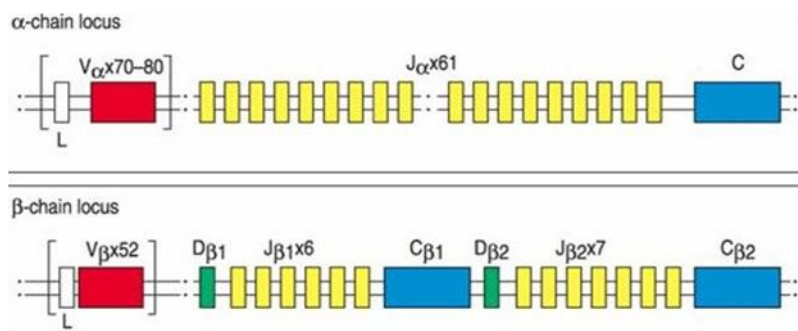


Figura 2.1.3.II: Organizzazione dei loci genici del TCR α e β nell'uomo. Da Immunobiology, Garland Publishing 2001.

Il locus TCR γ , come il locus Ig λ delle immunoglobuline ha un'organizzazione più semplice in cui i segmenti genici V sono separati da una serie di segmenti J-C.

Il locus genico del TCR δ rappresenta un caso particolare: i segmenti variabili δ sono infatti localizzati tra i segmenti genici V e J del TCR α . (Figura 2.1.3.III).

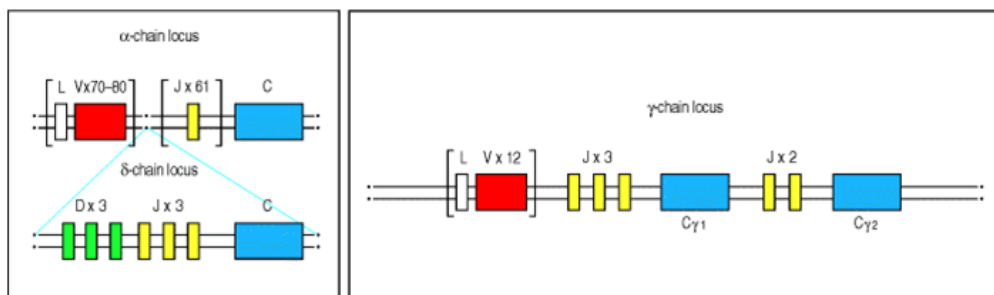


Figura 2.1.3.III: Organizzazione dei loci genici del TCR γ e δ nell'uomo. Da Immunobiology, Garland Publishing 2001

2.1.4 La diversità immunitaria

Lo studio delle caratteristiche strutturali e funzionali dei geni delle immunoglobuline e del TCR hanno permesso di formulare diverse ipotesi sull'acquisizione della diversità immunitaria. In particolare si ritiene che quattro meccanismi fondamentali siano in grado di spiegare l'enorme potenzialità di riconoscimento antigenico del sistema immunitario: la ricombinazione somatica, la diversità combinatoria, la diversità giunzionale e l'ipermutazione somatica (Lewin, 2006).

2.1.4.1 Ricombinazione somatica (Riarrangiamento V(D)J)

La ricombinazione somatica è un processo di ricombinazione del DNA genomico che tipicamente avviene nei linfociti T e B. Come già precedentemente esposto, la possibilità di ricombinare il DNA e creare nuovi geni attivi è prerogativa del sistema immunitario nel quale, durante lo sviluppo dei linfociti, i segmenti genici riarrangiano in maniera sequenziale per formare gli esoni della regione variabile. Le modalità con cui avvengono i riarrangiamenti genici sono diversi all'interno dei diversi loci delle immunoglobuline e del TCR, pur presentando alcune somiglianze che rispecchiano quelle strutturali prima descritte.

2.1.4.1a Immunoglobuline

Il processo di ricombinazione somatica nelle catene leggere inizia con l'unione di un segmento genico V ad un segmento genico J generando la sequenza VJ-C. Durante questa ricombinazione si generano 3 esoni, separati da altrettanti introni: gli esoni L, V e l'esone C.

Tutto il tratto di DNA viene trascritto in un pre-RNA messaggero (o trascritto primario) in cui sono ancora presenti le sequenze introniche. La successiva processazione porta all'eliminazione mediante splicing degli introni situati tra L e VJ e tra il complesso VJ e il segmento C, dando origine ad un RNA messaggero che viene infine tradotto con produzione della catena polipeptidica.

Nel locus H, il processo di ricombinazione somatica che genera una completa regione variabile si realizza in due eventi separati.

Nel linfocita pro-B precoce si ha la prima ricombinazione che porta al congiungimento di uno dei segmenti DH con uno dei segmenti JH, con la contemporanea delezione del tratto di DNA interposto (riarrangiamento DJ).

Nel linfocita pro-B tardivo, uno dei numerosi segmenti genici V si congiunge al complesso DJ precedentemente formato per dare origine all'esone completo della regione variabile della catena pesante (riarrangiamento VDJ).

Durante la processazione del trascritto primario di RNA, gli esoni della regione C e la sequenza leader si uniscono al complesso VDJ in seguito all'eliminazione degli introni mediante splicing.

Si forma quindi un mRNA che infine viene tradotto con produzione della catena polipeptidica di una catena pesante.

Dopo la traduzione si verifica la rimozione della sequenza leader e la formazione dei ponti disolfuro che uniscono le catene polipeptidiche. In posizione 3' rispetto all'RNA di ciascuna regione costante (CH) vi sono dei siti di poliadenilazione (uno per le μ , uno per le σ e così per le altre classi): soltanto in uno di questi, in base all'isotipo che deve essere espresso, vengono aggiunti numerosi nucleotidi di adenina, chiamati "code di poli-A" che guidano lo splicing; così, ad esempio, se viene poliadenilato il sito in 3' rispetto alla C ϵ viene espressa la IgE e il tratto di RNA tra il complesso VDJ e il C ϵ viene eliminato grazie allo splicing. La traduzione dell'mRNA maturo porta alla produzione di una catena μ

funzionante; questa impedisce il riarrangiamento del locus della catena pesante sull'altro cromosoma; tale fenomeno prende il nome di esclusione allelica (Jung et al, 2006).

Se, tuttavia, per qualsiasi motivo non si produce una catena pesante funzionante, si attua il riarrangiamento sull'altro allele; infine, se anche questo porta ad una catena pesante abortiva, si ha la morte della cellula per apoptosi (Jung et al, 2006).

La ricombinazione del DNA nei loci κ e λ per la produzione delle catene leggere inizia soltanto dopo che è avvenuto il riarrangiamento e la successiva espressione dei geni della catena pesante.

Il locus κ è il primo ad andare incontro al processo di ricombinazione e la produzione di una catena leggera κ funzionale blocca il riarrangiamento a livello del locus λ , poiché ogni linfocita produce un solo tipo di catena leggera (fenomeno dell'esclusione allelica) (Figura 2.1.4.I).

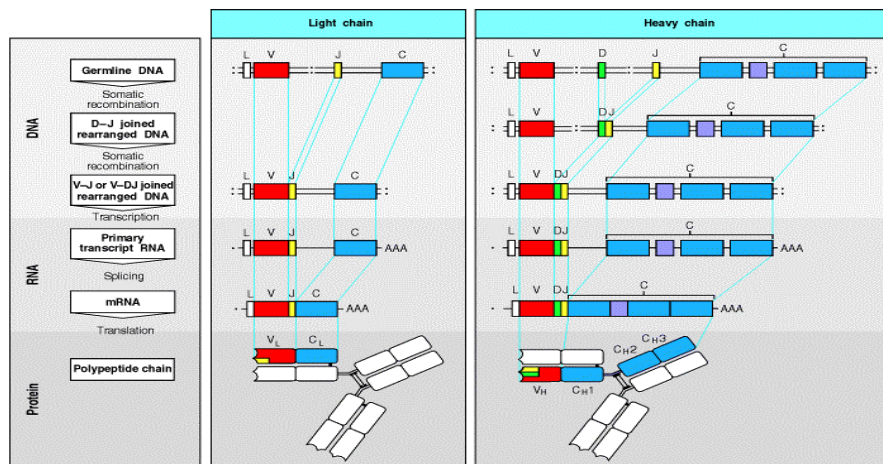


Figura 2.1.4.I: I geni delle regioni variabili e costanti delle immunoglobuline sono prodotti attraverso il processo di ricombinazione somatica dei segmenti genici Da Immunobiology, Garland Publishing 2001

2.1.4.1b TCR

Il riarrangiamento genico del TCR avviene nel timo e segue meccanismi simili a quelli precedentemente descritti per le immunoglobuline.

La ricombinazione dei geni del TCR α/β origina nel locus genico β . Inizialmente, si verifica un congiungimento tra i segmenti $D\beta$ e $J\beta$ che determina la formazione di un unico segmento genico $DJ\beta$ con eliminazione del DNA interposto. Successivamente si verifica il riarrangiamento tra $DJ\beta$ e uno dei segmenti $V\beta$ creando il segmento genico $VDJ\beta$ che codifica per la regione variabile della catena β .

Infine VDJ β si congiunge con il segmento C β 1 e, se tale riarrangiamento risulta produttivo, la catena β viene sintetizzata (Lewin, 2006).

Il riarrangiamento dei geni della catena α è simile a quello della catena β , con la differenza che in questo caso mancano i segmenti genici D. Una volta prodotta, la catena α viene espressa sulla membrana insieme alla catena β ed il linfocita T è pronto per la selezione timica. Ogni cellula T può ricombinare in modo produttivo una sola catena β a causa del fenomeno di esclusione allelica, presente anche nel TCR; tale esclusione non avviene per le catene α che possono subire riarrangiamenti multipli (Jung et al, 2006).

Come già detto in precedenza, il locus δ si trova intercalato tra i segmenti genici V e J della catena α e a causa della sua localizzazione, ogni riarrangiamento dei segmenti genici del TCR α induce una delezione dei geni δ , che vengono rimossi in due tappe durante il processo di ricombinazione di V α con J α . Questo processo di esclusione porta inevitabilmente all'impossibilità di co-espressione α - δ ; l'attivazione del locus δ determina la ricombinazione VDJ, anche se è possibile l'incorporazione di entrambi i segmenti D e la creazione di un riarrangiamento VDDJ (Lewin, 2006).

2.1.4.2 Diversità combinatoria

Nello schema genetico della linea germinale di ciascun individuo, sono presenti molteplici copie dei segmenti genici V, D e J che codificano per la regione variabile delle immunoglobuline e del TCR: la selezione e la successiva combinazione random di questi segmenti contribuisce significativamente alla grande diversità delle regioni variabili delle immunoglobuline.

Il numero massimo di combinazioni possibili per ogni locus genico è dato dal prodotto del numero dei segmenti genici V, J e D (per il locus H e i loci TCR β e δ) o V e J (per i loci delle catene leggere e il TCR α e γ). Tuttavia, il grado di diversità combinatoria che si può generare può essere molto minore rispetto a quello atteso, perché non tutti i segmenti genici sono scelti con uguale frequenza e non tutte le possibili combinazioni danno origine a polipeptidi funzionali. Esistono segmenti genici non funzionali chiamati pseudogeni e numerosi riarrangiamenti che incorporano uno pseudogene possono risultare non produttivi. Ad esempio nell'uomo, sono stati identificati per il locus H, 123 segmenti V, dei quali

soltanto 39, risultano funzionali ed in grado di determinare riarrangiamenti produttivi (Matsuda et al, 1998).

Tuttavia, il locus H possiede oltre ai segmenti V, 27 segmenti D e 4 segmenti J, che ricombinandosi possono dare origine a circa 4000 combinazioni.

Le possibilità di ricombinazione delle catene leggere sono notevolmente inferiori rispetto al locus H: la catena k possiede 40 segmenti genici V e 5 segmenti genici J (40 X 5), per un totale di circa 200 ricombinazioni, per la catena λ sono invece possibili circa 120 combinazioni (30 x 4) (Lewin, 2006).

Sebbene la funzione delle immunoglobuline sia determinata dall'azione complementare delle catene pesanti e delle catene leggere, per quanto prima esposto, il maggior contributo alla generazione della diversità e della specificità delle immunoglobuline, viene dato proprio dal locus H (Matsuda et al, 1998).

Inoltre ogni possibile catena pesante prodotta si può legare ad ogni possibile catena leggera; questo permette di aumentare ulteriormente la diversità combinatoria della regione variabile delle Ig: $320 (200 + 120) \times 4000 = 128000$ combinazioni.

Recentemente è stato proposto uno schema di organizzazione del TCR γ nel cane: secondo Yagihara e collaboratori (2007), il locus TCR γ , posto sul cromosoma 18, sarebbe composto da 4 segmenti V, preceduti da quattro sequenze L, 6 segmenti J e 4 segmenti C.

2.1.4.3 Diversità giunzionale

La ricombinazione dei geni delle Ig e del TCR, è caratterizzata da un riarrangiamento fisico di sequenze che comporta rotture ed unioni che devono avvenire secondo precisi schemi garantiti da meccanismi strettamente regolati (Lewin, 2006).

Il riarrangiamento VDJ è guidato dall'attività coordinata delle ricombinasi, un complesso enzimatico che contiene i prodotti proteici dei geni RAG-1 e RAG-2 (*Recombination Activating Genes*), in grado di riconoscere quale segmento ricombinare grazie a sequenze conservate non codificanti di DNA dette sequenze consenso o *recombination signal sequences* (RSS) (Lewin, 2004).

Ogni RSS è costituita da una sequenza altamente conservata di sette nucleotidi chiamata eptamero (localizzata sempre accanto alla sequenza codificante), seguita da una sequenza non conservata di 12 o

23 nucleotidi denominata *spacer*, a sua volta seguita da un'altra sequenza conservata di nove nucleotidi, detta nonamero (Jung et al, 2006) (Figura 2.1.4.3 I).

Nel locus κ , i segmenti V sono seguiti dalla sequenza eptamerica e nonamerica separate fra loro da uno *spacer* di 23 paia di basi; nei segmenti J, lo *spacer* tra le due sequenze conservate è costituito da 12 nucleotidi (Figura 2.1.4.3 I).

Nel locus λ , la situazione è simile, ma la spaziatura tra eptamero e nonamero è invertita: 12 nucleotidi per i segmenti V e 23 per i segmenti J. Nel caso del locus H, la situazione è più complessa: nei segmenti V l'eptamero e il nonamero sono spazati da 23 paia di basi, nei segmenti J le due sequenze conservate sono spaziate da 23 paia di basi, mentre i segmenti D presentano le due sequenze conservate separate da 12 paia di basi sia in direzione 5' che in 3'. Nella ricombinazione è generalmente seguita la "regola del 12/23", che prevede il riarrangiamento di due segmenti genici solo se uno ha uno *spacer* di 12 nucleotidi e l'altro di 23.

Questo spiega la sequenza nella ricombinazione delle catene pesanti: ciascun segmento VH e JH possiede uno *spacer* di 23 nucleotidi e non può quindi essere ricombinato; prima è necessaria la ricombinazione tra il segmento V e il segmento D o tra il segmento D e il segmento J. Le ricombinazioni fra i segmenti V e J sono invece consentite nei loci κ e λ , dove i segmenti conservati presentano sequenze spaziatrici di 12 e 23 paia di basi.

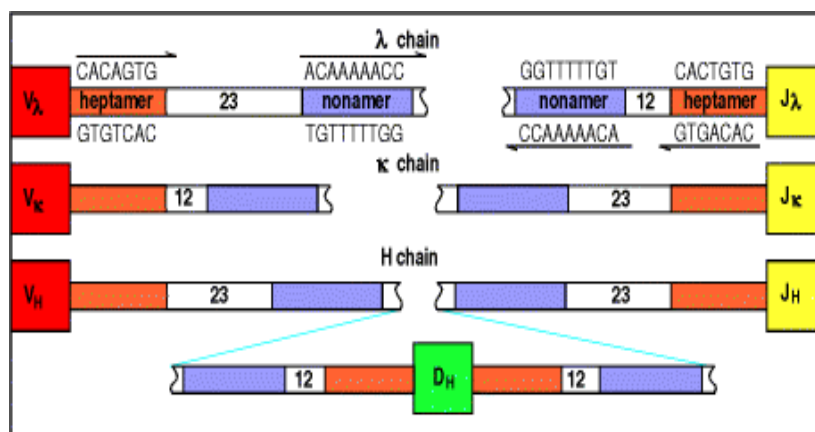


Figura 2.1.4.3: Disposizione delle sequenze conservate (eptamero e nonamero) e degli *spacer* tra i segmenti genici che codificano le regioni variabili delle catene pesanti (H) e delle catene leggere κ e λ . Da Immunobiology, Garland Publishing, 2001

Le sequenze spaziatrici hanno quindi lo scopo di impedire ricombinazioni non corrette, ad esempio, tra segmenti genici dello stesso tipo o nel caso del locus H, l'eventuale riarrangiamento diretto tra i segmenti V e J.

Il processo di ricombinazione avviene quando la ricombinasi RAG1, riconosce ed allinea le sequenze consenso (RSS) appropriate, reclutando RAG2 nel complesso: il nonamero fornisce il sito di riconoscimento iniziale mentre l'eptamero dirige il sito di taglio (Lewin, 2006). Il complesso enzimatico così formato, incide il filamento di DNA in direzione 5' rispetto alla sequenza eptamerica (l'estremità contigua alla sequenza codificante), producendo una rottura a singolo filamento (*nick*). Tale incisione determina l'esposizione di un gruppo OH- terminale in direzione 3' e P-terminale in direzione 5': il gruppo OH, attacca il gruppo fosfato nell'altro filamento, creando una forcina al terminale della sequenza codificante, in cui l'estremità 3' di un filamento è unita all'estremità 5' dell'altro filamento di DNA, determinando perciò una rottura a doppia elica (*Double StrandBreak*, DSB). Il DSB, determina il rilascio di un intero frammento di DNA, contenente gli eptameri, posto tra le due sequenze codificanti: le estremità di tale frammento vengono denominate estremità segnale, mentre quelle prodotte sulle sequenze codificanti (V, J, o D), vengono chiamate estremità codificanti. Le forcine alle estremità codificanti, forniscono il substrato dello stadio successivo della reazione: un'incisione a singolo filamento, accanto alla forcina, che determina un disaccoppiamento delle estremità codificanti con sporgenza di un singolo filamento. Tale sporgenza, viene eliminata con sintesi di nucleotidi complementari (nucleotidi palindromici, P), che ricostituiscono il doppio filamento (duplex). Durante questo processo di rifinitura delle estremità codificanti, vengono anche aggiunte alcune basi extra, apparentemente con sequenze casuali (nucleotidi N), ad opera dell'enzima TdT (deossinucleotidil transferasi terminale) (Figura 2.1.4.3 II).. Gli N-nucleotidi vengono aggiunti in special modo nelle giunzioni V-D e D-J del locus della catena pesante e sono meno comuni nei geni della catena leggera, poiché la TdT viene espressa solo per un breve periodo nello sviluppo B-cellulare durante il riarrangiamento genico della catena pesante, che si verifica prima di quello della catena leggera. L'ultima fase della reazione è l'unione delle estremità codificanti rifinite, che frequentemente, determina anche l'unione delle estremità segnale del frammento generato dalla rottura della doppia elica, formando una molecola circolare (Figura 2.1.4.3 II)..

Per quanto precedentemente esposto, i meccanismi enzimatici coinvolti nella rottura e nella successiva riunione del DNA assicurano che una giunzione codificante possa avere una sequenza diversa da quella che sarebbe prevista con un'unione diretta delle estremità V,D e J. I cambiamenti di sequenza a livello giunzionale rendono possibile un'estesa diversità di questo sito (cd diversità giunzionale), che codifica per la regione CDR3, coinvolta nel riconoscimento antigenico: il massimo della diversità è quindi generato nel sito che entra in contatto con l'antigene bersaglio (Lewin, 2006). Naturalmente, i cambiamenti nel numero di coppie di basi che avvengono nelle giunzioni codificanti, influenzano il modulo di lettura della sequenza poiché il processo di unione sembra essere del tutto casuale: soltanto un terzo delle sequenze unite mantiene il modulo di lettura corretto. Nei restanti casi, la presenza di un segmento fuori fase, sposta il modulo di lettura (*frame-shift*) determinando una conclusione prematura della traduzione (ricombinazione non produttiva) (Lewin, 2006, Morrison e Neuberger, 2001).

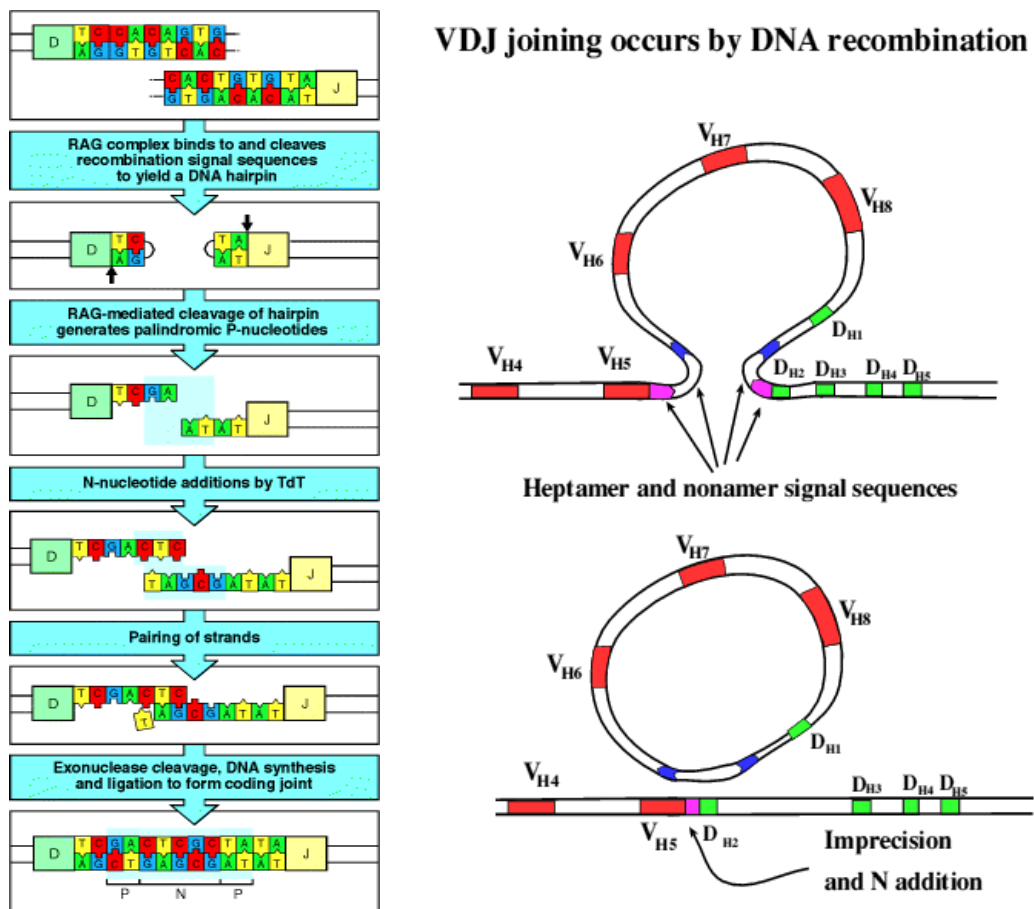


Figura 2.1.4.3 II: sx) Diversità giunzionale. Da Immunobiology, Garland Publishing, 2001. dx) Azione delle ricombinasi sulle estremità codificanti e segnale. Da Holmes et al, Cambridge University, 2004.

2.1.4.3 Diversità somatica (Maturazione dell'affinità)

Negli organi linfoidi periferici i linfociti B maturi (centrociti o cellule del centro germinale) subiscono un'ulteriore diversificazione nel sito di riconoscimento antigenico tramite il processo di ipermutazione somatica.

Dopo l'incontro con l'antigene e la stimolazione del linfocita B da parte di un linfocita T helper, si generano delle mutazioni puntiformi nelle regioni geniche codificanti per i domini variabili, che determinano un aumento della variabilità in tutte e 3 le CDR di entrambe le catene immunoglobuliniche.

Poiché queste mutazioni avvengono in maniera casuale, solo alcune di esse sono in grado di aumentare l'affinità del recettore per l'antigene: la maggior parte delle mutazioni inducono una diminuzione o addirittura possono prevenire completamente l'espressione delle Ig attraverso la creazione di "codoni stop" (Harris et al, 2001).

Pertanto, soltanto i linfociti del centro germinale che subiscono mutazioni in grado di aumentare l'affinità del loro recettore per l'antigene vengono selezionati positivamente. Tutti gli altri (più del 90%) vanno incontro a morte cellulare per apoptosi (Harris et al, 2001).

Questo fenomeno è noto come maturazione dell'affinità e avviene soltanto nel corso delle risposte anticorpali ad antigeni proteici, dipendenti dalla cooperazione dei linfociti T-helper (Wilson et al, 2001).

