

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

**DIAGNOSTICA COLLATERALE IN MEDICINA
INTERNA VETERINARIA**

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza:

Vet/08 Clinica Medica Veterinaria

***VALUTAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA MEDIANTE
RQ-PCR UTILIZZANDO PRIMERS CLONE-SPECIFICI IN CANI
AFFETTI DA LINFOMA E SOTTOPOSTI A TRATTAMENTO
ANTIBLASTICO MULTIFARMACO***

Presentata da: **Dott. ssa Camilla Cammelli**

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo

Prof. Paolo Famigli Bergamini

Relatore

Dott.Fabio Gentilini

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
CAPITOLO 1: ANALISI MOLECOLARE DELLA MALATTIA RESIDUA	5
1.1 Introduzione.....	5
1.2 Malattia Residua Minima (MRM)	5
1.3 Ricerca della clonalità.....	8
1.4 Traslocazioni cromosomiche.....	10
CAPITOLO 2: GENETICA DELLE IMMUNOGLOBULINE E DEL TCR.....	14
2.1 Introduzione.....	14
2.2 Struttura molecolare delle Ig e del TCR.....	15
2.2.1 Immunoglobuline (Ig)	15
2.2.2 TCR	17
2.3 Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR.....	19
2.3.1 Immunoglobuline	20
2.3.2 TCR.....	21
2.4 La diversità immunitaria.....	22
2.4.1 Ricombinazione somatica (Riarrangiamento V(D))	22
2.4.1.1 Immunoglobuline.....	23
2.4.1.2 TCR	25
2.4.2 Diversità combinatoria.....	26
2.4.3 Diversità giunzionale.....	27
2.4.3 Diversità somatica (Maturazione dell'affinità).....	31

CAPITOLO 3: LA PCR NELLA VALUTAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA	33
3.1 Introduzione.....	33
3.2 Amplificazione dei riarrangiamenti genetici dei recettori antigene-specifici tramite PCR.....	34
3.3 Identificazione dei primers consenso per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi B canine	38
3.4. Identificazione dei primers per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi T canine.....	40
3.5 Limiti dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nella valutazione della MRM	41
3.6 Valutazione quantitativa della MRM mediante RQ-PCR.....	44
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	50
CAPITOLO 5: RISULTATI	66
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	91
BIBLIOGRAFIA.....	99
NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE	111

INTRODUZIONE

In medicina umana, l'avvento delle tecniche di biologia molecolare in oncologia, ha apportato notevoli contributi nella diagnosi e classificazione delle patologie linfoproliferative. Queste tecniche sono, oggi, utilizzate a completamento delle tecniche cito-morfologiche comunemente impiegate. In particolare, l'applicazione di tale metodiche riveste una notevole importanza nella ricerca di markers molecolari di neoplasia, utilizzati per la valutazione e il monitoraggio della malattia residua minima (MRM), considerata un potenziale indicatore sensibile dell'outcome dopo la terapia. In medicina umana il monitoraggio e la valutazione quantitativa mediante Real-time quantitativa (RQ-PCR) della MRM nelle neoplasie linfoproliferative rappresenta uno dei capisaldi dei miglioramenti terapeutici. Tuttavia, allo scopo di valutare il reale significato prognostico della MRM è richiesta l'implementazione di approcci standardizzati nelle modalità e nei tempi di valutazione quantitativa della MRM (Cazzaniga e Biondi, 2005; Jolkowska et al., 2007).

Le neoplasie linfoproliferative canine presentano nella loro patogenesi, 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 (Gentilini et al., 2008; Yamazaki et al., 2008); è possibile pertanto speculare che come nel linfoma umano, anche nel linfoma canino la fonte della recidiva della patologia linfoproliferativa derivi dalla malattia residua minima (Yamazaki et al., 2008). Negli ultimi 10 anni, anche in medicina veterinaria, l'interesse nella validazione di marker molecolari di neoplasia ha prodotto diversi studi, rivolti alla valutazione della clonalità (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al, 2003; Avery e Avery, 2004; Vernau, 2004; Tamura et al, 2006; Yagihara et al, 2007; Gentilini et al., 2008) e della malattia residua minima in corso di neoplasie linfoproliferative canine (Calzolari et al., 2006; Yamazaki et al., 2008; Gentilini et al., 2009).

La disponibilità di saggi molecolari altamente sensibili e specifici nella valutazione della MRM rappresenterebbe anche per la medicina veterinaria una svolta in ambito clinico.

Il nostro studio si propone di valutare, attraverso la ricerca dei riarrangiamenti genici clonali delle immunoglobuline mediante RQ-PCR, le oscillazioni quantitative della MRM nel follow-up clinico di cani affetti da linfoma e in remissione completa della sintomatologia dopo trattamento antitumorale e di stabilirne le implicazioni prognostiche.

CAPITOLO 1

ANALISI MOLECOLARE DELLA MALATTIA RESIDUA

(tratto e modificato dalla Tesi di Dottorato del Dr.Fabio Gentilini previa autorizzazione scritta dell'autore; vedi NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE)

1.1 Introduzione

Nel seguente capitolo viene descritto il significato della malattia residua minima (MRM) e le sue implicazioni prognostiche nel management clinico di un paziente affetto da neoplasia linfoproliferativa. Attraverso le applicazioni della tecnica molecolare PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nella valutazione della MRM, vengono inoltre descritti i concetti di clonalità e traslocazione cromosomica.

1.2 Malattia Residua Minima (MRM)

I moderni protocolli terapeutici sono in grado di indurre la completa remissione dei sintomi in una alta percentuale di pazienti affetti da neoplasie linfoproliferative; tuttavia una significativa percentuale dei casi recidiva a distanza variabile dall'inizio della terapia (Bruggemann et al., 2004; Cazzaniga e Biondi 2005). La fonte di questa ricaduta e l'impossibilità di ottenere una remissione duratura deriva dalla presenza di una popolazione cellulare neoplastica resistente alla terapia, che persiste al di sotto del livello identificabile con le tecniche convenzionali cito-morfologiche (Rezuke et al., 1997; Braziel et al.,2003; Cazzaniga e Biondi, 2005).

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 può permanere una popolazione neoplastica di 10^8 - 10^9 cellule tumorali. 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, le cui caratteristiche sono rimaste a lungo sconosciute a causa della limitata sensibilità delle tecniche di analisi disponibili per identificarle (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, Yamazaki et al., 2008). L'impiego di tecniche molecolari sensibili per la valutazione della MRM ha permesso di individuare la persistenza di cellule neoplastiche residue anche in casi clinici caratterizzati da lunghe remissioni cliniche o andamenti indolenti della malattia e ridefinendo il concetto di remissione molecolare (Paietta, 2002).

La valutazione della malattia residua minima presenta una notevole importanza clinica per le sue implicazioni prognostiche: in primo luogo, permette un monitoraggio molecolare del comportamento della neoplasia durante la chemioterapia, consentendo di apprezzare la sensibilità delle cellule neoplastiche al trattamento; in secondo luogo, essa consente di individuare precocemente 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. 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. A questo scopo sono state validate diverse metodiche che consentono di valutare le

oscillazioni quantitative della MRM nel *follow-up* clinico del paziente e che hanno, inoltre, permesso di dimostrare come la valutazione quantitativa e la cinetica della MRM siano più significativamente correlate con l'evoluzione clinica del paziente, rispetto alla sua presenza/assenza (Donovan et al., 2000; Biondi et al., 2000). La valutazione quantitativa della MRM, presenta infatti notevole valenza prognostica, perché in relazione alla quantità di clone neoplastico presente, consente di suddividere i pazienti in categorie di rischio e, in base a quest'ultime, condurre per ciascun paziente approcci terapeutici personalizzati migliorandone complessivamente la prognosi (Biondi et al., 2000; Donovan et al., 2000; Uchiyama et al., 2003; van der Velden et al., 2003; Bruggemann et al., 2006).

Nella leucemia linfoblastica acuta del bambino, il livello quantitativo della MRM identificato nel midollo osseo durante le fasi precoci del trattamento rappresenta un fattore prognostico indipendente dai parametri biologici e clinici comunemente utilizzati per la stratificazione dei pazienti (Cazzaniga e Biondi, 2005; Bruggemann et al., 2000). Il monitoraggio della MRM in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali, per malattie emato-oncologiche, rappresenta un altro esempio di applicazione clinica di valutazione della MRM. I pazienti che mostrano attraverso lo studio della MRM un basso rischio di recidiva, possono essere sottoposti ad terapia immunosoppressiva più intensiva, diminuendo così il rischio di *graft-versus-host disease*; viceversa un'intensificazione della terapia immunosoppressiva diventa controindicata in pazienti con persistenza di una piccola quantità di clone neoplastico, probabilmente controllato dal sistema immunitario (Farina et al., 2009).

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 la PCR, che attraverso l'analisi di clonalità, permette di identificare fino ad una cellula neoplastica tra 10^2 - 10^3 cellule normali utilizzando primers consenso (Vernau e Moore, 1999) o 1 cellula neoplastica tra 10^4 - 10^6 cellule normali mediante primers o sonde tumore-specifici (Szczepanski et al., 2002; Braziel et al., 2003; Cazzaniga e Biondi, 2005;

Arons et al.,2006; Jolkowska et al., 2007). La necessità di quantificare e valutare la cinetica della MRM ha determinato una notevole evoluzione della tecnica PCR, della quale la Real-time PCR quantitativa (RQ-PCR) rappresenta la metodica più sensibile e maggiormente applicata (Bruggeman et al., 2000; van der Velden et al., 2003). La RQ-PCR permette una valutazione quantitativa del clone neoplastico residuo e consente di monitorarne le oscillazioni, durante il *follow-up* della malattia.

Le tecniche PCR utilizzate per la valutazione e il monitoraggio della MRM si basano sulla identificazione di marcatori tumore-specifici rappresentati dai riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici e dai *breakpoints* delle traslocazioni cromosomiche (Braziel et al., 2003).

1.3 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 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).

La tecnica molecolare inizialmente utilizzata per la valutazione della clonalità è stata l'analisi mediante ibridazione Southern Blot (SB). Questa è una metodica sensibile e specifica, per la determinazione della clonalità, ma, contemporaneamente afflitta da numerose limitazioni (tra cui complessità di esecuzione e necessità di DNA adeguato per quantità e purezza), che ne hanno limitato l'utilizzo come tecnica diagnostica pratica (Rezuke et al., 1997; Vernau, 2004). Inoltre, manca di una sensibilità accettabile per il riconoscimento della malattia residua minima.

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).

1.4 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). I geni coinvolti nelle traslocazioni cromosomiche che si associano alle diverse neoplasie linfoproliferative rappresentano i bersagli ideali poiché le regioni di riarrangiamento cromosomico sono unicamente presenti nelle cellule neoplastiche (Cazzaniga e Biondi, 2005). 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'iperespressione 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 MRM dopo trattamento terapeutico (Rezuke et al., 1997).

CAPITOLO 2

GENETICA DELLE IMMUNOGLOBULINE E DEL TCR

(tratto e modificato dalla Tesi di Dottorato del Dr.Fabio Gentilini previa autorizzazione scritta dell'autore; vedi NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE)

2.1 Introduzione

In medicina umana sono stati condotti numerosi studi legati alla necessità di standardizzare i modi e i tempi di rilevamento della MRM allo scopo di rilevarne le implicazioni prognostiche. Un prerequisito fondamentale perché i sistemi di valutazione e monitoraggio della MRM, possano essere integrati nei protocolli diagnostici ed essere così applicati in studi clinici, è rappresentato dalla possibilità di impiegare le stesse metodiche in tutti i pazienti. La ricerca mediante PCR delle traslocazioni cromosomiche può essere applicata solo in un limitato sottogruppo di pazienti affetti da neoplasie linfoproliferative e il loro valore prognostico non è stato ancora ampiamente riconosciuto (Cazzaniga e Biondi, 2005). Diversamente, i riarrangiamenti genici di IgH possono essere utilizzati come target molecolari per la valutazione tumore-specifica della MRM, in circa il 90% dei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule B e in approssimativamente l'80% dei pazienti affetti da linfoma e mieloma (Bruggemann et al., 2000). 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 e di utilizzare anche nel linfoma canino, i riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici come marker molecolare per la valutazione della MRM. Sono stati effettuati anche alcuni studi di citogenetica e recentemente è stato dato inizio ad un progetto di valutazione dell'espressione genica dei linfomi canini su di un'ampia casistica, sebbene l'applicazione clinica diagnostica e prognostica delle traslocazioni cromosomiche appaia ancora lontana. (Thomas et al.,2003). Nonostante la notevole omologia tra cane e uomo nella struttura, l'organizzazione e la regolazione dei

loci genici che codificano per i recettori antigene-specifici, risulta ancora non del tutto conosciuta, 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.

2.2 Struttura molecolare delle Ig e del TCR

2.2.1 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 1)

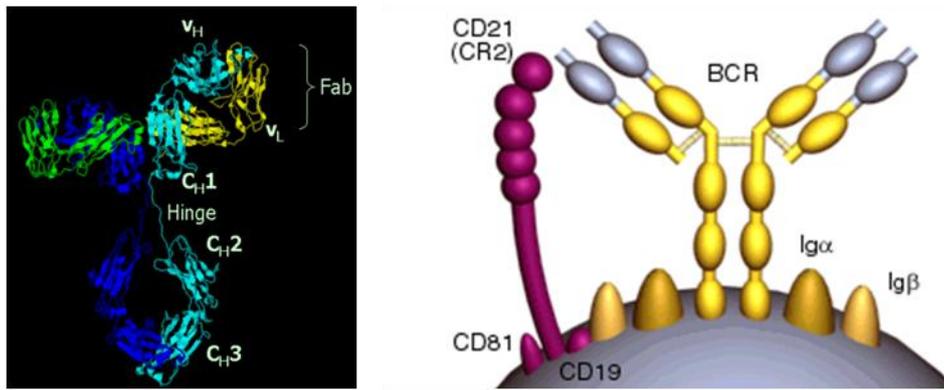


Figura 1: sx) Struttura cristallografica di un'immunoglobulina con la classica forma a Y; dx) Struttura tridimensionale del B-cell Receptor sulla superficie di un linfocita

2.2.2 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).

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.

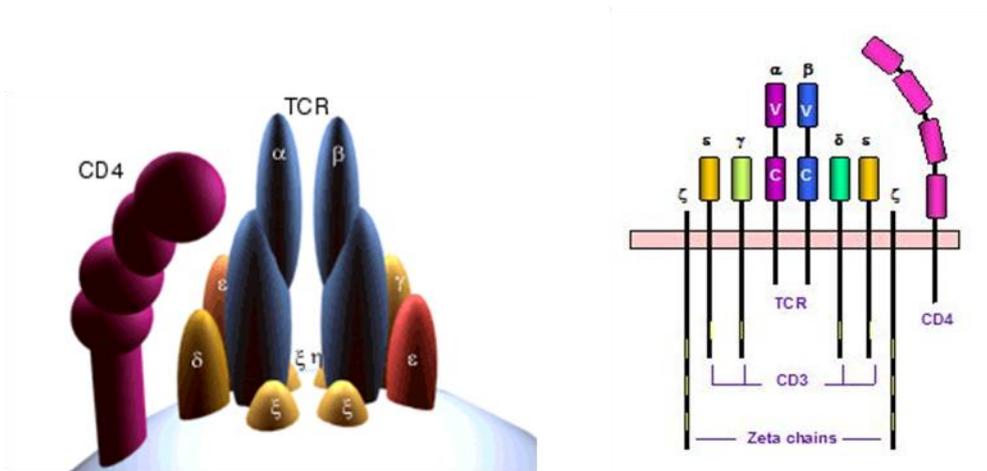


Figura 2: sx) Struttura tridimensionale del TCR sulla superficie di un linfocita T helper; dx) Domini del TCR. Evidenza dei domini transmembranari ed intramembranari e struttura del CD3 e del CD4

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).

2.3 Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR

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.

2.3.1 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 3).

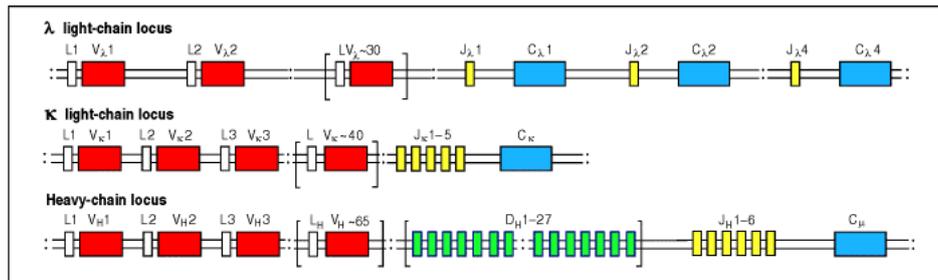


Figura 3: Organizzazione dei loci delle catene leggere e della catena pesante delle immunoglobuline umane: Da Immunobiology. Garland publishing 2001

2.3.2 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 4).

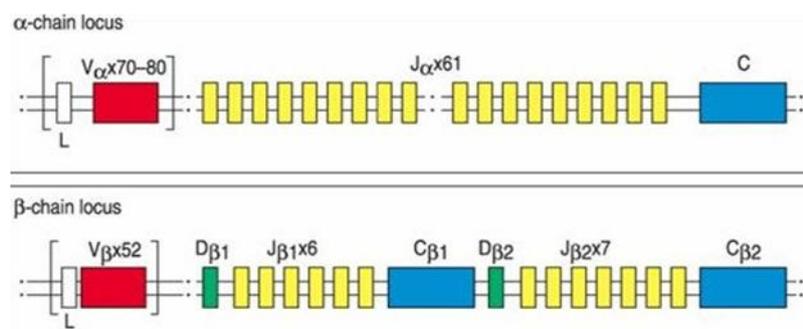


Figura 4: Organizzazione dei loci genici del TCR α e β nell'uomo. Da Immunobiology, Garland Publishing 2001.

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 5).

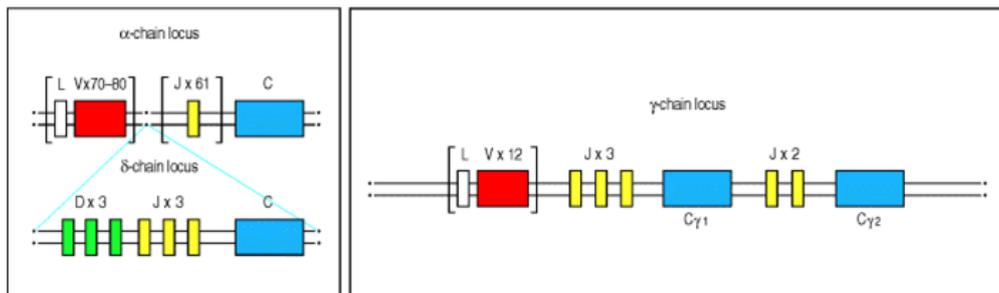


Figura 5: Organizzazione dei loci genici del TCR γ e δ nell'uomo. Da Immunobiology, Garland Publishing 2001

2.4 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).

2.4.1 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.

2.4.1.1 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).

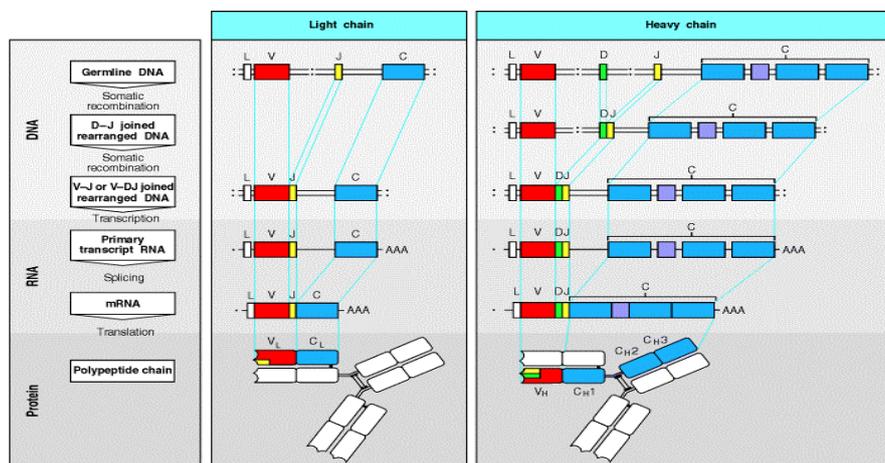


Figura 6: I geni delle regioni variabili e costanti delle immunoglobuline sono prodotti attraverso il processo di ricombinazione somatica dei segmenti genici Da Immunobiology, Garland

Publishing 2001

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 6).

2.4.1.2 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 $VDJ\beta$ si congiunge con il segmento $C\beta 1$ 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 $V\alpha$ con $J\alpha$. 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).

2.4.2 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, classificati sulla base di sequenze nucleotidiche omologhe, all'interno di 7 famiglie e dei quali soltanto 39, risultano funzionali ed in grado di determinare riarrangiamenti produttivi (Matsuda et al., 1998).

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 κ 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.

2.4.3 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, 2006).

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 7).

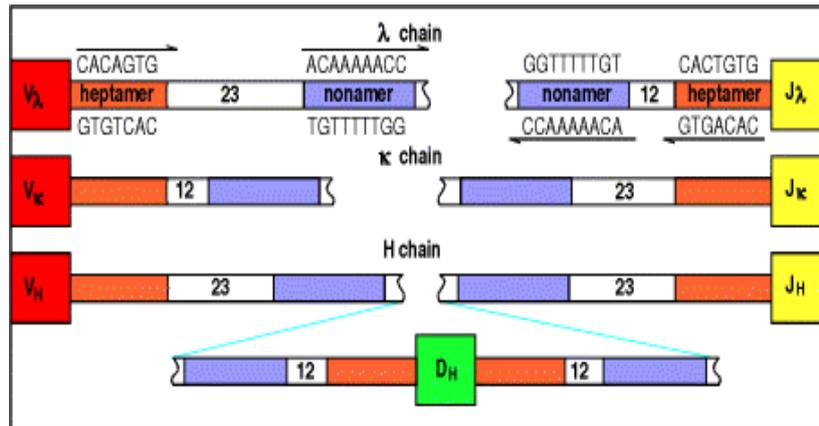


Figura 7: Disposizione delle sequenze conservate (eptamero e nonamero) e degli *spacer* tra i segmenti genici che codificano le regioni variabili delle catene pesanti (H) e delle catene leggere κ e λ. Da Immunobiology, Garland Publishing, 2001

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 7).

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 V_H e J_H 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.

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 8). 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 8).

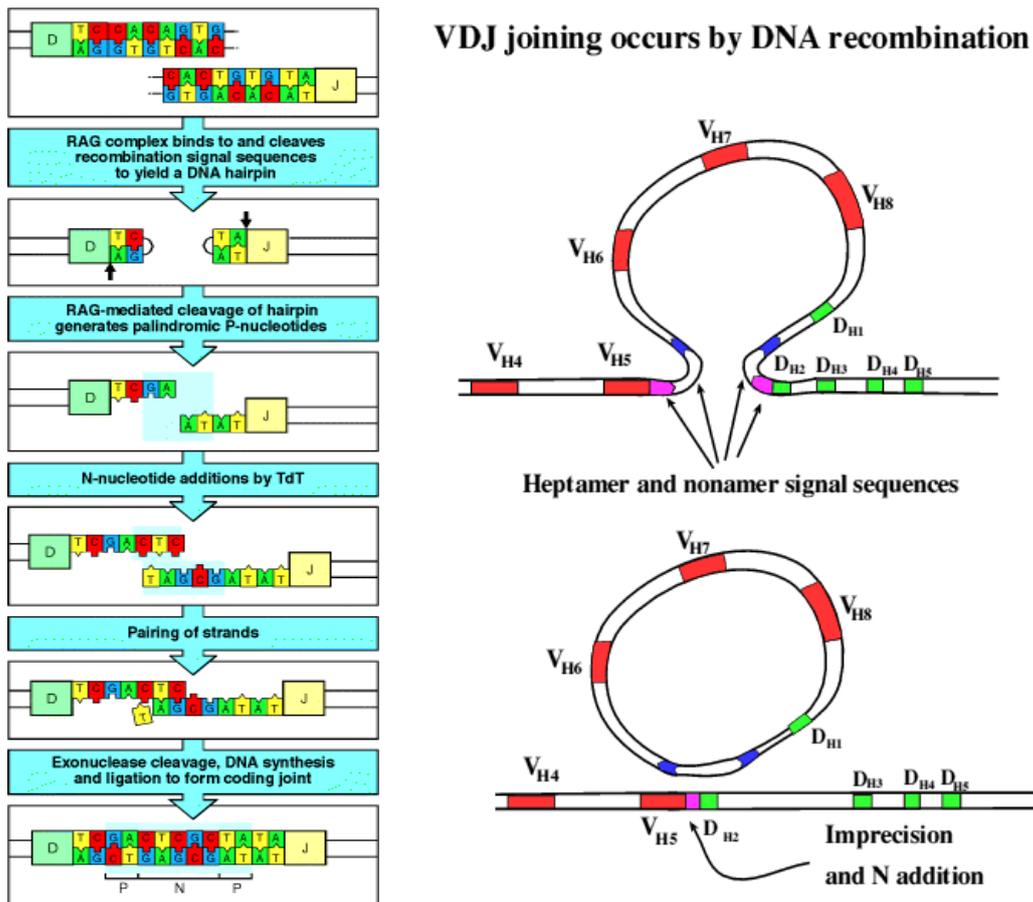


Figura 8: sx) Diversità giunzionale. Da Immunobiology, Garland Publishing, 2001. dx) Azione delle ricombinasi sulle estremità codificanti e segnale. Da Holmes et al, Cambridge University, 2004.

