

Università degli Studi di Bologna

**Dottorato di Ricerca in
Scienze Morfologiche Umane e Molecolari
XIX ciclo**

Coordinatore: Prof. Lucio Cocco

Sede Amministrativa: Università degli studi di Bologna

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/16 ANATOMIA UMANA

**TROMBOCITOPENIA CON ASSENZA DEL RADIO
(SINDROME TAR):
VERIFICA FUNZIONALE DI DUE MUTAZIONI NELLA
REGIONE DEL PROMOTORE DEL TGF β 2
E STUDIO DELLE
CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

Tesi di Dottorato

Presentata da:

Dott.ssa Cosetta Marchionni

Relatore:

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

1.INTRODUZIONE	1
1.1 Sindrome TAR: Aspetti Fisiopatologici	1
1.1.1 Anomalie Ematologiche.....	2
1.1.2 Anomalie Scheletriche.....	3
1.1.3 Anomalie Cardiache.....	4
1.1.4 Altre anomalie.....	5
1.2 Storia Naturale	6
1.3 Ereditarietà	7
1.4 Embriogenesi	10
1.5 Prospettive terapeutiche	11
1.6 Malattie Genetiche	15
1.6.1 Malattie mendeliane.....	16
1.6.2 Malattie multifattoriali.....	17
1.6.3 Malattie genetiche rare.....	17
1.6.4 Diagnosi delle malattie genetiche.....	18
1.7 La Superfamiglia dei TGFβ	19
1.7.1 La Superfamiglia dei TGF β	19
1.7.2 Cos'è il TGF β e quale è la sua funzione biologica.....	20
1.7.3 Recettori e traduzione del segnale.....	21
1.7.4 Ruolo del TGF β nella formazione delle ossa.....	22
1.8 Perché proprio il TGFβ2	23
1.8.1 Topi knockout per il TGF β 2: difetti multipli nello sviluppo.....	23
1.8.2 Associazione genetica (Linkage).....	25
1.9 Cellule Staminali Mesenchimali (MSC)	28
1.9.1 Plasticità delle cellule staminali mesenchimali.....	31
2. SCOPO	34
3. MATERIALI E METODI	35
3.1 Analisi molecolare del gene codificante il TGFβ2 mediante PCR e sequenziamento automatico	35
3.1.1 I pazienti.....	35
3.1.2 Progettazione dei primers.....	35
3.1.3 PCR.....	37
3.1.4 Cycle sequencing e precipitazione dei prodotti.....	39
3.1.5 Sequenziamento automatico.....	40
3.2 Clonaggio	42
3.2.1 Vettore con il frammento di DNA Wild-type/Mutato.....	42
3.2.2 Vettore con Green Fluorescent Protein (GFP).....	44
3.2.3 Amplificazione del DNA.....	46
3.2.4 Digestione.....	48

3.2.5 Ligazione.....	49
3.2.6 Preparazione dei ceppi batterici.....	50
3.2.7 Trasformazione di batteri competenti e purificazione del DNA plasmidico.....	51
3.3 Saggio delle linee cellulari compatibili con l'approccio sperimentale.....	54
3.3.1 Analisi bioinformatica sui fattori di trascrizione che si legano alla sequenza.....	54
3.3.2 RT-PCR.....	54
3.4 Trasfezione di linee cellulari.....	58
3.4.1 Coltura delle linee cellulari.....	58
3.4.2 Trasfezione e risemina nelle piastre schermate.....	58
3.5 Rilevazione del segnale.....	60
3.5.1 Reported-based Assays.....	60
3.5.2 Firefly Luciferasi.....	61
3.5.3 Reagenti utilizzati.....	62
3.5.4 Rilevazione dei segnali in fluorescenza e luminescenza.....	63
3.5.5 Elaborazione dei dati.....	64
3.6 Allestimento di colture primarie di MSC da sangue midollare..	66
3.6.1 Isolamento.....	66
3.6.2 Espansione in coltura.....	67
3.6.3 Caratterizzazione immunofenotipica.....	67
3.6.4 Differenziamento osteogenico in vitro.....	68
4.	
RISULTATI.....	70
4.1 Risultati dell'analisi molecolare del gene del TGFβ2.....	70
4.2 Risultati ottenuti dall'analisi bioinformatica.....	72
4.3 Risultati dell'RT-PCR come saggio di linee cellulari compatibili.....	72
4.4 Risultati ottenuti dalle trasfezioni con GFP+MUT e GFP+WT: normalizzazione dei valori rilevati in luminescenza.....	73
4.5 Risultati dell'isolamento ed espansione di MSC da midollo osseo.....	77
4.6 Risultati della caratterizzazione immunofenotipica.....	78
4.7 Risultati del differenziamento osteogenico.....	79
5. DISCUSSIONE.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	86