A differenza di quanto accade per i linfociti B, la diversità recettoriale T non è aumentata da meccanismi di ipermutazione somatica. Diverse ipotesi sono state considerate per spiegare tale differenza: la prima ipotesi, è che l'assenza di tale processo sarebbe necessaria per evitare un'eccessiva variabilità del recettore con possibile comparsa di cloni linfocitari mutanti diretti contro strutture "self". Questa restrizione non si applica alle cellule B poiché affinché si realizzi il processo di ipermutazione somatica è necessaria la stimolazione del linfocita B da parte di un linfocita T helper. Anche se si creassero cloni linfocitari B mutanti verso bersagli "self", questi non sarebbero comunque in grado di produrre autoanticorpi, se non in seguito alla stimolazione da parte di un linfocita T helper allo stesso modo attivato da autoantigeni (Lewin, 2006).

Un'altra ipotesi è che un eventuale processo di ipermutazione somatica possa determinare una perdita della capacità di riconoscimento del complesso MHC da parte dei linfociti T e di conseguenza, la perdita di ogni capacità di indurre una risposta immunitaria (Wilson et al, 2001, Lewin, 2004).

2.2 DIAGNOSI E PROGnosi MOLECOLARI DELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE

2.2.1 Introduzione

Nel seguente capitolo verranno descritte le principali tecniche molecolari ad oggi utilizzate in medicina umana nella diagnosi e nella prognosi delle neoplasie linfoproliferative, con particolare riferimento alla PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tecnica utilizzata nella fase sperimentale di questo lavoro. Attraverso le applicazioni della biologia molecolare nelle neoplasie linfoidi, verranno descritti i concetti di clonalità, traslocazione cromosomica e malattia residua minima (MRM).

2.2.2 Utilizzo delle tecniche molecolari nella diagnosi delle neoplasie linfoproliferative

In Medicina Umana, la diagnosi delle neoplasie linfoproliferative, prevede un approccio multiparametrico, in cui accanto alle tradizionali valutazioni cliniche e citomorfologiche, vengono applicate speciali tecniche di cito/istochimica, studi immunopatologici e metodiche di genetica molecolare, al fine di ottenere precise indicazioni patogenetiche e prognostiche (Rezuke et al,1997; Harris, 2001; Kocjan, 2005).

Le neoplasie linfoidi, pongono, talvolta, il clinico ed il patologo di fronte ad un dilemma diagnostico, soprattutto nello stadio iniziale della patologia, quando la distinzione tra una neoplasia incipiente ed uno stato di iperplasia reattiva può risultare estremamente problematica (Vernau, 2004). Inoltre, l'utilizzo preferenziale di tecniche poco invasive nella fase iniziale dei protocolli diagnostici clinici, (aspirazione con ago sottile o biopsie guidate), determina spesso la presenza di materiale diagnostico scarso per quantità e/o qualità, creando un'ulteriore difficoltà di interpretazione (Kocjan, 2005). Un'altra considerazione, riguarda la possibilità che la citomorfologia, sebbene in grado di diagnosticare e classificare buona parte dei linfomi, risulti in alcuni casi del tutto insufficiente: è quanto avviene ad esempio in corso di proliferazioni linfocitarie mature, nelle quali la distinzione tra una linfocitosi ed una neoplasia linfoide indolente spesso non è possibile (Ben-Ezra et al, 2000; Vernau, 2004). Gli errori diagnostici comunemente associati alla citologia convenzionale comprendono anche la difficoltà di differenziare le diverse varianti di linfoma ed i linfomi dalle neoplasie

metastatizzanti tipo “*round cells*” come neuroblastomi periferici e carcinomi a piccole cellule (Kocjan, 2005). Benché l’avvento delle tecniche immunopatologiche abbia in gran parte risolto tali problemi, l’applicazione di queste metodiche a piccole quantità di tessuto, non è sempre possibile. Inoltre, la diversità antigenica di questo eterogeneo gruppo di neoplasie, non permette in alcuni casi la diagnosi certa (Rezuke et al, 1997). Il miglioramento apportato dall’immunocito/istochimica al protocollo diagnostico delle neoplasie linfoproliferative è tuttavia indubbio, considerando la possibilità di identificare tramite queste tecniche la linea di origine della neoplasia che, come noto, presenta una notevole valenza prognostica (Rezuke et al, 1997). In tutti quei casi in cui la morfologia e le tecniche immunopatologiche non risultano esaustive dal punto di vista diagnostico, è necessario l’utilizzo di tecniche molecolari quali ad esempio il *Southern Blotting* (SB) o la PCR, che sono in grado di identificare una neoplasia linfoide in modo più oggettivo ed accurato (Vernau e Moore, 1999, Medeiros e Carr, 1999).

L’utilizzo delle tecniche di biologia molecolare, non è semplicemente limitato alla diagnosi delle neoplasie linfoidi, ma contribuisce in modo significativo alla comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di queste neoplasie, permettendo al contempo di rifinirne i criteri classificativi (l’identificazione di particolari mutazioni genetiche associate a diversi tipi di linfoma, ha contribuito alla nuova classificazione WHO delle neoplasie linfoproliferative) (Harris et al, 2000).

In conclusione, l’utilizzo delle tecniche molecolari nel protocollo di lavoro delle neoplasie linfoidi è diventato un mezzo indispensabile nella diagnosi e nella stadiazione delle neoplasie linfoproliferative: gli obiettivi più importanti della diagnosi molecolare di linfoma sono la ricerca della clonalità e l’identificazione delle traslocazioni cromosomiche (Kocjan, 2005).

2.2.3 Ricerca della clonalità

Una neoplasia è costituita da una popolazione cellulare con identiche caratteristiche, derivata dalla proliferazione di un unico precursore comune e per questo definita clonale; pertanto, tutte le cellule tumorali contengono un’identica sequenza di DNA, che può essere utilizzata come marker specifico di neoplasia (Rezuke et al, 1997; Lana et al, 2006).

La clonalità nelle neoplasie linfoidi viene definita con diversi criteri: può essere suggerita dall'osservazione di una popolazione cellulare monomorfa o identificata con metodiche immunopatologiche per la presenza di un determinante antigenico monoclonale; essa è tuttavia determinata in modo più preciso ed accurato individuando la presenza di un riarrangiamento genico clonale dei recettori antigene-specifici o l'esistenza di alterazioni cromosomiche ricorrenti, tramite metodiche di biologia molecolare (Rezuke et al, 1997).

Le tecniche molecolari sono in grado di diagnosticare una neoplasia linfoide attraverso la dimostrazione della clonalità; tuttavia, essa deve essere sempre e comunque interpretata nel complesso dei riscontri clinici, morfologici ed immunofenotipici (Vernau e Moore, 1999). La contestualizzazione della clonalità è necessaria poiché, seppur fortemente indicativa di neoplasia, non è in grado singolarmente di dimostrare l'ipotesi neoplastica, né implica necessariamente la malignità: in altre parole, se la neoplasia è sempre clonale, l'inverso non è sempre vero (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al, 2003). Esistono patologie infiammatorie o infezioni virali acute, accertate sia nell'uomo che nel cane, che possono indurre gammopatie monoclonali o alcune malattie linfoproliferative benigne dell'uomo che possono risultare clonali (ad esempio la linfadenopatia angioimmunoblastica, disordini linfoproliferativi AIDS-correlati, la linfocitosi a grandi granuli) (Burnett et al, 2003).

La ricerca della clonalità con metodiche di genetica molecolare trova la sua primaria applicazione in tutti quei casi in cui essa non può essere identificata con le tecniche tradizionali; la sensibilità di tali metodiche permette inoltre di riconoscere la presenza di una popolazione clonale anche quando questa rappresenta soltanto l'1% della totalità delle cellule (Rezuke et al, 1997), consentendo la possibilità di monitoraggio molecolare della neoplasia durante il trattamento antitumorale (Burnett et al, 2003).

2.2.4. Traslocazioni cromosomiche

I linfomi, analogamente alla maggior parte delle neoplasie, sono caratterizzati da lesioni genetiche in grado di determinare l'attivazione di proto-oncogeni o l'inattivazione di geni oncosoppressori. I proto-oncogeni sono geni normalmente coinvolti nella regolazione dei processi di crescita e proliferazione cellulare, con la potenzialità di contribuire alla trasformazione neoplastica, quando strutturalmente o

funzionalmente alterati. (Rezuke et al, 1997). L'avvento delle tecniche di genetica molecolare ha permesso di identificare nelle neoplasie linfoidi, molteplici lesioni genetiche, integralmente coinvolte nella loro patogenesi. La maggior parte delle anomalie genetiche identificate, sono ascrivibili a traslocazioni cromosomiche che determinano la trasposizione di un proto-oncogene da un cromosoma all'altro, inducendone l'attivazione (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001). Una traslocazione cromosomica, è in grado di attivare un proto-oncogene anche attraverso la formazione di un trascritto di fusione, derivante dalla combinazione di due geni, localizzati nei due punti di rottura dei cromosomi coinvolti nella trasposizione (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999; Harris et al, 2001). Le traslocazioni cromosomiche determinano delle deregolazioni trascrizionali di proto-oncogeni, attraverso due meccanismi: la deregolazione omotopica, che si verifica quando vi è un'alterazione della regolazione di un proto-oncogene che viene fisiologicamente espresso dalla cellula e la deregolazione eterotopica, che si riferisce all'attivazione di un proto-oncogene che normalmente non viene espresso dalla cellula (Harris et al, 2001).

Dal punto di vista diagnostico, la scoperta di traslocazioni cromosomiche specifiche in determinati tipi di linfoma, ha permesso di complementare e raffinare i criteri classificativi dell'istologia tradizionale, portando all'identificazione di specifici tipi nosologici in base alla presenza o l'assenza di una determinata lesione genetica. Tale considerazione è soprattutto valida per i linfomi non-Hodgkin ed in particolar modo per i B- diffusi a grandi cellule (DLBCL) un gruppo di neoplasie, eterogeneo dal punto di vista clinico e prognostico in cui i criteri morfologici non sono sufficienti a stabilire l'esatta entità patologica (De Paepe e Wolf-Peeters, 2007).

Quattro esempi di proto-oncogeni identificati nelle neoplasie linfoidi e coinvolti nella loro patogenesi sono il bcl-2 (linfoma follicolare), il bcl-1 (linfoma mantellare) il c-MYC (linfoma di Burkitt) ed il PAX-5 (linfoma linfoplasmacitico) (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001; Kocjan, 2005; Bende et al, 2007).

A differenza della maggior parte dei proto-oncogeni, il bcl-2 non regola direttamente la proliferazione cellulare, bensì è preposto al controllo della morte cellulare programmata o apoptosi (Harris et al, 2001). Nell'ambito dei linfomi follicolari, la sua attivazione avviene tramite la traslocazione t(14;18) (q32;q21), che determina la giustapposizione del gene bcl-2, (cromosoma 18), al locus H (cromosoma 14) cui consegue la deregolazione trascrizionale omotopica di tale gene: l'iperpressione di bcl-2 così

ottenuta protegge la cellula neoplastica dall'apoptosi. La traslocazione t(14;18) è stata segnalata in oltre l'80% dei casi di linfoma follicolare umano (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001).

La traslocazione t(11;14)(q13;q32) associata al linfoma mantellare determina la giustapposizione del proto-oncogene bcl-1 (anche conosciuto come CCND-1), posto sul cromosoma 11, al segmento genico J del locus H nel cromosoma 14. Tale trasposizione determina la deregolazione eterotopica del gene bcl-1 che codifica per la Ciclina D1, coinvolta nella progressione dalla fase G1 alla fase S, promovendo di conseguenza la proliferazione cellulare (Harris et al 2001).

Le traslocazioni che coinvolgono l'oncogene c-MYC, sono presenti nel 100% dei linfomi di Burkitt AIDS-correlati (Harris et al, 2001). Il 75% delle traslocazioni cromosomiche che si manifestano in questa patologia sono di tipo t(8;14)(q24;q32), e determinano lo spostamento del locus c-MYC (cromosoma 8), verso la porzione distale del locus H, sul cromosoma 14 (Busch et al, 2004). La conseguenza più comune di tale trasposizione è la deregolazione omotopica del gene c-MYC che codifica per una fosfoproteina nucleare, deposta al controllo della crescita e della proliferazione cellulare (Harris et al, 2001). I siti di rottura cromosomica di c-MYC e dei geni del locus H, sono specifici per ogni paziente; di conseguenza la traslocazione c-MYC/H, rappresenta un marker molecolare paziente-specifico (Busch et al, 2004).

Un'ulteriore esempio di marker molecolare di linfoma è la traslocazione t(9;14)(q13;q32), riscontrata nel 50% dei linfomi linfoplasmacitici ed in particolar modo associata allo sviluppo della Macroglobulinemia di Waldenström. Tale traslocazione coinvolge oltre al locus H, il gene PAX-5 che codifica per un fattore trascrizionale specifico per il controllo della proliferazione B-cellulare. La trasposizione determinerebbe la deregolazione omotopica di tale gene contribuendo alla linfomagenesi (Harris et al, 2001).

Le traslocazioni cromosomiche in corso di linfoma, sono diventate importanti marcatori genetici di neoplasia che non hanno soltanto importanti implicazioni diagnostiche, ma possono essere utilizzati a fini prognostici, nel monitoraggio della risposta terapeutica (Harris et al, 2000, Bende et al, 2007).

Tra le tecniche molecolari utilizzate per l'identificazione di specifiche traslocazioni cromosomiche, la PCR risulta quella maggiormente impiegata come metodica diagnostica pratica e per il monitoraggio della malattia dopo trattamento terapeutico (Rezuke et al, 1997).

2.2.5 Malattia Residua Minima (MRM)

Benché i moderni protocolli terapeutici siano in grado di indurre la completa remissione dei sintomi in un'alta percentuale di pazienti affetti da neoplasie linfoproliferative, la maggior parte di essi, infine, recidiva (Bruggemann et al, 2004).

La fonte di questa ricaduta deriva dalla presenza di una popolazione cellulare neoplastica che persiste a livelli non evidenziabili dalle metodiche convenzionali. (Rezuke et al, 1997).

All'ammissione clinica, un paziente affetto da una neoplasia linfoproliferativa può presentare circa 10^{12} cellule tumorali, che vengono facilmente rilevate all'esame microscopico. Dopo la fase di induzione chemioterapica, il paziente può raggiungere la remissione clinica completa, anche se in realtà una popolazione neoplastica di 10^8 - 10^9 cellule tumorali può permanere. Le tradizionali tecniche morfologiche non sono in grado di differenziare una popolazione costituita da 10^9 cellule neoplastiche, da una popolazione non neoplastica (Rezuke et al, 1997); questo significa che la remissione clinica risulta compatibile con la persistenza di una quantità considerevole di cellule neoplastiche residue (Bruggeman et al, 2004).

Questa "riserva" di cellule neoplastiche, evidenziabili soltanto attraverso metodiche molecolari è comunemente chiamata Malattia Residua Minima o MRM (Braziel et al, 2003).

La malattia residua minima ha un importante significato prognostico: in primo luogo, permette un monitoraggio molecolare del comportamento della neoplasia durante la chemioterapia, consentendo di apprezzare la sensibilità delle cellule neoplastiche al trattamento (efficacia terapeutica); in secondo luogo, essa consente di individuare i pazienti ad alto rischio di recidiva (Dolken 2001; van der Velden et al, 2004). Tali implicazioni prognostiche, hanno determinato la possibilità di intervenire sul piano terapeutico al fine di ottenere la scomparsa del clone neoplastico residuo raggiungendo la remissione molecolare completa e al contempo ridurre l'intensità terapeutica nei pazienti con MRM non rilevabile. Tuttavia, gli studi eseguiti sulla MRM hanno dimostrato che pazienti con diverse forme di linfomi non-Hodgkin possono avere remissioni cliniche durature, nonostante la persistenza di un clone neoplastico residuo e che pazienti con diverse forme di leucemia possono mostrare una remissione clinica e molecolare duratura, senza tuttavia raggiungere la guarigione completa (Bruggeman et al; 2004). Tali

considerazioni hanno determinato un acceso dibattito tra i ricercatori, soprattutto legato alla necessità di standardizzare i tempi ed i modi di rilevamento della MRM e stabilirne al contempo l'utilità prognostica. Questi studi hanno permesso di dimostrare come la valutazione quantitativa e la cinetica della MRM siano in realtà molto più importanti rispetto alla sua presenza/assenza. A questo scopo sono state validate diverse metodiche che consentono di valutare le oscillazioni quantitative della MRM nel *follow-up* clinico del paziente (Donovan et al, 2000; Biondi et al, 2000).

I target utilizzati nel monitoraggio della MRM, sono principalmente due: i riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici ed i *breakpoints* delle traslocazioni cromosomiche neoplasia-specifiche (Braziel et al, 2003).

La valutazione della MRM necessita di tecniche molecolari con sensibilità maggiore rispetto a quella richiesta per l'identificazione della clonalità; la metodica ideale deve essere rapida, poco costosa, standardizzabile e specifica. (Braziel et al, 2003).

Poche tecniche presentano caratteristiche di sensibilità tali da poter essere utilizzate per rilevare la MRM nelle neoplasie linfoproliferative (Braziel et al, 2003); una di queste è l'analisi mediante PCR, che permette di identificare una cellula neoplastica tra 10^2 - 10^3 cellule normali (Vernau e Moore, 1999).

2.3 LA PCR NELLA DIAGNOSI E NEL MONITORAGGIO DELLE NEOPLASIE

LINFOPROLIFERATIVE

2.3.1 Introduzione

Quando gli studi di valutazione della clonalità vennero condotti per la prima volta sui pazienti umani, fu impiegata con successo l'analisi mediante ibridazione Southern Blot (SB), una metodica sensibile e specifica, ma afflitta da numerose limitazioni (tra cui lunghezza e complessità di esecuzione), che ne hanno limitato l'utilizzo come tecnica diagnostica pratica (Rezuke et al, 1997; Vernau, 2004). Nonostante la tecnica SB risulti adeguata in fase diagnostica nell'identificazione della clonalità e della linea di origine, manca di una sensibilità accettabile per il riconoscimento della malattia residua minima o delle recidive incipienti. Inoltre la necessità di utilizzare una quantità di DNA adeguata per

quantità e purezza, rendono questa tecnica poco adatta all'utilizzo clinico pratico (Rezuke et al, 1997; Vernau, 2004).

I problemi legati all'impiego dell'ibridazione SB sono stati superati in medicina umana grazie all'avvento della reazione a catena della polimerasi (PCR) ed al buon esito del suo successivo adattamento per la valutazione della clonalità nelle proliferazioni linfoidi (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999).

I test basati sulla PCR sono rapidi, applicabili su piccole quantità di DNA (come biopsie ottenute mediante punch ed aspirati con ago sottile) o su DNA di bassa qualità o solo parzialmente intatto (come quello estratto da tessuti fissati in formalina od inclusi in paraffina) (Rezuke et al, 1997; Vernau e Moore, 1999).

È un test che presenta una quantità minima rilevabile pari allo 0,1% di popolazione clonale linfoide, cioè in grado di identificare una cellula monoclonale in 10^3 cellule policlonali; inoltre, l'utilizzo di target molecolari B o T determina la possibilità di identificare la linea di origine della neoplasia, quando questa non può essere determinata con metodiche immunopatologiche (Vernau e Moore, 1999).

La sensibilità, la semplicità di esecuzione e la possibilità di applicazione su piccole quantità di DNA hanno reso la PCR la metodica molecolare cardine nella diagnosi e nella prognosi delle neoplasie linfoproliferative (Rezuke et al 1997).

La necessità di individuare la MRM, quantificarla ed utilizzarla nel *follow-up* clinico di ogni paziente, ha determinato un enorme sviluppo delle tecniche basate sulla PCR, volte a migliorarne ulteriormente la sensibilità. Una delle applicazioni più importanti che offre la PCR è quella di amplificare un prodotto derivato dai riarrangiamenti genici clonali delle Ig e del TCR, avvalendosi di primer consenso e di utilizzare tale prodotto, per il sequenziamento genetico. La possibilità di conoscere la sequenza genetica originale della neoplasia di ogni singolo paziente, ha permesso di costruire sonde paziente-specifiche (Brisco et al, 1996; Provan et al, 1996), determinando un incremento della sensibilità notevole (riconoscimento di una cellula monoclonale su 10^5 cellule policlonali) (Jilani et al, 2006).

L'applicazione della PCR precedentemente descritta, presenta tuttavia dei limiti legati alla complessità di esecuzione e ai costi del sequenziamento e della successiva creazione di sonde paziente-specifiche

marcate. Inoltre la difficoltà di monitoraggio di alcune neoplasie linfoidi, caratterizzate da continue mutazioni nei cloni neoplastici, rendono le sonde paziente-specifiche non sempre in grado di identificare la presenza di un clone neoplastico residuo. Recentemente, Jilani e collaboratori (2006), hanno applicato una metodica semplice che permette di ridurre i costi e la complessità di esecuzione, migliorando al contempo la sensibilità nell'individuazione della MRM. Tale tecnica combina la PCR alla Ligase Chain Reaction (LCR): i prodotti ottenuti con PCR attraverso primer consenso in fase diagnostica, vengono digeriti con enzimi di restrizione ed i frammenti così ottenuti, vengono utilizzati nel *follow-up* molecolare. La PCR eseguita nel monitoraggio della MRM, può contenere una quantità di prodotto inadeguata per renderne possibile la visualizzazione su gel di agarosio e, talvolta anche su sequenziatore automatico. Tuttavia, se il prodotto si è formato e perciò se persiste un clone neoplastico, è possibile combinare tale prodotto con i frammenti ottenuti in fase diagnostica, in presenza di una Ligasi. Tale enzima riconosce selettivamente uno stampo (costituito dal prodotto PCR) e ricombina i frammenti solo se lo stampo è perfettamente identico. In questo modo, è possibile visualizzare un prodotto PCR altrimenti non identificabile: tale combinazione PCR/LCR, ha permesso di aumentare la sensibilità della metodica fino al riconoscimento di 1 cellula clonale su 500000 (5×10^5) (Jilani et al, 2006).

Un'ulteriore evoluzione della tecnica PCR, riguarda la validazione della metodica Real-Time PCR (RT-PCR) per la ricerca di riarrangiamenti clonali delle Ig e del TCR, nel monitoraggio della MRM. La RT-PCR permette una valutazione quantitativa del clone neoplastico residuo e consente di monitorarne le oscillazioni, durante il *follow-up* della malattia. La quantificazione della MRM, presenta notevole valenza prognostica poiché consente di suddividere i pazienti in categorie di rischio, in relazione alla quantità di clone neoplastico presente (maggior presenza quantitativa di MRM, maggior rischio di recidiva precoce) (Biondi et al, 2000; Donovan et al, 2000; Uchiyama et al, 2003).

2.3.2 Amplificazione dei riarrangiamenti genetici dei recettori antigene-specifici tramite PCR

Precedentemente è stato descritto il complesso meccanismo di riarrangiamento genico del TCR e delle immunoglobuline, in cui la scelta dei segmenti genici da ricombinare avviene in maniera relativamente casuale, in modo tale che ogni singola cellula B o T sia caratterizzata da un unico pattern di

riarrangiamenti recettoriali (Vernau, 2004). In una neoplasia linfoide, al contrario, ogni clone di cellule neoplastiche B o T presenta un unico ed identico riarrangiamento genico delle Ig o del TCR, che può essere utilizzato come marker molecolare specifico di clonalità (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999).

A questo scopo, la PCR viene applicata nell'identificazione di riarrangiamenti genici clonali in quei segmenti di DNA che codificano per le regioni variabili dei geni delle Ig e del TCR, amplificando le V(D)J splice junctions di entrambi i tipi di recettore.

L'eterogeneità dell'aggiunta (e della delezione) dei nucleotidi N nei punti di giunzione tra i segmenti genici V, D e J, determina un *fingerprint* esclusivo per ogni dato riarrangiamento che offre un bersaglio sensibile e specifico per l'amplificazione mediante PCR (Rezuke et al, 1997; Vernau e Moore, 1999; Cazzaniga e Biondi, 2005).

Il riarrangiamento clonale dei segmenti VDJ della catena pesante delle Ig è tipico delle neoplasie linfoidi a cellule B e può essere amplificato mediante PCR utilizzando primer che legano il segmento genico V ed il segmento genico J della regione variabile delle catene pesanti delle Ig.

La Figura 2.3.2.I mostra come si realizza, mediante PCR l'amplificazione genica dei riarrangiamenti immunoglobulinici.