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).

2.4.3 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, 2006).

CAPITOLO 3

LA PCR NELLA VALUTAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA

(in parte tratto e modificato dalla Tesi di Dottorato del Dr.Fabio Gentilini previa autorizzazione scritta dell'autore; vedi NOTA SUL DIRITTO D'AUTORE)

3.1 Introduzione

Nel precedente capitolo 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 e 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).

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. Attraverso la PCR e l'utilizzo di primers consenso è possibile amplificare, per ciascun paziente al momento dell'esordio della malattia, il riarrangiamento genico clonale di Ig o del TCR. e in seguito al sequenziamento del prodotto, identificare la sequenza nucleotidica della regione di giunzione V(D)J sulla base della quale costruire oligonucleotidi allele-specifici (Brisco et al., 1996; Provan et al., 1996; van der Velden et al., 2003).

Questi possono venire, così, utilizzati nella reazione di amplificazione dei riarrangiamenti del clone neoplastico residuo come primers paziente-specifici (in

nested PCR o fluorescenti in Real-time PCR quantitativa) oppure come sonde clone-specifiche, marcate radioattivamente o fluorescenti per la visualizzazione dei prodotti PCR in tecniche di ibridazione o in Real-time PCR quantitativa (RQ-PCR) (Pongers-Willemse et al., 1999). La possibilità di utilizzare oligonucleotidi paziente-specifici ha determinato un notevole incremento della sensibilità nell'identificazione della MRM (riconoscimento di una cellula monoclonale su 10^5 cellule policlonali) (Jilani et al., 2006; Rezuke et al., 1997; Vernau e Moore, 1999; Cazzaniga e Biondi, 2005).

In questo capitolo verrà descritto l'utilizzo della tecnica mediante PCR per la individuazione dei riarrangiamenti genici del recettore antigenico clone-specifico sia nell'uomo che nel cane ed in seguito le applicazioni della nuova metodologia in Real-time quantitative PCR (RQ-PCR).

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

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.

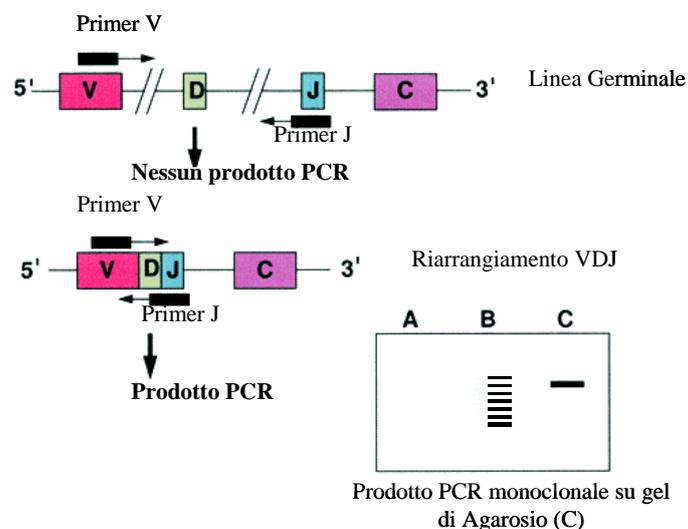


Figura 9: Illustrazione schematica del funzionamento della PCR nell'identificazione di un riarrangiamento genico B. Da Rezuke et al.; 1997, modificato.

La Figura 9 mostra come si realizza, mediante PCR l'amplificazione genica dei riarrangiamenti immunoglobulinici.

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 9, 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 su gel o capillare, è rappresentato rispettivamente da bande (frammenti) di diversa lunghezza risultanti in uno smear pattern (Figura 9, linea B) o un pattern con picchi multipli (Gentilini et al., 2008)

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 9, linea C) (Rezuke et al., 1997) o un picco distinto nell'elettroforesi capillare (Gentilini et al., 2008).

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 10).

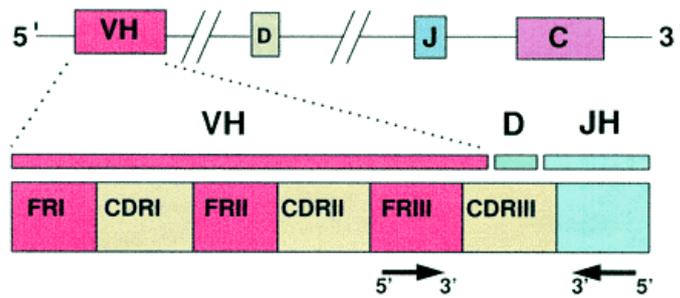


Figura 10: Organizzazione genetica della regione variabile delle Immunoglobuline. Da Rezuze et al., 1997.

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).

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 (Rezuze 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 10); 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). La standardizzazione delle metodiche PCR per la diagnosi di linfoma nell'uomo, prevede l'utilizzo di 7 primer V ognuno disegnato su una delle sette famiglie dei segmenti genici V, combinati ad un unico primer consenso J (Van Dongen et al., 2003). L'utilizzo di primer complementari alla regione FRI permettono l'amplificazione di un prodotto di peso molecolare più grande da poter sottoporre ad una nested-PCR. La nested-PCR rappresenta una modificazione della PCR "tradizionale" e utilizzata per migliorarne notevolmente la sensibilità, in quanto prevede l'utilizzo di due coppie differenti di primers per l'amplificazione di un singolo locus genico (Jolkowska et al., 2007).

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).

3.3 Identificazione dei primers 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 porzione 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).

Oltre ai primer VH precedentemente descritti, disegnati sulla FRIII della regione variabile della catena pesante, Gentilini e collaboratori (2008) hanno recentemente validato la creazione di due nuovi primer forward disegnati sulla FRI. Confrontando la sequenza cDNA della catena pesante canina, con tutte le sequenze geniche VH umane, disponibili sui database genetici, i ricercatori hanno individuato, per omologia di sequenza con la controparte umana, la FRI putativa e su di essa disegnati 10 primer forward di cui 4 presentavano la maggiore omologia di sequenza con 52 sequenze delle FRI derivate mediante lo studio del database genetico del cane. La costruzione e l'impiego di primers complementari alla regione FRI permette l'amplificazione di un segmento di DNA più grande da poter sottoporre successivamente ad una reazione in nested-PCR, utilizzando multiple coppie di primers e incrementare la sensibilità della tecnica tradizionale nell'individuazione della MRM (Gentilini et al., 2008). Come avviene in Medicina Umana, anche nel linfoma canino, la possibilità di utilizzare sullo stesso prodotto differenti set di primers costruiti su differenti regioni (FRI, FRIII e J) della regione variabile di IgH e del TCR può ridurre la comparsa di risultati falsi negativi e aumentare notevolmente la sensibilità del metodo nella diagnosi di clonalità (Gentilini et al., 2008). La necessità di amplificare segmenti genici differenti, richiede multipli approcci di PCR; se un set di primers non si lega al riarrangiamento perché mutato è probabile che in un altro punto non siano presenti mutazioni e quindi possa avvenire il legame.

3.4. Identificazione dei primers per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi T canine

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 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).

3.5 Limiti dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nella valutazione della MRM

Nonostante i numerosi vantaggi della PCR nella valutazione della MRM, la tecnica può essere associata alla comparsa di risultati falsi positivi e falsi negativi, legati a problematiche, sia di tipo interpretativo, sia di tipo più marcatamente tecnico, che riguardano le indagini molecolari.

La “pseudoclonalità” rappresenta una importante causa di risultati falsi positivi nella valutazione della MRM, determinata dalla competizione dei primers su target condivisi da cellule normali e cellule neoplastiche. In un campione follow-up di un soggetto in remissione clinica della malattia linfoproliferativa, i linfociti neoplastici rappresentano solo una piccolissima percentuale della popolazione totale e i primers utilizzati possono legarsi al DNA dei linfociti non neoplastici, determinando una significativa diminuzione della specificità del metodo (van Dongen et al., 2003). La pseudoclonalità è un fenomeno osservato soprattutto mediante l'impiego di primers consenso e nella analisi dei prodotti in seguito a separazione elettroforetica su gel. In questi casi, il DNA può essere amplificato solo da un piccolo numero di linfociti normali e dare così l'impressione, mediante elettroforesi su gel, della presenza di una popolazione linfocitaria clonale (Avery e Avery, 2004). La possibilità di differenziare i prodotti PCR per differenze di grandezza dell'ordine di un solo nucleotide tramite l'impiego dell'elettroforesi capillare permette di superare i limiti interpretativi indotti dalla visualizzazione dei prodotti PCR su gel e ridurre pertanto la comparsa di risultati falsi positivi indotti da una pseudoclonalità, aumentando la capacità di individuazione della MRM (Jilani et al., 2006; Gentilini et al., 2008). La pseudoclonalità si verifica soprattutto quando i campioni che sono sottoposti ad indagine molecolare, provengono da soggetti in remissione clinica e costituisce un limite significativo all'utilizzo di primers consenso nella valutazione della MRM (Avery e Avery, 2004).

Tuttavia, anche tramite l'impiego di oligonucleotidi clone-specifici la presenza del “background” di linfociti policlonali normali che accompagna la popolazione

neoplastica, può oscurare la presenza del riarrangiamento clonale e indurre in questo caso la comparsa di un risultato falso negativo (van Dongen et al., 2003; van der Velden et al., 2003). Anche in questo caso, l'impiego di determinate tecniche di analisi degli amplificati genici rispetto ad altri, può rendere l'interpretazione dei risultati più sensibile (Avery e Avery 2004). 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 mediante elettroforesi capillare. Jilani e collaboratori (2006), hanno applicato una metodica che permette di migliorare 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. 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).

La possibilità di identificare mediante PCR al momento della diagnosi del paziente, il riarrangiamento genico clonale e di costruire oligonucleotidi paziente-specifici per la valutazione della MRM nei campioni follow-up, ha permesso un incremento notevole della sensibilità e della specificità della PCR nella determinazione della MRM (Arons et al; 2006). Effettuare amplificazioni geniche comporta il rischio frequente di contaminazioni di DNA proveniente da individui diversi e la possibile comparsa di risultati falsi positivi. Questo problema può essere limitato dalla costruzione ed impiego di primers paziente-specifici in grado di amplificare solo le sequenze geniche di interesse.

Tuttavia, la costruzione e l'impiego di oligonucleotidi paziente-specifici presenta dei limiti legati alla complessità di esecuzione e ai costi del sequenziamento e della successiva creazione di sonde clone-specifiche marcate. Inoltre la difficoltà di monitoraggio di alcune neoplasie linfoidi, caratterizzate da continue mutazioni nei cloni neoplastici, rendono gli oligonucleotidi paziente-specifici non sempre in grado di identificare la presenza di un clone neoplastico residuo (ven der Velden et al., 2003). 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; Avery e Avery, 2004; Jolkowska et al., 2007).

Un'altra possibilità è che il marker clonale possa essere modificato, durante il corso della malattia da un riarrangiamento genico secondario che coinvolge un differente locus genico, mediato dall'attività del sistema dell'enzima V(D)J ricombinasi. Questo fenomeno prende il nome di evoluzione clonale (Cavè, 1999; Szczepanski et al., 2002). 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). In Medicina Umana per evitare la comparsa di risultati falsi negativi nella valutazione della MRM dovuti alla instabilità dei marker clonali durante il corso della malattia, vengono sempre monitorati per ciascun paziente, al momento della diagnosi e durante il follow-up almeno due differenti riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici coinvolgenti i differenti locus genici (Szczepanski et al., 2002; Jolkowska et al., 2007). La comparsa di risultati falsi negativi nella valutazione della MRM può essere inoltre legata a problematiche di tipo tecnico (mancata amplificazione della sequenza genica di

interesse per errato disegno dei primers, presenza di enzimi inibitori o consumo dei reagenti). La qualità, il tipo di campione e il momento in cui viene prelevato possono rappresentare delle variabili rilevanti al fine della sensibilità della metodica nella valutazione della MRM. Ad esempio nelle leucemie i campioni di midollo osseo prelevati durante la terapia di induzione possono contenere un alta percentuale di cellule T, diversamente dalla fase di post-induzione e mantenimento in cui vi può essere una prevalenza di cellule B (van der Velden et al., 2003).

3.6 Valutazione quantitativa della MRM mediante RQ-PCR

La PCR rappresenta la tecnica più sensibile e maggiormente applicata nella valutazione della MRM (Bruggemann et al., 2000), tuttavia, nella sua configurazione tradizionale, non è adatta a fornire risultati di tipo quantitativo. Le caratteristiche intrinseche della reazione PCR possono infatti limitare il suo uso come test diagnostico qualora si richieda una accurata quantificazione della MRM. Il numero di cicli di amplificazione necessari ad ottenere, dopo separazione elettroforetica, una banda visibile dei prodotti, dipende in gran parte dalla concentrazione iniziale delle molecole bersaglio, tuttavia l'effetto del numero dei cicli non è proporzionale ad essa a causa della presenza del cosiddetto "effetto plateau" in cui, nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce a causa di variabili difficilmente controllabili dall'operatore (come qualità del campione, riduzione dei componenti della PCR, nuova fase di annealing dei filamenti dei prodotti della PCR, cinetica di amplificazione, presenza di prodotti di amplificazione non specifici).

Il sistema ideale di quantificazione deve pertanto essere in grado di misurare l'amplificazione del prodotto prima del raggiungimento del "plateau", durante la fase esponenziale della reazione PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione viene influenzata minimamente dalle variabili di reazione ed è possibile ottenere una quantificazione riproducibile del template di partenza a partire dalla quantità del prodotto ottenuto. Ciò è consentito dalla Quantitative Real-time PCR (RQ-PCR), che

attraverso la generazione di specifici segnali di fluorescenza monitorati ad ogni ciclo di amplificazione, permette di esaminare le cinetiche e l'intero processo PCR e non semplicemente l'esito finale della reazione (PCR tradizionale "end-point") (Bruggeman et al., 2000). Prima dell'avvento della Real-time PCR, allo scopo di rendere possibile una quantificazione della MRM a partire dalla quantità di prodotto ottenuto e di superare la limitazione della PCR tradizionale, sono state messe a punto varie strategie, quali la tecnica delle diluizioni limitanti e la PCR competitiva (Eckert et al., 2000; Cavè et al., 1994; Yamazaki et al., 2008). Nella diluizione limitante, in seguito alla separazione elettroforetica e visualizzazione dei prodotti mediante tecniche di ibridazione, la quantificazione relativa della MRM viene ottenuta confrontando l'intensità del segnale radioattivo o fluorescente emesso dal campione follow-up con l'intensità del segnale ottenuta da progressive diluizioni del DNA estratto al momento della diagnosi. Si tratta tuttavia di un approccio molto indaginoso poichè richiede numerose amplificazioni in replicato, oltre la preparazione per ciascun caso di sonde clone-specifiche. Inoltre non sempre le condizioni di reazione permettono di raggiungere una sensibilità sufficiente ad alte diluizioni (Cavè et al., 1994).

Il metodo della PCR competitiva è basato sulla contemporanea amplificazione del bersaglio genomico e di un competitore, di cui è nota la concentrazione molare e che ha funzione di vero e proprio standard interno. Il competitore ha dimensioni simili a quelle del target con cui condivide i siti di riconoscimento dei primers per le regioni V(D)J, ma contiene al livello della sequenza della regione giunzionale V(D)J una modifica (inserzione o delezione di alcuni nucleotidi) che ne permette una facile risoluzione dopo elettroforesi su gel di poliacrilamide, oppure, in alternativa, una digestione differente da parte degli enzimi di restrizione (Jilani et al., 2006) o una ibridizzazione differenziale con sonde oligonucleotidiche specifiche. Il principio del metodo è che, avendo competitore e target gli stessi siti di riconoscimento dei primers, qualsiasi variabile influenzi il "rate" di amplificazione ha lo stesso effetto su entrambe le sequenze. Durante la fase "plateau", il rapporto tra i prodotti derivati dallo standard interno e della

sequenza di interesse rimane identica a quella osservata durante la fase esponenziale, rendendo possibile la quantificazione. Questa tecnica richiede comunque una particolare attenzione perché se il “disegno” della sequenza del competitore e del bersaglio sono sufficientemente diversi, si verifica una variazione nell'efficienza dell'amplificazione rendendo i risultati non più quantitativi. La notevole complessità di esecuzione, i costi elevati e la difficoltà di standardizzare la metodica, limitano comunque l'applicazione clinica della diluizione limitante e della PCR competitiva nella valutazione della MRM (Cavè et al., 1994; Bruggeman et al., 2000).

La RQ-PCR permette una valutazione quantitativa della MRM sensibile, specifica, altamente riproducibile e straordinariamente rapida (Yamazaki et al., 2008; Cazzaniga e Biondi, 2005). Attraverso la rivelazione dei prodotti PCR in fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione è possibile eseguire simultaneamente amplificazione ed analisi dei prodotti; ciò consente di eliminare gli step di processazione post-PCR, riducendo notevolmente i tempi di esecuzione e minimizzando il rischio di contaminazione dei prodotti (Eckert et al., 2000; van der Velden et al., 2003; Cazzaniga e Biondi, 2005).

Per la valutazione della MRM mediante RQ-PCR è possibile utilizzare sistemi di rilevazione in fluorescenza aspecifici (tramite coloranti intercalanti del DNA a doppio filamento come il SYBR Green I) oppure specifici tramite l'impiego di oligonucleotidi fluorescenti costruiti sulla regione giunzionale V(D)J (allele-specifici), impiegati come sonde (sonde ad idrolisi o di ibridazione) oppure come primers. La limitazione principale dei coloranti per il DNA a doppio filamento è rappresentata dalla assenza di specificità di sequenza. Il segnale rivela l'amplificazione del prodotto desiderato e di qualsiasi altro frammento di DNA a doppio filamento, inclusi i dimeri dei primer e prodotti aspecifici (Cazzaniga e Biondi, 2005). Pertanto è necessario impiegare le curve di fusione dei prodotti, allo scopo di identificarne la *temperatura melting* (T_m), un parametro caratteristico per ciascun frammento di DNA e che consente di verificare l'identità del prodotto. La identificazione dei prodotti tramite la T_m rappresenta una valida alternativa all'identificazione dei prodotti basata sulla dimensione; poiché la T_m

di un prodotto PCR non è determinata solo dalla lunghezza del prodotto, ma anche dalle caratteristiche della sequenza nucleotidica, è possibile tramite l'analisi della curva di fusione, discriminare tra prodotti di uguale lunghezza che altrimenti migrerebbero nello stesso punto del gel. L'utilizzo di oligonucleotidi allele-specifici marcati incrementa significativamente la specificità della metodica e permette la quantificazione in presenza di prodotti di amplificazione aspecifici. In questo caso, la valutazione quantitativa della sequenza genica di interesse è affidata alla rilevazione e conseguente quantificazione della fluorescenza emessa da un fluoroforo "reporter" o "accettore" legati agli oligonucleotidi allele-specifici, il cui segnale di fluorescenza cresce in maniera proporzionale alla quantità del prodotto PCR della reazione.

La metodica impiegata per la valutazione quantitativa sensibile ed accurata della MRM in RQ-PCR, sfrutta la specificità di oligonucleotidi allele-specifici (ASO), che possono essere rappresentati dalle sonde oppure dai primers (Gentilini et al., 2009)(Figura 11).

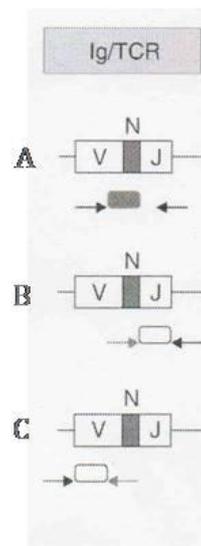


Figura 11: rappresentazione dei diversi approcci in RQ-PCR. (A) sonda allele-specifica; (B) primer forward allele-specifico; (C) primer reverse allele-specifico. Da van der Velden et al.(2003) modificato.

Allo scopo di raggiungere una adeguata sensibilità e specificità nella valutazione della MRM, sono stati descritti numerosi approcci in cui è stato previsto l'impiego di una sonda clone-specifica associata a primers consenso oppure un primer allele-specifico associato ad una sonda e ad un

primer consenso oppure strategie miste (Pongers-Willemse et al., 1998; Pongers-Willemse et al., 1999; Nakao et al., 2000; Eckert et al., 2000; Bruggemann et al., 2000; Brisco et al., 2001; Nyvold et al., 2002; Tarusawa et al., 2002; Eckert et al., 2003; Bottcher et al., 2004; Uchiyama et al., 2004; van der Velden et al., 2007; Flohr et al., 2008; Gentilini et al., 2009).

Nella metodica in cui è previsto l'impiego di una sonda costruita sulla regione giunzionale V(D)J e associata a primers consenso (Figura 11, A), la specificità può essere ridotta a causa della competizione dei primers tra le cellule neoplastiche e le cellule policlonali (psudoclonalità). Inoltre si tratta di una metodica particolarmente costosa, perché oltre a richiedere l'acquisto di una sonda fluorescente onerosa, questa deve essere costruita e validata per ciascun paziente (Pongers-Willemse et al., 1998; van der Velden et al., 2003). Numerosi ricercatori hanno proposto l'uso di un primer oligonucleotidico allele-specifico e di una sonda fluorescente per la regione consenso, piuttosto dell'uso di una sonda clone-specifica (Figura 11, B e C) (Bruggemann et al., 2000; Eckert et al., 2000).

Questa metodica consente di ridurre il costo e migliorare la sensibilità nella valutazione della MRM in modo considerevole (1 cellula neoplastica su 10^5 - 10^6 cellule normali) (Bottcher et al., 2004; Arons et al., 2006). L'impiego del solo primer forward allele-specifico presenta alcuni vantaggi rispetto all'utilizzo del primer reverse. Il numero dei segmenti genici J sottoposti al processo di ricombinazione è inferiore rispetto al numero dei segmenti genici V, per cui questo approccio costituisce un sistema più semplice per la costruzione di sonde consenso, anche se, per lo stesso motivo può presentare minore specificità. Inoltre la regione di giunzione D-J è meno soggetta a processi di riarrangiamenti secondari (evoluzione clonale) e a fenomeni di ipermutazione somatica rispetto ai segmenti genici V, causa di instabilità del target nella ricerca della MRM (van der Velden et al., 2003).

Sono stati descritti approcci RQ-PCR che prevedono l'impiego di primers allele-specifici e sistemi di rilevazione in fluorescenza tramite coloranti intercalanti il DNA (SYBR

Green I); tuttavia questa metodica può presentare alcuni limiti riguardanti la specificità. L'amplificazione di prodotti aspecifici con una T_m simile o sovrapponibile alla T_m del prodotto specifico può infatti indurre la comparsa di risultati falsi positivi (Nakao et al., 2000; Eckert et al., 2000).