1. INTRODUZIONE

1.1. SINDROME TAR: ASPETTI FISIOPATOLOGICI

La sindrome TAR è un'associazione rara (1:350.000 nati) di trombocitopenia ed aplasia bilaterale del radio, descritta per la prima volta nel 1929 [Greenwakt e Shermann, 1929] ma definita come sindrome molto più tardi. Infatti, solo nel 1969 Hall et al. classificarono tale malattia con l'acronimo "Thrombocytopenia with absent radius (TAR)" mediante la pubblicazione di uno studio che raccoglie ben 40 casi (13 nuove segnalazioni aggiunte alla revisione di 27 casi già precedentemente segnalati in letteratura) che rappresenterà il punto di riferimento per tutte le diagnosi successive [Hall et al., 1969]. Nel 1948 fu descritto il primo caso di aplasia congenita dei megacariociti associata a deformità congenite [Hauser, 1948], seguito dalla descrizione di altri 4 pazienti affetti da trombocitopenia congenita ipoplastica con assenza del radio bilateralmente [Gross et al., 1956]. Altri casi vengono segnalati nel 1959 da Show ed Oliver, anno in cui viene ipotizzata una causa genetica del quadro (considerato come una probabile variante dell'anemia di Fanconi). Solo più tardi, nel 1967, Dignan conferma l'esistenza di una sindrome la cui espressione e gravità possono essere molto varie ma comprendono in genere:

- Anomalie ematologiche
- Anomalie scheletriche
- Disfunzioni cardiache

Il fatto che in tale malattia ci sia un'associazione di anomalie comprendenti più sistemi è stato messo in relazione al contemporaneo sviluppo di tali apparati durante la 4^a ed 8^a settimana di gestazione. Inoltre, le somiglianze con la rosolia congenita suggerirebbero una lesione intrauterina durante lo sviluppo di tali sistemi, ma in realtà un agente eziologico non è stato tuttora trovato. La caratteristica che permette, in genere, di fare una diagnosi, oltre alla trombocitopenia ed

all'assenza del radio, risiede nel fatto che tali pazienti presentano il pollice; mentre molte altre sindromi che coinvolgono un'anormalità scheletrica delle braccia mancano di pollice.

Un ulteriore problema, da non sottovalutare, è correlato al fatto che, durante l'infanzia, i pazienti TAR continuano ad avere livelli di piastrine notevolmente bassi che in caso di stress o malattie virali possono diminuire ulteriormente fino a richiedere una trasfusione di piastrine.

1.1.1. Anomalie Ematologiche

Tali problemi ematologici consistono in trombocitopenia congenita o neonatale associata a megacariociti assenti, ridotti in numero o immaturi e precursori mieloidi ed eritroidi apparentemente normali nel midollo osseo. Altre anomalie osservate includono reazioni leucemoidi, eosinofilia ed anemia.

La trombocitopenia si evidenzia in quasi il 90% dei casi entro i primi 4 mesi [Hall et al., 1969] manifestandosi clinicamente come porpora, petecchie, epistassi, melena, emottisi, ematuria ed emorragia intracranica. Dalle anamnesi la trombocitopenia ha carattere episodico e viene precipitata da stress, episodi infettivi, disturbi gastrointestinali od interventi chirurgici.

La conta piastrinica nell'infanzia oscilla usualmente tra 15000 e 30000/mm³ (valori normali: 250000-450000/mm³), scendendo spesso anche al di sotto di 10000/mm³, comunque in genere tende ad aumentare con l'età sino a raggiungere quasi il range di normalità in età adulta [Hall, 1987; 1995].