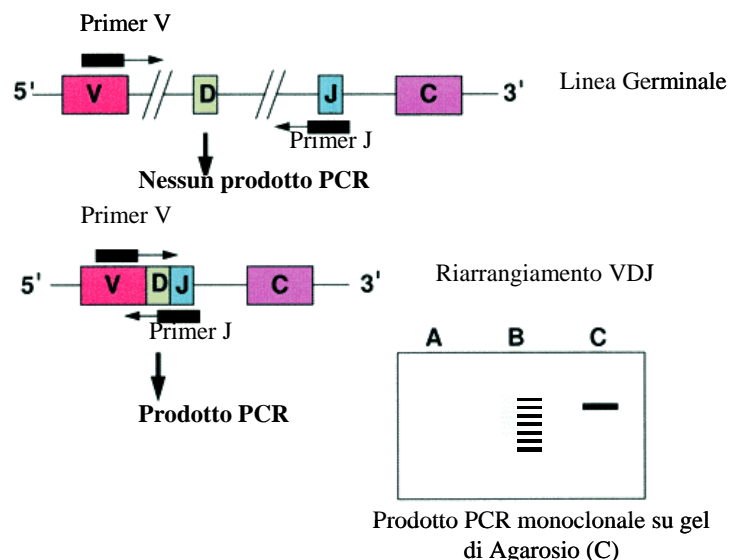


Figura 2.3.2.I: Illustrazione schematica del funzionamento della PCR nell'identificazione di un riarrangiamento genico B. Da Rezuke et al; 1997, modificato.

Per amplificare con successo un segmento di DNA, i primer utilizzati devono riconoscere sequenze geniche poste all'interno di una corta sequenza di DNA. Nello schema genico della linea germinale, le sequenze target dei primer all'interno dei segmenti genici V e J sono ampiamente separate per l'assenza dei riarrangiamenti genici, perciò non è possibile ottenere alcun prodotto amplificato (Figura 2.3.2.I, linea A); soltanto in caso di riarrangiamento VDJ, la vicinanza dei segmenti genici permette l'amplificazione di un prodotto.

In una popolazione policlonale, ciascuna cellula presenta una diversa specificità antigenica ed un distinto riarrangiamento genico, pertanto, il prodotto amplificato, visualizzato mediante elettroforesi, è rappresentato da bande (frammenti) di diversa lunghezza risultanti in uno smear pattern (Figura 2.3.2.I, linea B).

In una popolazione monoclonale al contrario, tutte le cellule presentano identici riarrangiamenti, per cui il prodotto amplificato è rappresentato da una singola banda discreta (Figura 2.3.2.I, linea C) (Rezuke et al, 1997).

Come già detto in precedenza, nei linfociti B, la regione variabile della catena pesante (VH) è costituita da 3 regioni *framework* (FR), in cui sono presenti sequenze nucleotidiche conservate e da 3 regioni CDR, in cui sono presenti sequenze ipervariabili di DNA che codificano per la regione legante l'antigene e che sono sottoposte al processo di ipermutazione somatica. CDRI, CDRII e tutte le regioni FR sono codificate dal segmento genico V, mentre la CDRIII viene codificata dal segmento genico D e dai segmenti di DNA posti tra le giunzioni V-D e D-J (Figura 2.3.2.II).

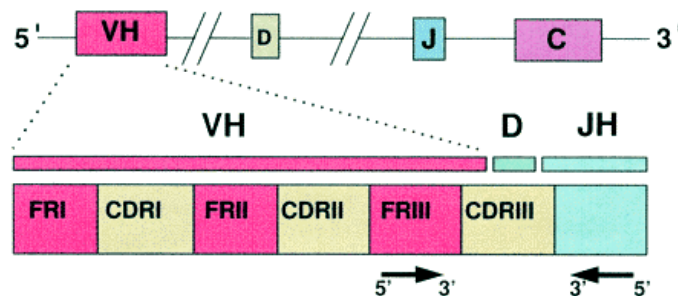


Figura 2.3.2.II: Organizzazione genetica della regione variabile delle Immunoglobuline. Da Rezuke et al, 1997.

I metodi comunemente impiegati in Medicina Umana riguardano l'amplificazione della regione CDRIII della catena pesante delle Ig, utilizzando come sonde degli oligonucleotidi che presentano omologia

con le sequenze conservate della regione FRIII dei segmenti genici VH e con quelle dei segmenti genici JH (Ramasamy et al, 1992).

La costruzione di primer, disegnati in accordo alla sequenza della CDRIII del clone neoplastico d'esordio, rende più sensibile la rilevazione delle cellule neoplastiche e può essere utilizzato per lo studio della MRM.

Nella valutazione delle neoplasie B-cellulari, l'utilizzo di questi primer permette di identificare la clonalità nel 50-60% dei casi; in una buona percentuale di pazienti, in effetti, l'amplificazione di VDJ può non riuscire, a causa di mutazioni che non permettono un corretto *annealing*, o perché, essendo la costruzione di questi primer basata su un limitato numero di sequenze IgH, non è possibile legare tutti i possibili segmenti VH (Rezuke et al, 1997).

Per aumentare la sensibilità di tale tecnica, è possibile amplificare un segmento di DNA più grande, utilizzando dei primer complementari alla regione FRI, posta più esternamente rispetto alla FRIII (Figura 2.3.2.II); quest'ultima presenta una sequenza sufficientemente conservata da rendere possibile l'utilizzo di un solo primer, diversamente dalla regione FRI che richiede, per la sua eterogeneità, l'utilizzo di sette differenti primer, che corrispondono alle 7 famiglie di geni VH, identificate in medicina umana (Ramasamy et al, 1992).

Nonostante la maggior complessità di esecuzione, utilizzando la regione FRI, è possibile individuare riarrangiamenti genici delle immunoglobuline nel 94% delle neoplasie linfoidi a cellule B e quindi di ridurre, rispetto al primo metodo, il numero di falsi negativi (Ramasamy et al, 1992).

Per quanto riguarda le neoplasie a cellule T, poiché i geni del TCR α sono molto complessi e i geni del TCR δ sono spesso deleti nelle cellule T mature, il TCR γ e il TCR β rappresentano i più efficienti target per l'amplificazione mediante PCR (Rezuke et al, 1997).

In medicina umana, lo studio sulla clonalità delle neoplasie linfoproliferative a cellule T, viene eseguita mediante l'analisi del locus γ (TCR γ) che fornisce un rendimento diagnostico migliore di quella del locus β (TCR β); questo vantaggio è dato dal fatto che il locus γ viene sottoposto a riarrangiamenti genici con maggiore frequenza nelle cellule T, indipendentemente dall'espressione del TCR di superficie. Inoltre, il numero limitato dei segmenti genici V e la mancanza dei segmenti genici D,

rendono il locus γ , più semplice da studiare per selezionare i primer ed ottimizzare la PCR (Theodorou et al, 1996; Rezuke et al, 1997).

I riarrangiamenti del locus γ risultano più semplici da rilevare rispetto a quelli del TCR β e rappresenterebbero pertanto una misura più sensibile di clonalità rispetto ai riarrangiamenti del TCR β (Burnett et al, 2003).

2.3.3 Limiti della PCR nella valutazione della clonalità e della MRM

Nonostante i numerosi vantaggi della PCR nella valutazione della clonalità B e T-cellulare, tale tecnica risulta associata ad un'alta percentuale di risultati falsi-negativi.

Come già accennato, il mancato *annealing* dei primer diretti contro le regioni FRIII e FRI in una significativa percentuale di neoplasie linfoproliferative a cellule B, può essere dovuto a mutazioni somatiche all'interno delle regioni FRI e FRIII che impediscono il corretto *annealing* dei primer.

L'ipermutazione somatica coinvolge i segmenti genici V e J ed è un processo che si realizza nelle cellule B mature dopo la loro esposizione all'antigene.

Pertanto, nei linfomi che derivano dalle cellule B che non sono state ancora esposte all'antigene (come quelle dello strato mantellare), il processo di ipermutazione somatica non è significativo ed i falsi negativi non costituiscono un problema.

Viceversa, nei linfomi che derivano da cellule che sono state esposte all'antigene (come ad esempio quelli follicolari) il processo di ipermutazione somatica è sostanziale ed i falsi negativi possono risultare superiori di numero (Rezuke et al, 1997).

Le altre cause responsabili della comparsa di falsi negativi sono rappresentate dall'inabilità dei primer V di riconoscere le sequenze complementari di DNA nei segmenti genici V o ancora dall'incapacità dei primer V e J di riconoscere alterazioni genetiche quali riarrangiamenti parziali (riarrangiamenti DJ) o traslocazioni cromosomiche (Rezuke et al, 1997). In medicina umana la presenza di riarrangiamenti parziali è molto frequente nella leucemia linfoblastica acuta infantile, dove arriva a rappresentare oltre il 20% dei casi (Cazzaniga e Biondi, 2005). Così come in fase diagnostica tali limitazioni possono essere rilevate anche nella valutazione della MRM, nella quale peraltro, la percentuale di falsi negativi può aumentare sensibilmente. In effetti, la stabilità dei marker in corso di neoplasia non è assoluta e i

prodotti tumorali presenti negli stadi iniziali della patologia possono essere assenti nei cloni cellulari responsabili della recidiva. Questa instabilità è generalmente dovuta al fatto che il marker identificato al momento della diagnosi, è presente solamente in un sub-clone di cellule neoplastiche, che può non essere il responsabile della progressione della patologia e della successiva ricaduta: questo fenomeno è noto con il nome di oligoclonalità (Cavè, 1999; Paietta, 2002).

Un'altra possibilità è che il marker clonale possa essere modificato da un riarrangiamento genico secondario. Questo fenomeno prende il nome di evoluzione clonale (Cavè, 1999).

Sebbene il rilevamento della MRM possa essere ostacolata dall'instabilità dei marker e dalla probabilità di cambiamento nel pattern dei riarrangiamenti durante l'evoluzione della neoplasia, il rischio di un risultato falso negativo è basso quando lo studio della MRM viene condotto durante gli stadi precoci del trattamento (Cavè, 1999).

2.3.4 I riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine

Com'è noto da tempo, le neoplasie linfoproliferative canine presentano, seppur con differenze specie-specifiche, un'alta similitudine con la controparte umana, tanto che il cane è stato più volte proposto come modello sperimentale spontaneo per lo studio di queste neoplasie (Knapp e Waters, 1997; Vail e McEwen, 2000; Gentilini et al, 2005).

In Medicina Veterinaria la diagnosi di neoplasia linfoproliferativa, viene effettuata in prima istanza attraverso la valutazione morfologica dei preparati cito/istologici, che solitamente è in grado di individuare e classificare una neoplasia linfoide; tuttavia, gli stessi errori diagnostici e limiti interpretativi, riscontrati in Medicina Umana, sono presenti anche in Medicina Veterinaria. Analogamente alla controparte umana, gli studi immunopatologici hanno contribuito a migliorare il protocollo diagnostico e la classificazione dei linfomi canini, poichè l'avvento delle tecniche di biologia molecolare è troppo recente per coadiuvare il percorso diagnostico clinico o avanzare ipotesi patogenetiche. Nondimeno, negli ultimi 8 anni, l'interesse nella validazione di marker molecolari di neoplasia ha prodotto diversi studi, soprattutto rivolti alla valutazione della clonalità in corso di neoplasie linfoproliferative canine (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al, 2003; Avery e Avery, 2004;

Vernau, 2004; Tamura et al, 2006; Yagihara et al, 2007). Sono stati effettuati anche alcuni studi di citogenetica e recentemente è stato dato inizio ad un progetto di valutazione dell'espressione genica dei linfomi su di un'ampia casistica, sebbene l'applicazione clinica diagnostica e prognostica delle traslocazioni cromosomiche appaia ancora lontana. (Thomas et al, 2003; Modiano, 2004).

La presenza di differenze specie-specifiche tra la genetica delle immunoglobuline nell'uomo e nel cane implicano spesso approcci differenti o in ogni caso non del tutto sovrapponibili.

Un esempio evidente è l'utilizzo della clonalità delle catene leggere come marker di neoplasia linfoproliferativa che viene effettuato in Medicina Umana: la possibilità di utilizzare le catene leggere a scopo diagnostico è possibile poiché fisiologicamente le catene di isotipo κ e λ si trovano in rapporto di equilibrio, per questo l'identificazione di linfociti B che esprimono in predominanza un isotipo piuttosto che un altro è indicativa di una popolazione monoclonale (Rezuke et al, 1997).

In Medicina Veterinaria, la fisiologica predominanza della catena leggera λ (in rapporto 90% a 10%) rende difficile il suo utilizzo come marker di clonalità a meno che non venga dimostrata, tramite metodiche immunopatologiche, la completa positività anticorpale verso la catena leggera λ associata alla negatività anticorpale verso la catena leggera κ (Arun et al, 1996; Avery e Avery, 2004; Vernau, 2004).

2.3.5 Identificazione dei primer consenso per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi B canine

Nella diagnostica molecolare dei linfomi canini per l'amplificazione della regione variabile delle Immunoglobuline (VH) si utilizzano primer consenso, ossia sequenze costruite su nucleotidi altamente conservati nella regione target. I primi primer consenso validati in Medicina Veterinaria, risalgono al 2003, quando Burnett e collaboratori (2003), li disegnarono su sequenze di DNA complementare (cDNA), ottenute tramite retrotrascrizione dell' RNAm estratto da una milza di cane sano. Il cDNA fu clonato, sequenziato e successivamente allineato, evidenziando la presenza di 5 sequenze con differenze significative (5 cloni). Nonostante le diversità riscontrate, tutti e 5 i cloni presentavano una sequenza altamente conservata in corrispondenza della FRIII putativa che poteva essere amplificata, tramite PCR, da un unico primer comune VH (primer forward); tali cloni contenevano altresì due sequenze altamente conservate a livello della regione J putativa, amplificabili tramite 2 diversi primer

JH (primer reverse). Secondo gli autori il primer forward e i due primer reverse, non potevano essere combinati in un'unica reazione, pertanto le reazioni di amplificazione della regione variabile delle Ig, in relazione al primer J utilizzato furono designate IgH maior, in grado di amplificare la maggioranza dei riarrangiamenti genici possibili ed IgH minor, in grado di amplificare solo una piccola proporzione di essi. Il set di primer così ottenuto, è stato contestualmente utilizzato su campioni diagnostici, determinando l'identificazione di una popolazione clonale nel 91% delle neoplasie linfoidi testate (Burnett et al, 2003).

Successivamente all'avvento del completo sequenziamento del genoma canino, un ulteriore studio basato sull'analisi informatica delle sequenze depositate sui database, scaturiti dal completamento degli studi genetici sul cane, ha ridefinito i primer da utilizzare nella ricerca della clonalità B-cellulare (Tamura et al, 2006). Confrontando le sequenze di cDNA del locus H depositate in precedenza, con tutte le sequenze genomiche della regione variabile delle immunoglobuline canine, presenti sui database, i ricercatori sono stati in grado di individuare un singolo gene, posto sul cromosoma 8, contenente 61 diversi segmenti genici V ed un solo segmento genico J. Allineando i 61 segmenti genici V, è stato possibile identificare, in corrispondenza della FRIII, una sequenza altamente conservata di 20 nucleotidi; su questa e sull'unico segmento J sono stati disegnati i primer in grado di amplificare, mediante PCR, la regione ipervariabile CDRIII, consentendo la valutazione della clonalità nei linfomi canini, con un'unica coppia di primer (Tamura et al, 2006).

2.3.6 Identificazione dei primer per l'amplificazione genica del TCR

Lo stesso criterio utilizzato per l'identificazione della clonalità B, è stato utilizzato da Burnett e collaboratori (2003) per il TCR. La decisione di indirizzare le ricerche sul locus γ , è stata dettata dalle stesse considerazioni effettuate in Medicina Umana, già descritte nel precedentemente. Il metodo utilizzato per l'acquisizione del cDNA dal timo di un cane sano e la successiva creazione dei primer è stato lo stesso utilizzato per le Immunoglobuline. Anche in questo caso i ricercatori hanno ottenuto 5 cloni sui quali, ricercando le sequenze conservate, sono stati disegnati i primer. Così come per le Immunoglobuline anche il locus TCR, è stato amplificato attraverso un primer forward comune V e due primer reverse, J γ . A differenza del set di primer per le Ig, i tre primer sono stati utilizzati nella stessa

reazione. Anche in questo caso l'utilizzo di queste sonde è stata in grado di determinare la presenza di una popolazione linfoide nei campioni sottoposti ad indagine molecolare (Burnett et al, 2003).

Come in precedenza, anche in questo caso il gruppo di ricercatori giapponesi autori dello studio basato sul genoma canino, ha utilizzato lo stesso criterio investigativo applicato sui linfomi B, al TCR canino, arrivando ad avanzare un'ipotesi sull'organizzazione genetica dell'intero locus γ (Yagihara et al, 2007).

In questo studio sono stati identificati 22 cloni codificanti il TCR canino attraverso i quali, tramite analisi computerizzata del database genetico del cane, è stato possibile identificare almeno 4 repertori di regioni V, appartenenti a due distinti sottogruppi, e 6 regioni J anch'esse suddivisibili in 2 sottogruppi, in base a similitudini di sequenza (Yagihara et al, 2007). Questi dati hanno permesso la creazione di 4 primer ognuno dei quali specifico per ogni sottogruppo: la combinazione delle quattro sonde identificate ha permesso di individuare una popolazione clonale nella totalità dei campioni neoplastici testati (11 linfomi e leucemie T), distinguendoli da campioni iperplastici e sani (Yagihara et al, 2007).

2.3.7 Sensibilità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine

L'applicazione pratica ad un ampio studio casistico delle tecniche PCR validate in Medicina Veterinaria ha permesso di valutarne pregi e limiti. Come accennato precedentemente, nello studio eseguito da Burnett e collaboratori (2003), la sensibilità della PCR nella valutazione della clonalità delle neoplasie linfoidi B e T canine è stata approssimativamente del 90% (77 campioni positivi a PCR su 101 soggetti inclusi nello studio per diagnosi citomorfologica di neoplasia linfoproliferativa). Tale sensibilità si è dimostrata molto più alta di quella ottenuta in analoghi studi sull'uomo (Vernau, 2004).

Gli stessi autori hanno tuttavia evidenziato come la tecnica PCR da loro validata presenti una diversa sensibilità quando utilizzata su campioni provenienti da tessuti linfoidi od ottenuti da tessuti non linfoidi. Nel tessuto linfoide, la PCR è molto sensibile e presenta una quantità minima rilevabile di 1 cellula neoplastica su 1000 (Burnett et al.; 2003); al contrario nel tessuto non linfoide, la sensibilità è risultata decisamente inferiore (1 linfocita neoplastico in una popolazione di 100 linfociti non neoplastici) (Lana et al, 2006). Una possibile spiegazione riguarderebbe la competizione, durante

l'amplificazione, tra le sequenze geniche riarrangiate dei linfociti normali e il DNA neoplastico (Burnett et al, 2003).

La PCR diagnostica, per avere un valido riscontro pratico deve in ogni caso poter essere applicata a matrici diagnostiche anche molto diverse tra loro. Burnett e collaboratori hanno dimostrato come la tecnica PCR potesse essere applicabile a qualsiasi matrice biologica: campioni bioptici, fluidi cavitari, ago-aspirati, midollo osseo, e materiale citologico.

Anche nell'applicazione su sangue periferico, la PCR per la ricerca della clonalità linfoide si è dimostrata più sensibile rispetto alla valutazione citomorfologica nell'identificazione di una popolazione clonale. Nello studio di Keller e collaboratori (2004), il 76% dei soggetti affetti da linfoma in stadio clinico III/V o VI/V hanno presentato una positività PCR su sangue periferico, nonostante la valutazione citomorfologica eseguita contestualmente su midollo e sangue fosse risultata negativa. Tale riscontro molecolare, ha permesso la collocazione di questi soggetti nel V stadio WHO (coinvolgimento neoplastico del midollo), che non sarebbe stata possibile con il solo ausilio delle tecniche morfologiche tradizionali. Tuttavia, tale positività non ha costituito un fattore prognostico negativo nel *follow-up* clinico dei pazienti (Lana et al, 2006).

Nonostante i numerosi vantaggi della PCR nella valutazione della clonalità B e T cellulare, anche negli studi sul cane, la tecnica ha dimostrato di essere associata a risultati falsi negativi e falsi positivi.

Di conseguenza, la valutazione della clonalità deve essere sempre interpretata insieme ai riscontri clinici, morfologici ed immunofenotipici e nel rispetto dei limiti di sensibilità e di specificità della tecnica utilizzata (Avery e Avery 2004).

La mancanza di riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici nei casi di neoplasia linfoide confermata (falsi negativi) può essere dovuto a varie cause.

E' possibile che i primer comunemente utilizzati nel cane e nell'uomo non siano in grado di riconoscere tutte le possibili ricombinazioni VDJ: pertanto, una neoplasia linfoide che presenti ricombinazioni VDJ tali per cui i primer utilizzati non sono in grado di riconoscere alcuna sequenza nucleotidica ad essi complementare, potrebbe produrre un risultato falso negativo all'indagine PCR.

Il sequenziamento del genoma canino ha permesso di stabilire con quale grado i primer comunemente utilizzati riescano a riconoscere le ricombinazioni VDJ (Avery e Avery 2004); tale riscontro, ha

consentito di perfezionare la tecnica PCR, tramite la costruzione di nuovi primer in grado di assicurare una “copertura” più completa di tutti i possibili riarrangiamenti (Vernau, 2004).

E' possibile inoltre, che il “fallimento” dei primer diretti contro la regione FRIII in una significativa percentuale di neoplasie linfoproliferative a cellule B, possa essere dovuto a mutazioni somatiche all'interno della regione variabile riarrangiata delle Ig che impediscono il corretto annealing dei primer (Vernau, 2004).

In Medicina Umana, quest'ultimo problema è stato superato tramite la creazione addizionale di primer consenso diretti verso le regioni FRI e FRII, in aggiunta a quelli utilizzati per l'amplificazione dei riarrangiamenti del locus della catena leggera k delle Ig. I riarrangiamenti delle Ig κ non sono, infatti, sottoposti al processo di ipermutazione somatica e perciò sono ritenuti target stabili per l'amplificazione mediante PCR (Vernau, 2004).

Un'altra causa di falsa negatività all'indagine PCR, può essere legata alla natura della neoplasia stessa: alcune neoplasie linfoproliferative derivano da cellule Natural Killer in altre parole da linfociti privi di recettore (anche dette cellule non-B, non-T), pertanto, non è presente né identificabile alcun riarrangiamento genico. Un altro esempio è rappresentato dalle neoplasie linfoidi che coinvolgono i precursori dei linfociti che presentano la configurazione genetica della linea germinale: anche in questo caso l'assenza di riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici, non permette l'amplificazione del prodotto PCR (Avery e Avery, 2004).

Nello studio di Lana e collaboratori (2006), allo scopo di determinare se i risultati falsi negativi fossero legati alla presenza di una particolare neoplasia oppure ad un limite della tecnica, sono stati confrontati i tempi di sopravvivenza e i *Disease Free Interval* (DFI/ intervallo libero da malattia) dei pazienti affetti da linfoma che hanno mostrato riarrangiamenti genici clonali e quelli che, viceversa sono risultati falsi negativi; la mancanza di una differenza significativa dei DFI e dei tempi di sopravvivenza tra i due gruppi ha indotto ad ipotizzare che la causa dei risultati falsi negativi fosse da imputare al mancato *annealing* dei primer consenso (Lana et al, 2006).

E' infine possibile che i risultati falsi negativi possano essere legati alla presenza di un numero di cellule neoplastiche inferiore alla quantità minima rilevabile dalla PCR (1 cellula neoplastica su 100 o 1000 linfociti normali) (Avery e Avery 2004). Questa eventualità si verifica soprattutto quando i

campioni che sono sottoposti ad indagine molecolare, provengono da soggetti in remissione clinica anziché in ammissione: quest'ultima considerazione costituisce un limite significativo all'utilizzo di questi primer nella valutazione della Malattia Residua Minima (Avery e Avery, 2004).

Alcune neoplasie linfoidi possono mostrare riarrangiamenti genici biclonali o multipli (pattern oligoclonale) dello stesso recettore antigene-specifico (Avery e Avery 2004). Per analogia a quanto osservato in Medicina Umana, è possibile che il riarrangiamento biclonale dello stesso recettore antigene-specifico sia determinato dall'esistenza di due popolazioni di cellule neoplastiche o dalla presenza di riarrangiamenti non produttivi sul secondo cromosoma (fenomeno di mancata esclusione allelica) (Burnett et al, 2003).

I riarrangiamenti multipli potrebbero essere indotti dalla trasformazione della neoplasia in cloni multipli che hanno subito successivi riarrangiamenti CDRIII (come descritto per il linfoma a cellule B nell'uomo) o dalla presenza di cloni multipli generati per stimolazione di un processo trasformante, quale l'esposizione ad un carcinogeno o il risultato di un processo virale (come descritto per l'infezione umana da HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus-1*) (Burnett et al, 2003; Avery e Avery 2004).