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

Premessa

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la MRM e le sue oscillazioni durante il follow-up clinico mediante ricerca dei riarrangiamenti genici Ig clone-specifici (cd paziente-specifici) e con metodo di RQ-PCR in 7 cani affetti da linfoma e sottoposti a trattamento chemioterapico. La tecnica prevede l'impiego di hairpin-primers (primers a forcina) paziente-specifici, la cui validazione completa è stata effettuata per 5 dei nostri pazienti (Gentilini et al., 2009). Nella prima parte di questo studio è stata valutata e confrontata l'efficacia e l'accuratezza delle due diverse tipologie di primers (primer standard e hairpin-primers) allo scopo di verificare se la configurazione a forcina dei primers paziente-specifici potesse indurre, rispetto all'impiego di primers lineari, un miglioramento della sensibilità, specificità e accuratezza della metodica RQ-PCR per la valutazione della MRM. Nella seconda parte di questo studio, abbiamo utilizzato la metodica di RQ-PCR mediante hairpin-primers paziente-specifici per la valutazione retrospettiva della MRM durante il decorso clinico di 7 cani affetti da linfoma e sottoposti a trattamento antitumorale multifarmaco. In tutti i pazienti è stata inoltre approntata una nuova metodica definita Antiprimer Quenching-based Real Time (aQRT-PCR) (Li et al., 2006) al fine di normalizzare i dati quantitativi ottenuti da sangue periferico.

I soggetti di questo studio sono stati selezionati in base alla presenza di clonalità del riarrangiamento Ig evidenziata in fase diagnostica mediante GeneScanning, poiché le tecniche di aQRT-PCR e RQ-PCR utilizzate in questo studio sono state messe a punto unicamente per i linfomi con immunofenotipo B.

4.1 Contributo casistico

In questo studio sono stati analizzati i campioni provenienti da 7 cani affetti da linfoma multicentrico a cellule B, giunti in visita presso il Dipartimento Clinico Veterinario nel periodo compreso tra Settembre 2006 e Gennaio 2010 sottoposti a trattamento chemioterapico e per i quali fossero disponibili adeguate matrici biologiche (vedi sotto). In tutti i casi la diagnosi di linfoma è stata ottenuta mediante esame citologico da AAS linfonodale.

In tutti i soggetti l'approccio antiblastico ha previsto un protocollo multifarmaco comprendente Doxorubicina, L-Asparaginasi, e Prednisone, con una fase di induzione della durata di 19 settimane che ne ha determinato la remissione completa della sintomatologia clinica. Per 4 soggetti, il trattamento antiblastico ha previsto, inoltre, la somministrazione di Vincristina e Ciclofosfamide in giorni successivi ogni 4 settimane durante la fase di mantenimento.

Il materiale ottenuto in fase di ammissione dagli AAS linfonodali è stato sottoposto ad estrazione del DNA e successivamente ad amplificazione PCR utilizzando primers consenso allo scopo di ottenere un prodotto derivato dai riarrangiamenti genici clonali IgH da sottoporre a sequenziamento genetico per la costruzione dei primers paziente-specifici.

Per la valutazione quantitativa della MRM mediante RQ-PCR, durante il follow-up clinico dei soggetti trattati, sono stati utilizzati i campioni di sangue intero in K₃EDTA prelevati prima del trattamento, durante la fase di induzione chemioterapica e durante la fase di mantenimento. I campioni sono stati stoccati a - 20° C prima di essere sottoposti ad estrazione del DNA. Tuttavia, prima del congelamento a -20°C da alcuni campioni ematici è stata separata un'aliquota di 1000 µl da cui ottenere un pellet cellulare di globuli bianchi. Il pellet di globuli bianchi è stato ottenuto aggiungendo 5 volumi di soluzione di lisi (hemolyzing reagent; Roche®), invertendo gentilmente alcune volte e centrifugando a 1000 x g per 5 minuti. Il trattamento è stato ripetuto almeno 2 volte o

fino ad ottenere un pellet cellulare visivamente privo di residui di emoglobina. Il pellet è stato infine risospeso in 200µl di cell resuspension solution, Promega®) e successivamente stoccato a -20° C prima di essere sottoposto ad estrazione del DNA. Il DNA estratto dai campioni ematici e dai pellettati cellulari è stato sottoposto ad analisi mediante aQRT-PCR per valutare l'adeguatezza di estrazione del DNA. I campioni ritenuti adeguati mediante aQRT-PCR sono stati successivamente sottoposti ad analisi mediante RQ-PCR per la valutazione quantitativa della MRM.

4.2 Campioni in ammissione

4.2.1 Estrazione del DNA

Il DNA dai campioni all' ammissione è stato ottenuto raccogliendo il materiale rimasto all'interno del beccuccio dell'ago utilizzato per l'AAS linfonodale attraverso lavaggi ripetuti con Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 fino ad un volume finale di 200µl e sottoposto a successiva estrazione con Kit commerciale (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma®, *Protocollo Mammalian tissue preparation*, fornito dal produttore). La concentrazione del DNA genomico estratto è stato misurato mediante spettrofotometro ad una assorbanza di 260 nm.

4.2.2 Ricerca mediante PCR dei riarrangiamenti genici di IgH mediante primer consenso

Il DNA dei campioni ottenuti dai pazienti al momento dell'ammissione è stato sottoposto ad amplificazione mediante PCR utilizzando primers disegnati sui segmenti genici VDJ e perciò in grado di individuare la presenza di un riarrangiamento genico dei recettori antigene-specifici della linea cellulare B. In particolare sono stati utilizzati primers consenso ottenuti da bibliografia (Gentilini et al., 2008), costruiti sulla FRI della regione variabile di IgH (primer forward) e all'interno dei segmenti genici J (primer reverse)(Burnett et al., 2003; Gentilini et al., 2008))(Tabella 1). Per ogni campione è

stato previsto un controllo DNA positivo rappresentato da 2 primer diretti contro l'esone 1 del segmento genico C μ , che codifica per la regione costante delle Immunoglobuline e del TCR e ottenuti da bibliografia (Burnett et al., 2003)(Tabella 1).

I primers utilizzati sono stati marcati all'estremità 5 con il fluoroforo HEX (primers forward per C μ) e 6-FAM (primer forward per FRI).

prodotto	target	Nome del primer	orientation	label	Sequenza 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
	Ig C μ	C μ 2	reverse		ggg tgt tga ttg cac tga gg	300	
5'FWRI	Ig VH FWR1	FAM_5'FW	forward	6-FAM	gag ggg cag ctg ggg gag tct	500	1.75
		RI					
	Ig JH	CB2	reverse		tga gga gac ggt gac cag ggt	500	

Tabella 1: primers utilizzati per l'amplificazione di C μ (controllo positivo) e primers utilizzati per l'amplificazione IgH.

La presenza di un prodotto pari a circa 130bp, sanciva la presenza di una quantità di DNA sufficiente per eseguire le prove di clonalità. (Gentilini et al., 2008),

La miscela di reazione è stata eseguita utilizzando PCR buffer 1X (PCR Platinum® Taq DNA polymerase buffer, Invitrogen, Milano), 1.75-2 mM di MgCl₂ (tabella 1), 250 nM di dNTPs (PCR Grade®, Invitrogen), 300-500 nM di ciascun primers (tabella 1), 1 U ricombinante di Taq DNA polimerasi (Platinum® Taq DNA polymerase, Invitrogen), 2,5 μ l di DNA e acqua da biologia molecolare fino a raggiungere un volume finale di 25 μ l. I prodotti PCR sono stati amplificati mediante termociclatore Ep Gradient S (Eppendorf®) utilizzando un protocollo di ciclo termico comprendente una fase a 95°C per 3 minuti seguiti da 30 cicli con denaturazione a 95°C per 30 secondi, annealing a 58°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 30 secondi. Il ciclo di amplificazione ha previsto una fase finale di estensione a 72°C per 30 minuti necessaria per l'analisi di frammento (Gentilini et al., 2008).

Gli amplificati ottenuti dalla PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM® 310. La conferma di una clonalità B e quindi la

diagnosi di linfoma a cellule B è stata ottenuta mediante analisi di frammento (Gentilini et al., 2008).

Gli ampliconi sono stati sottoposti a purificazione con kit commerciale (E-Gel Clone-well kit, Invitrogen®) e successivamente sottoposti a sequenziamento diretto mediante Big Dye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems®) e analisi su sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem®).

Per i casi n°1, 2 e 3 le sequenze sono state clonate all'interno di vettori plasmidici mediante TOPO TA Cloning® Kit (con pCR4-TOPO) con One Shot® TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen).

4.2.3 Disegno dei primers clone-specifici

Le sequenze nucleotidiche ottenute da ciascun paziente in seguito a sequenziamento sono state allineate (mediante algoritmo IgBLAST) con sequenze umane disponibili sul database allo scopo di identificare le sequenze nucleotidiche delle FRI, FRII e FRIII. Usando l'informazione ottenuta dalle regioni FR putative e allineando le 7 sequenze canine, sono state identificate le CDR I, le CDR II e la sequenza giunzionale della CDR III (Figura 12).

La regione CDR I è lunga circa 20 nucleotidi e la sua sequenza nucleotidica presenta solo pochi polimorfismi; al contrario, le regioni CDRII e CDRIII sono sufficientemente lunghe e variabili da rendere possibile la costruzione di primers clone-specifici (Figura 12.).

Per ciascun paziente, i primers utilizzati per l'amplificazione della sequenza nucleotidica clone-specifica V(D)J sono stati disegnati sulle CDRs della regione variabile del gene IgH utilizzando il software Beacon Designer v3.0 e Primer Express; il primer forward complementare alla sequenza germinale ipervariabile CDRII e il primer reverse complementare alla sequenza giunzionale CDRIII (Figura 12).

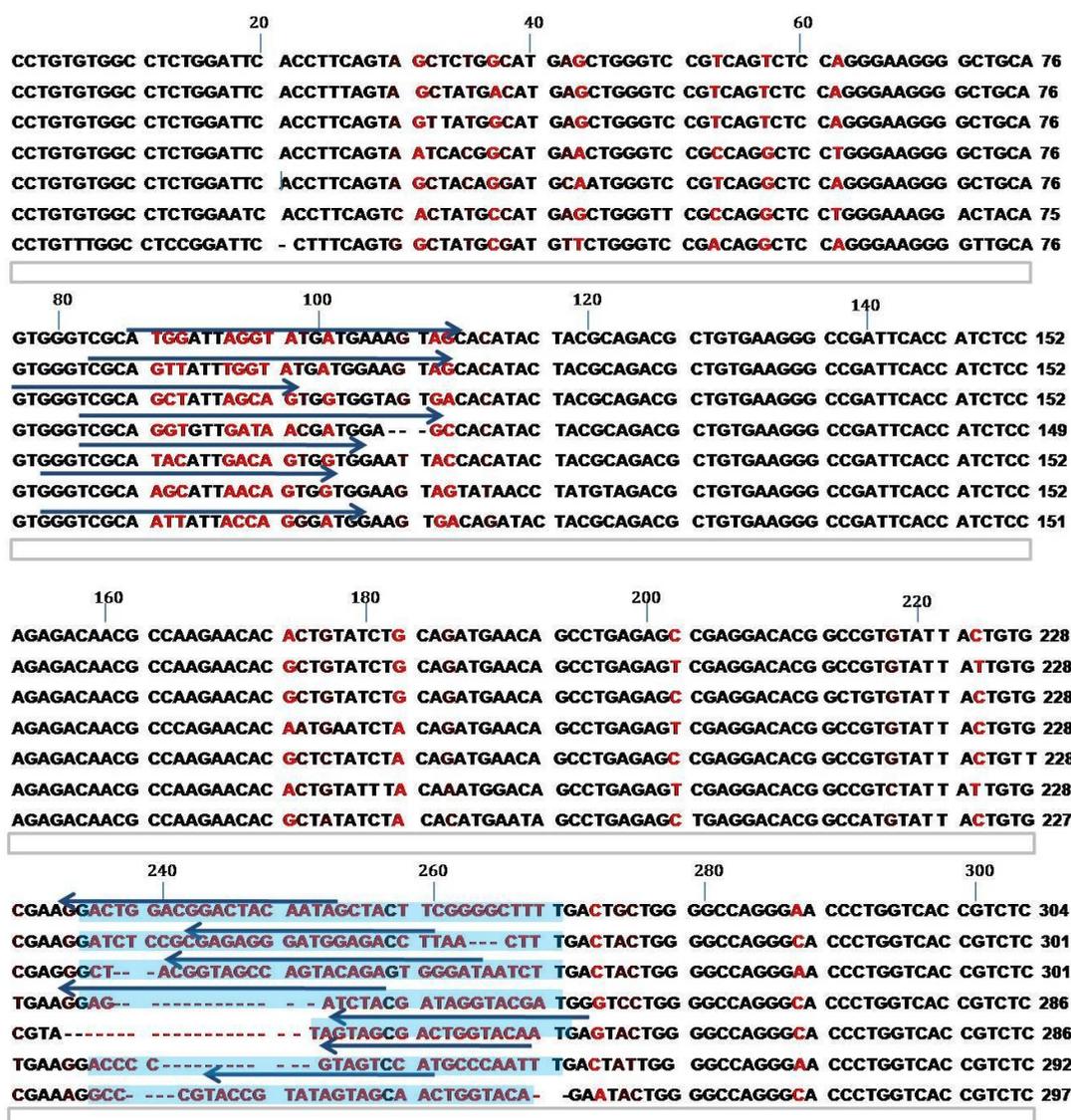


Figura 12 : allineamento delle sequenze dei riarrangiamenti genici di IgH dei 7 casi di linfoma canino. Le regioni germinali CDR I (\approx 25-45 nucleotidi) e CDR II (\approx 87-109 nucleotidi) così come la regione giunzionale CDR III (\approx 233-269 nucleotidi, evidenziata in azzurro) sono rappresentate come allineamenti di ridotta conservazione. Le frecce indicano per ciascun caso le sequenze nucleotidiche dei primer clone-specifici forward e reverse.

Le sequenze dei primers sono state scelte in modo tale da assicurare che l'annealing avvenisse solo sulle sequenze di interesse CDRs, evitando l'adesione sulle sequenze conservate, responsabile di una perdita di specificità. Di conseguenza sono stati selezionati i primers con estremità 3' all'interno della CDRs e con la più corta sequenza nucleotidica a livello dell'estremità 5'.

Per ciascun paziente è stata selezionata e scelta ciascuna coppia di primers clone-specifica (Tabella 2).

Caso	Sequenze 5'>3' primers lineari	Tm
1	Fwd tcg cat gga ttt act atg atg gaa g	57.1
	Rev gta cgt aat agt tac cgg ggt cc	57.8
2	Fwd atg gat tag gta tga tga aag tag c	54.6
	Rev tgt agt ccg tcc agt cct tc	55.4
3	Fwd gtg ggt cgc agc tat tag cag	58.4
	Rev ccc act ctg tac tgg cta ccg	59.1
4	Fwd tcg cat aca ttg aca gtg g	52.1
	Rev ctc att gta cca gtc gct ac	52.8
5	Fwd gca gtt att tgg tat gat gga agt ag	56.4
	Rev aag gtc tcc atc cct ctc g	54.4
6	Fwd tgg gtc gca agc att aac agt ggt	58.7
	Rev ttg ggc atg gac tac ggg gt	58.6
7	Fwd gtg ggt cgc aat tat tac cag gga	57.5
	Rev gtt gct act ata cgg tac ggg c	57.0

Tabella 2: sequenze nucleotidiche dei primers lineari clone-specifici utilizzati per ciascun paziente e relativa Tm.

Su ciascun primer clone e paziente-specifico è stato inoltre disegnato il rispettivo hairpin-primer, costruito aggiungendo in corrispondenza dell'estremità 5' di ciascun primer lineare, una "coda" costituita da 5-9 nucleotidi, complementari alle sequenze in 3' (Tabella 3).

Caso		Sequenza 5'>3' hairpin primers	Tm	Hairpin free energy -ΔG (Kcal/mol)	Cross-dimer free energy -ΔG (Kcal/mol)
1	Fwd	<u>ctt cca tct</u> cgc atg gat tta cta tga tgg aag	64.4	-8.0	- 2.5
	Rev	<u>gga ccc</u> gta cgt aat agt tac cgg ggt cc	67.6	-6.9	
2	Fwd	<u>gct act tta</u> tgg att agg tat gat gaa agtagc	61.2	-7.7	-2.8
	Rev	<u>gaa gga ctg</u> tag tcc gtc cag tcc ttc	64.2	-10.0	
		<u>gaa ggt</u> gta gtc cgt cca gtc ctt c	62.3	-4.0	
3	Fwd	<u>ctg ctc</u> agt ggg tcg cag cta tta gca g	65.7	-4.7	-6.6
	Rev	<u>cgg tat</u> atc cca ctc tgt act ggc tac cg	65.9	-5.8	
4	Fwd	<u>cca ctt</u> cgc ata cat tga cag tgg	60.1	-4.5	-1.7
	Rev	<u>gta gcc</u> tca ttg tac cag tgc cta c	61	-4.2	
5	Fwd	<u>cta ctt cgc</u> agt tat ttg gta tga tgg aag tag	62.8	-5.8	-5.3
	Rev	<u>cga gaa</u> agg tct cca tcc ctc tcg	61.9	-4.6	
6	Fwd	<u>cca ctg tgg</u> gtc gca agc att aac agt gg	63.7	-4.08	
	Rev	<u>acc cct</u> tgg gca tgg act acg ggg t	61.6	-3.64	
7	Fwd	<u>tcc cgt</u> ggg tcg caa tta tta cca ggg a	60.8	-4.37	
	Rev	<u>gcc cgt</u> gtt gct act ata cgg tac ggg c	72.1	-6.42	

Tabella 3 : sequenze nucleotidiche degli hairpin-primers (o primers a forcina) clone-specifici utilizzati per ciascun paziente in RQ-PCR e relativa Tm. I nucleotidi che sono stati aggiunti per determinare una configurazione a forcina di ciascun primer sono stati sottolineati.

La scelta del numero di nucleotidi aggiunti in corrispondenza dell'estremità 5' di ciascun primer e di conseguenza la decisione di utilizzare un primer con una "coda" più

o meno lunga rispetto ad un altro, è stata dettata dalla entalpia misurata come $-\Delta G$ kcal/mol e basata sulle seguenti reazioni standard: concentrazione ionica monovalente di 50mM, concentrazione ionica di Na^+ totale equivalente di 269.09 mM, calcolo della temperatura per energia libera di 25°C e concentrazione di ione Mg^{++} di 3mM (e calcolate mediante il software DINAMelt Server) (Tabella 3).

In alcuni casi, sono stati testati primers lineari con una estremità 5' di differente lunghezza e scelti di conseguenza per lo stesso target, i rispettivi hairpin-primers (Tabella 3).

Validazione della RQ-PCR utilizzando hairpin-primers

4.2.4 Effetti della configurazione a forcina dei primer e analisi della curva di dissociazione dei primer (curva di melting)

È stata effettuata una analisi di melting in presenza di SYBR Green utilizzando ciascun primer lineare e hairpin-primer (singoli e in coppia) alla stessa concentrazione (300-400nmol) e inclusi in una miscela di reazione PCR, non contenente DNA genomico e di un volume finale di 25 μ l. Per ogni amplificazione è stato incluso un ciclo termico per l'analisi della curva di melting partendo da una temperatura di 25°C fino a 95°C.

L'effetto sulla performance del saggio RQ-PCR indotto dal differente disegno degli hairpin-primers (lunghezza della forcina e conseguente stabilità) e dalle differenti temperature di annealing è stata valutata sull'amplificazione di 2 campioni del caso n°2, rappresentati rispettivamente dai punti di calibrazione corrispondenti a 1.25×10^5 e 2.0×10^2 copie per reazione e utilizzando lo stesso hairpin-primer forward e due differenti hairpin-primers reverse. I campioni sono stati amplificati mediante cicli di profilo termico a 2 step utilizzando due differenti temperature di annealing (60°C e 64°C).

Un campione corrispondente ad un punto di calibrazione del caso n°2 è stato inoltre sottoposto ad amplificazione PCR utilizzando la stessa concentrazione di primer e differenti concentrazioni di primers (100nmol di primer forward e 500nmol di primer

reverse e viceversa). Ciò è stato effettuato per valutare se l'amplificazione di prodotti aspecifici fosse legata alla formazione di dimeri di primer o all'aggancio aspecifico dei primer ad un target diverso da quello desiderato (cross-dimeri).

4.2.5 RQ-PCR

Per i casi n°1, 2, 3, 4 e 5 la RQ-PCR è stata effettuata mediante iCycler thermal-cycler (Biorad) utilizzando una miscela di reazione costituita da 12,5µl di real-time mix (2X) con SYBR Green (Biorad), 1.5-2 µl di ciascun primer forward e reverse paziente-specifico (300-400 nmol), 2 µl di DNA e acqua da biologia molecolare fino a raggiungere un volume finale di 25 µl.

Sono stati utilizzati protocolli PCR di ciclo termico in 3 step (denaturazione, annealing ed estensione) per le temperature di annealing sotto ai 60°C e protocolli PCR in 2 step (denaturazione e annealing/estensione) per le temperature di annealing sopra i 60°. Il protocollo PCR in 3 step ha previsto i seguenti cicli di profilo termico: 95°C per 3 min seguita da 40 cicli con denaturazione a 95°C per 15 s, annealing a 50-58°C per 30 s, estensione a 72° C per 30 s e una fase di estensione finale di 72° C per 5 min. Il protocollo di ciclo termico in 2 step ha previsto invece i seguenti cicli di profilo termico: 95°C per 3 min seguiti da 40 cicli con denaturazione a 95°C per 15 s, annealing/estensione a 60°C-68°C per 60 s, e una fase di estensione finale di 72° C per 5 min. Per ogni amplificazione è stato incluso un ciclo termico per l'analisi della curva di melting partendo da una temperatura di 55° fino a 95° tramite incrementi di 0.5 ogni 10 sec.

4.2.6. Specificità PCR

Per i casi n°1, 2, 3, 4 e 5 la prova necessaria per la valutazione della specificità della RQ-PCR, è stata eseguita utilizzando ciascuna coppia di primers paziente-specifico su 1 campione costituito da un pool di DNA genomico estratto da linfonodi di soggetti sani e

su 5 campioni costituiti da un pool di DNA genomico ottenuto da soggetti affetti da linfoma. I campioni sono stati amplificati in RQ-PCR a partire da una temperatura di annealing di 5°C al di sotto della T_m media dei primers e prevedendo un incremento della temperatura di annealing di 2.5° C in ciascuna successiva reazione PCR qualora fosse stata osservata la comparsa di prodotti aspecifici con una T_m simile a quella del prodotto specifico (range 86-88°).

Per gli hairpin-primers, la valutazione della specificità è stata effettuata partendo da una temperatura di annealing/estensione di 60°C.

4.2.7 Calibrazione

Il DNA plasmidico contenente le sequenze clonate del locus IgH riarrangiato dei casi n°1, 2 e 3 è stato digerito mediante l'enzima di restrizione SphI (New England Biolab) ed allestite in duplicato delle diluizioni seriali, per ottenere, sulla curva di calibrazione, i seguenti punti di concentrazione del target: 2.5×10^5 , 1.25×10^5 , 2.5×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 and 2.0×10^2 copie/ μ l (considerato come range quantitativo)(Pongers-Willemsse et al.,1999). Ogni punto di calibrazione del plasmide è stato successivamente diluito in rapporto 1:1 V/V con 50 ng/ μ l di un pool di DNA genomico estratto da linfonodi normali ed effettuata una RQ-PCR (come descritta nel paragrafo 4.2.5 e a partire da una temperatura di annealing di 60°) utilizzando entrambe le tipologie di primers (lineari e hairpin-primers).