L'aspirato midollare evidenzia megacariociti assenti (in circa i 2/3 dei casi) o ridotti in numero, piccoli ed immaturi (contenenti scarsi segmenti nucleari e citoplasma vacuolizzato), in assenza di riconoscibile riproduzione piastrinica e talvolta con apparente estrusione di materiale nucleare che risulta maggiormente alterato durante gli episodi di severa

trombocitopenia rispetto ai periodi asintomatici [Fayen et al., 1980; Hall et al., 1969].

Durante il primo anno di vita, nel 60-70% dei pazienti si riscontrano reazioni leucemoidi che consistono nel rilievo di leucocitosi $> 35000/\text{mm}^3$ fino a $141000/\text{mm}^3$ in un caso descritto da Hall et al., soprattutto in concomitanza di stress e/o episodi infettivi, accompagnata spesso da ingrossamento epatico, splenico e linfonodale. Tali reazioni si manifestano prevalentemente al di sotto dei 6 mesi e possono recidivare. Infine è stata descritta anemia in un cospicuo numero di pazienti. Non è chiaro però se questa possa essere interamente correlata alla perdita ematica da sanguinamento secondario alla trombocitopenia o se sia implicata anche una ridotta sopravvivenza eritrocitaria [Hall, 1987; 1995].

Nell'indagine condotta da Hall et al. l'aspirato midollare ha evidenziato un normale numero di precursori eritroidi in tutti i casi eccetto 5 in cui non è stata possibile una valutazione attendibile. Non è stato dimostrato nessun difetto consistente a carico dei globuli rossi circolanti [Hall et al., 1969].

1.1.2. Anomalie scheletriche

L'anomalia scheletrica predominante è rappresentata dall'assenza del radio nel 100% dei casi, tanto che la diagnosi di sindrome TAR non può prescindere dalla completa assenza del radio bilateralmente per essere presa in considerazione. L'esame autoptico degli arti indica che il radio non è mai stato presente, dal momento che i muscoli che dovrebbero inserirvisi prendono invece inserzione sulle ossa carpali [Hall, 1987; 1995].

Le mani non possono considerarsi normali vista la loro deviazione radiale, la limitata estensione delle dita con vari gradi di contrattura e l'ipoplasia delle ossa carpali e falangee. La deviazione radiale delle mani diventa sempre più evidente con l'età e l'anomala inserzione sulle ossa

carpali dei muscoli (normalmente attaccati al radio) devia il polso durante la contrazione.

Anche l'ulna presenta anomalie, mancando bilateralmente in circa il 20% ed unilateralmente nel 10% dei casi, e risulta comunque malformata in tutti i pazienti. L'omero è anormale in almeno il 50% ed assente bilateralmente dal 5 al 10% dei casi (in cui la mano si articola direttamente con la spalla). L'articolazione della spalla può essere anomala in funzione della presenza o meno di una normale testa omerale [Hall, 1987; 1995].

Anomalie agli arti inferiori sono frequenti [Ray et al., 1980; Schoenecker et al., 1984] e possono essere severe. Ad esempio un quadro di tetrafocomelia, caratterizzato da aplasia degli arti inferiori oltre che superiori, è stato documentato in 5 pazienti: queste osservazioni sono importanti per sottolineare come la sindrome possa essere caratterizzata da una espressività clinica estremamente variabile [Anyane-Yeboah et al., 1985; Pfeiffer et al., 1975; Temtamy et al., 1978].

Le coste e la colonna sono spesso coinvolte; infine sono state descritte anche ipoplasia della mandibola e della mascella.

1.1.3. Anomalie cardiache

Sono rappresentate principalmente dalla tetralogia di Fallot e dai difetti del setto atriale, ma è stato riferito anche un caso di destrocardia.

L'insufficienza cardiaca e l'anemia, legata ad un'anomalia cardiaca congenita, sono state causa di morte di alcuni pazienti; oggi però, con la disponibilità di trasfusioni piastriniche, i pazienti vengono sottoposti a qualsiasi intervento chirurgico correttivo quando ne sussista l'indicazione [Hall, 1987; 1995].