2.3.8 Specificità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle malattie linfoproliferative canine

L'analisi dei prodotti PCR mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide, non sempre permette una facile differenziazione tra riarrangiamenti genici monoclonali ed oligoclonali o policlonali; è quanto accade quando viene utilizzato il TCR γ , per la valutazione della monoclonalità nelle malattie linfoproliferative T (Avery e Avery, 2004). Come precedentemente riportato, il locus γ viene maggiormente utilizzato perché oltre a fornire un rendimento diagnostico superiore rispetto al locus β , presenta un limitato numero di segmenti genici V sottoposti al processo di ricombinazione; a causa di questa minore eterogeneità tra i riarrangiamenti genici, il TCR γ costituisce un sistema più semplice per la costruzione di primer consenso, ma per lo stesso motivo in grado di indurre la comparsa di risultati falsi positivi (Vernau e Moore, 1999; Vernau, 2004). Alcuni campioni provenienti da soggetti

non affetti da neoplasia linfoide possono mostrare riarrangiamenti genici clonali: è il caso di alcune infezioni (tra cui l'Ehrlichiosi sostenuta da *E.canis*) che sono in grado di indurre un riarrangiamento clonale T (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al.; 2003).

Tale popolazione monoclonale od oligoclonale, sarebbe indotta dalla presenza di cellule T trasformate ma non ancora evolute verso un evidente stato neoplastico, (come già precedentemente descritto nell'infezione da visus HTLV in Medicina Umana) oppure da una popolazione di cellule T iperplastiche reattive, che recederà successivamente (come l'infezione da virus di Epstein-Barr) (Burnett et al, 2003). Nessuno studio in Medicina Veterinaria, ha valutato il decorso clinico di cani positivi a PCR per riarrangiamenti clonali T in corso di Ehrlichiosi o altre patologie infiammatorie per la possibile insorgenza di neoplasie linfoidi conclamate (Avery e Avery, 2004). Tale considerazione è particolarmente importante quando i risultati PCR vengono designati come falsi positivi solo sulla base di risultati citologici o istologici negativi e non nel rispetto dell'eventuale decorso clinico. In uno studio sull'uomo, 80 casi di iperplasia linfoide benigna o atipica sono stati testati per la valutazione della clonalità, e tutti i pazienti che hanno mostrato riarrangiamento genico clonale T o B hanno sviluppato una neoplasia entro i due anni (Avery e Avery, 2004).

La "pseudoclonalità" rappresenta un'altra causa di risultati falsi positivi, determinata dall'utilizzo di primer consenso. Essa si verifica quando il campione testato contiene pochi linfociti (es. un tessuto non linfoide) o DNA di scadente qualità (es. un tessuto fissato in formalina). In questi casi, il DNA può essere amplificato solo da un piccolo numero di linfociti normali e dare così l'impressione della presenza di una popolazione linfocitaria clonale. Per limitare il fenomeno della pseudoclonalità, è quindi importante testare la sensibilità e la specificità della tecnica utilizzata nelle differenti matrici diagnostiche (in particolare tessuto fissato in formalina contro tessuto fresco) (Avery e Avery, 2004).

2.3.9 Determinazione della linea di origine delle neoplasie linfoidi mediante scoperta dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici

Nell'uomo e nel cane, l'analisi clonale dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici può essere utilizzata anche per contribuire all'accurata assegnazione della linea di origine delle neoplasie linfoidi, in particolare nei casi in cui le tecniche immunopatologiche non risultino esaustive. Questa

possibilità è soprattutto importante considerando la valenza prognostica della linea di origine nelle neoplasie linfoproliferative canine (Vail, 2000).

Il riscontro di un riarrangiamento genico del TCR è considerato sufficiente a giustificare la definitiva classificazione della neoplasia come appartenente alla linea cellulare T, con una certezza paragonabile al valore dei riarrangiamenti delle Ig nelle neoplasie linfoidi B (riarrangiamenti genici di linea appropriata). Sebbene queste conclusioni siano considerate generalmente vere, non possono valere in senso assoluto se prese singolarmente: l'interpretazione dei risultati ai fini dell'assegnazione della linea di origine deve essere effettuata con cautela (Vernau, 2004). Risultano di dubbia interpretazione anche quei casi dove si verificano entrambi i tipi di riarrangiamento genico dei recettori antigene-specifici (sia T che B): non è chiaro in effetti se si possa trattare di una doppia clonalità neoplastica o se si debba considerare la possibilità di un risultato falso positivo su una delle due linee cellulari (Burnett et al, 2003).

L'identificazione tramite PCR dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici, può senz'altro consentire la diagnosi più accurata delle neoplasie linfoproliferative in Medicina Veterinaria e potrebbe essere impiegata anche come marker di MRM. La possibilità di monitorare con tecniche molecolari tali neoplasie, apporterebbe senz'altro notevoli miglioramenti nella comprensione della patogenesi e dell'evoluzione di queste neoplasie che, come noto, nel 90% dei casi recidivano invariabilmente entro due anni: tali studi potrebbero altresì consentire di modulare il trattamento terapeutico, al fine di ottenere remissioni più durature. Un tentativo preliminare di applicare un approccio molecolare finalizzato alla valutazione della MRM è stato impiegato recentemente dal nostro gruppo di ricerca. I risultati di questa tesi comprendono ed ampliano le strategie, i metodi ed i risultati di questo approccio.

2.4 STRUTTURA ED OBIETTIVI DEL PROGETTO

2.4.1 Diagnosi delle malattie linfoproliferative nella specie canina



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Research paper

GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas

Fabio Gentilini^{a,*}, Claudia Calzolari^a, Maria E. Turba^b, Giuliano Bettini^c,
Paolo Famigli-Bergamini^a

^a Veterinary Clinical Department, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

^b Genefast Srl, Castelnuovo Rangone, Modena, Italy

^c Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2008

Received in revised form 2 September 2008

Accepted 16 September 2008

Keywords:

Ig/TCR gene rearrangement

PCR

Dog

Lymphoma

GeneScanning

ABSTRACT

The diagnosis of canine lymphoma is achieved using morphological and immunological methods. In a certain percentage of cases, difficulties in making a definitive diagnosis of lymphoproliferative disorders may occur despite extensive immunophenotyping. Therefore, additional diagnostics, such as molecular assessment of Ig/TCR gene rearrangements clonality, may confirm the final diagnosis. Polyacrylamide gel electrophoresis and heteroduplex analysis have already been proven to be suitable for detecting clonality but are cumbersome and labor-intensive. In the present study, GeneScanning analysis of PCR products originating from different primer sets targeting different regions of Ig and TCR was validated in improving sensitivity as well as in reducing the turnaround time of gene rearrangement assays. GeneScanning exploits 5' fluorescently labelled primers for the automated and fast analysis of PCR products either as *singleplex* or *multiplex* runs. Initially, the assay was set up using DNA purified from normal tissues ($n = 6$), hyperplastic/reactive tissues ($n = 10$) and a small set of immunophenotyped lymphoma samples ($n = 12$). The optimized methods were then used in a large set of 96 canine lymphoma samples. Normal and hyperplastic/reactive lymphoid tissues showed typically polyclonal or, occasionally, oligoclonal PCR products. Lymphoma samples showed monoclonal peaks arranged as a single or, occasionally, a double narrow base peak sometimes embedded in a polyclonal background. In all immunophenotyped cases, an Ig or TCR clonal finding corresponded to B- and T-cell lymphomas, respectively. Overall, 94/96 (97.9%) samples showed clonal Ig/TCR clonal rearrangements among which clonal Ig was found in 61/96 (63.5%) of samples and clonal TCR in 33/35 Ig negative samples (34.4% of all cases). In one out of ten randomly chosen cases, both Ig and TCR clonal gene rearrangements were found. Among the factors affecting assay accuracy, DNA quality has been shown to be critical and the amplification of DNA controls of different size are recommended to evaluate DNA integrity. Frozen material such as that which remained inside the hub of the needle used for diagnostic procedures is optimal for the analysis herein described. In conclusion, GeneScanning represents a versatile tool for routinely assessing Ig/TCR clonal rearrangements and supporting the diagnostic protocol of canine lymphomas.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Veterinary Clinical Department, University of Bologna, Via Tolara di Sopra no 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy. Tel.: +39 051 2097978; fax: +39 051 2097593.

E-mail address: fabio.gentilini@unibo.it (F. Gentilini).

1. Introduction

Lymphoid malignancies are among the most common neoplastic diseases in dogs, with an incidence rate of

134/100,000 cases/year (Dobson et al., 2007). The diagnosis of canine lymphoid neoplasia is achieved using a variety of laboratory investigations. In most cases, malignant lymphoproliferations can be distinguished from reactive ones by traditional morphological analysis of the lymphocytes, alone or in conjunction with antibody staining of the cell surface and intracellular/nuclear antigens. In the last decade, in human medicine, molecular methods, in particular PCR, have been increasingly employed to support traditional techniques in diagnosing lymphoproliferative disorders (Rezuke et al., 1997; Medeiros and Carr, 1999; van Dongen et al., 2003; Hodges et al., 2005). PCR relies on the amplification of tumour markers such as specific chromosome aberrations or Ig chain and T-cell receptor (TCR) clonal rearrangements based on the assumption that all cells of a malignancy have a common clonal origin (Rezuke et al., 1997; Medeiros and Carr, 1999).

During early lymphoid development, the many different variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments of the Ig and TCR gene loci undergo recombination processes. The V(D)J rearrangements are mediated by the recombinase enzyme complex which recognizes and splits gene segments at the recombination signal sequences (Jung et al., 2006). The many different combinations of V, D, and J gene segments represent the so-called combinatorial repertoire. Furthermore, during the rearrangement process at the junction sites of the V, D, and J gene segments, deletion and random insertion of nucleotides occur, resulting in highly diverse junctional regions which significantly contribute to the total repertoire of Ig and TCR molecules. Mature B-lymphocytes further extend their Ig repertoire upon antigen recognition in germinal centers via somatic hypermutation leading to single-nucleotide mutations and occasional insertions or deletions of nucleotides (Harris et al., 2001; Jung et al., 2006).

The assessment of clonal rearrangements of antigen receptor genes has also recently been introduced into veterinary medicine (Vernau and Moore, 1999; Burnett et al., 2003; Keller et al., 2004; Moore et al., 2005; Werner et al., 2005; Tamura et al., 2006; Yagihara et al., 2007). The methods described in some of these studies were reliably accurate which allows their use in clinical settings. Nevertheless, some improvements are needed. For example, the techniques described so far in dogs involve a limited number of probes targeting the same region (consensus sequences on IgH V framework region III); polymorphisms or mutations on consensus sequences recognized by a single oligonucleotide probe may occur leading to false negative results (Burnett et al., 2003; Avery and Avery, 2004). To prevent this occurrence in human medicine, the simultaneous use of multiple primer sets is required (van Dongen et al., 2003). In addition, canine TCR γ rearrangements showed a limited repertoire of gene segments (Yagihara et al., 2007) causing false positive results when assessed with standard PAGE techniques (Vernau, 2004). To avoid this pitfall, techniques such as heteroduplex analysis assay are needed to confirm a positive clonal finding (Avery

and Avery, 2004; Vernau, 2004). Alternatively, the GeneScanning technique is employed in human medicine as a reliable PCR downstream application to detect clonality (van Dongen et al., 2003). GeneScanning involves the elevated discrimination features of capillary electrophoresis together with the highly sensitive fluorogenic probe detection of a laser beam. The advantages of GeneScanning over PAGE are numerous. The possibility of separating products differing in size by only one nucleotide limits the occurrence of false positive results. Fluorescence detection is highly sensitive and also allows analyzing PCR products from a small amount of DNA samples. Finally, GeneScanning is a rapid, high throughput method suitable for both random-access and batch analysis (i.e., single specimen or many specimens could be automatically processed in the same analytical session) which is ideal for complying with the demands of a clinical laboratory.

This study is aimed at validating methods for carrying out GeneScanning analysis in order to diagnose B- and T-cell lymphomas in dogs. Furthermore, some new oligonucleotide probes targeting consensus sequence on IgH V framework region (FWR) I were validated in order to reduce the occurrence of false negative results. Finally, the methods of simultaneously assessing multiple Ig PCR products were set up and herein presented.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The cases of canine lymphoma diagnosed by cytology and/or histology between 1997 and 2007 were retrospectively selected by reviewing the medical records of the Veterinary Clinical Department, University of Bologna. We included lymphomas (all types) and excluded multiple myelomas, Waldenstrom Macroglobulinemia, plasmocytomas and lymphoid leukaemias. Available stored diagnostic samples of the selected cases were retrieved from the biological sample repository of the laboratory. Formalin-fixed paraffin-embedded-tissues were excluded and the respective cytological sample or stored frozen tissue were used as substitutes for DNA extraction when available. Stained smears of those cases having only a cytological diagnosis were independently reviewed by two haematologists (F.G. & C.C.) who were blinded one to the other. Whenever a diagnosis of lymphoma was not confirmed by both, the sample was excluded. The healthy control group was made up of five lymph node frozen samples excised from dogs deceased from toxic causes and one sample of PBMC from a healthy dog. The hyperplastic/reactive control group was made up of frozen fine needle aspirates and bioptic samples of lymph nodes or PBMC obtained from three dogs affected by leishmaniosis, three dogs affected by ehrlichiosis and four dogs with miscellaneous hyperplastic/reactive lymphadenopathies. Cytological samples or frozen biopsies from 12 dogs with a lymphoma already immunophenotyped by immunohistochemistry (six B-cell lymphomas and six T-cell lymphomas) represented the positive control group.

2.2. Immunophenotyping

Immunophenotyping was carried out on 10% buffered formalin-fixed paraffin-embedded tissue sectioned at 4 μ m using antibodies against human CD3 (dilution 1:75; Dako, Glostrup, Denmark) and human CD79 α (dilution 1:10; Dako, Glostrup, Denmark) for T- and B-cell lymphocyte identification, respectively. A streptavidin–biotin–peroxidase technique (LSAB KIT, Dako, Glostrup, Denmark) was employed as a detection method according to the manufacturer's recommendations. A normal canine lymph node was used as a positive control for both CD3 and CD79 α . An isotype-matched irrelevant antibody (NeoMarkers, Fremont, CA) was used as a negative control for the immuno-labelling procedures in replicate sections instead of the primary antibody.

2.3. DNA extraction

DNA was extracted from cytologically stained smears, frozen aspirates left inside the hub of the needle after the diagnostic procedure or from frozen tissue collected by means of biopsy. Stained smears were scratched with a sterile scalpel blade. Materials were collected in a 1.5-ml tube and the DNA was extracted using commercial kits following the manufacturers' instructions (Qiapm DNA micro kit, Qiagen[®], Milan, Italy – ChargeSwitch[®] Forensic DNA purification Kit, Invitrogen, Milan, Italy). The frozen material inside the hub of the needle was collected by repeated flushing of the needle with 200 μ l of PBS. The DNA was subsequently extracted using a commercial kit (Qiapm DNA mini kit, Qiagen[®], Milan, Italy). The biopsy samples were weighed, and 100 mg was excised and lysed by using the following lysis buffer: Tris–HCl 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 20 mM, SDS 0.1%, pH 8) +5 μ l of proteinase K (10 mg/ml). The samples were incubated in lysis buffer at 55 °C for 2 h and then at 37 °C overnight. The lysed samples were subsequently extracted using a Qiamp DNA mini kit (Qiagen[®], Milan, Italy). Negative extraction controls were included for each batch of samples.

2.4. Probes design

Besides those primers previously described (Burnett et al., 2003; Tamura et al., 2006) which anneal within the canine IgH V FWR III, new probes were designed to hybridize 5' upstream within conserved sequences on the FWR I. To accomplish this task, putative FWR I, II and III as well as hypervariable complementary determining regions (CDRs) I and II ortholog with the human counterparts were identified by blasting (with IgBLAST) the cDNA sequence of a canine heavy chain (GenBank AF354264) against a database of human VH genes. Subsequently, 10 forward primers annealing within the canine ortholog FWR I (90 bp) were designed using Beacon Design v3.0 software and checked for mismatches aligning the primers against a set of 52 sequences of canine VH FWR I retrieved from the whole genome of *Canis Familiaris* (Dog Genome assembly 2.0). Of all the candidate probes, the four forward primers with the highest homology within the FWR I sequences were purchased (Invitrogen, Milan, Italy). The primer pairs

were first screened by using positive and negative control samples; of those primer pairs which gave satisfactory results, one forward primer, annealing toward the 5' end and a second forward primer annealing toward the 3' end of the putative FWR I, were purchased with 6-FAM 5' labelling. Those primers, called 5' FWRI and 3' FWRI, respectively, were employed in the GeneScanning analysis.

The definitive primer sets used in this study, including information about the 5' labelling, are reported in Table 1.

2.5. Experimental layout

Overall, the Ig rearrangements were tested with the three primer sets previously described (Burnett et al., 2003; Tamura et al., 2006) and two newly designed primer pairs. The former included forward primers annealing on the FWR III and yielding a small PCR product (SP); the latter included forward primers annealing on the FWR I and yielding a large PCR product (LP). The TCR rearrangements were assayed with one primer set including a forward degenerate primer and two reverse primers as previously reported (Burnett et al., 2003). The initial testing phase of the methods and protocols was carried out on a set of positive and negative control samples (control groups). After PCR, the amplicons were first analyzed on 2.5% low melting point agarose gel (Eppendorf, Invitrogen) and then by means of GeneScanning. After that, a comprehensive challenge against the entire panel of samples was carried out in a stepwise process by means of GeneScanning alone. First of all, all the samples were assayed by amplifying the C μ DNA control (Burnett et al., 2003). The C μ target gives an amplicon approximately 120 bp in size which is nearly equal to SP Ig and TCR amplicons. Samples with repeatedly negative results were excluded from further analysis. All the remaining samples were assayed using the following primer pairs: Tamura F–Tamura R (Tamura et al., 2006); CB1–CB2 (Burnett et al., 2003), 3' FWRI–J2, 5' FWRI–CB2. Samples with at least one Ig clonal rearrangement were considered positive. Negative samples as well as 10 randomly selected Ig clonal positive samples, were assayed with the TCR γ 3–TCR γ 1/TCR γ 2 primer set (Burnett et al., 2003). Samples with a TCR γ clonal pattern were considered positive. Samples testing negative were additionally assayed with CB1–CB3 (Burnett et al., 2003) and then considered definitively negative for clonal gene rearrangements. Due to the fact that long-term storage of stained smears may lead to markedly reduced DNA quality, samples testing positive on at least 1 SP and negative on both LPs were re-assayed with a PCR which amplifies a larger DNA control (canine β -actin gDNA control, sized approximately 300 bp). β -Actin products were visualized on agarose gel after ethidium bromide staining. Samples with negative results were considered to have low quality degraded DNA.

2.6. PCR

In the initial testing phase, in order to optimize the PCR reactions of primer pairs, different PCR mixtures and cycling conditions were tested in order to obtain discrete bands in the lymphoma control samples. The amplicons

Table 1

The primer sets used in this study, including information about the characteristics of the primers and PCR mixtures.

Primer set	Target	Primer name	Orientation	5' label	Sequence 5' → 3'	[primer] (nM)	[MgCl] (mM)
C μ	Ig C μ	C μ . 1	Forward	HEX	ttc ccc ctc atc acc tgt ga	300	2
		C μ . 2	Reverse		ggt tgt tga ttg cac tga gg	300	
CB major	Ig VH FWR III Ig JH	CB1	Forward	6-FAM	cag cct gag agc cga gga cac	300	2
		CB2	Reverse		tga gga gac ggt gac cag ggt	300	
CB minor	Ig VH FWR III Ig JH	CB1	Forward	6-FAM	cag cct gag agc cga gga cac	300	2
		CB 3	Reverse		tga gga cac aaa gag tga gg	300	
TCR	TCR VH TCR JH TCR JH	TCR γ 3	Forward	6-FAM	tct ggg vtg tav tac tgt gct gtc tgg	300	2
		TCR γ 2	Reverse		gtt act ata aac ctg gta ac	300	
		TCR γ 1	Reverse		acc ctg aga att gtg cca gg	300	
Tamura	Ig VH FWR III Ig JH	Tamura F	Forward	6-FAM	aca cgg ccv tgt att act gt	300	2
		Tamura R	Reverse		tga gga gac ggt gac c	300	
5' FWRI	Ig VH FWR I Ig JH	FAM_5' FWRI	Forward	6-FAM	gag gtg cag ctg gtg gag tct	500	1.75
		CB2	Reverse		tga gga gac ggt gac cag ggt	500	
3' FWRI	Ig VH FWR I Ig JH	FAM_3' FWRI	Forward	6-FAM	gcc tct gga ttc acc ttc ag	500	1.75
		J2	Reverse		agg aga cgg tga cca ggg t	500	
FWRI-ci	Ig VH FWR I Ig JH	FWRI-ci	Forward		agg tgc agt tgg tgg agt ct	500	1.75
		J4	Reverse		gag gag acg gtg acc agg gtt	500	
FWRI-co	Ig VH FWR I Ig JH	FWRI-co	Forward		act ctc ctg tgt ggc ctc tg	500	1.75
		J3	Reverse		agg aga cgg tga cca ggg ttc	500	
β -Actin	Canine β -actin	β -Actin_F2	Forward		acc act ggt att gtc atg gac tct g	200	2
		β -Actin_R2	Reverse		gct ctt ctc cag gga gga cga	200	

were electrophoresed in a low melting point 2.5% agarose gel and visualized after staining with ethidium bromide together with a 100-bp ladder (100 bp DNA Ladder[®], Promega).

All PCR reactions were carried out in 25 μ l final volume. The PCR mixture was composed of 1 \times PCR buffer (PCR Platinum[®] Taq DNA polymerase buffer, Invitrogen, Milan, Italy), 1.75–2 mM magnesium chloride, 250 nM dNTPs (PCR Grade[®], Invitrogen, Milano), 200–500 nM of each primer, 1 U recombinant Taq Polymerase (Platinum[®] Taq DNA polymerase, Invitrogen, Milano) and 2.5 μ l of DNA template brought up to 25 μ l with molecular biology grade water (Eppendorf, Milan, Italy). Each PCR reaction was carried out in duplicate. Positive and negative PCR controls were included in each PCR run. PCR mixture details are included in Table 1.

PCR was carried out using an EP-gradient S thermal-cycler (Eppendorf, Milan, Italy). The PCR cycling conditions are schematically indicated in Table 2. For GeneScanning

analysis, the PCR cycling protocol was adjusted with a final extension step of 30 min instead of 5 min in order to avoid the plus-A artefact.

2.7. Automated fragment analysis (GeneScanning)

GeneScanning analysis was carried out on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®], Monza, Italy) supplied with a 47-cm length capillary and loaded with Performance Optimized Polymer-4 (POP-4, Applied Biosystems[®], Monza, Italy). The selected run module was characterized by a separation capacity of about 500 bp, a separation time of 24 min and a run duration of approximately 30 min.

The setting up of the *singleplex* run included the testing of different dilutions of PCR products and size standard as well as different electrokinetic injection conditions in order to optimize the signal intensity ratio (PCR amounts/size standard). In the general testing phase, the PCR

Table 2

PCR cycling conditions used in this study for each primer set.

Primer set	Cycling conditions
C μ	95 °C \times 3 min – 40 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 30 s – 72 °C \times 30 s) 72 °C \times 30 min
CB major	95 °C \times 3 min – 40 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s) 72 °C \times 30 min
CB minor	95 °C \times 3 min – 40 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s) 72 °C \times 30 min
TCR	95 °C \times 3 min – 40 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s) 72 °C \times 30 min
Tamura	95 °C \times 3 min – 40 \times (95 °C \times 30 s – 56 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s) 72 °C \times 30 min
5' FWRI	95 °C \times 3 min [10 \times (94 °C \times 30 s – 65 °C – 0.5 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s)] [30 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 30 s – 72 °C \times 30 s)] 72 °C \times 30 min
3' FWRI	95 °C \times 3 min [10 \times (94 °C \times 30 s – 65 °C – 0.5 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s)] [30 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 30 s – 72 °C \times 30 s)] 72 °C \times 30 min
FWRI_co	95 °C \times 3 min [10 \times (94 °C \times 30 s – 65 °C – 0.5 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s)] [30 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 30 s – 72 °C \times 30 s)] 72 °C \times 30 min
FWRI_ci	95 °C \times 3 min [10 \times (94 °C \times 30 s – 65 °C – 0.5 °C \times 20 s – 72 °C \times 20 s)] [30 \times (95 °C \times 30 s – 58 °C \times 30 s – 72 °C \times 30 s)] 72 °C \times 30 min
β -Actin	94 °C \times 3 min – 40 \times (94 °C \times 20 s – 58 °C \times 25 s – 72 °C \times 25 s) 72 °C \times 5 min

products were diluted 1:10–1:20 for stained smears and 1:20–1:40 for frozen tissue with HPLC water (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). One microliter of the diluted samples was then denatured (95° for 5 min) with 20 μ l of formamide (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems®, Milan, Italy), and 0.1 μ l of size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy) was added to each sample. The processed samples were loaded in duplicate on the genetic analyzer at an electrokinetic injection condition of 15 KV for 5 s.