Per i casi n°4 e 5 sono state allestite in duplicato, 5 diluizioni scalari in base 10 (da 10^{-1} a 10^{-5}) del campione genomico estratto al momento dell'ammissione, diluito in 50 ng/ μ l di un pool di DNA genomico estratto da linfonodi normali. Il DNA genomico dei casi 4 e 5 è stato quantificato mediante spettrofotometro (caso n°4: 78.6 ng/ μ l; caso n°5: 66.4 ng/ μ l) e sono state stimate per essi, il numero di copie del target, considerando 333 copie per ogni nanogrammo di DNA (Rasmussen et al., 2000; Gentilini et al., 2009) Ciascuna diluizione è stata sottoposta alla reazione RQ-PCR utilizzando la stessa miscela

di reazione e secondo gli stessi cicli di protocollo termico come descritto nel paragrafo 4.2.5.

Inoltre per la valutazione della sensibilità, per i casi n°1-2 e 3 sono state effettuate in duplicato anche diluizioni 1:5 del plasmide da 40 a 0.3 copie per reazione, diluite in 50 ng/reazione di un pool di DNA genomico

4.2.8 RQ-PCR casi 6 e 7

Per i casi n°6 e 7 la RQ-PCR è stata effettuata mediante StepOne™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) utilizzando una miscela di reazione costituita da 10µl di Master Mix (2X) Maxima™ SYBRGreen/ROX qPCR (Fermentas), 1,5 µl di ciascun primer forward e reverse paziente-specifico (300 nmol), 2 µl di DNA e acqua nucleasi deprivata fino a raggiungere un volume finale di 20µl.

I campioni n°6 e 7 sono stati amplificati in presenza di SYBR Green a partire da una temperatura di annealing di 60° e secondo i seguenti cicli di profilo termico: 95° per 10 minuti, seguiti da 40 cicli con denaturazione a 95° per 15 secondi e annealing/estensione a 60° per 30 secondi e con una singola lettura di fluorescenza effettuata alla fine di ogni ciclo. Per ogni amplificazione è stato incluso un ciclo termico per l'analisi della curva di melting partendo da una temperatura di 60° fino a 95° tramite incrementi di 0.3°. Per le analisi delle curve di melting non hanno mostrato la comparsa di prodotti aspecifici; pertanto la temperatura di annealing di 60° è stata considerata la temperatura ottimale per le successive amplificazioni PCR.

4.2.9 Specificità e calibrazione

Nei casi n°6 e 7, la valutazione della specificità della RQ-PCR è stata effettuata testando ciascuna coppia di hairpin-primers paziente-specifico su 6 campioni, rappresentati da 2 campioni costituiti dal DNA genomico paziente-specifico estratto all'ammissione, 2

campioni costituiti da un pool di DNA genomici ottenuti da linfonodi affetti da linfoma e 2 campioni di DNA genomico purificati da linfonodi non colpiti da linfoma.

Ciascun pool di DNA genomico è stato ottenuto miscelando un uguale quantità di 5g di DNA genomici purificati, ottenuti da campioni citologici o istologici di linfonodo di cani affetti da linfoma e con concentrazioni variabili di DNA di 30-120 ng/ μ l.

Per il caso n° 6 sono state allestite in duplicato, 5 diluizioni scalari 1:5, del campione genomico estratto al momento dell'ammissione, diluito in acqua da biologia molecolare.

Ciascuna diluizione è stata sottoposta alla reazione RQ-PCR utilizzando la stessa miscela di reazione e secondo gli stessi cicli di protocollo termico come descritto nel paragrafo 4.2.8.

Per il caso n° 7 non è stato possibile ottenere una curva di calibrazione per mancanza di una adeguata concentrazione di DNA ottenuto dal preparato citologico al momento dell'ammissione.

4.3 Campioni follow-up

4.3.1 Estrazione DNA campioni follow-up

I campioni di sangue intero congelato e i pellettati prelevati durante il follow-up clinico dei soggetti trattati, sono stati sottoposti ad estrazione del DNA tramite kit commerciale (GenElute™ Blood Genomic DNA kit, Sigma®).

4.3.2 aQRT-PCR

Come accennato all'inizio di questo capitolo, al fine di normalizzare i dati quantitativi ottenuti da sangue periferico, è stata utilizzata per tutti i pazienti, una metodica definita *Antiprimer Quenching-Based Real-Time PCR* (aQRT-PCR).

Nel nostro studio, questa tecnica è stata applicata sul DNA estratto dai campioni follow-up, utilizzando primers consenso ottenuti da bibliografia (Gentilini et al., 2008) e costruiti sulla FRI della regione variabile di IgH (primer forward) e sul segmento genico

J (primer reverse). Di questi, il primer forward è stato modificato tramite l'aggiunta, in corrispondenza dell'estremità 5,' di una sequenza oligonucleotidica generica marcata con FAM (5'FAM-AGTGCTATCCGAGGGAA-3'), come previsto dalla metodica stessa (Li et al., 2006). Per evitare che la nuova struttura oligonucleotidica potesse assumere una configurazione a forcina o potesse indurre la formazione di dimeri di primer, il disegno del primer forward modificato, è stato verificato utilizzando il software Beacon Designer v3.0. Inoltre, sempre secondo metodica; è stato incluso nella stessa miscela di reazione un oligonucleotide definito antiprimer, complementare alla sequenza oligonucleotidica generica del primer modificato (5'-TTCCCTCGGATAGCACT-BHQ1-3') e marcato all'estremità 3' con una molecola quencher. La costruzione e la scelta del primer è stata dettata dalla necessità di utilizzare una sequenza oligonucleotidica con una temperatura melting superiore a quella dell'antiprimer, per permettere la rilevazione del segnale di fluorescenza come previsto dalla tecnica stessa (Li e Makrigiorgios, 2007). Il principio del metodo aQRT-PCR è illustrato nella figura. 13 e 14.

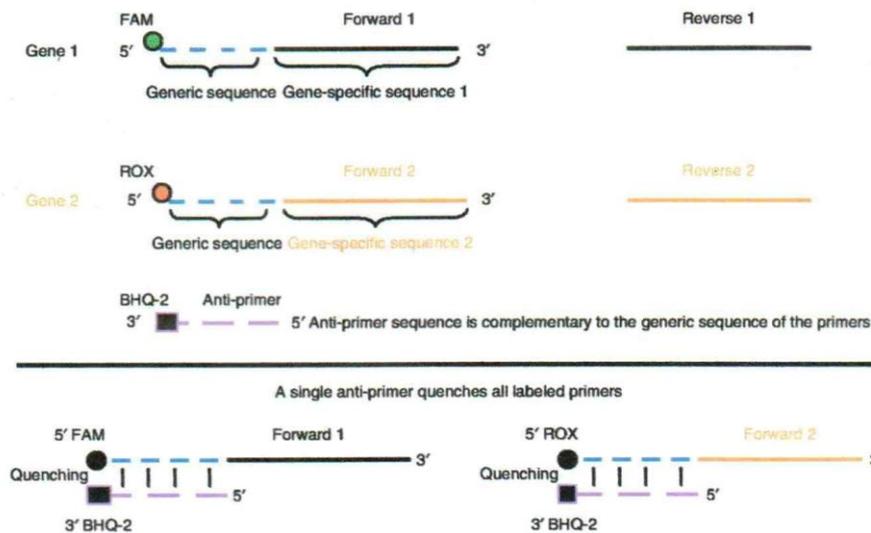


Figura 13:Disegno dei primers e dell'antiprimer per la metodica aQRT-PCR. Da Li e Makrigiorgos (2007).

Durante il secondo ciclo PCR, la sequenza oligonucleotidica generica viene inclusa nella sintesi della catena complementare, determinando la formazione di un prodotto PCR a

doppia catena, fluorescente all'estremità 5'. In seguito all'annealing ed estensione del primer, la temperatura della reazione viene abbassata per permettere all'antiprimer di legare il primer libero e quencharne la sua fluorescenza. L'antiprimer non può legare il primer fluorescente incorporato nel prodotto PCR a doppia catena; di conseguenza si verifica, ad ogni ciclo di amplificazione, un incremento esponenziale del segnale di fluorescenza (Figura 14).

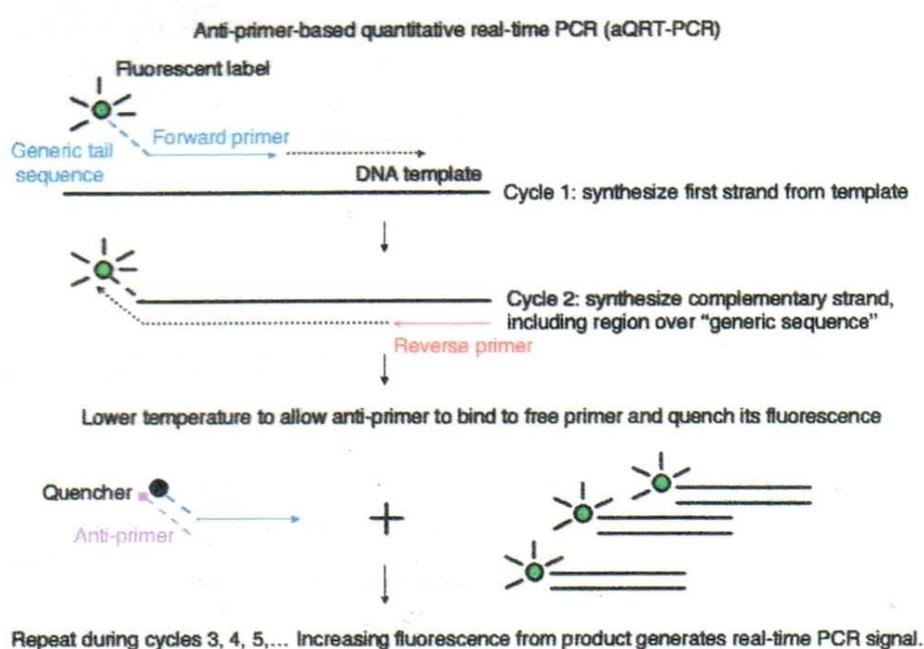


Figura 14: Metodica aQRT-PCR. Da Li e Makrigiorgos (2007).

La aQRT-PCR sui campioni follow-up dei casi n°1, 2, 3, 4 e 5 è stata effettuata mediante iCycler thermal-cycler (Biorad), mentre per i casi n°6 e 7, mediante StepOne™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems), utilizzando una miscela di reazione costituita da 10µl di Master Mix (2X) Maxima™ Probe qPCR (Fermentas), 1 µl di primer reverse e di primer forward modificato, 5 µl di antiprimer, 2 µl di DNA e acqua nucleasi deprivata fino a raggiungere un volume finale di 20µl.

I campioni sono stati amplificati secondo i seguenti cicli di profilo termico: 95° per 10 minuti, seguiti da 40 cicli con denaturazione a 95° per 15 secondi, annealing/estensione a 60° per 30 secondi, annealing dell'antiprimer al primer libero, (non incorporato nel

DNA a doppio filamento) a 50° per 30 secondi e lettura di fluorescenza effettuata alla fine di ogni ciclo a 50° per 15 secondi.

Alla temperatura di annealing ed estensione di 60°, la sequenza specifica del primer (T_m di $\approx 65^\circ\text{C}$) può legare il DNA e indurre la polimerizzazione senza subire interferenze da parte dell'antiprimer, che presenta una T_m inferiore ($\approx 57^\circ\text{C}$). Quando la temperatura viene successivamente abbassata a 50°, l'antiprimer può legare il primer fluorescente libero, a singola catena, spengendo la sua fluorescenza (Li e Makrigiorgos, 2007).

4.3.3 RQ-PCR dei campioni follow-up

La RQ-PCR dei campioni in remissione dei 5 pazienti utilizzati per la validazione degli hairpin-primers è stata effettuata mediante iCycler thermal-cycler (Biorad) utilizzando la stessa miscela di reazione e lo stesso ciclo di profilo termico come descritto nel paragrafo 4.2.5 utilizzando una temperatura di annealing di 60°, mentre per i pazienti n°6 e 7 è stata effettuata mediante StepOne™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) impiegando la stessa miscela di reazione e lo stesso ciclo di profilo termico come descritto nel paragrafo 4.2.8.

CAPITOLO 5

RISULTATI

Validazione degli hairpin-primers

Effetti della configurazione a forcina dei primers e analisi della curva di dissociazione dei primer

Come dimostrato dall'analisi della curva di dissociazione (curva di melting) di ciascuna delle 5 coppie di hairpin-primers e primers lineari testati in questo studio, gli hairpin primers hanno mantenuto la struttura secondaria a temperature più elevate rispetto ai rispettivi primers lineari (Figura 15).

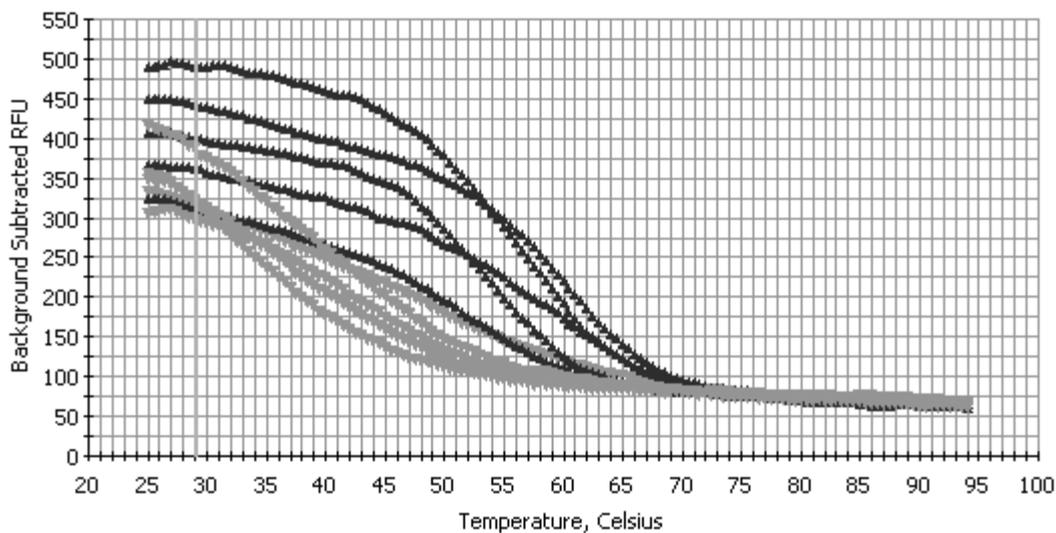


Figura 15: curve di dissociazione di ciascuna delle 5 coppie di hairpin-primers (in nero) e primers lineari (in grigio), utilizzati in questo studio.

L'effetto sulla performance del saggio RQ-PCR indotto dal differente disegno degli hairpin-primers (lunghezza della "coda" e conseguente stabilità) è stata valutata tramite amplificazione di 2 campioni del caso n°2, (punti di calibrazione corrispondenti a 1.25×10^5 and 2.0×10^2 copie per reazione), utilizzando lo stesso hairpin-primer forward e due differenti hairpin-primers reverse e cicli di profilo termico a 2 step testando due differenti temperature di annealing (60°C e 64°C) (Figure 16 e 17). L'hairpin-primer

reverse contenente 9 nucleotidi (9HS) ha conservato la struttura secondaria a temperature superiori a 75°C. L' hairpin-primer reverse contenente 5 nucleotidi (5HS), a 65°C ha mostrato solo la persistenza di una struttura secondaria residua (Figura 16).

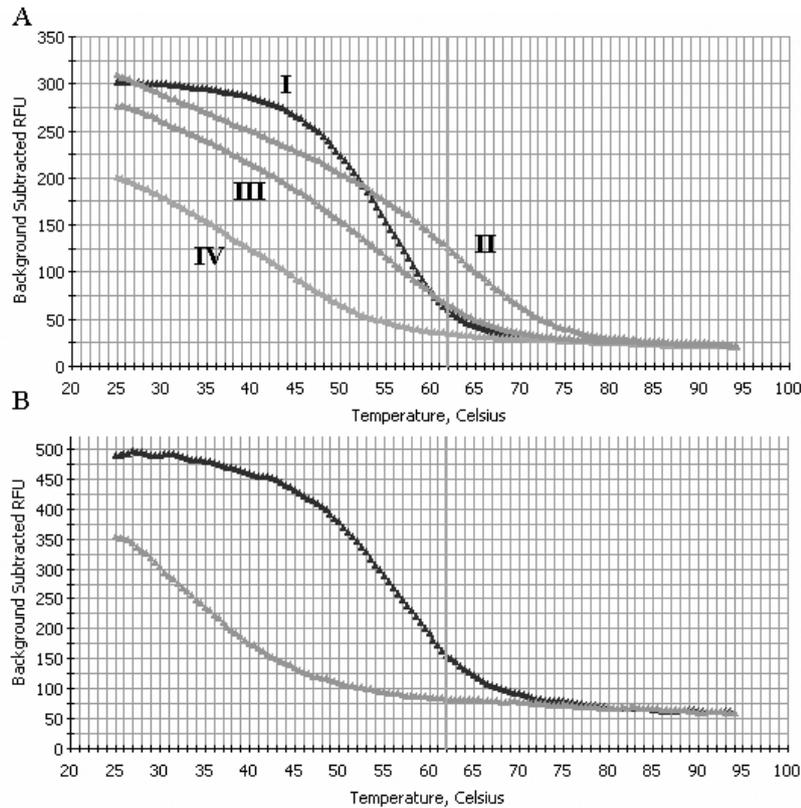


Figure 16: Analisi della curva di dissociazione (DCA) degli hairpin primers e dei primers lineari del caso n°2. **A:** DCA di un primer singolo. Curva I: hairpin-primer fwd ; curva II 9HS reverse; curva III: 5HS reverse; curva IV: primer forward lineare. A differenza del primer lineare e degli altri hairpin-primers, a 60°C-64°C l'hairpin-primer reverse costituito da 9 nucleotidi mantiene una struttura secondaria. **B** DCA delle coppie di primers: curva nera hairpin primer forward e reverse costituiti da 5 nucleotidi; curva grigia primers forward e reverse lineari La fluorescenza ad ogni punto di temperatura della curva di dissociazione dell'hairpin primer è approssimativamente determinata dalla fluorescenza cumulativa originata dal primer singolo del grafico A.

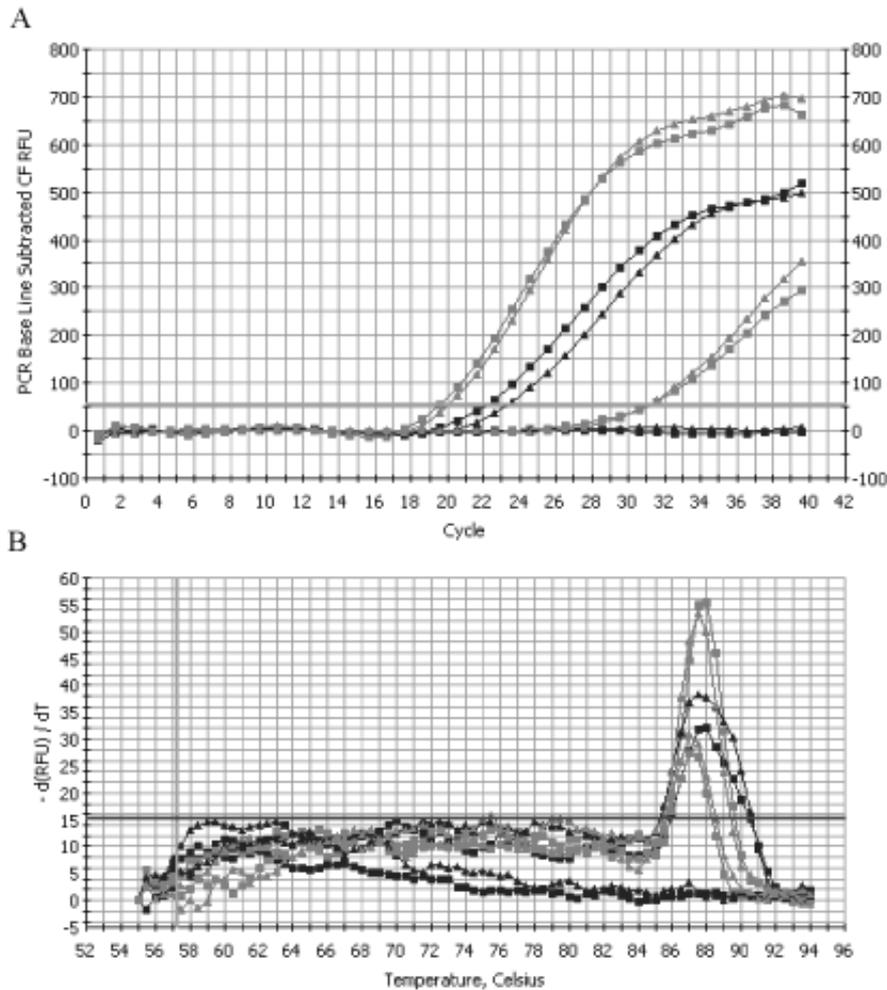


Figure 17: Effetto della lunghezza della “coda” dell’hairpin-primer: Curve di amplificazione e curva di melting del caso n°2. In grigio sono rappresentate le curve di amplificazione e le curve di melting del primer reverse 5HS; in nero le curve di amplificazione e le curve di melting del primer reverse 9HS RQ-PCR con temperature di annealing/estensione di 60°C (quadrati) e 64°C (triangoli). Sono rappresentati due campioni del caso n°2 con differente numero di copie del target (alto e basso).

Come mostrato nella figura 17 nonostante il numero di copie e pur utilizzando lo stesso hairpin primer forward, il 5HS reverse ha determinato un Ct più basso rispetto al 9HS reverse. Inoltre, a 64°C il 9HS ha presentato una efficienza superiore che a 60°C (nonostante comunque la mancata amplificazione ad entrambe le temperature di annealing del campione a più basso numero di copie, 2.0×10^2 (Figura 17)).

Anche tramite l’impiego di hairpin-primers, durante lo studio è stata osservata la formazione di dimeri di primers; soprattutto durante l’amplificazione PCR in campioni

non contenenti il target specifico (campioni bianchi o negativi) e in campioni contenenti un numero basso o molto basso di copie (nei casi n°2, 3 e 4)(Figura 18).

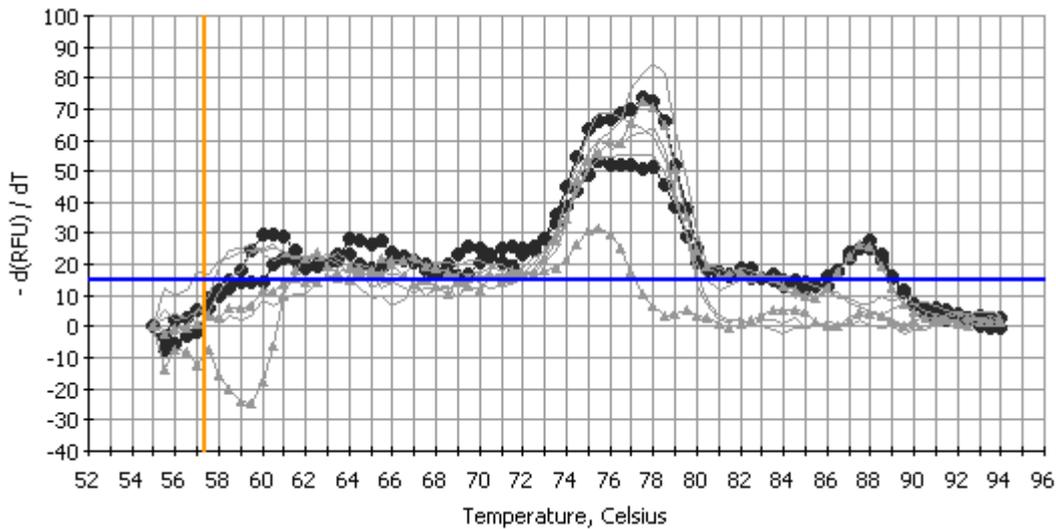


Figura 18: Analisi delle curve di melting per la valutazione della sensibilità dell'esperimento in RQ-PCR. caso n°2. Duplicati del campione costituito da 1.6 (cerchi neri) del campione costituito da 0.3 copie/reazione (triangoli grigi) e controlli negativi (campioni genomici e campioni senza DNA)(linee grigie). In tutti i campioni testati sono evidenti dei picchi melt ad una T_m nel range di 74-80°C indotti da dimeri di primers. Entrambi i duplicati del campione costituito da 1.6 copie/reazione hanno raggiunto un picco specifico ad una $T_m \approx 88^\circ\text{C}$., mentre solo 1 dei 2 duplicati del campione costituito da 0.3 copie/reazione ha presentato un picco specifico a $T_m \approx 88^\circ\text{C}$

In campioni contenenti meno di 40 copie per reazione non è possibile ottenere una accurata valutazione quantitativa; questo perché la fluorescenza rilevata, deriva dalla sommazione dei segnali di amplificazione dei prodotti specifici e aspecifici. Utilizzando differenti concentrazioni di primers (100nmol di primer forward e 500nmol di primer reverse e viceversa) sono stati ottenuti valori di C_t superiori rispetto ai valori ottenuti nelle reazioni di amplificazioni in cui era stato previsto l'impiego di primers reverse e forward alla stessa concentrazione. Ciò è risultato nonostante la mancata osservazione di una fluorescenza indotta dalla amplificazione di dimeri di primer e nonostante l'evidenza, tramite l'analisi delle curve di dissociazione (figura 15) che ad ogni punto di temperatura, l'intensità della fluorescenza generata da ogni coppia di primers riproducesse l'effetto additivo della fluorescenza indotta dai primers singoli e che non

fosse stata osservata una fluorescenza addizionale indotta dall'amplificazione di cross-dimeri.

Specificità RQ-PCR

Utilizzando primers lineari e cicli di profilo termico con una temperatura di annealing molto vicina alla T_m media dei primers stessi (variazioni di -5°C - 0°C la T_m media), è stata osservata una maggiore intensità di fluorescenza, indotta dall'amplificazione di prodotti aspecifici aventi profili melt vicini o sovrapponibili al picco melt del prodotto specifico (Figura 19).

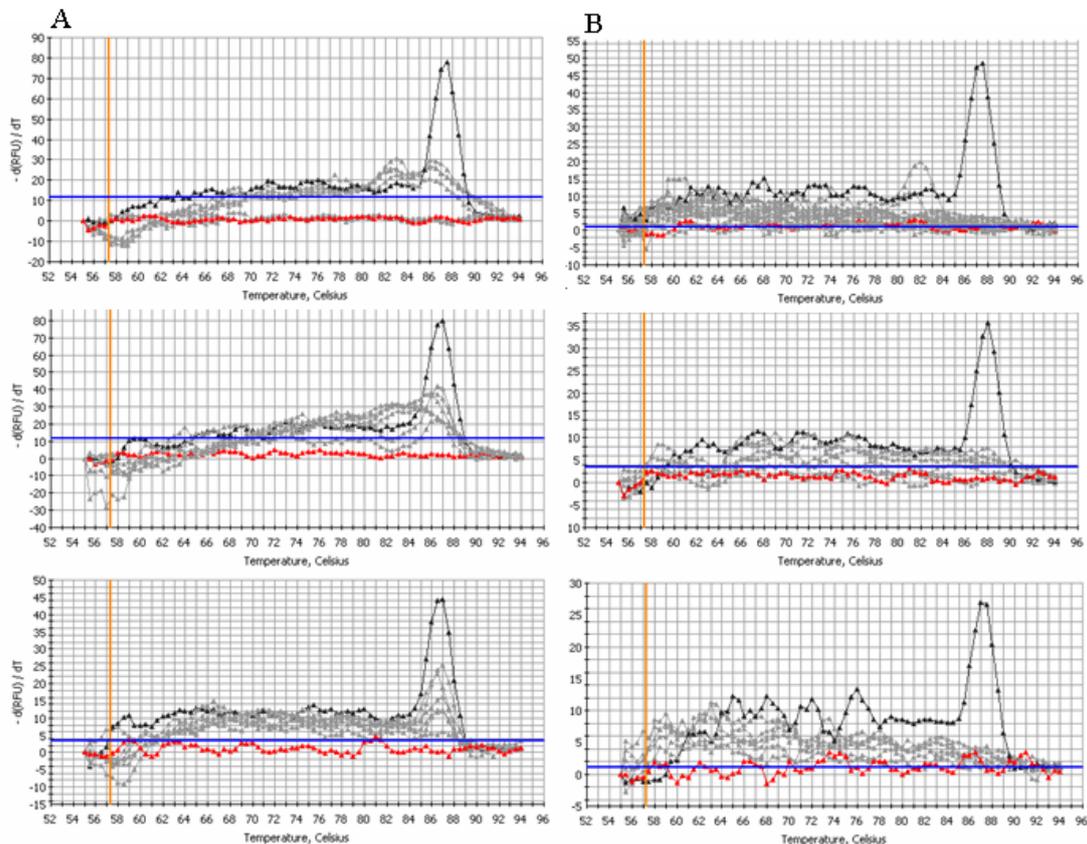


Figura 19: Effetto della temperatura di annealing sulla specificità della RQ-PCR. Esempi selezionati di analisi delle curve di melting del metodo RQ-PCR utilizzando primer standard.

A) Reazione 3-step RQ-PCR con una temperatura di annealing molto vicina alla T_m media dei primers e B) rispettiva reazione RQ-PCR 2-step con una temperatura di annealing/estensione $5-10.5^{\circ}\text{C}$ sopra la T_m media dei primers; le curve nere indicano il target specifico, le curve grigie indicano il target aspecifico, la curva rossa indica il campione senza DNA.

Tramite l'analisi delle curve di dissociazione è stato osservato che ad una temperatura di annealing inferiore a 60°C, l'hairpin primer mantiene significativamente la sua struttura secondaria, ostacolando l'efficienza della PCR. Di conseguenza l'esperimento di specificità mediante hairpin-primers è stata eseguita iniziando da una temperatura di annealing di 60°C ed incrementando la temperatura di annealing/estensione qualora fosse stata osservata l'amplificazione di prodotti aspecifici. Inoltre, non è stata osservata nessuna amplificazione di prodotti aspecifici, utilizzando variazioni della temperatura di annealing/estensione comprese tra -1°C e 5°C la T_m media degli hairpin-primers.

Sensibilità RQ-PCR ed efficienza PCR

Le curve di calibrazione e le efficienze dei primers lineari e degli hairpin-primers sono riportate nella tabella 4.

Caso #	Diluizioni seriali	Tipo di primer		Coefficiente di correlazione	Sensibilità
		T° di annealing	Efficienza		
1	Plasmide	Lineare	87.1 %	0.983	40 copie/reazione
		HS	99.4 %	0.989	1.6 copie/reazione
2	Plasmide	Lineare	86.5%	0.960	8 copie/reazione
		HS	82.2%	0.997	1.6 copie/reazione
3	Plasmide	Lineare	91.0%	0.996	40 copie/reazione
		HS	104.2%	0.988	8 copie/reazione
4	genomico	Lineare	99.2%	0.965	10^{-3}
		HS	108.1%	0.995	10^{-4}
5	genomico	lineare 65°C	98.3%	0.980	$10^{-4}/10^{-5}$
		HS 68°C	103.0%	0.999	10^{-4}

Tabella 4: Saggio RQ-PCR eseguita con primers clone-specifici lineari e tramite hairpin-primers. Parametri osservati dalla curva di calibrazione e sensibilità.

In tutti i casi il coefficiente di correlazione è stato > a 0.960. Nei casi 1, 2 e 3 le efficienze indotte dai primers lineari sono state rispettivamente di 83.4%, 86.5% e 91.0%, mentre la sensibilità è stata di 40, 8 e 40 copie per reazione, rispettivamente. La efficienza

indotta dagli hairpin-primers è stata di 99.4%, 82.2% e 104.2% con una sensibilità di 1.6, 1.6 e 8 copie per reazione (Tabella 4).

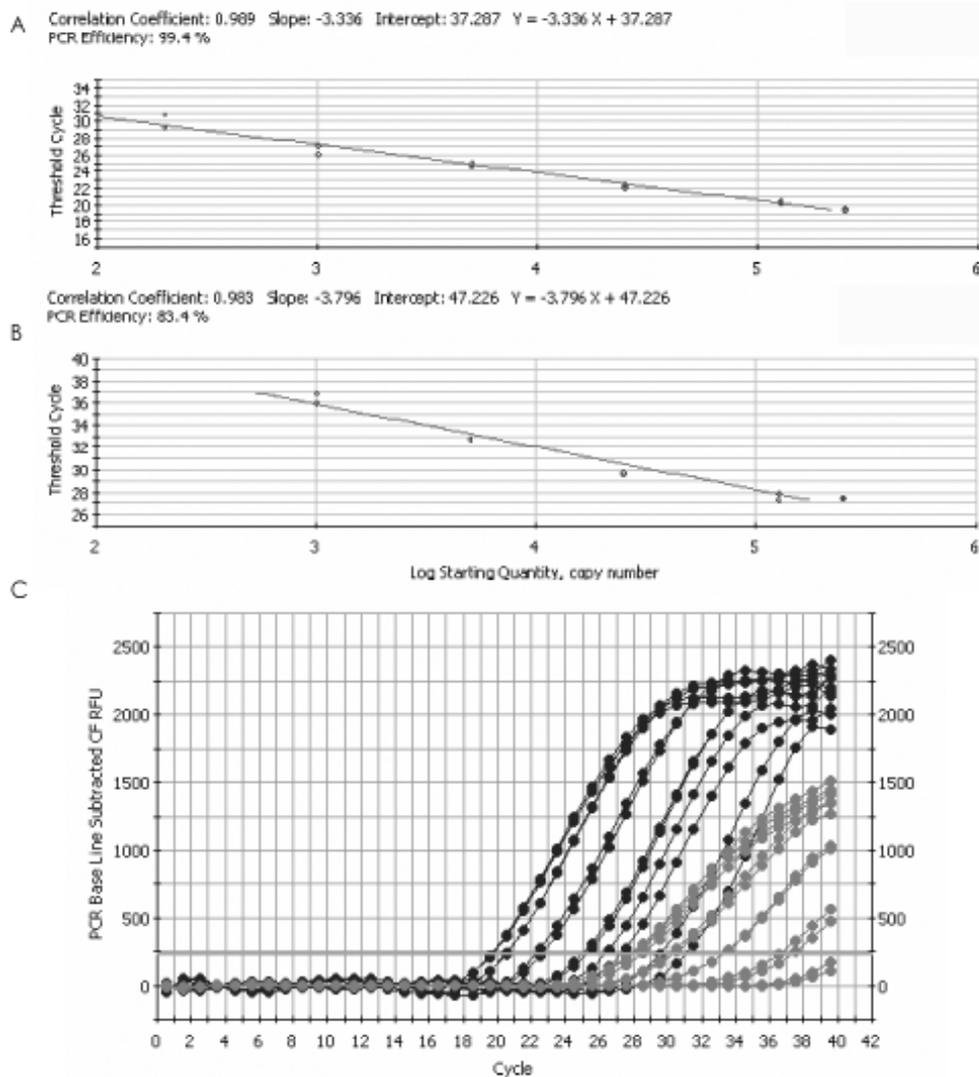


Figura 20: Curve di calibrazione delle diluizioni plasmidiche da 2.5×10^5 a 2.0×10^2 del caso n°1. RQ-PCR dual step con temperatura di annealing/estensione di 68°C ottenuta con (A) hairpin-primers e (B) primers lineari; (C) comparazione delle curve di amplificazione ottenute mediante hairpin-primers (in nero) e mediante primers lineari (in grigio). Nel caso n°1, la sensibilità del primer lineare è stata di 40 copie per reazione a 65°C e 200 copie per reazione a 68°C .

Nei casi n°4 e 5, mediante saggio RQ-PCR con hairpin-primers sono risultati positivi i campioni rappresentati dalle diluizioni seriali 10^{-4} (approssimativamente 3 copie/ μl), 10^{-3} (approssimativamente 30 copie/ μl) e 10^{-5} (0.3 copie/ μl). Nel caso n°5, mediante primers lineari è stato ritrovato positivo solo uno dei due replicati del campione rappresentato dalla diluizione seriale 10^{-5} (approssimativamente 0.3 copie/ μl) e ad

una temperatura di 65°C, la quale è risultata la temperatura di annealing ottimale per i saggi di RQ-PCR sia mediante hairpin-primers, che tramite primers lineari. Tuttavia, a 65°C mediante saggio con hairpin-primers, è stata sempre osservata nel campione 10⁻³, insieme alla presenza di un picco melt specifico, la fluorescenza indotta da un dimero di primer (T_m di 76.5°C). Nel caso n°5, a 68°C è stato possibile ottenere mediante hairpin-primers, la migliore efficienza PCR e curva di calibrazione, poiché non è stata osservata la comparsa di nessuna fluorescenza indotta da dimeri di primers fino alla diluizione seriale 10⁻⁴. Viceversa, mediante primers lineari, a 68°C la sensibilità del saggio nel caso n°5 è stata di 10⁻³.

Valutazione della MRM dei campioni in remissione

Gli hairpin-primers sono stati utilizzati per valutare retrospettivamente il decorso clinico di 7 cani affetti da linfoma e sottoposti a trattamento antitumorale multifarmaco. I soggetti sono stati definiti, in corrispondenza di ogni visita pre-trattamento, in remissione parziale (RP) qualora l'esame clinico evidenziasse una riduzione dei linfonodi variabile tra 0 e 25%, in remissione completa (RC) qualora si osservasse una riduzione dei linfonodi superiore al 75% oppure in recidiva, in caso di un aumento in più di un linfonodo osservato dopo un periodo di almeno 1 settimana di remissione completa.

Per alcuni casi riportiamo di seguito le curve di amplificazione e le curve di melting ottenute mediante RQ-PCR dei campioni di follow-up. Sulle curve di amplificazione dei campioni follow-up, risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata definito il valore soglia di fluorescenza, settata in modo che i segnali di amplificazione specifici fossero separabili da quelli indotti dalla fluorescenza background della reazione e in maniera da intersecare ciascuna curva di amplificazione all'interno della regione di crescita esponenziale (fase in cui i reagenti sono lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità ridotti al minimo). L'intersezione tra il valore soglia e ciascuna curva di amplificazione ha definito il Ct (ciclo soglia) utilizzata come misura relativa della

quantità di MRM nella reazione PCR. Per ogni campione di follow-up è stata quindi ottenuta una curva di amplificazione il cui Ct è inversamente proporzionale alla quantità di MRM. Tramite la determinazione dei cicli soglia misurati per ciascuna diluizione plasmidica (casi n°1, 2 e 3) o del DNA estratto al momento dell'ammissione (casi n°4, 5, 6) è stato possibile ottenere una curva standard. Per il caso n°7 non è stato possibile ottenere una curva standard per mancanza di una adeguata quantità di DNA ottenuto dal preparato citologico al momento dell'ammissione. La quantità di MRM presente nei campioni follow-up risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata valutata interpolando il Ct di ciascun campione e confrontandolo con i punti della curva standard di riferimento. Solo per alcuni casi (casi n°6 e 7) sono inoltre riportate le curve di amplificazione ottenute mediante saggio aQRT-PCR. Riportiamo in seguito il monitoraggio retrospettivo della MRM durante il decorso clinico di ciascun soggetto preso in esame in questo studio.

Caso n°1

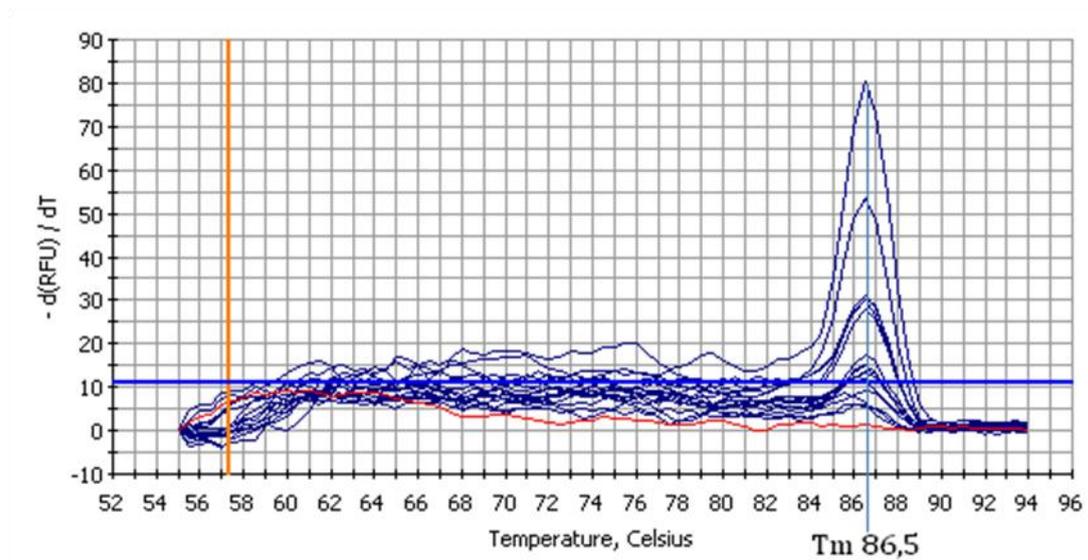


Figura 21: Analisi delle curve di melting dei campioni follow-up del caso n°1. Profili melt dei campioni follow-up che hanno mostrato amplificazione di prodotti specifici (T_m 86,5) e di conseguenza positivi per la MRM mediante RQ-PCR

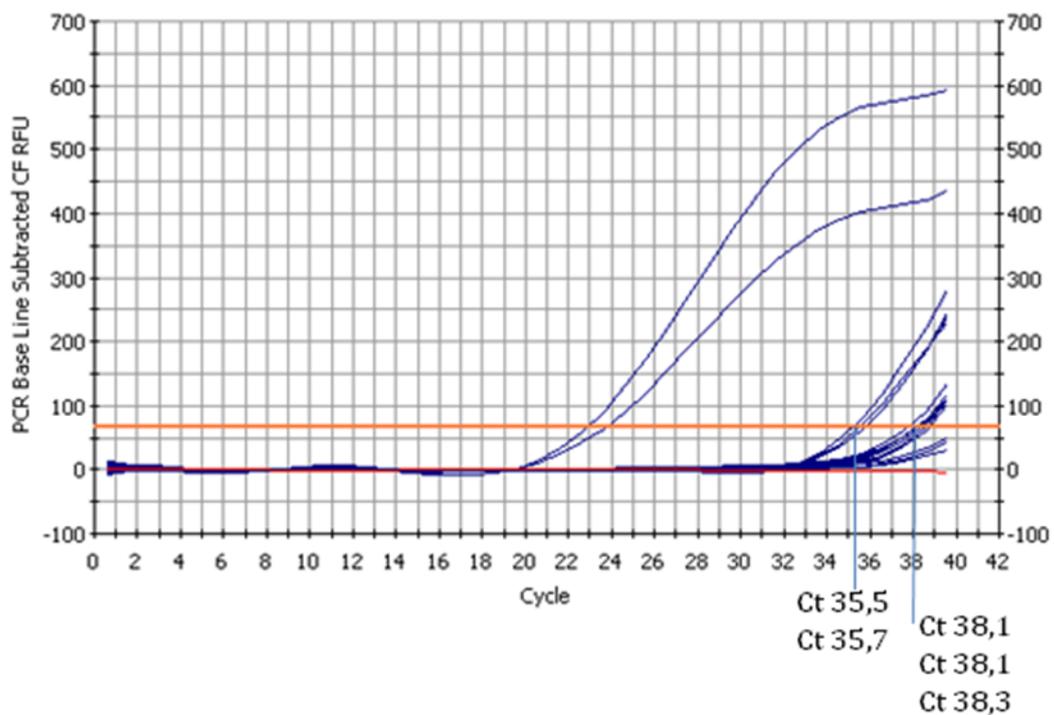


Figura 22: Curve di amplificazione dei campioni follow-up del caso n°1. Per le curve di amplificazione dei campioni risultati positivi al saggio RQ-PCR per la valutazione della MRM sono riportati i Ct.

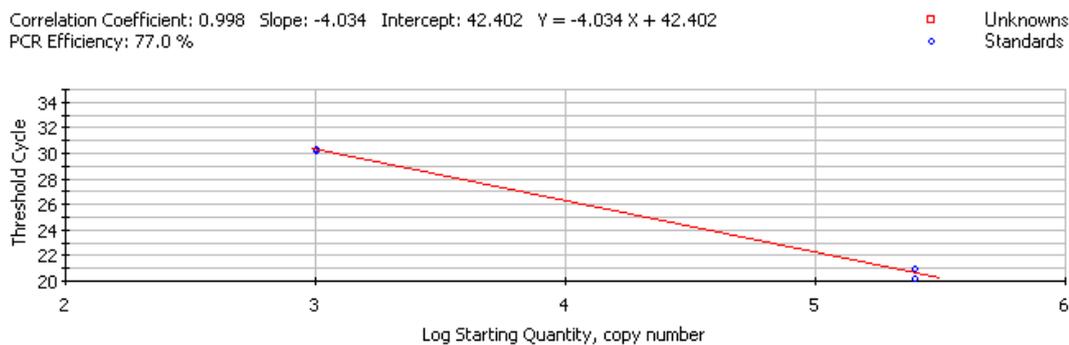


Figura 23: Curva standard delle quantità plasmidiche del DNA prelevato in ammissione in funzione del Ct del caso n°1 (nella curva sono rappresentate solo la diluizione minore e una diluizione intermedia). La quantità di MRM presente nei campioni follow-up risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata valutata interpolando il Ct di ciascun campione e confrontandolo con i punti della curva standard.

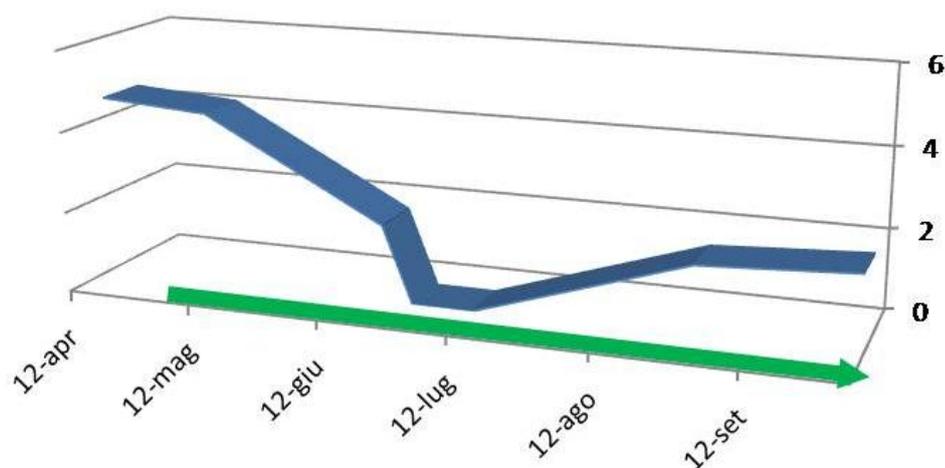


Figura 24: caso n°1. Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico. In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antiblastica; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia.

Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa evidente per tutto il periodo in cui è stato sottoposto a chemioterapia. Ad eccezione di un breve periodo, il saggio RQ-PCR 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 il trattamento chemioterapico.