The raw data were analyzed with Gene Mapper HID® Vers 3.2 software (Applied Biosystems, Monza, Italy).

In order to reduce the turnaround times and costs of the GeneScanning assay, an additional task aimed at carrying out the simultaneous assessment of multiple PCR products (*multiplex run*) was carried out. In particular, different respective dilutions and pooling ratios of the PCR products which influence the signal intensity ratio were tested. All samples were run as *singleplex* runs while *multiplex* runs were carried out only on a randomly selected subgroup of samples.

Interpretation of the results was carried out independently by two of the authors according to the following criteria (van Dongen et al., 2003): polyclonal patterns characterized by the presence of multiple sometimes condensed peaks frequently arranged in a Gaussian distribution of differently sized peaks were considered as negative (no clonal population); oligoclonal patterns characterized by a reduced number of peaks of similar height were considered as negative (no clonal population); monoclonal patterns characterized by the presence of one

single, narrowed peak in the expected range of each primer set or a narrowed peak at least twofold higher than the other background peaks or, occasionally, by two narrow peaks with similar height were considered as positive (clonal population).

3. Results

One hundred and twenty-four dogs were diagnosed as having lymphoma. At least one biological sample was available for DNA extraction in 114 cases. Of the 114 cases, three samples were excluded because formalin-fixed paraffin-embedded tissue was the only available biological sample. Three additional samples were subsequently excluded after the independent re-evaluation carried out by two haematologists (F.G. & C.C.) because of a disagreement in diagnosis. Of the remaining 108 samples, 80 had only a cytological diagnosis and 28 had both a cytological and a histological diagnosis. Overall, the samples included in the study were: (a) fine needle aspirates (21 frozen aspirates and 81 stained smears) from lymph nodes ($n=87$), the gut ($n=5$), the liver ($n=2$), the thymus ($n=1$), the spleen ($n=3$), bone marrow ($n=2$) and the skin ($n=2$); (b) imprint stained smears from gastric biopsy ($n=1$) and (c) lymph node frozen biopsies ($n=5$).

Of the lymphoma samples, 12 did not give an amplifiable C μ DNA control PCR product and were thereafter excluded from further downstream clonality assay. The remaining 96 samples were definitively tested for clonal rearrangements by PCR and GeneScanning analysis.

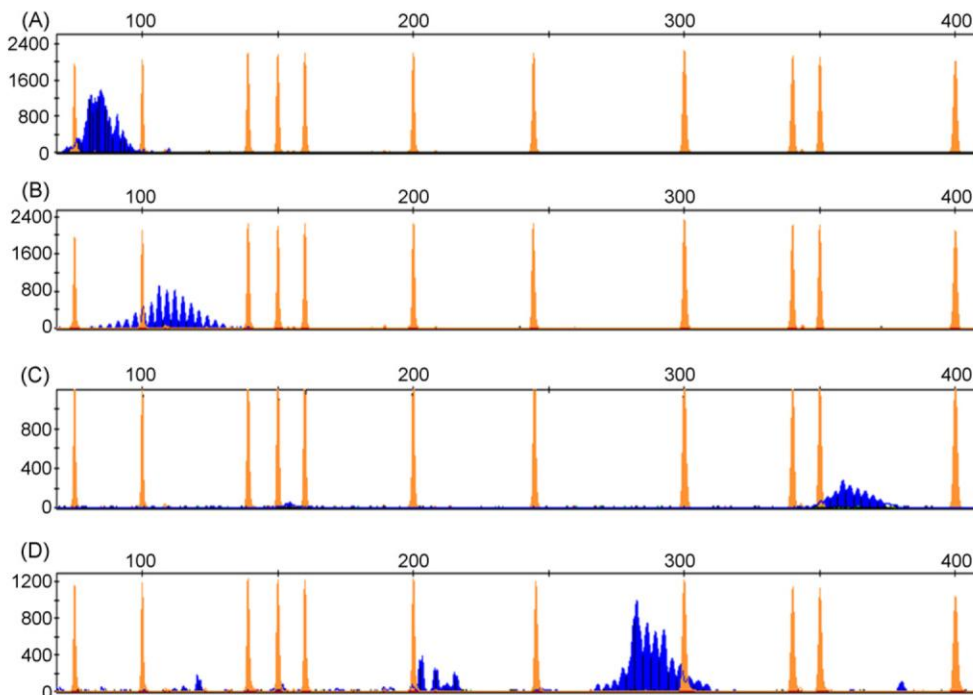


Fig. 1. Selected examples of GeneScanning analysis. Typical polyclonal patterns obtained with TCR (A), CB-major (B), 5' FWRI (C) and 3' FWRI (D) primer sets. In each primer set, the forward primer is 5' fluorescently labelled with 6-FAM. The polyclonal samples will yield multiple PCR products with a Gaussian size distribution of peaks (blue). Orange peaks represent size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.1. GeneScanning

Automated fragment analysis of the healthy control samples showed the typical pattern characterized by the Gaussian size distribution of peaks as described in human medicine in all cases (van Dongen et al., 2003) on either Ig or TCR assays (Fig. 1). Conversely, the peaks pattern generated by the hyperplastic/reactive samples showed a limited Ig/TCR rearrangement repertoire in one case of ehrlichiosis and one case of leishmaniosis which gave rise to oligoclonal Ig/polyclonal TCR and polyclonal Ig/oligo-clonal TCR patterns, respectively (Fig. 2). With the exception of these latter cases, hyperplastic/reactive samples also showed typical polyclonal patterns.

The positive control group showed a single, narrow-based peak identifying Ig or TCR clonal rearrangement while the other respective rearrangement was polyclonal (Fig. 3). In the positive control group, Ig or TCR patterns corresponded to the lineage assigned by immunophenotyping; accordingly, Ig clonal peaks were seen in B-cell lymphomas and TCR clonality in T-cell lymphomas. Clonal

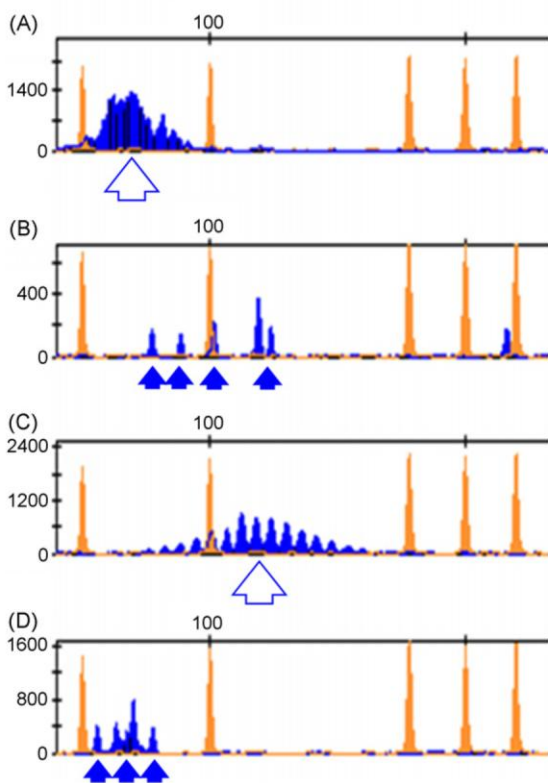


Fig. 2. Selected examples of GeneScanning analysis. Oligoclonal patterns obtained in 2 control samples. A (TCR primer set) and B (CB-major primer set) represent polyclonal TCR (open arrow) and oligoclonal Ig (solid arrows) patterns, respectively, in a dog affected by ehrlichiosis. C (major primer set) and D (TCR primer set) represent polyclonal Ig (open arrow) and oligoclonal TCR (solid arrows) patterns, respectively, in a dog affected by leishmaniosis. Blue peaks indicate 6-FAM fluorescently labelled PCR products; orange peaks represent size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

peaks were inconsistently mixed with much smaller intermingled peaks (Fig. 4); seemingly clonal peaks outside the expected size range of the primer set (i.e., peaks of approximately 200 bp in SP assays) were occasionally seen (Fig. 4).

The Tamura primer set showed peaks in the range of 72–90 bp. Clonal patterns were observed in 38 out of 96 samples. The CB-major primer set showed peaks in the range of 85–139 bp. Clonal patterns were observed in 53/96 samples. The 3' FWRI primer set showed peaks in the

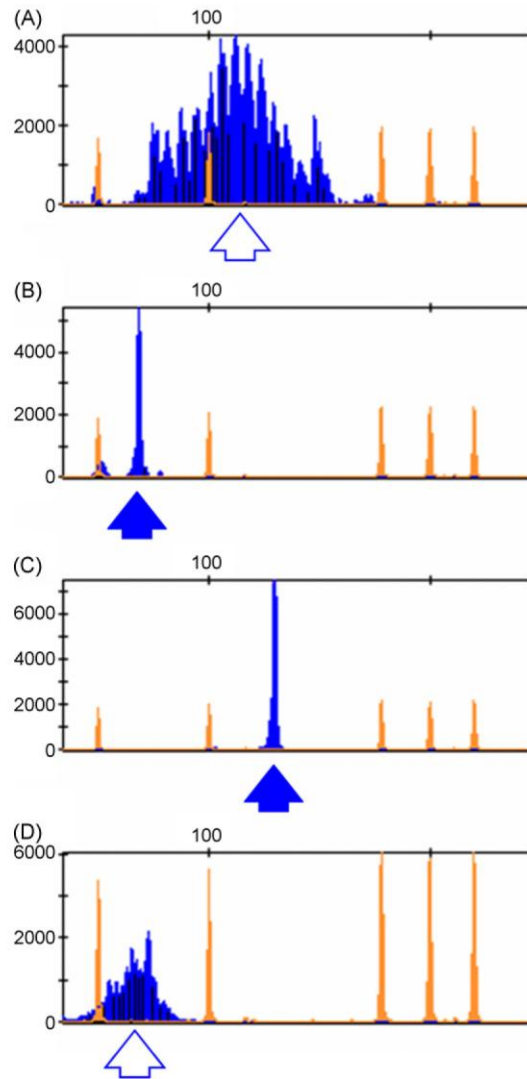


Fig. 3. Selected examples of GeneScanning analysis of two dogs with B- and T-cell immunophenotyped lymphomas. In T-cell lymphoma, a monoclonal peak (solid arrow) indicating a prevalent PCR product of the same size is evident with the TCR primer set (B) while the Ig rearrangement obtained with the CB-major primer set is polyclonal (open arrow) (A). In B-cell lymphoma, a monoclonal peak (solid arrow) indicating a prevalent PCR product of the same size is evident with CB-major primer set (C) while the TCR rearrangement obtained with the TCR primer set is polyclonal (open arrow). Blue peaks indicate 6-FAM fluorescently labelled PCR products; orange peaks represent size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

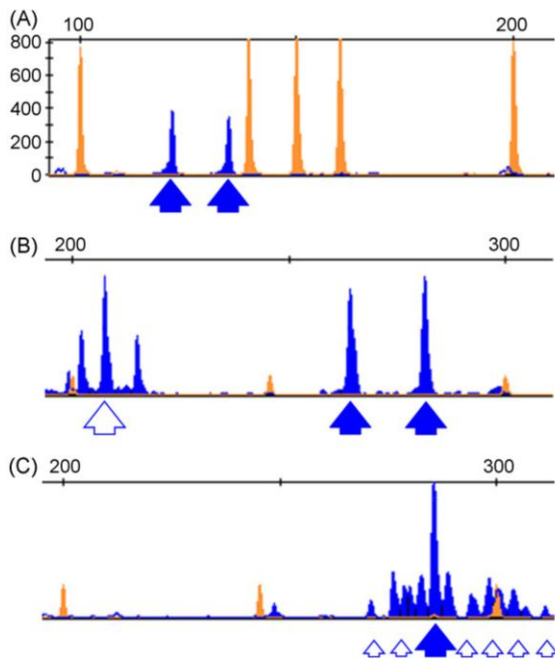


Fig. 4. Selected examples of atypical GeneScanning patterns. (A) Biclinal patterns obtained with the CB major primer set (solid arrows). (B) *Singleplex* run of PCR products obtained with the 3' FWRI primer set; biclinal peaks in the expected size range (262–301 bp; solid arrows) and other peaks outside the expected size range (open arrow). (C) PCR products obtained with the 3' FWRI primer set; a single prevalent clonal peak (solid arrow) embedded in a strong polyclonal background (open arrows). Blue peaks indicate 6-FAM fluorescently labelled PCR products; orange peaks represent size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

range of 262–301 bp. Clonal patterns were observed in 49/96 samples. The 5' FWRI primer set showed peaks in the range of 309–378 bp. Clonal peaks were observed in 50/96 samples. The only two samples assayed with the CB-minor primer set were negative.

Sixty-one samples (63.5%) had at least one clonal Ig product. In the majority of cases, clonal products were represented by a single discrete peak sometimes associated with lower background peaks. In nine cases, one or more clonal peaks were associated with an oligoclonal pattern in one of the other primer sets. Oligoclonal patterns were characterized by small numbers (3–5) of narrow-based peaks and were considered negative. In 8/61 Ig positive cases, an association between positive SP and both negative LPs were found. Those eight samples were assayed with the β -actin PCR assay. In 6/8 (75%) cases, the β -actin PCR assay gave negative results. Conversely, in 6/61 Ig positive cases, at least one positive LP and both negative SP products were found.

Samples testing negative on Ig rearrangements yielded positive results on TCR assay in 33/35 cases (94.2% of Ig negative samples and 34.4% of all cases). The 10 randomly selected Ig positive samples gave positive results in only one out of ten cases (10%). This latter sample had not been immunophenotyped. Only two samples did not defini-

tively show clonal rearrangements (polyclonal/oligoclonal patterns in Ig and also in TCR rearrangements). Overall, 94/96 (97.9%) of samples showed clonal Ig and/or TCR clonal rearrangements.

If the results of all primer sets are classified according to the sample type (frozen aspirates or biopsies versus cytological stained smears), data show that frozen material yielded a higher proportion of positive results (69/75 (93.2%) and 154/205 (75.1%), respectively).

Optimized *multiplex* runs were found to reproduce the same patterns and results as the respective *singleplex* runs (Fig. 5).

4. Discussion

The methods and protocols for automated fragment analysis (GeneScanning) of canine Ig and TCR gene rearrangements are herein provided. These methods could represent an improvement over previous techniques and provide another sensitive tool for the diagnosis of canine lymphoma. The assay is automated and rapid. Random-access could also allow the processing and evaluation of a single sample at a time. Multiple primer set products could be simultaneously assayed leading to improved sensitivity without increasing turnaround time which is reduced to a few hours from sample processing to result interpretation since about 45 min are required for post-PCR application (*multiplex* runs of GeneScanning). The application of the techniques to a wide set of samples showed its robustness, although complete validation was not accomplished.

In our study, GeneScanning detected fluorescent signals arranged as single or multiple, narrow- or wide-based peaks in all samples analyzed including normal, hyperplastic/reactive and neoplastic tissue. This finding was clearly expected but differs from a previous report which found clonal peaks in dogs affected by lymphoma and no peaks in normal or reactive samples (Jeon et al., 2007). The most likely explanation of such a discrepancy is technical and due to both different equipment and methods. Sample loading on a capillary is achieved by means of electro-injection. The setting of the injections (KV and seconds) is crucial in determining the amount of sample loaded. Increased time and KV increases the amount of the PCR product loaded. This is a fundamental step in interpreting the findings of GeneScanning which relies on the interpretation of the patterns and not on the presence/absence of fluorescence.

Correct interpretation of GeneScanning requires insight into the polyclonal Ig/TCR gene rearrangement patterns as well as the possibility of non-specific bands or large PCR products for each specific primer pair (van Dongen et al., 2003).

Most samples showed typical easily interpretable peak patterns. Polyclonal patterns were observed in all the control groups, both normal and reactive, as expected. All those samples showed Ig and TCR polyclonal patterns characterized by Gaussian distributed peaks which differed from each other by only a few nucleotides. In one sample of leishmaniosis and in one sample of ehrlichiosis, a reduced TCR and Ig repertoire, respectively, were classified as oligoclonal due to a limited number of peaks. The

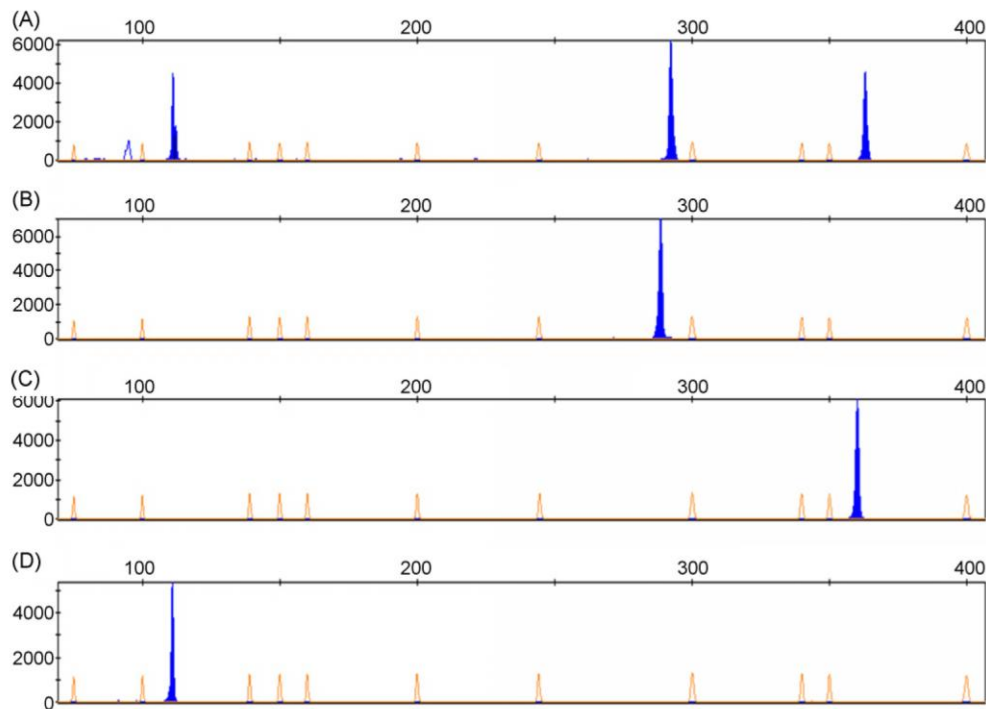


Fig. 5. GeneScanning analysis: (A) *multiplex* run of CB-major, 3' FWRI and 5' FWRI primer set PCR products (peaks of 120 bp, 290 bp and 360 bp, respectively). The *multiplex* run was carried out by pooling equal volumes of differently diluted PCR products (1:10, 1:20, 1:30 of 5' FWRI, 3' FWRI and CB-major PCR products, respectively). *Singleplex* runs of 3' FWRI (B), 5' FWRI (C) and CB-major (D) PCR products. Blue peaks indicate 6-FAM fluorescently labelled PCR products; orange peaks represent size standard (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Monza, Italy). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

significance of an oligoclonal pattern is uncertain but may represent a reduced diversity of the Ig/TCR repertoire caused by antigen-selected subclones.

Major PCR products outside the expected range were observed in 8/61 cases. These seemingly clonal peaks were usually longer than the expected size peak. These occurrences might cause challenging interpretations in *multiplex* runs without size standard while they are easily recognized when size standard is included in the assay. Peaks of unexpected size were more frequently detected in non-lymphoid tissues (4/8). This is likely due to aspecific binding to germline DNA instead of rearranged DNA. Annealing of the same primer both as forward and reverse in a downstream position or the annealing of one primer in a gene segment located downstream to the other segment has been reported to occur in human medicine (van Dongen et al., 2003). Since extensive cloning and sequencing were not carried out in our study, the specific origin of peaks outside the expected size range could not be ascertained.

Atypical patterns characterized by a minor clonal peak embedded in a strong polyclonal background were also observed and interpreted as clonal by two observers who were, nevertheless, non-blinded with regard to the diagnosis. Such findings are expected when clonal lymphoid cells are underrepresented as could be the case of early lymphoid neoplasia in which a few neoplastic cells are scattered among a majority of normal or reactive cells (van Dongen et al., 2003). The background peaks may

indicate the presence of many reactive B cells. Nevertheless, the possibility that degraded DNA could cause a polyclonal background is raised by the fact that some cases had a positive 120 bp and a negative 300 bp DNA control.

Other atypical patterns observed were represented by biclonal peaks within the expected range of the primer set represented by two peaks of approximately the same height and differing from each other by 4–18 nucleotides. This observation could be explained by the presence of two distinct clones. Alternatively, the loss of allelic exclusion with the presence of both functional and non-functional V(D)J rearrangements could be responsible for such findings. A biclonal peak was observed in one case in all the Ig primer sets while the other five cases showed biclonal peaks in one primer set (LP) and a single clonal peak in the other primer set (SP). In the former case, the addition of a few nucleotides located at the junctional V–D and D–J sites could be responsible while, in the latter, it is possible that insertions could occur in CDR I and/or II due to somatic hypermutations (Jung et al., 2006). Biclonal TCR rearrangements were also found. Biclonal TCR peaks should originate from rearrangements of both alleles, as was also found by Yagihara et al. (2007).

The overall sensitivity of GeneScanning was 97.9% which represents an improvement over the data reported by Burnett and colleagues (Burnett et al., 2003; Avery and Avery, 2004). False negative results may be caused by somatic hypermutations which occur in rearranged Ig in germinal and post-germinal B-cell lymphomas or by

improper annealing to the binding site of certain VH segments which may diverge from the majority. Somatic hypermutations are frequent in CDRs but could also occur in FWR where the primers were located. The primer set which yielded the highest number of clonal results was CB-major. Conversely, the Tamura primer set was found to yield positive results in a smaller proportion of cases when compared to CB-major although the target size was approximately the same. The reasons were not ascertained but, since the forward primer was designed in close proximity to the junctional VD regions, it is possible that the 3' end of the primer could not anneal to the rearranged target because of nucleotide deletion from the germline sequence.

A lower proportion of clonal peaks was also detected by LP primer sets when compared to the CB-major primer set. Nevertheless, many samples testing negative with both the LP products also had degraded DNA which likely explains the reduced liability in detecting clonal peaks in this group of samples. In addition, in frozen samples, LP was seen in clear clonal peaks in almost all cases. In six cases, at least one of the LP amplicons was positive and both the SP fragments were negative. This clearly demonstrates that multiple primer sets could increase accuracy. Thus, in this context, the validation of the newly designed primers showed its usefulness. In particular, 1 case of B-cell/T-rich intestinal lymphoma showed evident polyclonal peaks on TCR and all Ig primer sets with the exception of one clonal peak which was embedded in a strong polyclonal background in the 3' FWRI primer set.

Interestingly, it is worth noting that LP amplicons could cautiously be interpreted in long term room temperature stored samples. In fact, many of these samples resulted in an amplifiable $C\mu$ and no amplifiable β -actin DNA control. All these samples were represented by long term stored stained smears. The DNA degradation prevented the amplification of a 300-bp DNA control which, therefore, demonstrated the unreliability of the LP markers. Therefore, the use of DNA control of the same target size is necessary to avoid errors in interpreting negative results. Negative β -actin control was defined as the absence of the specific band on agarose gel. Nevertheless, samples with degraded DNA resulted in a background of very small irregular peaks in Ig/TCR gene rearrangement GeneScanning which may resemble an atypical polyclonal peak. Therefore, the simultaneous use of a DNA control labelled with a different fluorophore besides the one used in this study ($C\mu$) and included in the *multiplex* runs may aid in identifying those samples with degraded DNA by direct comparison of control and Ig/TCR peak height. The use of the internal size standard, although not strictly necessary, could also be useful in *multiplex* runs and when monitoring the disease over time. In fact, size standard could allow the clear identification of each clonal peak by means of its length. The PCR product length could hopefully aid in assessing whether subsequent analysis over the course of the disease detects the same neoplastic clone or whether a clonal evolution has emerged. Clonal evolution could itself have a prognostic significance.

TCR clonal rearrangements were found in 34.4% of cases. Although it is well known that the terms clonal TCR

rearrangement and T-cell immunophenotype are not synonymous, in this study, when the immunophenotype was assessed, it was found that they were synonymous. Moreover, the prevalence of B- and T-cell malignancies strictly resembles the data reported in a recent study on canine lymphomas (Guija de Arespachoga et al., 2007). Crosslineage Ig/TCR rearrangements have been reported in lymphoid and myeloid malignancies both in human and veterinary medicine (Przybylski et al., 1994; Szczepański et al., 1998; Szczepański et al., 1999a,b; Boeckx et al., 2002; Burnett et al., 2003). In our study, one out of ten randomly chosen cases showed both Ig and TCR rearrangements. This sample had not been immunophenotyped and no further conclusion could be made.