Caso n°2

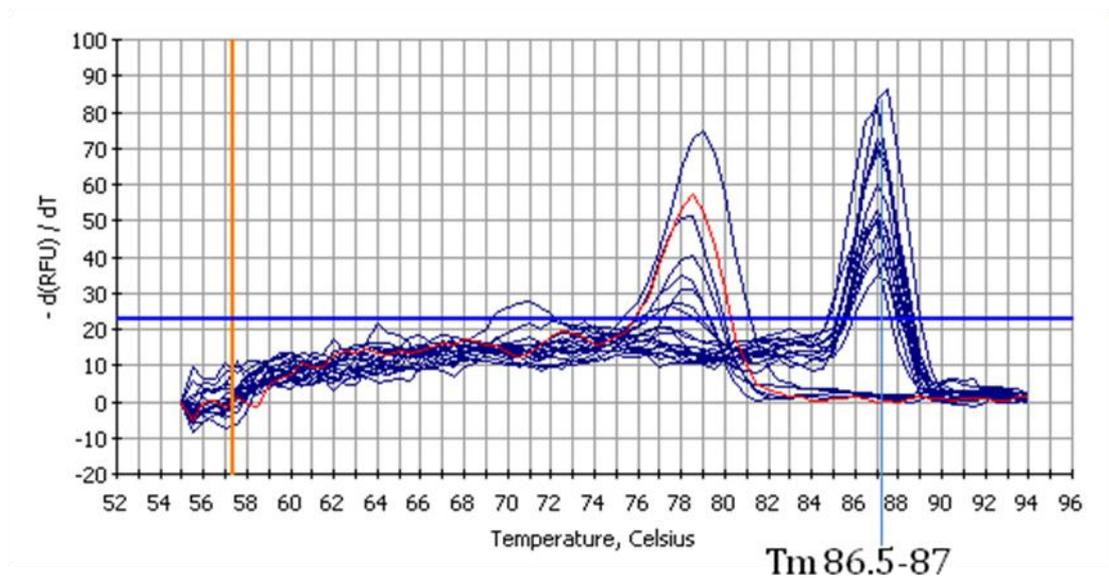


Figura 25: Analisi delle curve di melting dei campioni follow-up del caso n°2. A sx sono rappresentati i profili melt dei prodotti aspecifici, mentre a dx i profili melt dei campioni follow-up in cui si è verificata amplificazione di prodotti specifici (T_m 86,5-87)

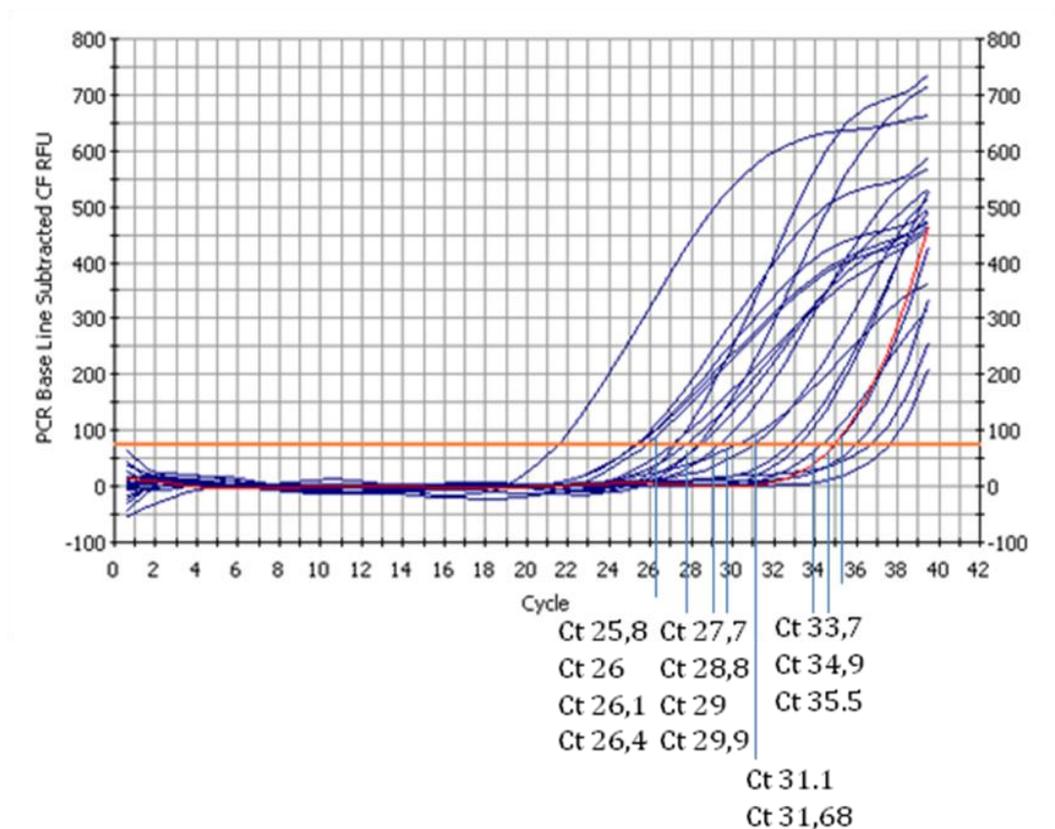


Figura 26: Curve di amplificazione dei campioni follow-up del caso n°2. Per le curve di amplificazione dei campioni risultati positivi al saggio RQ-PCR per la valutazione della MRM sono riportati i Ct.

La quantità di MRM presente nei campioni follow-up risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata valutata interpolando il Ct di ciascun campione e confrontandolo con i punti della curva standard (immagine non riportata).

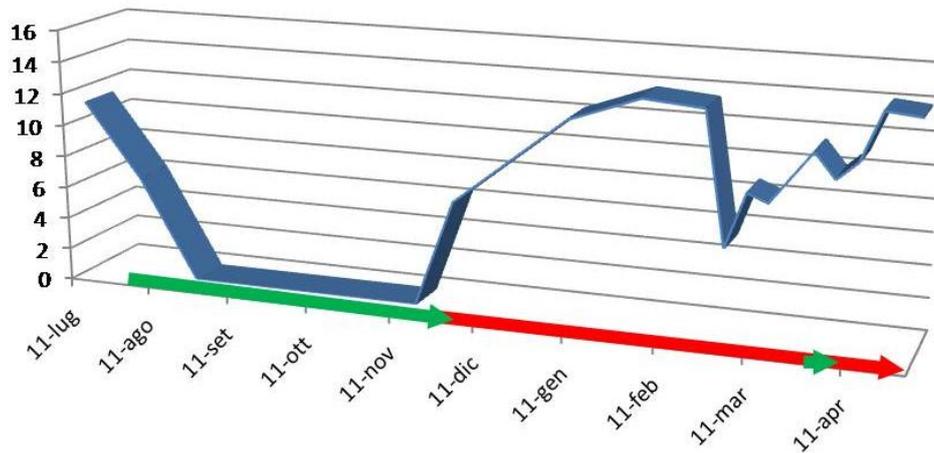


Figura 27: caso n°2. Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico. In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antitumorale; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia, mentre la freccia rossa indica il periodo in cui il soggetto ha presentato recidiva clinica.

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

Caso n°3

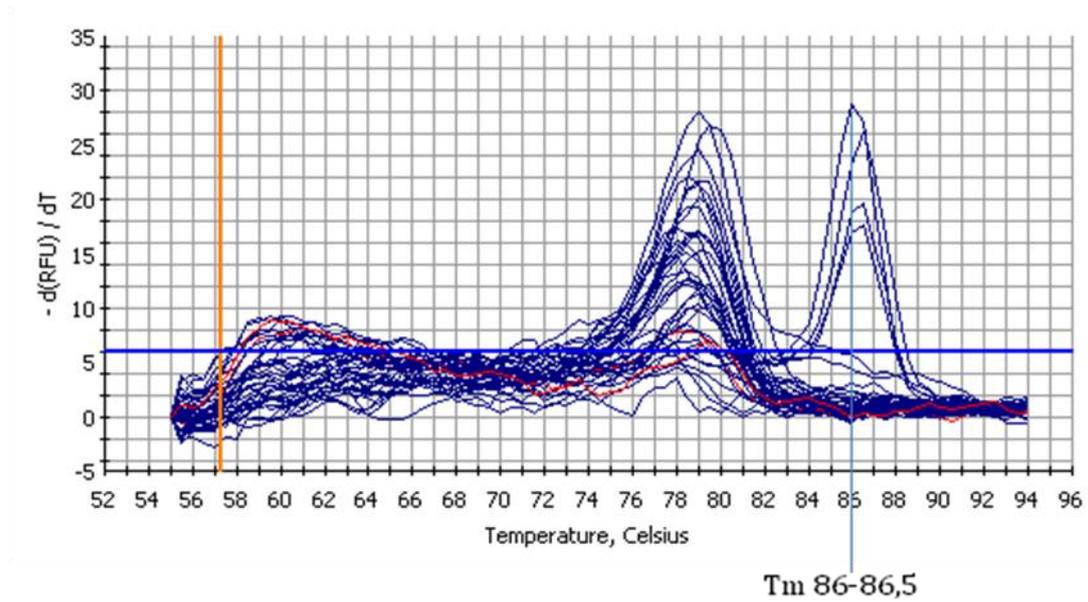


Figura 28: Analisi delle curve di melting dei campioni follow-up del caso n°3. A sx sono rappresentati i profili melt dei prodotti aspecifici, mentre a dx i profili melt dei campioni follow-up in cui si è verificata amplificazione di prodotti specifici (T_m 86-86,5)

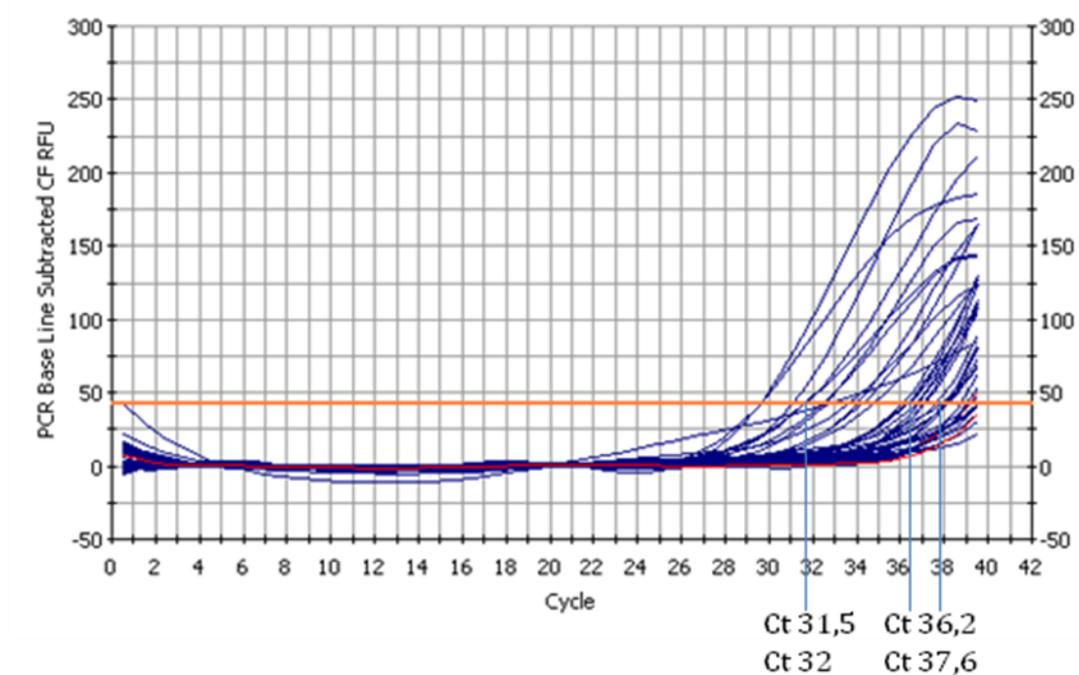


Figura 29: Curve di amplificazione dei campioni follow-up del caso n°3. Per le curve di amplificazione dei campioni risultati positivi al saggio RQ-PCR per la valutazione della MRM sono riportati i Ct.

La quantità di MRM presente nei campioni follow-up del caso n°3 risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata valutata interpolando il Ct di ciascun campione e confrontandolo con i punti della curva standard (immagine non riportata).

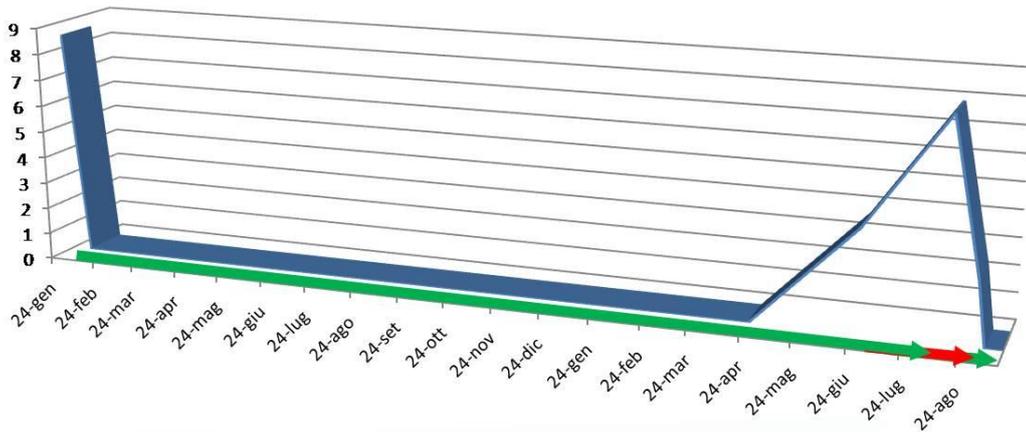
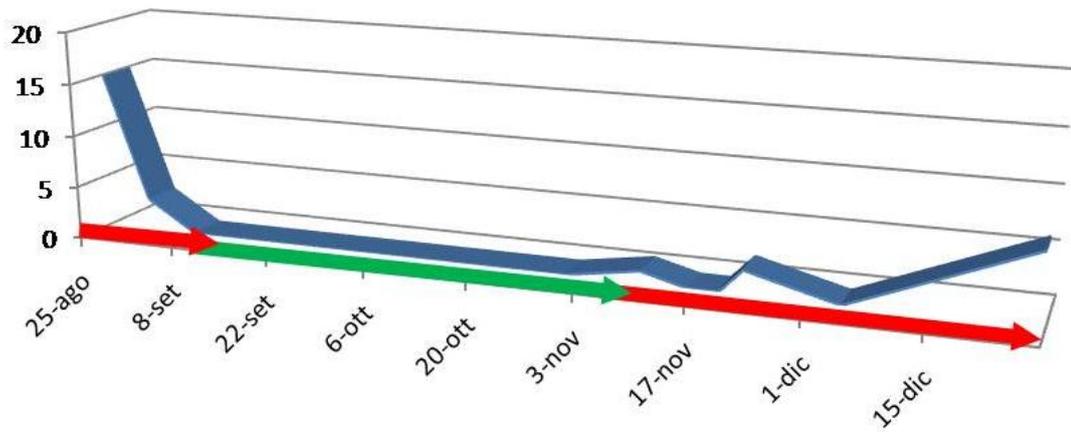


Figura 30: caso n°3. Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico. In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antitumorale; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia, mentre la freccia rossa indica il periodo in cui il soggetto ha presentato recidiva clinica.

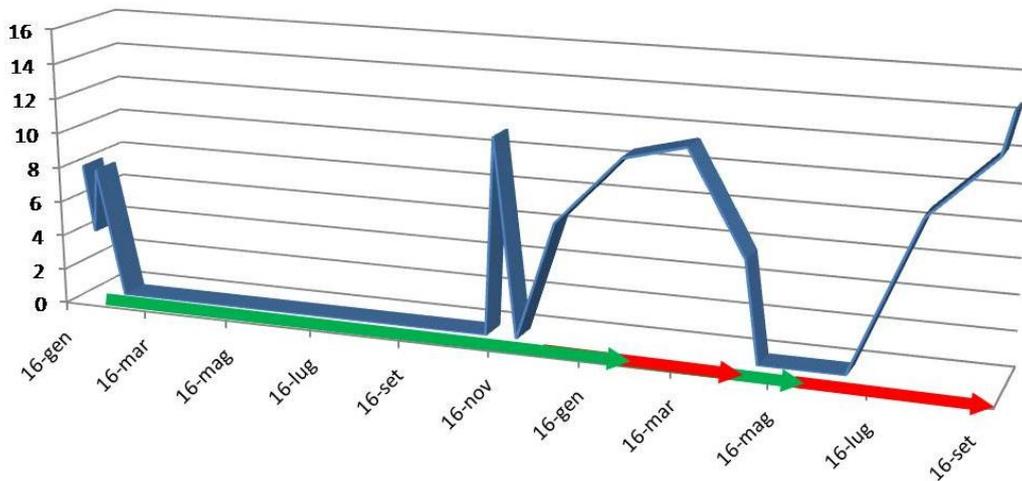
Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa prolungata. Il saggio RQ-PCR ha anticipato la recidiva di circa 3 mesi.

Caso n°4



Il soggetto ha presentato remissione clinica per una durata piuttosto breve con recidiva precoce non anticipata da RQ-PCR positiva. In questo caso il saggio molecolare sembra aver confermato il decorso clinico senza anticipare utili informazioni.

Caso n°5



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

Figura 31 e 32. Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico del caso n°4 (in alto) e n°5 (in basso). In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antiblastica; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia, mentre la freccia rossa indica il periodo in cui il soggetto ha presentato recidiva clinica.

Caso n°6

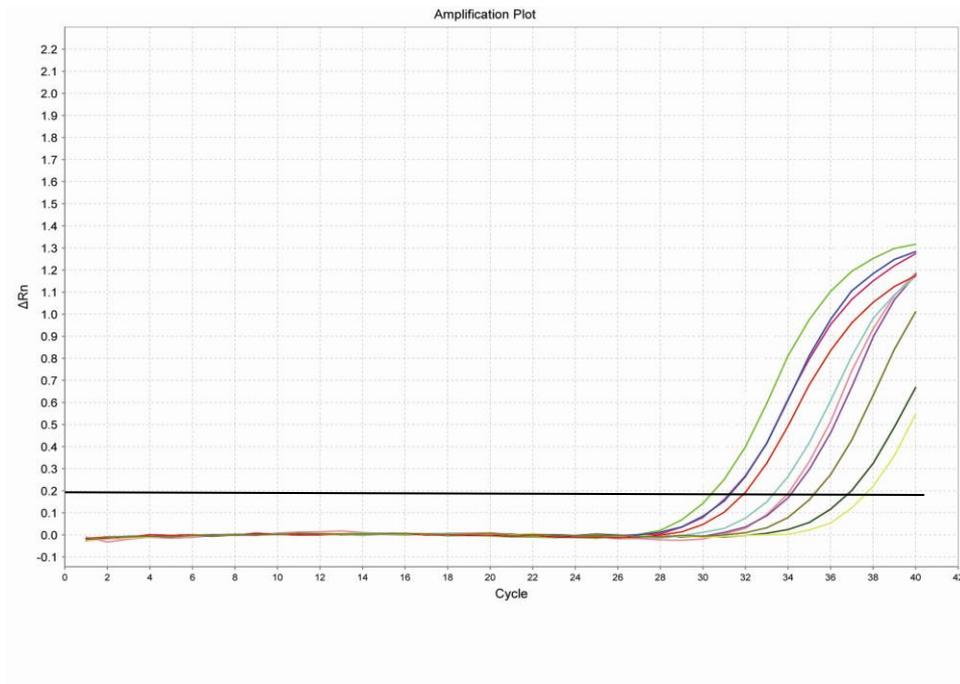


Figura 33: metodica aQRT-PCR. Curve di amplificazione dei campioni follow-up del caso n°6

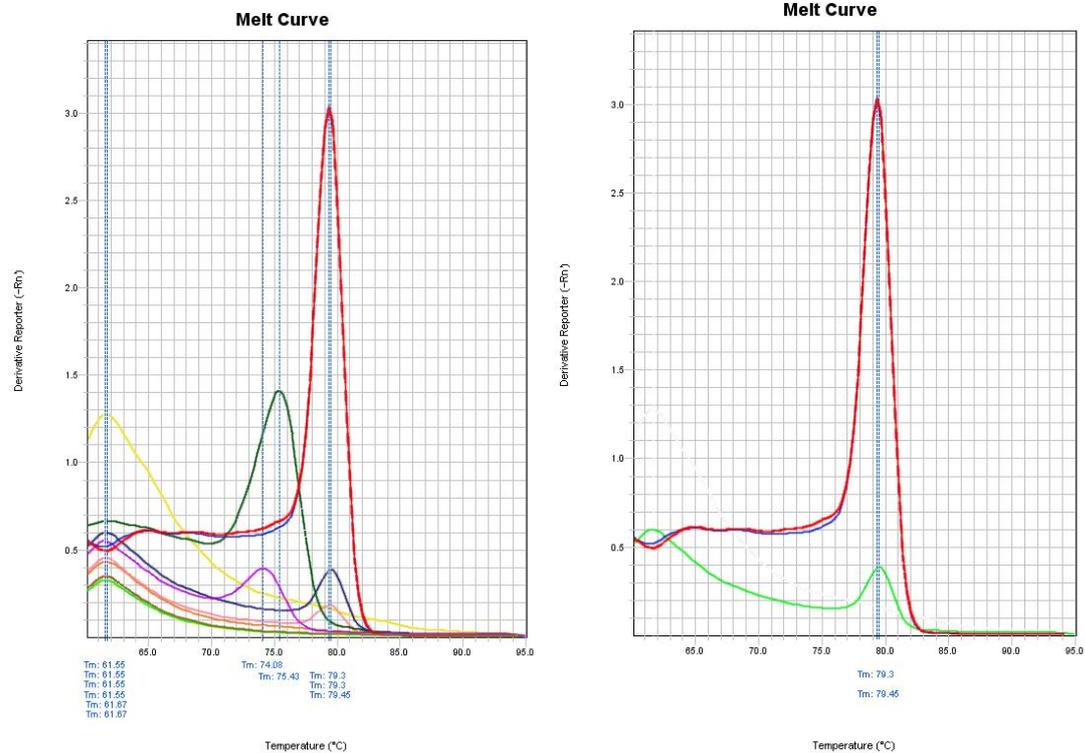


Figura 34: Analisi delle curve di melting dei campioni follow-up del caso n°6. A sx è rappresentata l'analisi delle curve di melting dei prodotti specifici ($T_m \approx 79-79.5$) e dei prodotti aspecifici. A dx sono rappresentati i profili melt dei tre campioni follow-up che hanno mostrato amplificazione di prodotti specifici e di conseguenza positivi per la MRM mediante RQ-PCR

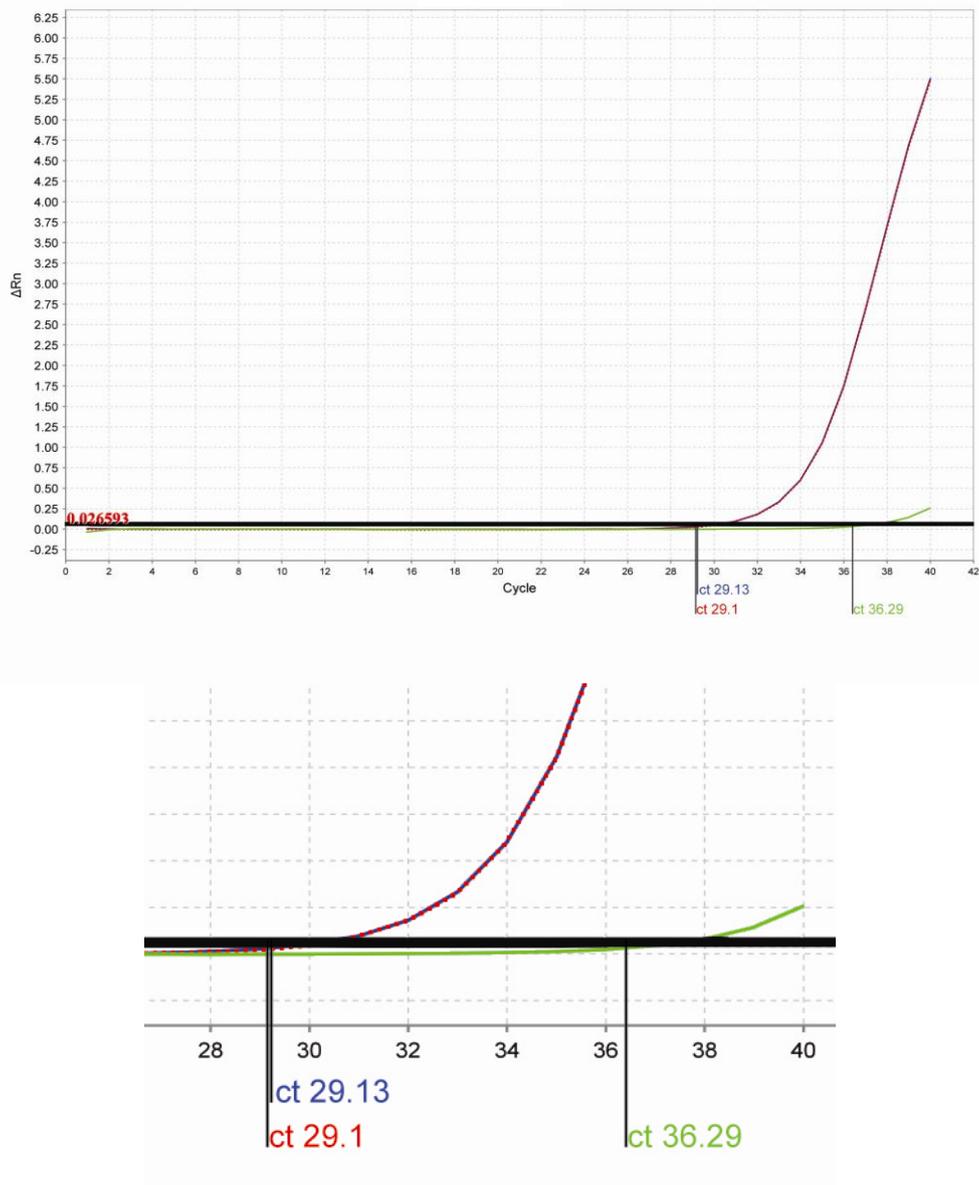


Figura 35: Curve di amplificazione dei tre campioni follow-up del caso n°6 risultati positivi al saggio RQ-PCR per la valutazione della MRM. Per ciascuna curva è riportato il Ct (dettaglio nella figura in basso).