The only two discordant samples referred to DNA extracted from long term stored stained smears. The diagnosis of high-grade lymphoma had been achieved by means of cytology alone. Neither dog underwent chemotherapy and both were lost to follow-up. The GeneScanning pattern was characterized by many different peaks of similar heights, both on Ig and TCR assays without a clearly evident clonal peak. The reason for the discrepancy could not be ascertained.

5. Conclusion

Our study provided methods of carrying out GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements. GeneScanning proved to be suitable for automated, fast, low turnaround time assay. New probes targeting FWR I were validated in order to improve assay accuracy. Hopefully, other primer sets already described and not used in this study (Yagihara et al., 2007) could be introduced with suitable labelling in *multiplex* runs further improving accuracy without sizeable adjunctive costs. New probes and, in general, all primer sets seemed to work more efficiently when the frozen material left inside the hub of the needle were used to accomplish DNA extraction. The corresponding stained smears should be checked to confirm the adequacy of the diagnostic procedure.

References

- Avery, P.R., Avery, A.C., 2004. Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet. Clin. Pathol.* 33, 196–207.
- Boeckx, N., Willemsse, M.J., Szczepanski, T., van der Velden, V.H., Langerak, A.W., Vandekerckhove, P., van Dongen, J.J., 2002. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16, 368–375.
- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F., Avery, A.C., 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.* 40, 32–41.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L., 2007. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small Anim. Pract.* 43, 240–246.
- Guija de Arespachoga, A., Schwendenwein, I., Weissenböck, H., 2007. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 136, 186–192.
- Harris, N.L., Stein, H., Coupland, S.E., Hummel, M., Favera, R.D., Pasqualucci, L., Chan, W.C., 2001. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2001, 194–220.
- Hodges, E., Williams, A.P., Harris, S., Smith, J.L., 2005. T-cell receptor molecular diagnosis of T-cell lymphoma. In: Illidge, T., Johnson,

- P.W.M. (Eds.), *Lymphoma: Methods and Protocols*, vol. 115. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 197–215.
- Jeon, S., Lee, M.J., Park, J., Kang, S.H., 2007. Fast molecular diagnostics of canine T-cell lymphoma by PCR and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detector. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 854, 268–272.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–547.
- Keller, R.L., Avery, A.C., Burnett, R.C., Walton, J.A., Olver, C.S., 2004. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet. Clin. Pathol.* 33, 145–149.
- Medeiros, L.J., Carr, J., 1999. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123, 1189–1207.
- Moore, P.F., Woo, J.C., Vernau, W., Kosten, S., Graham, P.S., 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 167–178.
- Przybylski, G., Oettle, H., Ludwig, W.D., Siegert, W., Schmidt, C.A., 1994. Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 87, 301–307.
- Rezuke, W.N., Abernathy, E.C., Tsongalis, G.J., 1997. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin. Chem.* 43, 1814–1823.
- Szczepański, T., Beishuizen, A., Pongers-Willemse, M.J., Hählen, K., Van Wering, E.R., Wijkhuijs, A.J., Tibbe, G.J., De Bruijn, M.A., Van Dongen, J.J., 1999a. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13, 196–205.
- Szczepański, T., Langerak, A.W., van Dongen, J.J., van Krieken, J.H., 1998. Lymphoma with multi-gene rearrangement on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. *Am. J. Hematol.* 59, 99–100.
- Szczepański, T., Pongers-Willemse, M.J., Langerak, A.W., Harts, W.A., Wijkhuijs, A.J., van Wering, E.R., van Dongen, J.J., 1999b. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V–D–J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* 93, 4079–4085.
- Tamura, K., Yagihara, H., Isotani, M., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2006. Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 163–167.
- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurings, E., García-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A., 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 12, 2257–2317.
- Vernau, W., Moore, P.F., 1999. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69, 145–164.
- Vernau, W., 2004. Clonal rearrangements of antigen receptor genes in the diagnosis of lymphoid neoplasia. In: *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)*, Middleton, WI.
- Werner, J.A., Woo, J.C., Vernau, W., Graham, P.S., Grahm, R.A., Lyons, L.A., Moore, P.F., 2005. Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. *Vet. Pathol.* 42, 596–607.
- Yagihara, H., Tamura, K., Isotani, M., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2007. Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 375–382.

2.4.2 Prognosi mediante valutazione della malattia residua minima delle malattie linfoproliferative della specie canina

2.4.2.1 Set up and validation of a real-time quantitative PCR using hairpin shaped clone specific primers for the monitoring of minimal residual disease in a canine spontaneous animal model of B-cell lymphoma.

Introduction

The molecular detection of residual malignant cells, namely minimal residual disease (MRD), during the course of haematological neoplasms is being increasingly considered a pivotal information for risk group stratification, for enabling effective treatment intervention and for outcome prediction (Cavé et al., 1998; Flohr et al., 2008). In addition, MRD assessment is used as end-point to objectively evaluate new treatments (Czuczman et al., 2001; Kimby et al., 2008). One of the most promising technique for MRD assessment is represented by PCR. In haematological malignancies, suitable PCR targets account for chromosome aberrations resulting in fusion genes either at the DNA or RNA level and gene rearrangements of Immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR). During early lymphoid development, the many different germline gene segments of the Ig/TCR gene loci undergo recombination processes. The V(D)J rearrangements are mediated by the recombinase enzyme complex which recognizes and split gene segments at the recombination signal sequences (Jung et al., 2006). The many different combinations of V, D, and J gene segments represent the so-called combinatorial repertoire. Furthermore, during the rearrangement process at the junction sites of the V, D, and J gene segments, deletion and random insertion of nucleotides occur, resulting in highly different junctional regions, which significantly contribute to the total repertoire of Ig molecules. Mature B-lymphocytes further extend their Ig repertoire upon antigen recognition in germinal centers via somatic hypermutation leading to single-nucleotide mutations and occasional insertions or deletions of nucleotides so as each lymphocyte has a unique rearranged sequence (Jung et al., 2006; Harris et al., 2001). Each target, including the Ig heavy chain (IgH) gene rearrangement, have been extensively evaluated as markers of disease in the clinical context and advantages and pitfalls

established (Pongers-Willemse et al., 1999; Sutton et al., 2008). Both in human and canine lymphoid neoplasia, the rearranged IgH locus shows some highly conserved sequence alternated with highly different and variable regions called complementarity determining regions (CDRs), the latter representing the clone-specific sequences and the “DNA fingerprint” of the disease (Jung et al., 2006; Gentilini et al., 2009).

While some of the PCR technique targeting Ig/TCR gene rearrangements are qualitative or semiquantitative, others could more accurately quantify the target sequence. Indeed, the quantitative assessment of MRD is strikingly important for the clinicians. Real-Time Quantitative PCR (RTQ-PCR) should discriminate few neoplastic cells in a background of a multitude of normal or reactive cells each one carrying a clone-specific rearrangements of unknown and unpredictable sequence. Furthermore, the assay should have a wide dynamic range over many magnitudes of target numbers, and should be reproducible and robust. Many approaches exploiting the specificity of allele specific (AS) oligos have been consistently used in RTQ-PCR for MRD assessment: AS oligos may be both probes or primers. Consensus forward and reverse primer coupled with patient specific internal probes (either hydrolysis or hybridization probes) complementary to junctional sequences or AS primers coupled with consensus internal probes or mixed strategies have been reported to achieve adequate sensitivity and specificity (Nyvold et al., 2002; Flohr et al., 2008; Pongers-Willemse et al., 1999; Norris et al., 1995; Voena et al., 1997; Pongers-Willemse et al., 1998; Brüggemann et al., 2000; Eckert et al., 2000; Nakao et al., 2000; Brisco et al., 2000; Tarusawa et al., 2002; Eckert et al., 2003; Sabesan et al., 2003; Böttcher et al., 2004; Uchiyama et al., 2004; van der Velden et al., 2006).

RTQ-PCR oligo design to achieve adequate sensitivity and accurate target quantification on the random junctional target sequences may result challenging due to difficult targets as long homopolymeric stretches, and inverse/direct repeats. Even more laborious may result the design of probes or primers which should work efficiently with a set of fixed consensus oligos. Thereafter, each patient specific assay might require extensive and labour intensive validation procedure before its application on the clinical case. Finally, unaffordable costs may be also associated with the use of expansive fluorogenic oligos which, in turn, confers higher specificity than DNA-intercalating dyes.

Although, PCR assays employing AS primers with DNA-intercalating dye would be reliable, their use for targeting Ig/TCR gene rearrangements raised some concerns about specificity (Nakao et al., 2000; Eckert et al., 2000). In fact, a possible pitfall represented by amplification of non-target products with melting temperature (T_m) very close or even overlapping with the T_m of the specific PCR products was reported (Nakao et al., 2000). Hairpin-shaped (HS) primer with the 3' end nucleotide corresponding to a polymorphism have been described to genotype SNPs (Hazbón and Alland, 2004; Boniotto et al., 2004). HS primers are designed by adding a 5' tail sequence reverse and complementary with the 3' primer end of an oligo. When compared with linear primer, allele specific HS primers broaden the ΔC_t obtained in 2 different real-time PCR targeting the 2 alleles (Hazbón and Alland, 2004). This feature was exploited to increase the discrimination power. Furthermore, upon specific target recognition, the 5' complementary tail is included in the PCR product and, by the following cycle, the T_m of the duplex PCR product/HS primer is increased.

In this work, the canine animal model of B-cell Non-Hodgkin Lymphoma was exploited to validate a technique of MRD assessment with both AS forward and reverse primers complementary to CDRII and CDRIII in RTQ-PCR with SYBR Green dye. The aim of this study was to verify 1) whether the hairpin-shape could be favourably introduced in linear clone-specific primers to improve the assay accuracy and 2) to set up a specific, sensitive and efficient alternative method of RTQ-PCR for MRD assessment.

Materials & methods

Experimental design, samples and clone-specific primers

The IgH rearranged locus of 5 cases of B-cells lymphoma (#1 to 5) confirmed by GeneScanning analysis were PCR amplified using consensus primers. The forward primer anneals within conserved sequence of IgH V framework region I and the reverse primer within the J segments (Gentilini et al., 2009). The amplicons were, then, gel purified with the Clone-well® kit (Invitrogen). The purified PCR products were both directly sequenced using forward and reverse consensus primers by using the Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystem) on an ABI Prism 310 Analyzer. Furthermore, 3 PCR products (#1, 2 and 3) obtained with consensus primers were cloned into the pCR-4 TOPO

(Invitrogen) plasmid vectors. Plasmids were used to transform Topo10 Chemically competent E.coli (Invitrogen), purified from E.coli and directly sequenced to confirm that the cloned product was the neoplastic one directly sequenced from the PCR product.

By blasting the sequences against a set of human sequences with Igbblast the putative orthologs of V framework region (FWR) I, II and III was identified. Using the information gained on the putative FWR and refining the data by aligning the 5 canine sequences, the germline CDRs I, II and the junctional CDR III could be identified (figure 2.4.2.I). The CDR I is about 20 bp long and just few hotspots polymorphisms could be identified. Conversely, CDR II and III were longer and variable enough to design clone-specific primers.

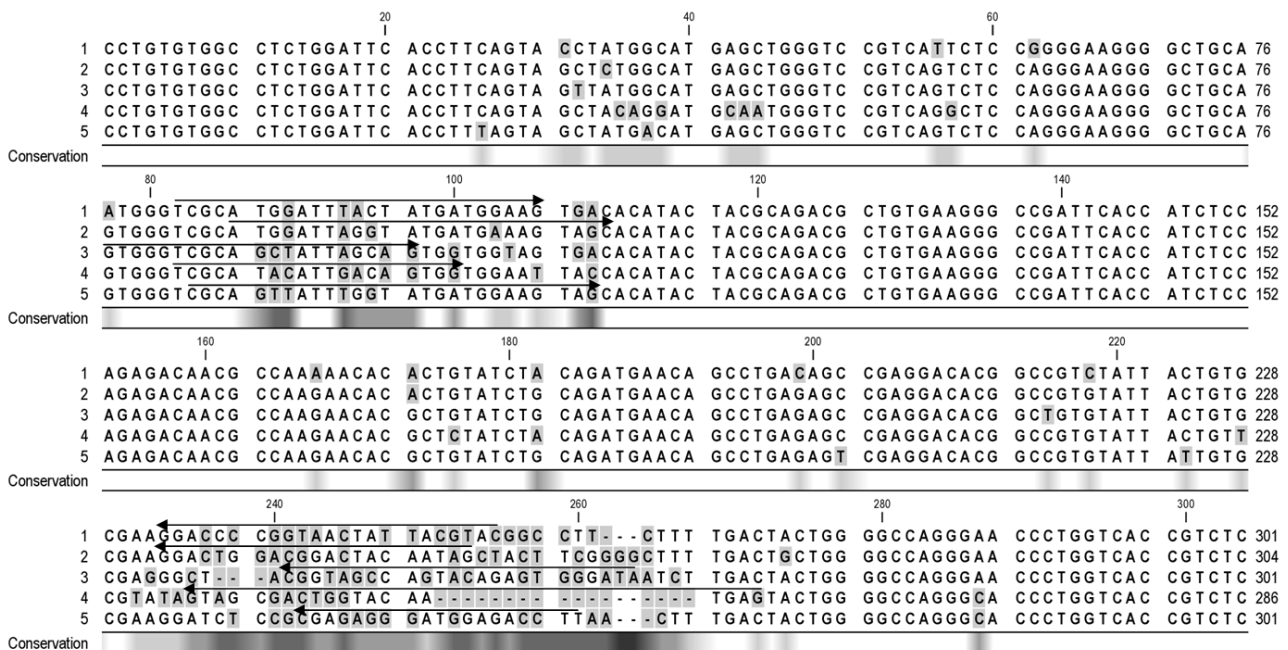


Figura 2.4.2.I: Sequences alignments of IgH gene rearrangements of 5 canine lymphomas. Germline CDRs I (\approx nt 25-45) and II (\approx nt 87-109) as well as the junctional CDR III (\approx nt 87-109) region (\approx nt 231-266) are represented as alignments reduced conservation. C Clone-specific forward and reverse primer for each case are indicated as arrows above the corresponding sequence.

Thus, for each patient clone, the best linear primer pair was designed using beacon designer V3 software, the forward complementary to CDRII and the reverse to the CDRIII, respectively. Primers with their 3' end within the CDRs were selected. Many primers pairs have been rejected because the 3' end mostly aligned in a conserved region. When the 5' end aligned outside the CDRs, the primer was

chosen with shorter 5' end to limit the number of nucleotides in the conserved sequence even at the 5' end. Five standard (linear) primer pairs were finally purchased (Table 2.4.2.I).

In addition, HS primer, designed by adding a 5-9nt long tail at the 5' end reverse and complementary to the 3' end of each linear forward and reverse primers, were also purchased (Table 2.4.2.I). Such modifications were predicted to fold the primer in a hairpin-shaped form with a specified enthalpy measured as $-\Delta g$ kcal/mol (beacon designer v3). Free energy predictions were accomplished with the beacon designer V3 software based on the following standard reactions conditions: monovalent ion concentration of 50mM, total Na⁺ equivalent of 269.09 mM, temperature for free energy calculation of 25°C and free Mg⁺⁺ ion concentration of 3mM. In some cases, the linear primer were modified with 5' tails of different length to verify their effect and alternative HS primers for the same target were purchased (Table 2.4.2.I).

Table 2.4.2.I: Linear and Hairpin-shaped clone-specific primers used in Real-Time quantitative PCR assays. The stem nucleotides of the predicted hairpin secondary structure are underlined.

Patient clone	Linear primers		Hairpin-shaped Primers				
	Sequence 5' > 3'	pred T _m	Sequence 5' > 3'	pred T _m	Hairpin free energy	Cross-dimer free energy	
					-ΔG (Kcal/mol)	-ΔG (Kcal/mol)	
1	Fwd	tcg cat gga ttt act atg atg gaa g	57.1	<u>ctt cca tct</u> cgc atg gat tta cta <u>tga tgg aag</u>	64.4	-8.0	-2.5
	Rev	gta cgt aat agt tac cgg ggt cc	57.8	<u>gga ccc</u> gta cgt aat agt tac <u>cgg ggt cc</u>	67.6	-6.9	
2	Fwd	atg gat tag gta tga tga aag tag c	54.6	<u>gct act tta</u> tgg att agg tat gat <u>gaa agt agc</u>	61.2	-7.7	-2.8
	Rev	tgt agt ccg tcc agt cct tc	55.4	<u>gaa gga ctg</u> tag tcc gtc <u>cag tcc ttc</u>	64.2	-10.0	
				<u>gaa ggt</u> gta gtc cgt cca <u>gtc ctt c</u>	62.3	-4.0	
3	Fwd	gtg ggt cgc agc tat tag cag	58.4	<u>ctg ctc</u> agt ggg tgc cag cta tta <u>gca g</u>	65.7	-4.7	-6.6
	Rev	ccc act ctg tac tgg cta ccg	59.1	<u>cgg tat</u> atc cca ctc tgt act ggc <u>tac cg</u>	65.9	-5.8	
4	Fwd	tcg cat aca ttg aca gtg g	52.1	<u>cca ctt</u> cgc ata cat tga <u>cag tgg</u>	60.1	-4.5	-1.7
	Rev	ctc att gta cca gtc gct ac	52.8	<u>gta gcc</u> tca ttg tac cag <u>tgc cta c</u>	61	-4.2	
5	Fwd	gca gtt att tgg tat gat gga agt ag	56.4	<u>cta ctt</u> cgc agt tat ttg gta tga <u>tgg aag tag</u>	62.8	-5.8	-5.3
	Rev	aag gtc tcc atc cct ctc g	54.4	<u>cga gaa</u> agg tct cca tcc <u>ctc tcg</u>	61.9	-4.6	

Effects of hairpin modification and dissociation curve analysis of primers

The melting profiles of the HS primers were characterized with dissociation curve experiments to infer an estimate of the proportion of hairpin folded oligo at each temperature. Single and pairs of linear and HS primers at the same concentration as in RTQ-PCR (300-400nmol) underwent to a melt cycle from 25°C to 95°C in 25µl of PCR mixture lacking genomic DNA (gDNA).

The effect of different HS primer design (stem length and stability) and different annealing temperatures on the assay performance were also assessed by amplifying 2 samples, represented by calibration points 1.25×10^5 and 2.0×10^2 copies/reaction of case #2 with the same HS forward primer and 2 different HS reverse primers in a 2 step cycling programs at different annealing temperatures (60°C and 64°C).

Primer-dimers were a common finding in HS RTQ-PCR. To confirm whether the primer-dimer was due to cross-dimer and not to self-dimer formation, a calibration point was PCR amplified using either equal amount or unbalanced concentration of primers (forward 100nmol, reverse 500nmol and viceversa).

RTQ-PCR assay

PCR was carried out in a iCycler thermal-cycler (Biorad) using a mixture composed by 12,5 µl of 2x real-time mix with SYBR Green (Biorad) 1.5-2 µl (300-400 nmol) each of forward and reverse primer, 2 µl of DNA brought up to 25 µl with molecular biology water. Annealing temperature below 60°C were used in 3 step PCR protocols whereas annealing temperature above 60°C was carried out as 2 steps cycling protocols. Three step PCR included an initial denaturation at 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 50-58°C for 30 s and 72° C for 30 s, and a final extension step at 72° C for 5 min. Dual step PCR protocol included an initial denaturation at 95° C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C-68°C° for 60 s of annealing/extension, and a final extension step at 72° C for 5 min. In both cases, a melt cycle was included starting from 55°C to 95°C with a 0.5°C increase cycle of 10sec for 80 times.

Specificity, calibration, efficiency and sensitivity

To evaluate the assay specificity, all the primer pairs were screened against 1 sample of pooled gDNA of normal lymph nodes and the 5 pooled gDNA of lymphoma samples. Each pool, with variable DNA concentration ranging from 30 to 120 ng/ μ l, was made up by mixing equal amount of 5 gDNA purified from bioptical or cytological canine diagnostic samples. The assay was repeatedly carried out each time with annealing temperature approximately 2.5°C increased from 5°C below the mean T_m of the primers until the temperature which did not yield aspecific products with T_m similar to the specific target one (always in the range 86-88°C). An additional challenge was performed against a further set of 15 pooled gDNA purified from lymph nodes of lymphoma affected dogs (DNA concentration ranging from 30 to 120 ng/ μ l). If a aspecific products were again noted the assay was repeated with increased temperature until no aspecific products were observed. When any aspecific products were observed, the annealing temperature was considered as optimal temperature of annealing (OTA) for further assays. Some cross-reactivity experiments were carried out simultaneously using the temperature gradient options of the thermal cycler. For HS primers, the specificity experiments were accomplished starting from annealing/extension temperature of 60°C.

The cycling protocol employing the OTA was used to calibrate the assay using precise serial dilution of linearized plasmid in case of patient clones 1,2 and 3. The plasmids containing the cloned sequence of IgH rearranged locus were cut with SphI (New England Biolab) endonuclease and serially diluted to obtain the following calibration point target concentration: 2.5×10^5 , 1.25×10^5 , 2.5×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 and 2.0×10^2 copies/ μ l which was considered the quantitative range.³³vandervelden Each plasmid calibration point was diluted 1:1 V/V with 50 ng/ μ l of pooled gDNA extracted from normal lymph nodes. Plasmid calibration were carried out with either linear or HS primers.

The assays of case 4 and 5 were calibrated using a ten-fold serial dilution of the original gDNA at diagnosis from 10^{-1} to 10^{-5} in 50 ng/ μ l of pooled gDNA extracted from normal lymph nodes. gDNA was spectrophotometrically quantified (case 4: 78.6 ng/ μ l; case 5: 66.4 ng/ μ l) and the target copy/number was estimated considering 333 copies for each nanogram of DNA (Rasmussen et al., 2000). Also ten-fold dilution series were subjected separately to RTQ-PCR with linear and HS primers. The calibrators samples were assessed in duplicates. In the sensitivity experiments of cases #1, 2 and 3, further 1:5

plasmid dilutions from 40 to 0.3 copies/reaction mixed with 50 ng/reaction of pooled gDNA, were tested in duplicate.

Results

Effects of hairpin modification, dissociation curve analysis and primer-dimer formation

As expected, HS primers maintained secondary structure at temperatures higher than the respective linear primers as demonstrated by dissociation curve analysis (DCA) (Figure 2.4.2.II).

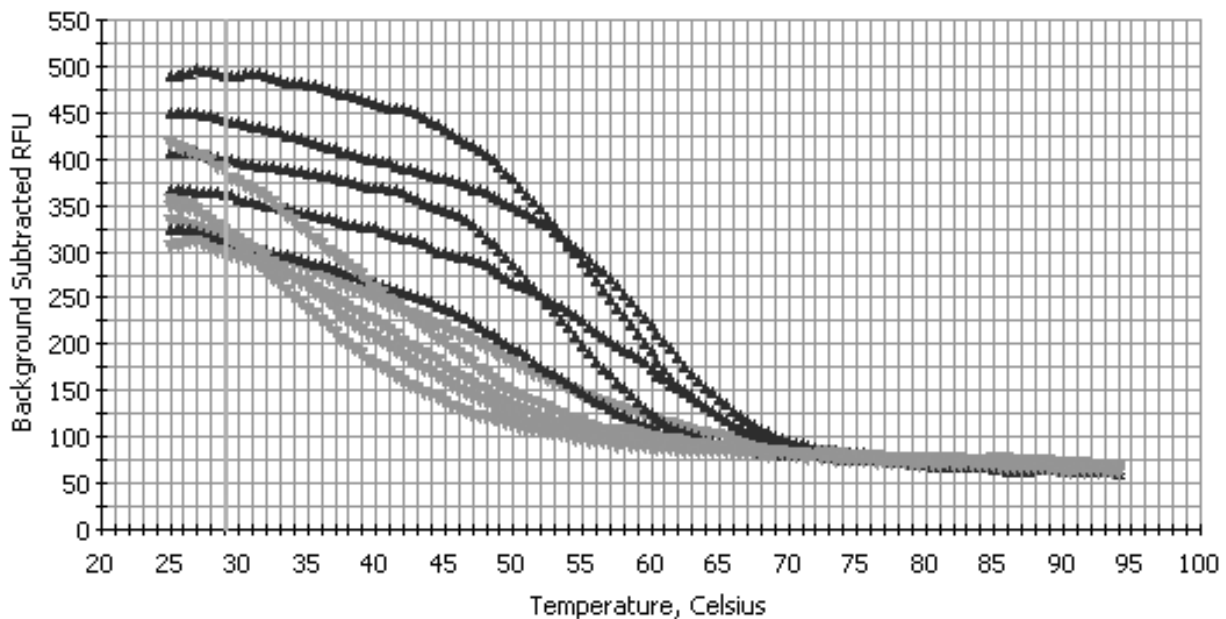


Figure 2.4.2.II: Dissociation curve analysis; black and grey slopes indicate the melting profile of each of the 5 hairpin-shaped and linear primer pairs, respectively used in the study.

Furthermore, by comparing the primers DCA with the annealing temperature used in the respective efficient PCR assay, it emerged that PCR could be efficiently accomplished assumed that a significant fluorescence is no more present at temperatures used for PCR annealing steps when the secondary structure are mostly resolved. Indeed, the effect of hairpin stem length and stability as verified by DCA and PCR efficiency were further verified in case #2. The 9nt stem length reverse HS primer (9HS primer) showed significant secondary structures still evident above 75°C while the 5nt stem length reverse HS primer (5HS primer) at 65°C showed only residual secondary structure (figure 2.4.2.III).

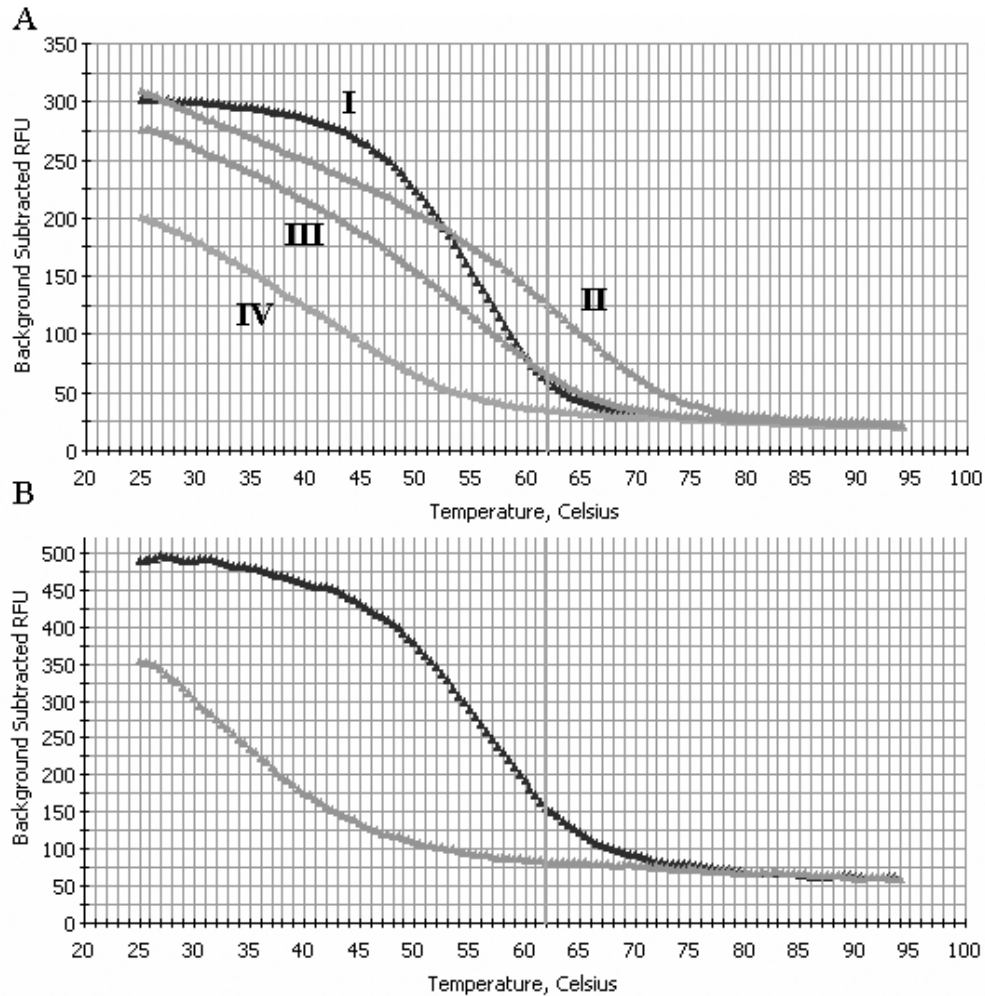


Figure 2.4.2.III: Dissociation curve analysis (DCA) of hairpin-shaped (HS) and linear primers of case #2. A: single primer DCA. Slope I: HS Fwd primer; slope II 9bp stem length HS reverse primer; slope III: 5bp stem length HS reverse primer; slope IV: forward linear primer. At 60°C-64°C a higher proportion of the 9bp stem length HS reverse primer maintains a secondary structure when compared with other HS and linear primers- B primers pairs DCA- black slope HS forward and 5bp stem length HS reverse primers; grey slope forward and reverse linear primers. The fluorescence at each point temperature of black slope is approximately determined by the cumulative fluorescence originated by the single primer of graph A.

When used in PCR assay with the same HS forward primer, the 5HS primer yielded lower cycle threshold (Ct) than the 9HS primer regardless the target copy number. Furthermore, the 9HS primer worked better at 64°C than at 60°C although both annealing temperatures did not yield amplification of the low copy number sample (Figure 2.4.2.IV).

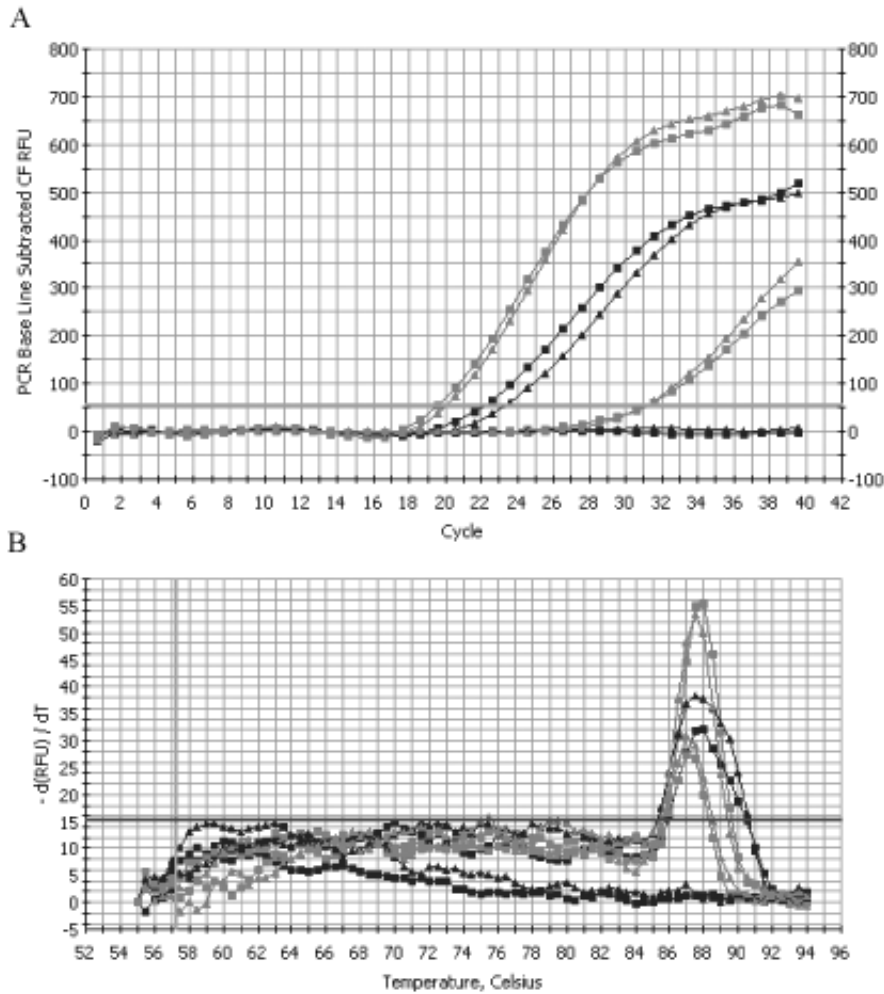


Figure 2.4.2.IV: Effect of Hairpin stem-length: Amplification plot and melt curves of case #2. Grey slopes correspond to the 5bp Hairpin-shaped (HS) reverse primer and black slopes to the 9bp HS reverse primer RTQ-PCR with annealing/extension temperatures of 60°C (squares) and 64°C (triangles). Two samples of case #2 with different target copy/numbers (high and low) are represented.

Also HS primer-dimer formation occurred frequently during the study and only minimal improvement were reached with alternative primer design. Nevertheless, primer-dimer resulted in an assay interference only rarely. Indeed, primer-dimer almost invariably, occurred in blank samples or samples without specific target. Nevertheless, in some cases, (cases #2,3 and 5), the primer-dimer formation occurred even in samples with low or very low target numbers (Figure 2.4.2.V).

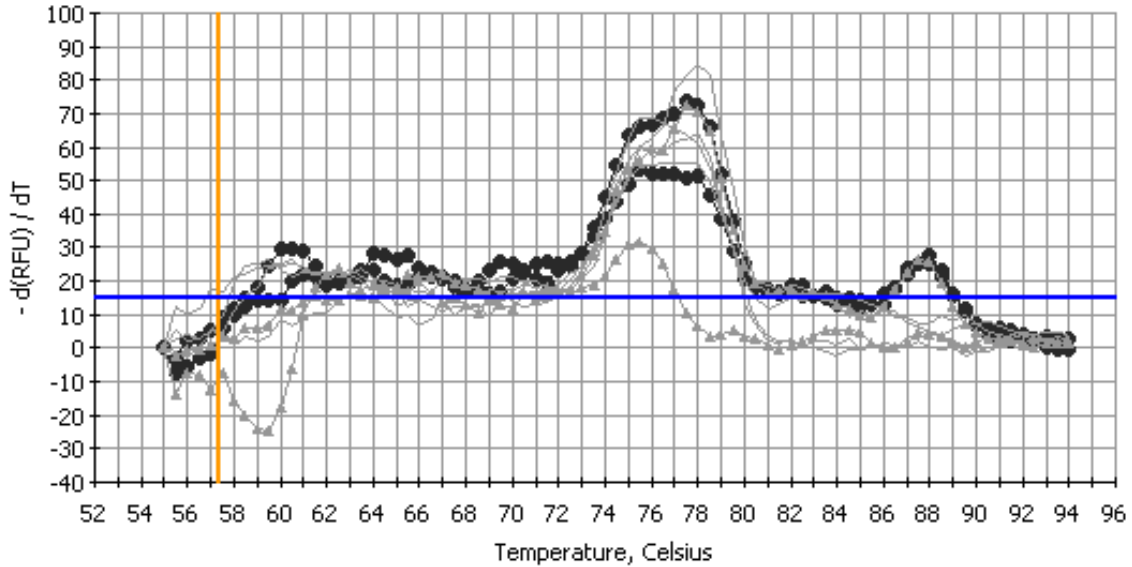


Figure 2.4.2.V: Melt curve analysis of sensitivity RTQ-PCR experiment. case #2. Duplicates of 1.6 (black circles), 0.3 copies/reaction (grey triangles) and negative (genomic and no dna samples) controls (grey lines). Primer-dimer melt peaks with T_m in the 74-80°C range are evident in all sample tested. 1.6 copies/reaction samples yielded a specific peak with $T_m \approx 88^\circ\text{C}$. Only 1 out of 2 duplicates of the 0.3 copies/reaction sample yielded a specific peak.

Therefore, the increased fluorescence in those samples due to both specific and aspecific signals hampered the quantitative assessment below the threshold of 40 copies/reaction. Unbalanced primers concentration lead to markedly increased C_t values when compared with the equal concentrations of primers although no primer-dimer fluorescence were seen. Moreover, DCA analysis showed that the at each point temperature, the fluorescence intensity generated by the primers pair seemed to reproduce the additive effect of the fluorescence of single primers. No significant additional cross-dimer fluorescence were noted on DCA analysis (Figure 2.4.2.III).

RTQ-PCR specificity

Cross reactivity experiments showed that at low annealing temperature (from -5°C to 0°C from the predicted mean T_m) linear primers in almost all cases gave fluorescence increase due to products with melt peaks very close or overlapping with the specific melt peak (Figure 2.4.2.VI).

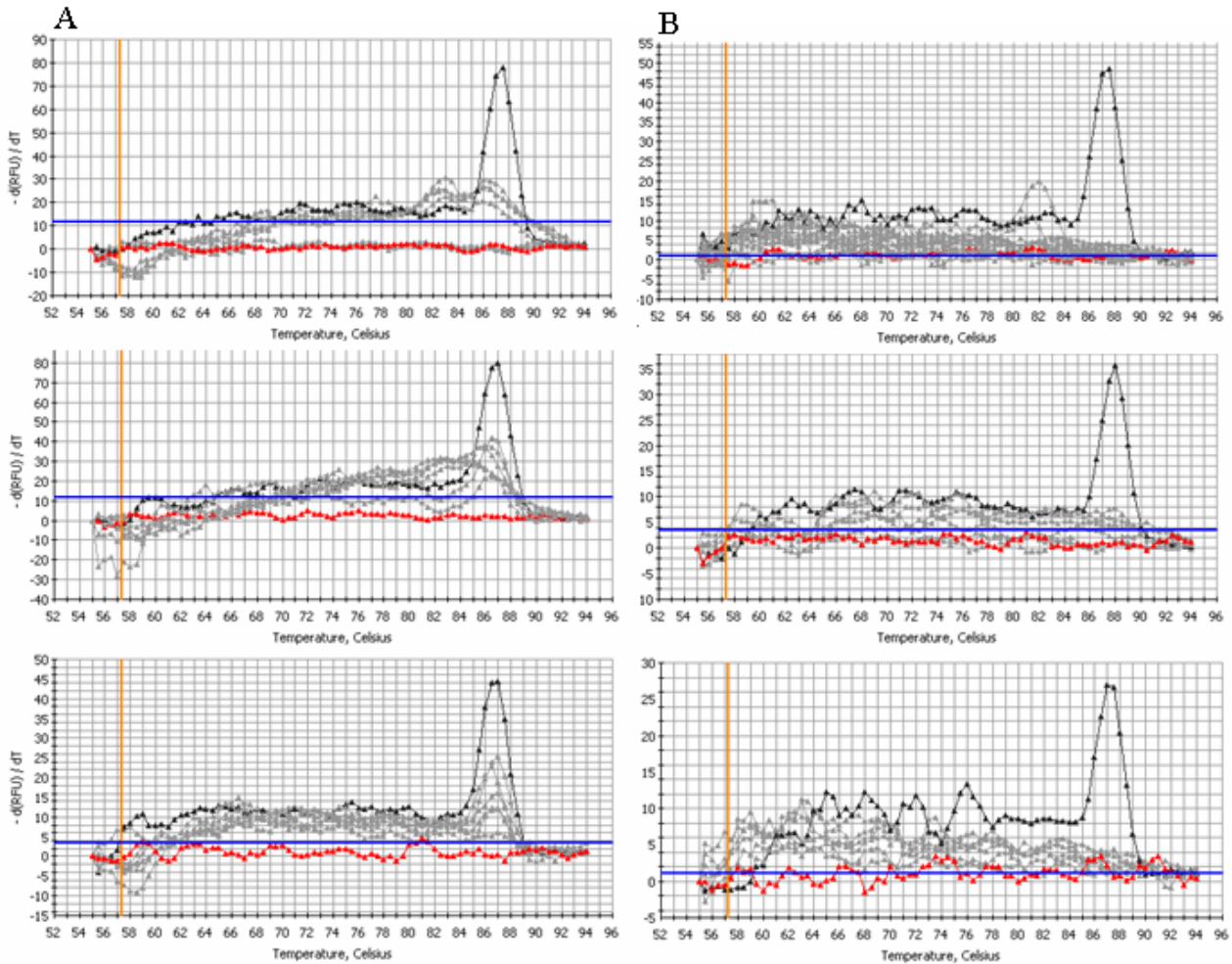


Figure 2.4.2.VI : Effect of annealing temperature on the RTQ-PCR specificity. Selected examples of melt curve analysis of standard primer assays. A) 3-step RTQ-PCR reaction with an annealing temperature nearly equal of the predicted mean T_m of the primers and B) the respective 2-step RTQ-PCR reaction with an annealing/extension temperature 5-10.5°C above the predicted mean T_m of the primers; Black curves indicate the specific target, grey curves indicate aspecific target, red curve indicate no dna sample.

The aspecific products were very common with both pooled normal lymph node gDNA and pooled lymphoma gDNA. Rarely, increased fluorescence due to products with melt peaks in the range of 82°C-84°C were found. At higher annealing temperature pooled gDNA randomly resulted in a delayed increased fluorescence (reaching the threshold after 35 Ct) with T melt peaks overlapping the specific melt peak. The definitive annealing temperature required to achieve adequate specificity with linear primers ranged from 5.0°C to 10.5°C above the mean T_m .

DCA experiments showed that at temperature below 60°C, the HS primer may maintain significant hairpin folding hampering PCR efficiency. Thus the specificity experiment with HS primers were carried out beginning from 60°C in 2 step PCR and increasing the annealing/extension temperature

accordingly with the expected specificity obtained. HS primers consistently shown to do not amplify cross-targets with 2 step PCR cycling protocol with annealing/extension temperature in the range of approximately -1°C to 5°C different from their mean T_m.

RTQ-PCR sensitivity and PCR efficiency

To carry out the assay calibration as well as to evaluate sensitivity using both serially diluted plasmid or gDNA series, the PCR protocols which yielded specific results, were used.

Calibration curve slopes and efficiencies of both linear and HS primers were reported in Table 2.4.2.II.

Case #	Dilution series	Primer type	efficiency	Correlation coefficient	Sensitivity
		Annealing T			
1	plasmid	linear	87.1 %	0.983	40 copies/reaction
		HS	99.4 %	0.989	1.6 copies/reaction
2	plasmid	linear	86.5%	0.960	8 copies/reaction
		HS	82.2%	0.997	1.6 copies/reaction
3	plasmid	linear	91.0%	0.996	40 copies/reaction
		HS	104.2%	0.988	8 copies/reaction
4	genomic	linear	99.2%	0.965	10 ⁻³
		HS	108.1%	0.995	10 ⁻⁴
5	genomic	linear 65°C	98.3%	0.980	10 ⁻⁴ /10 ⁻⁵
		HS 68°C	103.0%	0.999	10 ⁻⁴

Table 2.4.2.II: Real-Time quantitative PCR assays carried out with linear and hairpin-shaped clone-specific primers. Calibration curve parameters and sensitivity observed.

The coefficient correlations were > 0.960 in all cases. The linear primers efficiencies of cases # 1, 2 and 3 were 83.4%, 86.5% and 91.0% while the sensitivity was 40, 8 and 40 copies/reactions, respectively. The HS primers efficiency was 99.4%, 82.2% and 104.2% with a sensitivity of 1.6, 1.6 and 8copies/reaction (Figure 2.4.2.VII).

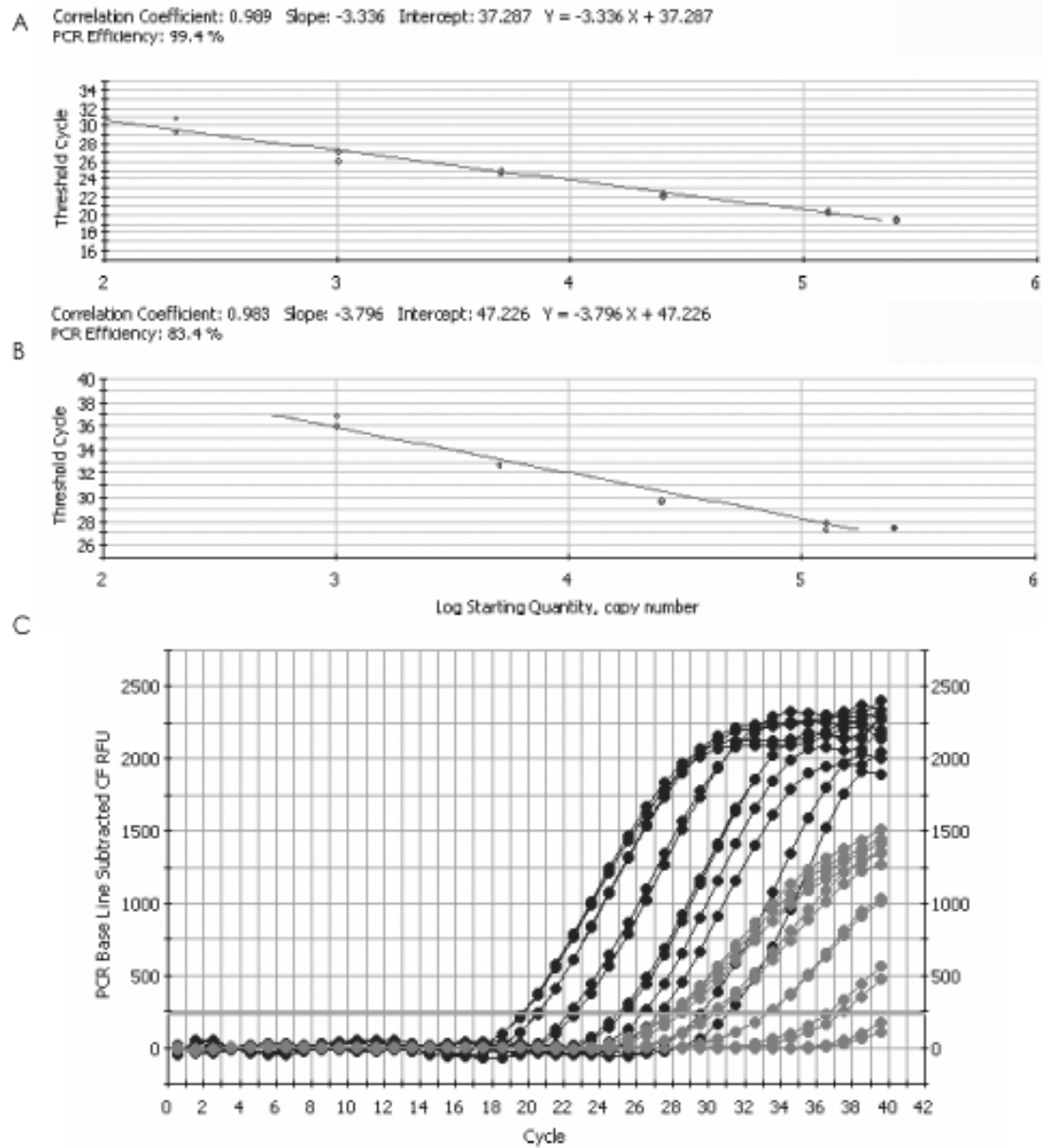


Figure 2.4.2.VII: Calibration curves case #1. Plasmid dilution series from 2.5×10^5 to 2.0×10^2 Dual step PCR with annealing/extension temperature 68°C obtained with Hairpin-shaped (HS) primers (A), linear primers (B); C curve slope comparison; black slopes indicate the curve obtained with HS primers and grey slopes indicate the curve obtained with linear primers in RTQ-PCR. In case # 1, linear primer sensitivity was 40 and 200 copies/reaction at 65°C and 68°C , respectively.

Primer-dimer formation frequently occurred simultaneously with specific target amplification at low or very low copies/reaction (Figure 2.4.2.V). In one case, the 1.6 copies/reaction resulted positive in one duplicate and negative in the other. Also reproducibility was affected by low copy number. CVs were below 5% until 40 copy/reaction but markedly increased in few copy number samples.

Ten-fold serial dilutions of the gDNA at diagnosis gave similar results. In both cases (case #4 and #5) HS primer assays consistently found positive the 10^{-4} samples (approx 3 copies/ μ l) compared to the 10^{-3} (approx 30 copies/ μ l) and 10^{-5} sample (0.3 copies/ μ l) respectively detected by the linear primer assay. In the latter case (#5) linear primers found positive 1 out of 2 replicate of the 10^{-5} sample (approx 0.3 copies/ μ l) at 65°C which was the OTA found for both linear and HS primers. Nevertheless, at 65°C, the HS primer assay yielded primer-dimer fluorescence (T_m of 76.5°C) already evident in the 10^{-3} sample together with the specific melt peak. In case #5 HS primers performed better at 68°C since primer-dimers fluorescence was not found until the 10^{-4} sample, allowing to obtain the best PCR efficiency and calibration curve slope. Conversely, when the dilution series of case #5 was assessed with linear primer at 68°C the sensitivity of drop to 10^{-3} .

Discussion

Here, we report, for the first time, the use of allele specific HS primers for efficient amplification of IgH targets of lymphoid malignancies. The methods herein described, presents some advantages over previous techniques since the RTQ-PCR assay achieved adequate sensitivity and specificity with less validation steps and without the use of expensive fluorescently labelled probes.