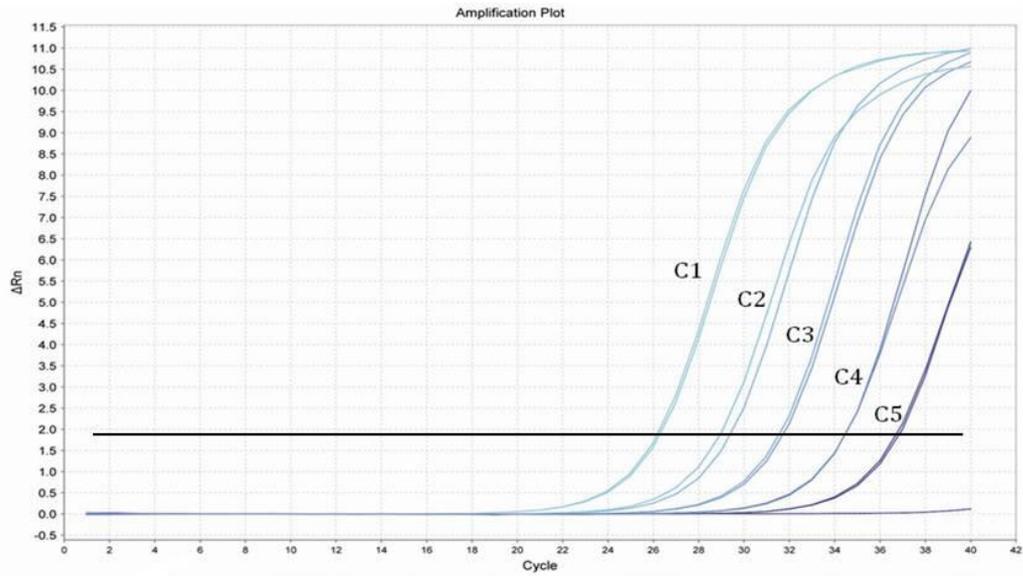


Figura 36: Curva standard del DNA prelevato in ammissione del caso n°6 calcolata tramite le 5 diluizioni (1:5) in duplicato del DNA genomico estratto al momento dell'ammissione (da C1 a C5 rispettivamente: 100%, 20%, 4%, 0,8%, 0,16%).

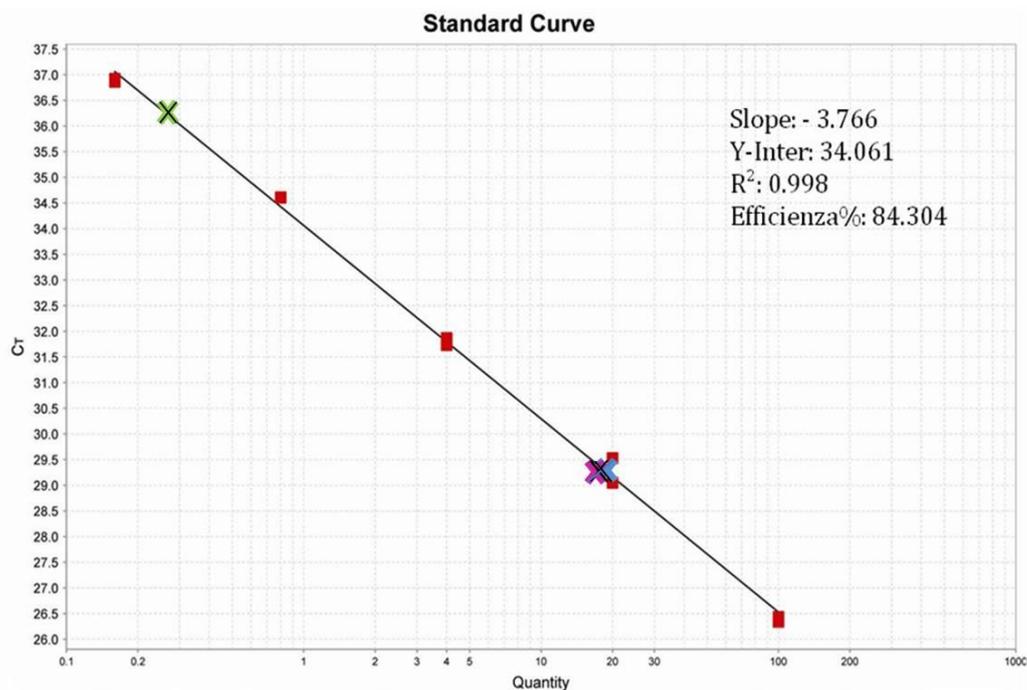


Figura 37: caso n°6. Curva standard delle quantità % del DNA prelevato in ammissione in funzione del Ct. La quantità di MRM presente nei campioni follow-up risultati positivi al saggio RQ-PCR è stata valutata interpolando il Ct di ciascun campione (crocette) e confrontandolo con i punti della curva standard.

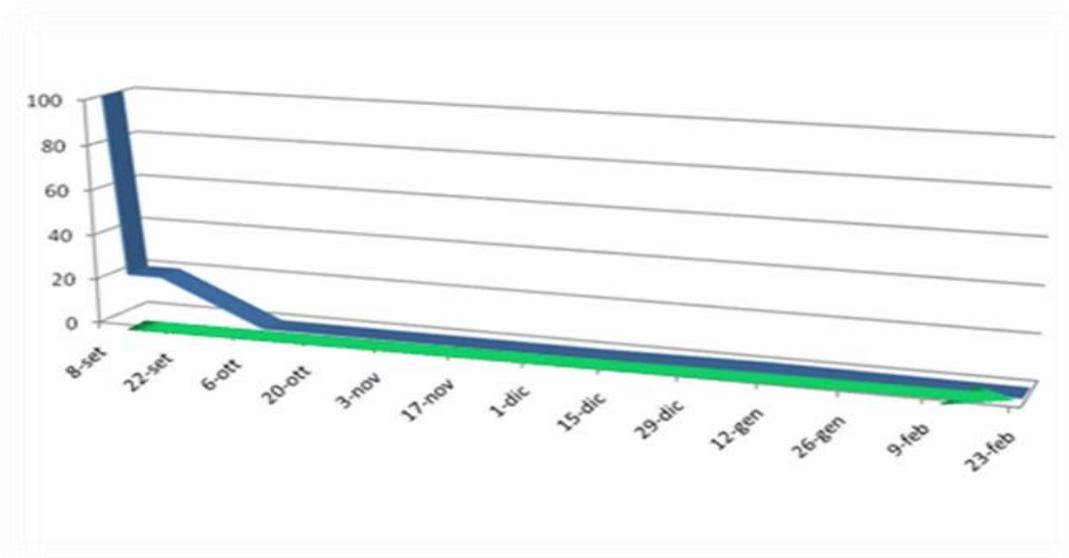


Figura 38: Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico del caso n°6. In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antiblastica; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia. In ordinata è rappresentata la % della quantità di MRM evidenziata mediante saggio RQ-PCR nei campioni follow-up rispetto alla quantità % del DNA genomico estratto al momento dell'ammissione.

Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa evidente per tutto il periodo in cui è stato sottoposto a terapia antiblastica. Il saggio RQ-PCR ha rilevato la presenza di MRM in corrispondenza della prima, della seconda e dell'ultima seduta chemioterapica della fase di induzione (quantità % di MRM del campione in remissione rispetto alla quantità di MRM del campione in ammissione; compresa tra 0,16% e 0,8%; non evidente nel grafico sopraesposto), con negatività tuttavia, nel campione prelevato 43 giorni dopo il termine della fase di induzione. Il follow-up di questo soggetto è stato concluso prima di poter stabilire una reale utilità del saggio RQ-PCR per il monitoraggio della MRM.

Caso n°7

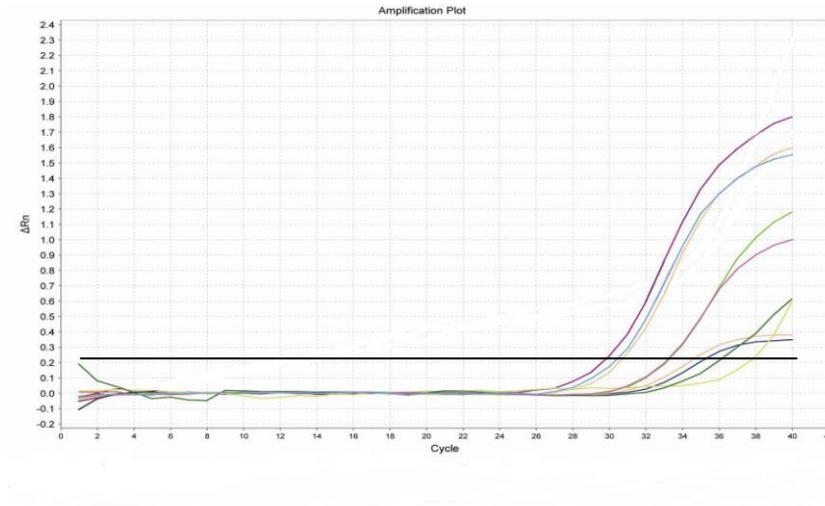


Figura 39: metodica aQRT-PCR. Curve di amplificazione dei campioni follow-up del caso n°7

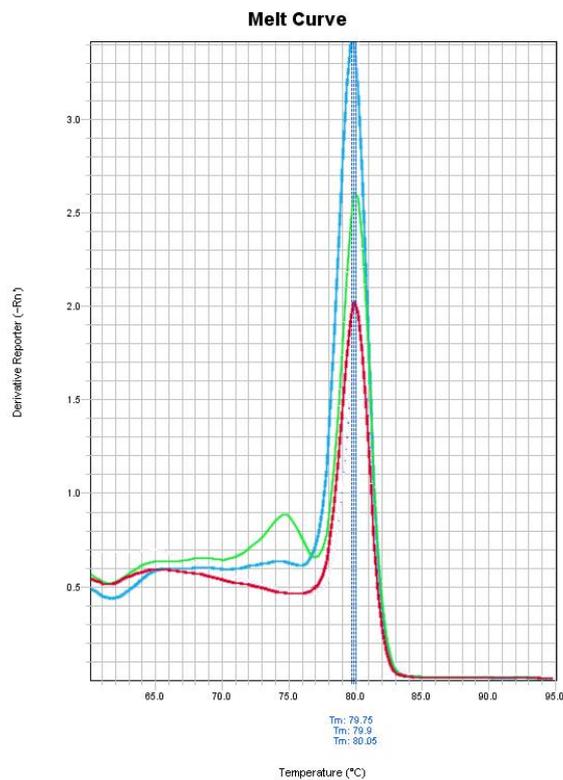


Figura 40: Analisi delle curve di melting dei campioni follow-up positivi del caso n°7. Sono rappresentati i profili melt dei tre campioni follow-up che hanno mostrato amplificazione di prodotti specifici ($T_m \approx 78.5-80$).

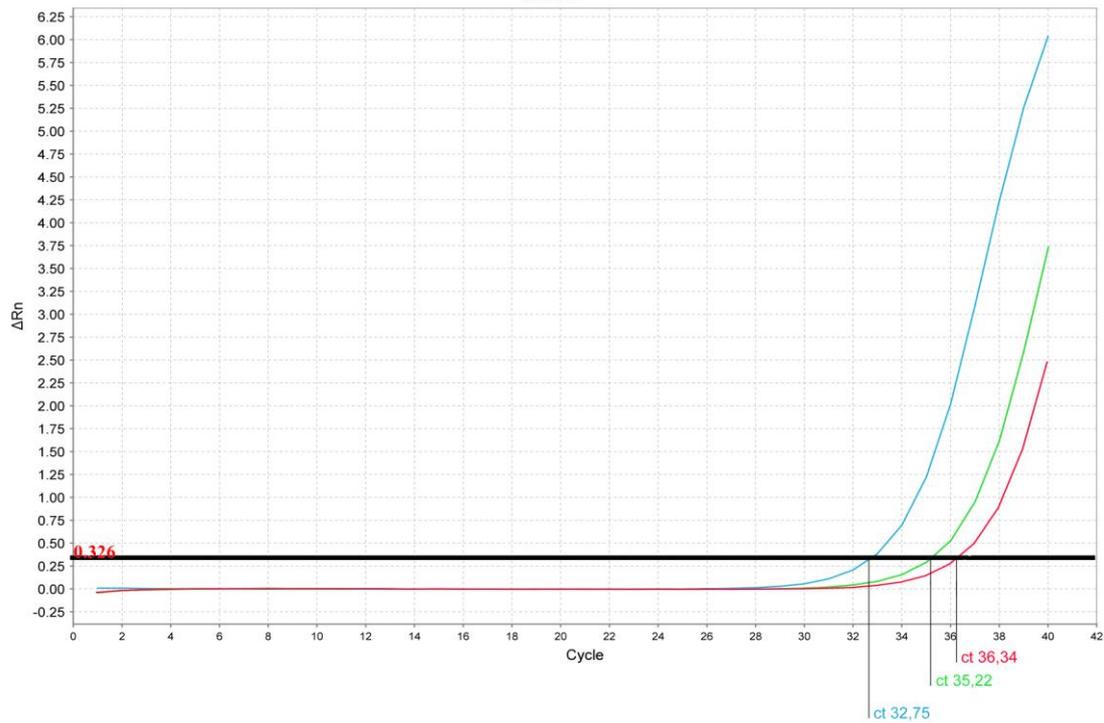


Figura 41: Curve di amplificazione dei tre campioni follow-up del caso n°7 risultati positivi al saggio RQ-PCR per la valutazione della MRM. Per ciascuna curva è riportato il Ct.

Per il caso n°7 non è stato possibile ottenere una curva standard (per inadeguata quantità di DNA ottenuto dal preparato citologico al momento dell'ammissione); di conseguenza, la quantificazione relativa della MRM nei campioni follow-up è stata effettuata comparando i Ct dei campioni in remissione risultati positivi mediante saggio RQ-PCR, con il Ct del campione prelevato al momento dell'ammissione (Figura 42).

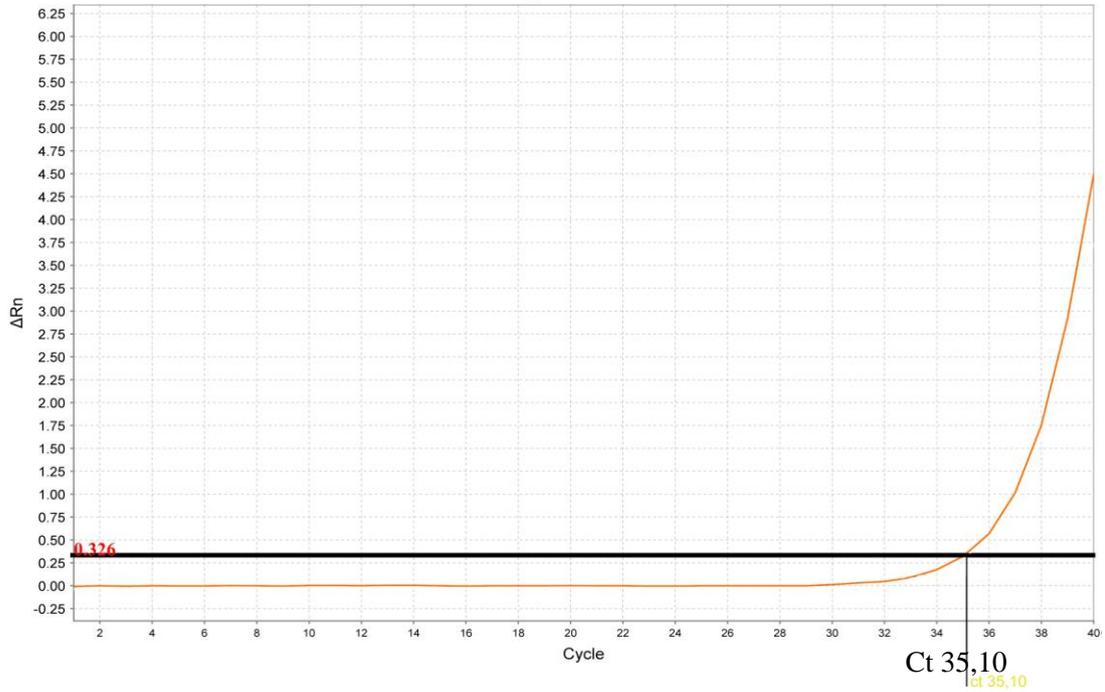


Figura 42: Curva di amplificazione del campione prelevato al momento dell'ammissione del caso n°7 e relativo Ct.

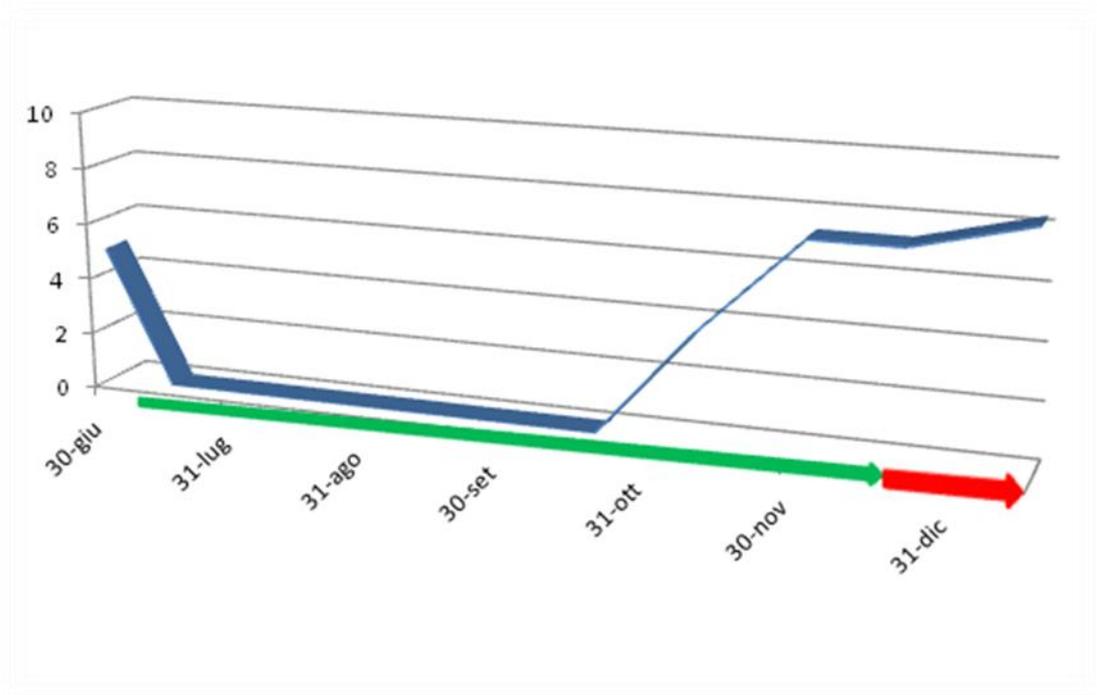


Figura 43: Monitoraggio della MRM durante il decorso clinico del caso n°7. In ascissa è rappresentato il periodo in cui il paziente è stato sottoposto a terapia antitumorale; la freccia in verde rappresenta il periodo in cui il soggetto ha presentato remissione completa della sintomatologia, mentre la freccia rossa indica il periodo in cui il soggetto ha presentato recidiva clinica.

Il cane ha conseguito una buona risposta clinica con remissione completa evidente per tutto il periodo in cui è stato sottoposto a chemioterapia. 20 giorni dopo l'ultima seduta chemioterapica effettuata durante il periodo di induzione, il saggio RQ-PCR ha mostrato positività per la MRM. Il saggio RQ-PCR ha anticipato la recidiva di circa 40 gg.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di quantificare i livelli di elementi neoplastici residui (malattia residua minima) nel sangue periferico di cani affetti da linfoma in remissione completa della sintomatologia, mediante ricerca dei riarrangiamenti genici clonali delle immunoglobuline e utilizzando hairpin-primers clone specifici in RQ-PCR. I protocolli terapeutici attuali impiegati per il linfoma canino si basano solo in parte su fattori prognostici che contribuiscono alla stratificazione terapeutica (stadio e substadio della classificazione WHO, immunofenotipo). Tali parametri distinguono in maniera ampiamente differenziata i pazienti esposti a rischio di recidiva ed è pertanto presente, come in medicina umana, anche in medicina veterinaria, l'esigenza di affinare la stratificazione del rischio per individuare in modo più affidabile i pazienti che possono trarre il massimo vantaggio da una intensificazione terapeutica. La possibilità di evidenziare riarrangiamenti genici clonali residui mediante RQ-PCR e di monitorare così la MRM nei soggetti in remissione consentirebbe di formulare un giudizio prognostico adeguato e, modulando il piano chemioterapico, di incrementare il periodo libero da malattia e migliorarne la sopravvivenza.

La ricerca mediante PCR dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici permette di individuare 1 cellula neoplastica tra 10^4 - 10^6 cellule normali (Szczepanski et al., 2002; Braziel et al., 2003; Cazzaniga e Biondi, 2005; Arons et al., 2006). Il più importante e principale obiettivo utile ad ottenere un metodo sensibile e accurato di individuazione della MRM, utilizzando i riarrangiamenti genici clonali come marker tumorali, è la capacità di distinguere il pattern di ricombinazione genica caratteristico del clone neoplastico da quello delle cellule linfoidi normali o reattive presenti nel campione. Quest'ultime possono presentare sequenze geniche altamente

omologhe con la sequenza target e indurre la comparsa di risultati falsi positivi, con conseguente rpercussione sul management clinico del paziente. Sono state descritte diverse tecniche che hanno previsto l'utilizzo di primers o sonde clone-specifiche. Poiché ogni saggio è paziente-specifico il disegno deve essere abbastanza flessibile per ridurre gli step di validazione e i costi totali. Nel presente studio sono stati utilizzati primers forward disegnati su sequenze germinali ipervariabili del gene IgH (CDRII) e primers reverse disegnati su sequenze giunzionali del riarrangiamento genico VDJ (CDRIII) del gene IgH dei 7 cani affetti da linfoma. Inoltre è stato ottimizzato il processo di costruzione e validata l'accuratezza di primers clone-specifici ad hairpin.

RQ-PCR

Sebbene la persistenza di cellule neoplastiche residue durante la terapia sia associata ad una cattiva prognosi, alcune evidenze hanno dimostrato che la presenza di MRM dopo la terapia può essere compatibile con lunghe sopravvivenze e che l'assenza di MRM individuabile può non garantire la guarigione completa. Queste considerazioni riflettono gli studi che sono stati effettuati su grande scala in medicina umana, allo scopo di standardizzare i tempi e i modi di rilevamento della MRM e che hanno permesso di dimostrare come la cinetica e la valutazione quantitativa della MRM abbiano maggiore significato prognostico rispetto alla sua presenza/assenza. La RQ-PCR permette una valutazione quantitativa del clone neoplastico residuo e consente di monitorarne le oscillazioni, durante il follow-up della malattia.