The forward and reverse AS primer were designed complementary with germline IgH V CDRII sequences and junctional CDRIII sequences, respectively. The use of linear AS primers complementary with germline and/or junctional sequences but also including a set of consensus sequence fluorescently labelled probes have been already shown to be accurate. 43tarusawa Unfortunately, we confirmed that the use of the DNA-intercalating dye SYBR Green instead of labelled probes, yielded the amplification of aspecific products with melt peaks overlapping with the specific one as already reported by others (Nakao et al., 2000). The aspecific amplification was unpredictable albeit the increasing of annealing temperature solved it. However, the critical effect of annealing temperature in influencing the assay sensitivity required cumbersome assay validation procedures as well as the annealing temperatures necessary to achieve adequate specificity with linear AS primers were as high as sensitivity loss occurred in some cases. In an attempt to verify whether modified AS primers could allow the use of inexpensive DNA-intercalating dye with accurate results (PCR efficiency, sensitivity

and specificity) some strategies were attempted. The main issues to address were associated with some peculiar technical difficulties of MRD assessment through V(D)J gene rearrangements target amplification. Indeed, an accurate assay should discriminate a target among a multitude of cross-targets of unknown sequences with a sensitivity of few copies/reaction. Normal or reactive lymphoid cells could theoretically carry sequences highly homologous with the target sequence. That collides with specificity which, in turn, is a compelling requirements because false positives could strongly impact the clinical management of the patient. Finally, since each assay is patient-specific, the design should be flexible enough to reduce the validation steps and overall costs. To address such concerns, initially, primers pairs of case #3 were purchased modified with locked nucleic acids (LNA) nucleotides (data not shown). LNAs are nucleic acid analogues that are conformationally locked in a C3'-endo/N-type sugar conformation by an O-2'- to C-4' methylene linkage.^{52lna} The LNA/DNA duplex show increased melting temperature and much increased stability so as the mismatched hybridization of LNA incorporating oligos is strongly destabilized favouring the allele specific hybridization (Ballantyne et al., 2008). Nevertheless, LNA oligo design is yet particularly challenging. Indeed, two different pairs of LNA AS primers were tested but no significant advantages over linear primers were observed and further experiments were not carried out. Hazbon and Allan demonstrated that the addition of a 5' tail sequence reverse and complementary with the 3' end of a primer improved the discriminatory potential of allele specific oligos for single nucleotide polymorphism (SNPs) genotyping (Hazbón and Alland, 2004). That study also demonstrated that the hairpin-shape had a better discrimination power than a generic 5'tail addition (Hazbón and Alland, 2004). Nevertheless, for SNPs typing, PCR efficiency and sensitivity are not actual concerns. In our study, the hypothesis that the hairpin secondary structure of modified clone-specific primers could allow efficient PCR amplification for quantification of MRD with high specificity and sensitivity was verified. Primer design software accurately rejects oligos with secondary structures and excessive stable hairpin structures. However, DCA showed that at annealing/extension temperatures used in 2-steps RTQ-PCR, HS primers secondary structures were almost completely resolved. At that temperatures, HS primers efficiently performed PCR. By comparing the dissociation curves and the predicted stability of the hairpin stem, an enthalpy between -4 to -8 Kcal/mol caused by 5-8 nt long hairpin stem worked adequately. Longer

stems with Δg less than -8.5 Kcal/mol caused the secondary structure to interfere with the PCR amplifications. Upon target hybridization, the 5' tail is included in the following PCR cycle and the T_m of the duplex composed by HS primer and the modified target is increased. The actual melting temperature increases cycle by cycle favouring the specific annealing of the HS primers. Nevertheless, in HS primers the free energy of the duplex loop moiety/target sequence should exceed the free energy of the hairpin folding. Consequently, the ratio between the stem and loop nucleotides should not be excessively high which means that the length of the 5' tail should be proportional to the primer length. For HS primer design, this issue was addressed by limiting the difference between the T_m of the HS and the respective linear primer within 10°C. A wider difference due to 5' tail excessive length lead to an excessive stability of the hairpin structure limiting the possibility of target annealing. The occurrences of primer-dimer was seen commonly in blank or genomic negative controls but did not represented a pitfall whether the melt curve analysis is perform as a common validation step at the end of PCR. Nevertheless, In few cases, low copy number samples yielded an increase of fluorescence due to both specific and aspecific amplifications hampering the possibility to correctly quantify low numbers samples. For this reason and for low reproducibility, samples with less than 8-40 copies/reactions could not be quantified. Although this represented a limit of the assay, it do not carry a detrimental impact on clinical management. Also alternative assays resulted scarcely reproducible when very few targets need to be quantified (van der Velden et al., 2007). Unbalanced primers PCR experiments showed that hairpin-dimer were caused by cross-dimer formation. Nevertheless, DCA did not shown a significant interaction between the forward and reverse HS primers. To explain the high fluorescence caused by HS primer-dimers evidenced in PCR, we speculated that the lengths of the HS primer yielded much longer primer-dimers than the respective shorter linear primers. The issue of primer-dimer formation was not completely addressed but the analysis of the limited number of samples of this study suggests that primer-dimer formation occurred less commonly and were less evident in those assays using linear primers with predicted high (less negative) Δg cross-dimer free energy. Further studies and experimental data may help to elaborate algorithms for software assisted effective and optimized HS primers design. The MRD assay using allele specific HS primers has several advantages over current techniques. Indeed, the assay herein described achieved adequate accuracy

with fewer validation procedures than the respective linear primers. We found that HS primers performed efficient PCR at annealing temperature just above their predicted T_m maintaining this capability even at higher temperatures. Conversely, linear primers were shown to be specific in some cases only at an annealing temperature which also cause reduced sensitivity while, in other cases, the increase of few degrees above the temperature necessary for specificity, caused a marked reduction of sensitivity. Thus, though also linear primer assays were shown to achieve reliable results, the HS primers conferred more flexibility to the assay design and achieved accurate results more consistently. Furthermore, the allele specific HS primers allow to reduce the overall costs due to the effective use of DNA-intercalating dyes SYBR Green instead of fluorescently labelled probes.

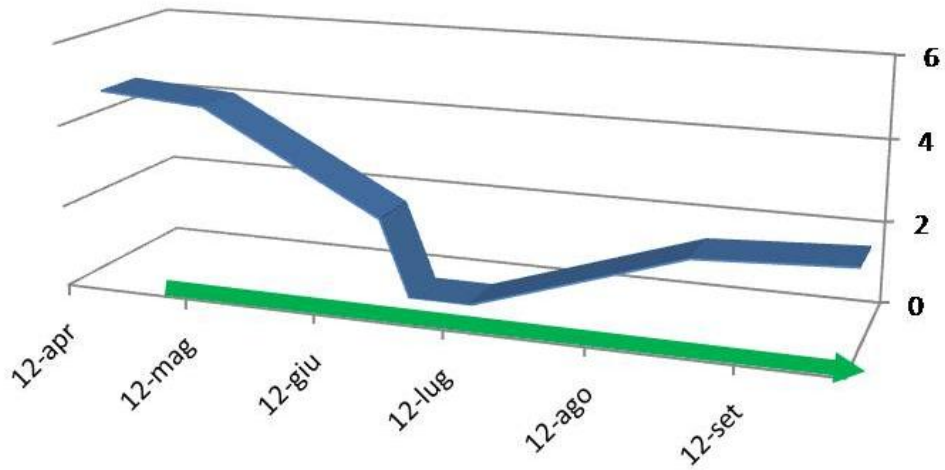
2.4.2.2 Monitoraggio retrospettivo della malattia residua minima da sangue periferico in corso di linfoma canino trattato con protocollo chemioterapico multifarmaco

I primer ad hairpin sono stati utilizzati per valutare retrospettivamente il decorso in 5 cani affetti da linfoma e sottoposti a chemioterapia antitumorale con protocollo multifarmaco comprendente nel caso 2 doxorubicina, LAsparaginase e prednisone e negli altri casi anche Ciclofosfamide e vincristina, Retrospettivamente è stata valutata la malattia residua minima nei campioni di sangue intero congelati al momento dell'effettuazione della seduta chemioterapica o al momento della visita di controllo in corrispondenza del Nadir (punto di massima riduzione del parametro ematologico) previsto neutrofilico.

Il DNA è stato estratto mediante kit commerciale e sottoposto a Real-Time qPCR con il medesimo saggio validato come sopra.

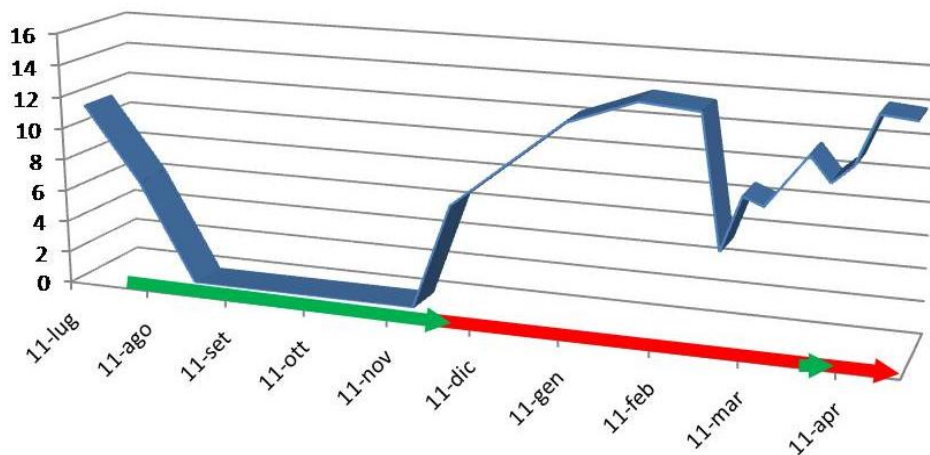
I soggetti sono stati definiti all'ammissione: al momento della prima visita clinica indipendentemente dallo stato clinico; in remissione parziale (RP) qualora l'esame clinico evidenziasse una riduzione dei linfonodi variabile tra 0 e 25%; in remissione completa qualora si osservasse una riduzione di tutti i linfonodi superiore al 75%; in recidiva, qualora si evidenziasse un aumento in più di 1 linfonodo dopo un periodo di almeno 1 settimana di remissione completa.

Caso 1:



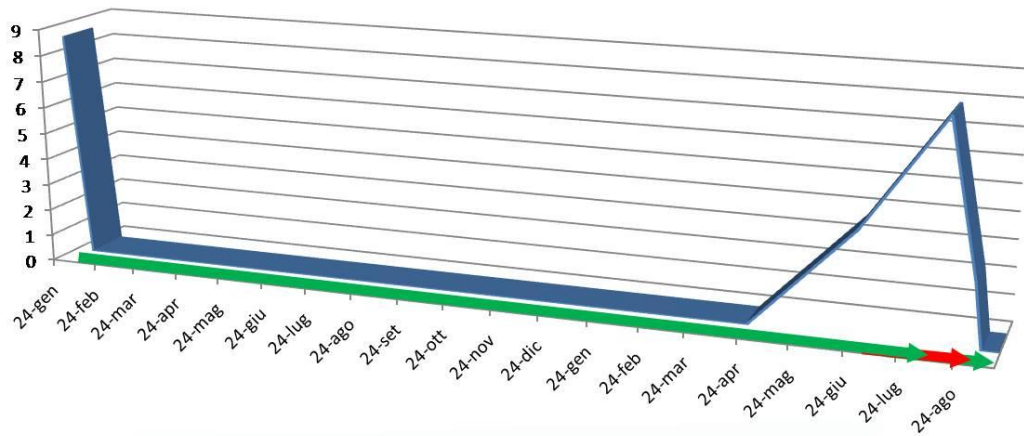
Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa evidente per tutto il periodo in cui è sottoposto a chemioterapia. Ad eccezione di un breve periodo, il saggio qPCR ha rivelato in quasi tutto il decorso la presenza di malattia residua minima. Il soggetto è deceduto in remissione clinica per cause apparentemente non correlate né con il linfoma, né con la chemioterapia.

Caso 2



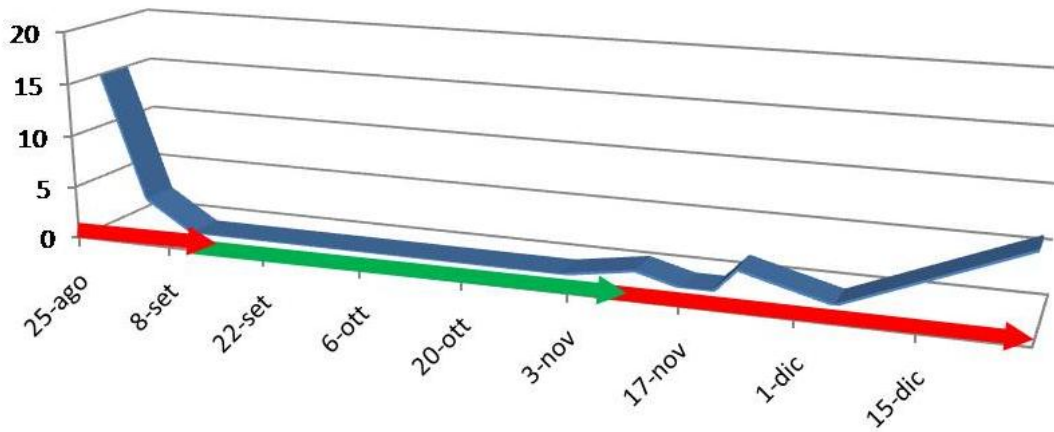
Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa evidente per tutto il periodo in cui è sottoposto a chemioterapia. Il saggio qPCR ha anticipato la recidiva di 9 gg. Dopo la prima recidiva il soggetto ha presentato quasi esclusivamente risposte parziali con saggio qPCR sempre positivo.

Caso 3:



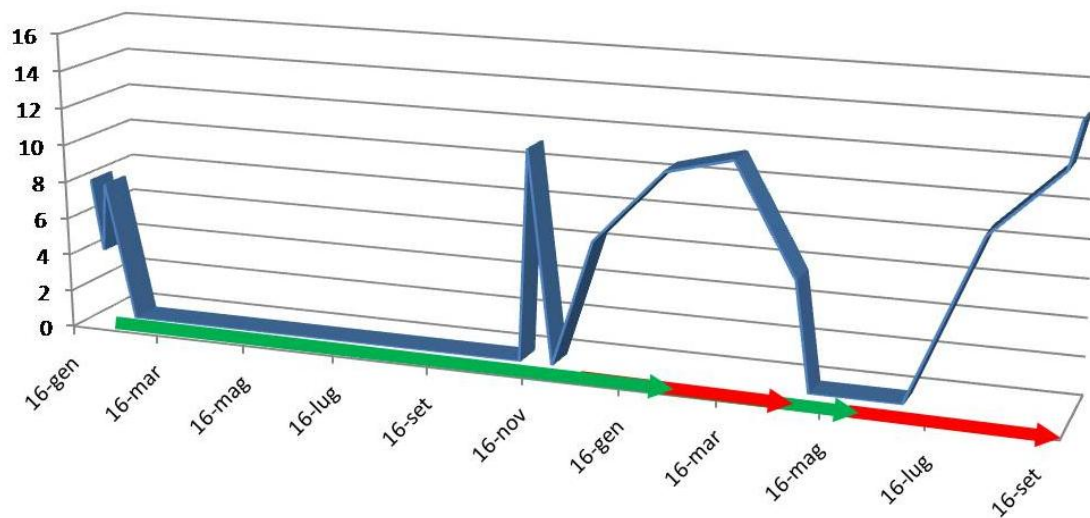
Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa prolungata. Il saggio qPCR ha anticipato la recidiva di circa 3 mesi.

Caso 4:



La remissione clinica ha durata piuttosto breve con recidiva precoce non anticipata da qPCR positiva. In questo caso il saggio molecolare sembra aver confermato il decorso clinico senza anticipare utili informazioni.

Caso 5:



Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa prolungata. Il saggio qPCR ha anticipato la recidiva di circa 3/4 mesi.

Sebbene la casistica sia limitata e le conclusioni non possano assumere validità generale, dai casi presentati sembra configurarsi una notevole utilità del saggio qPCR per il monitoraggio della malattia residua minima da sangue periferico. Ad eccezione di un caso, la positività al saggio ha sempre anticipato la recidiva clinica. In due soggetti il saggio qPCR ha evidenziato malattia residua minima da sangue periferico 3-4 mesi prima della recidiva clinicamente manifesta. L'applicazione prospettiva in gruppi caso-controllo potrà chiarire se la modulazione della terapia sulla base dei risultati del saggio qPCR può avere un effetto sul decorso in termini di prolungamento della remissione clinica, aumento del tempo di sopravvivenza o almeno come riduzione del dosaggio di antitumorale utilizzato a parità di efficacia clinica.

2.4.2.3 Bibliografia

1. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. 2002; 16:1668-1672.
2. Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance. *Genomics* 2008; 91: 301–305.
3. Boniotto M, Hazbón MH, Jordan WJ, Lennon GP, Eskdale J, Alland D et al. Novel hairpin-shaped primer assay to study the association of the -44 single-nucleotide polymorphism of the DEFB1 gene with early-onset periodontal disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11:766-769.
4. Böttcher S, Ritgen M, Pott C, Brüggemann M, Raff T, Stilgenbauer S, Döhner H, Dreger P, Kneba M. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004; 18:1637-1645.
5. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, Dolman G et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001; 15:385-390.
6. Brüggemann M, Droese J, Bolz I, Lüth P, Pott C, von Neuhoff N, Scheuering U, Kneba M. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000; 14:1419-1425.
7. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 1116-1123.
8. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998; 339:591-598.

9. Corradini P, Ladetto M, Zallio F, Astolfi M, Rizzo E, Sametti S et al. Long-term follow-up of indolent lymphoma patients treated with high-dose sequential chemotherapy and autografting: evidence that durable molecular and clinical remission frequently can be attained only in follicular subtypes. *J Clin Oncol.* 2004; 15; 22:1460-1468.
10. Czuczman MS, Grillo-López AJ, McLaughlin P, White CA, Saleh M, Gordon L et al. Clearing of cells bearing the bcl-2 [t(14;18)] translocation from blood and marrow of patients treated with rituximab alone or in combination with CHOP chemotherapy. *Ann Oncol.* 2001; 12:109-114
11. Eckert C, Landt O, Taube T, Seeger K, Beyermann B, Proba J et al. Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000; 14:316-323.
12. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2001; 358:1239-1241.
13. Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M et al. Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia.* 2003; 17:2517-2524.
14. Evans PA, Short MA, Owen RG, Jack AS, Forsyth PD, Shiach CR, Kinsey S, Morgan GJ. Residual disease detection using fluorescent polymerase chain reaction at 20 weeks of therapy predicts clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1998; 16:3616-3627.
15. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2008, 22:771-782.
16. Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 127: 47-56
17. Gökbüget N, Raff R, Brügge-Mann M, Flohr T, Scheuring U et al. Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. *Ann Hematol.* 2004; 83 Suppl 1:S129-131.

18. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001, 194-220.
19. Hazbón MH and Alland D. Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1236-1242.
20. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 541-547.
21. Kimby E, Jurlander J, Geisler C, Hagberg H, Holte H, Lehtinen T et al. Long-term molecular remissions in patients with indolent lymphoma treated with rituximab as a single agent or in combination with interferon alpha-2a: a randomized phase II study from the Nordic Lymphoma Group. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49:102-112.
22. Koshkin AA, Nielsen P, Meldgaard M, Rajwanshi VK, Singh SK, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): an RNA mimic forming exceedingly stable LNA:LNA duplexes. *J Am Chem Soc* 1998;120:13252–13253.
23. Malec M, van der Velden VH, Björklund E, Wijkhuijs JM, Söderhäll S, Mazur J et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia*. 2004; 18:1630-1636.
24. Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003
25. Merx K, Müller MC, Kreil S, Lahaye T, Paschka P, Schoch C et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*. 2002; 16:1579-1583.
26. Müller MC, Gattermann N, Lahaye T, Deininger MW, Berndt A, Fruehauf S et al. Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C. *Leukemia*. 2003; 17:2392-2400.

27. Nakao M, Janssen JW, Flohr T, Bartram CR. Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and T-cell receptor loci by LightCycler technology. *Cancer Res.* 2000; 60:3281-3289.
28. Norris MD, Kwan E, Haber M, Marshall GM. Detection of evolving immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia: a PCR-based assay employing overlapping DJH primers. *Leukemia.* 1995; 9:1779-1782.
29. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood.* 2002; 99:1253-1258.
30. Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2000; 95:790-794.
31. Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T et al. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia.* 2003; 17:1687-1694.
32. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998; 12:2006-2014.
33. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999; 13:110-118.
34. Raff T, Gökbuget N, Lüschen S, Reutzel R, Ritgen M, Irmer S et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood.* 2007; 109: 910-915.

35. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C, Carlotti E, Arcaini L, Baccarani M et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood*. 2002; 99:856-862.
36. Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E, Della Starza I, Baccarani M, Cortelazzo S et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2005; 105:3428-3433.
37. Rasmussen T, Poulsen TS, Honoré L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol*. 2000; 28:1039-1045.
38. Sabesan V, Cairo MS, Lones MA, Perkins SL, Morris E, Sposto R et al. Assessment of minimal residual disease in childhood non-hodgkin lymphoma by polymerase chain reaction using patient-specific primers. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 25:109-113.
39. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Sary J, Trka J Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 48:93-100.
40. Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E, Holm MS, Nielsen JL, Hokland P. Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol*. 2001; 67:302-308.
41. Sutton R, Bahar AY, Kwan E, Giles JE, Venn NC, Tran S, Hackenberg N, Pozza LD, Marshall GM, Haber M, van der Velden VH, Norris MD. Improving minimal residual disease detection in precursor B-ALL based on immunoglobulin-kappa and heavy-chain gene rearrangements. *Leukemia*. 2008; in press
42. Tarusawa M, Yashima A, Endo M, Maesawa C. Quantitative assessment of minimal residual disease in childhood lymphoid malignancies using an allele-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction. *Int J Hematol*. 2002; 75:166-173.
43. Uchiyama M, Maesawa C, Yashima-Abo A, Tarusawa M, Satoh M, Satoh T et al. Short consensus probes with 3'-minor groove binder of the immunoglobulin heavy-chain gene for real-time quantitative PCR in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Lab Invest*. 2004; 84:932-936.

44. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hählen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002;16:928-936.
45. van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, van Wering ER, van Dongen JJ. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 2003; 17:1834-1844.
46. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003; 17:1013-1034.
47. van der Velden VH, Boeckx N, van Wering ER, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004; 18:146-154.
48. van der Velden VH, de Bie M, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease. *Haematologica*. 2006; 91:679-682.
49. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007; 21:604-611.
50. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352:1731-1738.
51. van Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003; 17:2318-2357.

52. Voena C, Ladetto M, Astolfi M, Provan D, Gribben JG, Boccadoro M, Pileri A, Corradini P. A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia*. 1997;11:1793-1798.
53. Yashima A, Maesawa C, Uchiyama M, Tarusawa M, Satoh T, Satoh M et al. Quantitative assessment of contaminating tumor cells in autologous peripheral blood stem cells of B-cell non-Hodgkin lymphomas using immunoglobulin heavy chain gene allele-specific oligonucleotide real-time quantitative-polymerase chain reaction. *Leuk Res*. 2003; 27:925-934.

NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE

Il Copyright degli articoli inseriti nella presente Tesi di Dottorato, di cui il Dr. Fabio Gentilini è autore, sono detenuti da Elsevier B.V.. L'autore mantiene i seguenti diritti e pertanto l'utilizzo degli articoli ottempera alle norme sul diritto d'autore.

- *the right to include the journal article, in full or in part, in a thesis or dissertation;*
- *the right to use the journal article or any part thereof in a printed compilation of works of the author, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and*
- *the right to prepare other derivative works, to extend the journal article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.*

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/copyright#whatrights>

La stesura di parte del capitolo 2, ed in particolare I paragrafi 2.1, 2.2 e 2.3 sono stati ottenuti e in parte rielaborati dalla Tesi di Dottorato della Dr.ssa Claudia Calzolari "Diagnosi e prognosi molecolare nel linfoma canino", Dottorato di ricerca in Diagnostica collaterale in medicina interna veterinaria" ciclo XIX previa autorizzazione scritta dell'autrice. Ciò fatto in ottemperanza alle norme sul diritto d'autore ed in particolare alle "Indicazioni per l'applicazione delle Linee guida per l'accesso aperto alle tesi di dottorato".

http://www.unibo.it/Portale/Ricerca/Dottorati+di+ricerca/Infodottorandi/Informazioni_deposito_tesi.htm

Lì, 4 febbraio 2009

Io sottoscritta, Dott.ssa Claudia Calzolari in qualità di autrice della Tesi di Dottorato "Diagnosi e prognosi molecolare nel linfoma canino", Dottorato di ricerca in "Diagnostica collaterale in medicina interna veterinaria" ciclo XIX" depositata con il codice ID 92 presso AMS Tesi di Dottorato dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Autorizzo

Il Dr. Fabio Gentilini ad utilizzare parte della mia Tesi di Dottorato per la stesura dei paragrafi 2.1, 2.2 e 2.3 della propria Tesi di Dottorato.

In fede
 Claudia Calzolari