Oltre ad una valutazione quantitativa della MRM è possibile tramite RQ-PCR raggiungere un livello di sensibilità paragonabile al metodo di nested PCR, riducendo al contempo la comparsa di risultati falsi positivi dovuti a contaminazioni e falsi negativi indotti dai limiti interpretativi della visualizzazione dei prodotti su gel. Nella PCR convenzionale, per l'interpretazione del risultato qualitativo finale, è necessaria una lettura visiva della banda del prodotto amplificato nel gel e, pertanto, si verifica una

valutazione soggettiva del risultato positivo. Nella RQ-PCR il risultato viene, viceversa espresso quantitativamente in modo oggettivo. Inoltre poiché nella RQ-PCR la rilevazione avviene durante i cicli di amplificazione, l'iter analitico si presenta notevolmente ridotto e non prevedendo ulteriori manipolazioni dei prodotti al termine del processo amplificativo, questo sistema di analisi riduce notevolmente i rischi di contaminazione, che possono essere ulteriore fonte di dubbi interpretativi del risultato nei sistemi di PCR convenzionale e in particolare nelle metodiche di nested-PCR.

Hairpin-primers (primers a forcina)

In questo studio abbiamo riportato l'utilizzo di hairpin-primers clone-specifici per la valutazione della MRM, mediante ricerca dei riarrangiamenti genici clonali delle Ig e metodica di RQ-PCR. Hazbon e Allan (2004) hanno dimostrato che l'aggiunta, in corrispondenza dell'estremità 5', di una sequenza nucleotidica complementare all'estremità 3' tale da indurre una configurazione a forcina del primer migliorasse il potenziale discriminatorio degli oligonucleotidi allele-specifici per le metodiche di genotipizzazione basate sul polimorfismo a singolo nucleotide (SNPs) ed in misura maggiore rispetto all'aggiunta all'estremità 5' di una sequenza generica di nucleotidi. In questo studio è stato dimostrato che la struttura secondaria a forcina dei primers clone-specifici permette una efficiente, sensibile e specifica amplificazione PCR per la valutazione della MRM. Attraverso l'analisi della curva di melting (o curva di dissociazione) e gli esperimenti condotti allo scopo di valutare i differenti effetti indotti dalla lunghezza della sequenza nucleotidica aggiunta agli hairpin-primers, è stato dimostrato che è possibile utilizzare primers con una entalpia tra -4 e -8 Kcal/mol causata dall'aggiunta di 5-8 nucleotidi. Ad una entalpia superiore (-8.5 Kcal/mol), indotta dall'aggiunta di un numero più elevato di nucleotidi, l'eccessiva stabilità della struttura secondaria degli hairpin-primers, limita la possibilità di annealing del primer stesso sul target. In seguito all'ibridazione sulla sequenza target, la sequenza nucleotidica aggiunta in corrispondenza dell'estremità 5' viene inclusa nel successivo

ciclo PCR. La melting temperature della risultante doppia catena aumenta ad ogni ciclo favorendo l'annealing degli hairpin-primers.

Nei controlli negativi bianchi o con assenza di DNA è stata frequentemente osservata la comparsa di dimeri di primers, identificati comunque, al termine di ogni ciclo PCR, tramite l'analisi della curva di melting. In alcuni casi, le amplificazioni aspecifiche hanno indotto un incremento della fluorescenza, ostacolando un'accurata valutazione quantitativa in campioni contenenti un basso numero di copie del target. Per questa ragione e per la bassa riproducibilità, non è stato possibile, quantificare campioni contenenti meno di 8-40 copie per reazione. Pur non presentando evidenti implicazioni sul management clinico del paziente, ciò costituisce un limite della metodica. Analogamente a questo studio, altre metodiche sono risultate scarsamente riproducibili nella quantificazione di campioni contenenti poche copie del target (van der Velden et al., 2007). La maggiore lunghezza della sequenza nucleotidica degli hairpin-primers rispetto ai rispettivi primers lineari può indurre la formazione di dimeri di primers più lunghi e di conseguenza la rilevazione di una fluorescenza maggiore. Nel saggio RQ-PCR mediante hairpin-primers, la formazione dei dimeri è stata osservata meno frequentemente rispetto al saggio RQ-PCR utilizzando primers lineari.

Attraverso l'analisi della curva di dissociazione delle reazioni PCR in cui gli hairpin-primers sono stati utilizzati a concentrazioni differenti, è stato possibile dimostrare che tra i primers reverse e forward non si verifica una significativa interazione e che i dimeri indotti dagli hairpin-primers sono causati soprattutto dalla amplificazione di prodotti aspecifici (cross-dimeri).

Il saggio RQ-PCR mediante hairpin-primers presenta diversi vantaggi rispetto ad altre tecniche RQ-PCR di valutazione della MRM. Rispetto alla metodica mediante primers lineari, il saggio RQ-PCR si è dimostrato adeguatamente sensibile, specifico e accurato, richiedendo pochi step di validazione e l'impiego del SYBR Green al posto di costose sonde fluorescenti. Il SYBR Green si lega indiscriminatamente ad ogni doppio filamento; tuttavia la specificità della reazione è stata determinata tramite l'analisi della curva di

melting effettuata al termine di ogni ciclo di amplificazione. Mediante l'impiego di hairpin-primers è possibile ottenere una PCR efficiente anche a temperature di annealing superiore alla T_m del primer stesso. Diversamente in alcuni casi, i primers lineari sono risultati specifici a temperature di annealing, viceversa responsabili di una marcata riduzione della sensibilità. Il saggio RQ-PCR mediante hairpin-primers allele-specifici si è dimostrato adeguatamente sensibile e specifico, richiedendo pochi step di validazione e una riduzione dei costi totali dovuti all'impiego del SYBR Green al posto di costose sonde fluorescenti.

METODICA aQRT-PCR

In questo studio è stata utilizzata una metodica definita *Antiprimer Quenching-Based Real-Time PCR* (aQRT-PCR). Questa tecnica è stata applicata sul DNA estratto dai campioni follow-up, utilizzando primers consenso ottenuti da bibliografia (Gentilini et al., 2008) e costruiti sulla FRI della regione variabile di IgH (primer forward) e sul segmento genico J (primer reverse); tale saggio è stato quindi messo a punto solo per identificare la presenza di riarrangiamenti genici IgH.

Tramite la metodica aQRT-PCR è stato possibile valutare l'adeguatezza di estrazione del DNA, quantificare in maniera relativa (tramite i valori di Ct) la presenza nel campione di cellule linfoidi B (sia monoclonali che policlonali) e normalizzare i dati quantitativi ottenuti da sangue periferico.

Scelta della matrice

La scelta di effettuare la ricerca della malattia residua minima da sangue periferico è stata dettata dalla necessità di standardizzare l'estrazione del DNA, consentendo di sottoporre ad indagini molecolari quantità paragonabili di DNA di uno stesso soggetto. Vari studi hanno dimostrato la presenza di una alta positività PCR, nel sangue periferico di cani affetti da linfoma, senza segni clinici di coinvolgimento midollare (Keller et al.,

2004; Lana et al., 2006). Il sangue periferico rappresenta una matrice più semplice da campionare e di più facile standardizzazione rispetto al tessuto linfonodale. Per la presenza di linfonodi di dimensioni normali, il campionamento bioptico nei soggetti in remissione risulta infatti estremamente difficoltoso (Calzolari et al., 2006). Nello studio di Yamazaki e collaboratori (2008), la valutazione della MRM è stata effettuata sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), ipotizzando che la rimozione della componente neutrofilica in seguito a centrifugazione potesse incrementare la sensibilità della metodica. Nel medesimo studio è stato in seguito affermato che un miglioramento della tecnica potesse essere indotta tramite l'impiego di sangue intero dopo lisi degli eritrociti, in quanto la centrifugazione in gradiente di densità dei campioni di sangue periferico poteva non garantire la completa rimozione delle cellule neutrofiliche e al contempo determinare la perdita di cellule tumorali linfoidi, determinando un risultato non accurato.

In questo studio, per la valutazione della MRM mediante RQ-PCR durante il follow-up clinico dei soggetti trattati sono stati utilizzati i campioni di sangue intero congelato prelevati prima del trattamento chemioterapico dei pazienti. Alcuni campioni ematici, prima di essere congelati, sono stati trattati allo scopo di ottenere dei pellet cellulari di globuli bianchi visivamente privi di emoglobina. Ciò è stato effettuato allo scopo di valutare se i pellet cellulari ottenuti da sangue fresco potessero rappresentare matrici più sensibili e accurate rispetto al sangue congelato. Nel nostro studio solo per un campione è stata osservata positività al saggio RQ-PCR da pellet cellulare e negatività su sangue congelato. I risultati ottenuti in questo studio evidenziano l'utilità della RQ-PCR su sangue congelato e la possibilità di utilizzare questa matrice anche per studi retrospettivi; i risultati relativi alla valutazione della MRM su pellet cellulare pongono la necessità di un ampliamento della casistica. Il pellet cellulare potrebbe infatti rappresentare una matrice più sensibile per la valutazione della MRM.

Monitoraggio MRM

Sebbene la casistica sia limitata e le conclusioni non possano assumere validità generale, dai casi presentati sembra configurarsi una notevole utilità del saggio RQ-PCR per il monitoraggio della malattia residua minima da sangue periferico. Ad eccezione di due casi, la positività al saggio ha sempre anticipato la recidiva clinica e nel caso n°6 non è stato possibile determinarlo, in quanto il follow-up clinico del soggetto è stato concluso prima della comparsa della recidiva. In due soggetti il saggio RQ-PCR ha evidenziato la presenza di malattia residua minima da sangue periferico, 3-4 mesi prima della recidiva clinicamente manifesta. Nel caso n°7 la metodica ha anticipato la recidiva di circa 40 giorni, mentre nel caso n°2 di circa 9 giorni. Nel caso n°4 la positività al saggio RQ-PCR ha confermato il decorso clinico, senza tuttavia anticipare la comparsa della recidiva.

In nessun caso è stata osservata la comparsa di una recidiva clinica prima che il saggio RQ-PCR mostrasse una positività. Una causa di negatività al saggio RQ-PCR può essere infatti legata alla instabilità dei markers utilizzati. La stabilità dei markers durante il corso della malattia non è assoluta e i markers iniziali possono essere assenti nei cloni responsabili della recidiva. Questa instabilità può essere legata al fatto che il marker identificato al momento della diagnosi, è presente solo su un subclone neoplastico, che potrebbe non essere responsabile della recidiva (Cavè et al.,1999). Questo fenomeno viene chiamato “oligoclonalità”, ed è stato identificato anche in medicina veterinaria (Avery e Avery, 2004; Calzolari et al., 2006).

Un'altra possibilità è che il marker clonale possa essere invece, modificato da un secondo riarrangiamento genico (evoluzione clonale)(Cavè, 2003). Il trattamento chemioterapico può comportare la selezione di cloni nuovi maggiormente chemioresistenti (ad esempio cloni T), i cui riarrangiamenti non sono identificabili

mediante i primers utilizzati (Calzolari et al., 2006). In medicina umana, per evitare la comparsa di risultati falsi negativi nella valutazione della MRM dovuti alla instabilità dei marker clonali durante il corso della malattia, vengono sempre monitorati per ciascun paziente, al momento della diagnosi e durante il follow-up almeno due differenti riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici coinvolgenti i differenti locus genici (Szczepanski et al., 2002), con sequenziamento e gene-scanning dei prodotti alla diagnosi e alla recidiva (Farina, 2009). Nel caso n°1, ad eccezione di un breve periodo, il saggio RQ-PCR ha rivelato in quasi tutto il decorso la presenza di malattia residua minima; tuttavia il soggetto è deceduto in remissione clinica per cause non correlate al linfoma. Come descritto in medicina umana, la persistenza di MRM dopo il trattamento chemioterapico può essere compatibile con lunghe sopravvivenze. Studi futuri in medicina veterinaria, potranno essere condotti allo scopo di standardizzare i tempi ed i modi di rilevamento della MRM per stabilirne le reali implicazioni prognostiche. Inoltre, l'applicazione prospettiva in gruppi caso-controllo potrà chiarire se la modulazione della terapia sulla base dei risultati del saggio RQ-PCR può avere un effetto sul decorso, in termini di prolungamento della remissione clinica, aumento del tempo di sopravvivenza e riduzione del dosaggio di antitumorale utilizzato a parità di efficacia clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. **Arons E, Margulies I, Sorbara L, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Pastan I, Kreitman RJ.** Minimal Residual Disease in Hairy Cell Leukemia Patients Assessed by Clone-Specific Polymerase Chain Reaction. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(9): 2804-2811.
2. **Arun SS, Breuer W, Hermanns W.** Immunohistochemical examination of light-chain expression (Lambda/Kappa ratio) in canine, feline, equine, bovine and porcine plasma cells. *Zentralblatt fur Veterinar medizin. Reihe A*. 1996; 43(9): 573-576.
3. **Avery PR, Avery AC.** Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their compotance in transitional neoplastic states. *Veterinary clinical pathology*. 2004; 33(4): 196-207.
4. **Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJM.** Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21: 18-29.
5. **Biondi A, Valsecchi M.G, Seriu T, D'Aniello E, Willemse M.J, Faschino K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps W.A, Bartram C.R, van Dongen J.J, Panzer-Grumayer E.R.** Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*. 2000; 14(11): 1939-1943.

6. **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.
7. **Braziel RM, Shipp MA, Feldman AL, Espina V, Winters M, Jaffe ES, Petricoin EF 3rd, Liotta LA.** Molecular diagnostics. *Hematology*. 2003; 1:279-293.
8. **Brisco MJ, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Bradstock K, Enno A, Szer J, McCaul K, Morley AA.** Relationship Between Minimal Residual Disease and Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 1996; 87(12): 5251-5256.
9. **Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, Dolman G, Peng LM, Toogood IRG, Cheney K, Rice MS, Story CJ, Morley AA.** Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001; 15:385-390.
10. **Brüggemann M, Droese J, Bolz I, Lüth P, Pott C, von Neuhoff N, Scheuring 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.
11. **Brüggemann M, Pott C, Ritgen M, Kneba M.** Significance of minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Haematologica*. 2004; 112(1-2): 111-119.

12. **Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, Luschen S, Pott C, Ritgen M, Schering U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR, Kneba M.** Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 1116-1123.
13. **Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC.** Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Veterinary Pathology*. 2003; 40: 32-41.
14. **Busch K, Borkharrdt A, Wobmann W, Reiter A, Harbott J.** Combined polymerase chain reaction methods to detect *c-myc/IgH* rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica*. 2004; 89: 818-825.
15. **Calzolari C, Gentilini F, Agnoli C, Zannoni A, Peli A, Cinotti S, Famigli-Bergamini P.** PCR Assessment of Minimal Residual Disease in 8 Lymphoma-Affected Dogs. *Veterinary Research Communications* . 2006; 30 (Suppl.1): 285-288.
16. **Cavé H.** Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. In: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 1999.
17. **Cavé H, Guidal C, Rohrlich P, Delfau MH, Broyart A, Lescoeur B, Rahimy C, Fenneteau O, Monplaisir N, d'Auriol L, Elion J, Vilmer E, Grandchamp B.** Prospective Monitoring and Quantitation of Residual Blasts in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Polimerase Chain Reaction Study of δ and γ T-Cell Receptor Genes. *Blood*. 1994; 83(7): 1892-1902

18. **Cazzaniga G., Biondi A.** Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leucemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*, 90: 382-390, 2005
19. **Dolken G.** Detection of minimal residual disease. *Advances in cancer research*. 2001; 82: 133-185.
20. **Donovan JV, Ladetto M, Zou G, Neuberg D, Poor C, Bowers D, Gribben JG.** Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 2000; 95(8): 2651-2658.
21. **De Paepe P, De Wolf-Peeters C.** Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia*. 2007; 21: 37-43.
22. **Eckert C, Landt O, Taube T, Seeger K, Beyermann B, Proba J, Henze G.** Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000; 14:316-323.
23. **Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M, Seeger K, Biondi A, Cazzaniga G.** 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.

24. **Farina L, Carniti C, Dodero A, Vendramin A, Raganato A, Spina F, Batriarca F, Narni F, Benedetti F, Olivieri A, Corradini P.** Qualitative and quantitative polymerase chain reaction monitoring of minimal residual disease in relapsed chronic lymphocytic leukemia: early assessment can predict long-term outcome after reduced intensity allogeneic transplantation. *Haematologica* . 2009; 94(5): 654-662.

25. **Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schafer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR.** 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.

26. **Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P.** GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008; 127: 47-56.

27. **Gentilini F, Turba ME, Calzolari C, Cinotti S, Forni F, Zannoni A.** Real-time quantitative PCR using hairpin-shaped clone-specific primers for minimal residual disease assessment in an animal model of human non-Hodgkin lymphoma. *Molecular and Cellular Probes*. 2009; 24(1): 1-9

28. **Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, Chan WC.** New approaches in lymphoma diagnosis. *Hematology*. 2001, 194-220.

29. **Hazbón M, Alland D.** Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42:1236-1242.
30. **Jilani I, Keating M, William W, Kantarjian H, O'Brien S, Giles FJ, Albitar M.** Simplified sensitive method for the detection of B-cell clonality in lymphoid malignancies. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2006; 28: 325-331.
31. **Jolkowska J, Derwich K, Dawidowska M.** Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. *Journal of Applied Genetics*. 2007; 48(3): 77-83.
32. **Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW.** Mechanism and control of V(D)J recombination at the Immunoglobulin Heavy chain locus. *Annual Reviews of Immunology*. 2006; 24: 541-547.
33. **Keller RL, Avery AC, Burnett RC, Walton JA, Olver CS.** Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(3): 145-149, 2004
34. **Kocjan G.** BEST PRACTICE No 185 Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2005; 58: 561-567.
35. **Lana SE, Jackson TL, Burnett RC, Morley PS, Avery AC.** Utility of Polymerase Chain Reaction for Analysis of Antigen Receptor Rearrangement in Staging and Predicting Prognosis in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20: 329-334.

36. **Lewin B.** La diversità immunitaria. In Lewin B, *Il Gene VIII*. Bologna, Zanichelli Editore. 2006: 782-817.
37. **Li J, Makrigiorgos GM.** Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping. *Nature Protocols*. 2007; 2: 50-58.
38. **Li J, Wang F, Mamon H, Kulke MH, Harris L, Maher E, Wang L, Makrigiorgos GM.** Antiprimer Quenching-Based Real-Time PCR and Its Application to the Analysis of Clinical Cancer Samples. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4): 624-633
39. **Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T.** The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188(11): 2151-2162.
40. **Mayer SP, Giamelli J, Sandoval C, Roach AS, Ozkaynak MF, Tugal O, Rovera G, Jayabose S.** Quantitation of leukemia clone-specific antigen gene rearrangements by single-step PCR and fluorescence-based detection method. *Leukemia*. 1999; 13: 1843-1852.
41. **Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T.** The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188(11): 2151-2162.

42. **Medeiros LJ, Carr J.** Overview of the Role of Molecular Methods in the Diagnosis of Malignant Lymphoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 1998; 123(12): 1189-1207.
43. **Modiano JF.** Immunoglobulins. In Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. S.Louis, Mosby. 2000: 904-909.
44. **Morrison S, Neuberger MS.** Antigen recognition by B-cell and T-cell receptor. In Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomichik M. *Immunobiology*. New York, Garland Publishing. 2001
45. **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 Research*. 2000; 60:3281-3289.
46. **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.
47. **Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N, Wesenberg F, Jonsson OG, Forestier E, Schmiegelow K.** 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.
48. **Paietta E.** Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept?. *Bone Marrow Transplantation*. 2002; 29: 459-465.

49. **Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJ.** 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.

50. **Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel GF, van Dongen JJ.** 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.

51. **Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, Neuberg D, Maddoks A, Corradini P, Soiffer R, Ritz J, Nadler LM, Gribben JG.** Eradication of Polymerase Chain Reaction-Detectable Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With Improved Outcome After Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1996; 88(6): 2228-2235.

52. **Ramasamy I, Brisco M, Morley A.** Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *Journal of Clinical Pathology*. 1992; 45: 770-775.

53. **Rasmussen T, Poulsen TS, Honoré L, Johnsen HE.** Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Experimental Hematology*. 2000; 28:1039-1045.

54. **Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ.** Molecular diagnosis of B- and T- cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clinical chemistry.* 1997; 43(10): 1814-1823.
55. **Richards MH, Nelson JL.** The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution.* 2000; 17(1): 146-155.
56. **Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJM.** Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood.* 2002; 99(7): 2315-2323.
57. **Tamura K, Yagihara H, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M.** Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2006; 110: 163-167.
58. **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. *International Journal of Hematology.* 2002; 75:166-173.
59. **Theodorou I, Bigorgne C, Delfau MH, Lahet C, Cochet G, Vidaud M, Raphael M, Gaurland P, Farcet JP.** VJ Rearrangements of the TCR γ Locus in peripheral T-cell Lymphomas: analysis by Polymerase Chain Reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Pathology.* 1996; 178: 303-310.

60. **Thomas R, Smith KC, Ostrander EA, Galibert F, Breen M.** Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 1530-1537
61. **Uchiyama M, Maesawa C, Yashima A, Tarusawa M, Satoh T, Ishida Y, Ito S, Murai K, Enomoto S, Utsugisawa T, Moroyoshi K, Masuda T.** Development of consensus fluorogenically labeled probes of the immunoglobulin heavy-chain gene for detecting minimal residual disease in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Sciences*. 2003; 94(10): 877-885.
62. **Uchiyama M, Maesawa C, Yashima-Abo A, Tarusawa M, Satoh M, Satoh T, Ishida Y, Ito S, Murai K, Enomoto S, Utsugisawa T, Masuda T.** 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. *Laboratory Investigation*. 2004; 84: 932-936.
63. **Wilson IA, Cresswell P, Davis MM, Allen PM, Trowsdale J.** The generation of lymphocyte antigen receptors. In Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M, *Immunobiology*. New York, Garland Publishing, 2001.
64. **Wilson IA, Cresswell P, Davis MM, Allen PM, Trowsdale J, Nolte I.** Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. *Anticancer Research*. 2005; 25(6b): 3995-3998.

65. **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.
66. **van der Velden VH, Boeckx N, van Wering ER, van Dongen JJ.** Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2004; 18:146-154.
67. **van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cavé H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Shoot CE, van Dongen JJ.** Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007; 21:604-611.
68. **van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuring E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA.** 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*. 2003; 12: 2257-2317.
69. **Vernau W, Moore PF.** An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999; 69: 145-164.

70. **Vernau W.** Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes in the Diagnosis of Lymphoid Neoplasia. In: *Atti del 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)*, 13 Novembre 2004.
71. **Yamazaki J, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H.** Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2008; 126 (3-4): 321-331.
72. **Yagihara H, Tamura K, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M.** Genomic organization of the T-cell receptor γ gene and PCR detection of its clonal rearrangements in canine T-cell lymphoma/leukaemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115: 375-382, 2007.

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 dei capitoli 1, 2 e 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

Li, 31 marzo 2010

Io sottoscritto, Dott. Fabio Gentilini in qualità di autore della Tesi di Dottorato “Il cane come modello animale spontaneo di patologie neoplastiche dell’uomo: gene ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*) nella predisposizione al cancro ed importanza dei riarrangimenti genici dei geni Ig/TCR per la diagnosi e prognosi delle malattie linfoproliferative”, Dottorato di ricerca in “Biotecnologie cellulari e molecolari” ciclo XXI depositata presso AMS Tesi di Dottorato dell’Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Autorizzo

la Dott.ssa Camilla Cammelli ad utilizzare parte della mia Tesi di Dottorato per la stesura della propria Tesi di Dottorato

In fede

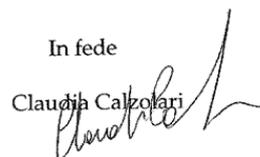
 Fabio Gentilini

Li, 31 marzo 2010

Io sottoscritta, Dott.ssa Claudia Calzolari in qualità di autrice della Tesi di Dottorato “Diagnosi e prognosi molecolare del 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

la Dott.ssa Camilla Cammelli ad utilizzare parte della mia Tesi di Dottorato per la stesura della propria Tesi di Dottorato

In fede

 Claudia Calzolari