1.1.4. Altre anomalie

Sono state segnalate altre anomalie minori che includono: ritardo mentale 8%, basso impianto delle orecchie 5%, micrognatia 3%, anomalie uterine 3%, anomalie urogenitali (comprendenti aplasia unilaterale del rene, trasposizione del pene e dello scroto) 3%, cisti pancreatica, dermatite seborroica (responsabile di sanguinamento cutaneo) ed edema dorsale del piede (forse da anomalia del sistema linfatico).

Il ritardo mentale, in tutti i casi, apparirebbe correlato ad emorragia intracranica ed estraneo ad anomalie strutturali di base del sistema nervoso centrale. Tuttavia è stato segnalato un caso di sindrome TAR con ritardo psicomotorio che, sottoposto a risonanza magnetica nucleare (RMN), ha mostrato ipoplasia del verme cerebellare e del corpo calloso.



Figura 1. Bambino affetto da sindrome TAR.

1.2. STORIA NATURALE

La sopravvivenza dei pazienti affetti da sindrome TAR dipende dalla severità e dalla durata della piastrinopenia, piuttosto che dalle anomalie scheletriche. Il periodo critico è rappresentato dal primo anno di vita poiché in questo periodo si manifestano i più severi episodi di trombocitopenia e di sanguinamento; il 40% dei pazienti decede nella prima infanzia, solitamente per emorragia intracranica [Fayen et al., 1980].

L'allergia e/o l'intolleranza alle proteine del latte vaccino sono relativamente comuni e l'esposizione a tale alimento può precipitare episodi di trombocitopenia, eosinofilia e reazioni leucemoidi. Infatti, nell'epoca precedente all'avvento delle trasfusioni piastriniche, la diarrea associata alla trombocitopenia rappresentava una comune causa di morte. Whitfield et al. nel 1976 documentano i casi di almeno 3 pazienti che, dopo essere stati sottoposti a dieta di eliminazione di latte vaccino, hanno presentato esacerbazione dei problemi ematologici alla reintroduzione dell'alimento.

Durante i primi due anni di vita si possono verificare significativi episodi di sanguinamento che rendono opportuno un attento monitoraggio dei piccoli pazienti. In questo periodo, inoltre, sarebbe saggio evitare eccessivi contatti sociali per limitare il più possibile l'esposizione a varie infezioni virali, in particolare quelle gastrointestinali, che possono precipitare episodi di trombocitopenia e reazioni leucemoidi.

Nonostante le precauzioni, molti bambini affetti da sindrome TAR richiedono più trasfusioni piastriniche, il cui maggior inconveniente è rappresentato dalla comparsa di produzione anticorpale contro gli antigeni piastrinici estranei: questa può essere limitata solo in parte dall'impiego di preparati forniti da un unico donatore. In seguito il numero di piastrine va aumentando gradualmente nel corso dell'infanzia, fino a raggiungere in età adulta un valore pressoché normale per la maggior parte del tempo; i pazienti adulti possono continuare a manifestare tendenza al sanguinamento, ma non sono più soggetti a gravi

emorragie, anche mantenendo una bassa conta piastrinica. Le donne affette dalla sindrome possono presentare menorragia.

Gli interventi chirurgici per la maggior parte dei problemi ortopedici dovrebbero essere differiti ad un'età meno rischiosa dal punto di vista ematologico, mentre rimane imperativa nei primi anni di vita la correzione chirurgica dei difetti cardiaci, affrontata in numerosi pazienti con l'ausilio delle trasfusioni piastriniche.

Può essere comune un certo ritardo motorio imputabile sia alle anomalie della mano e del polso, sia all'accorciamento degli arti inferiori: per tanto sarebbe importante ottenere l'immobilizzazione del polso in posizione centrale mediante stecche per impedire la deviazione radiale della mano e mantenerne la funzione. Infatti, una severa deviazione radiale del polso, o comunque qualsiasi anomalia di relazione anatomica tra nervi e tendini, possono essere causa di compressioni nervose o vascolari (come nel caso riferito da Hall et al. di un paziente che in età adulta ha iniziato ad accusare dolore al braccio accompagnato da deficit di sensibilità dalla mano). Infine nei pazienti più anziani si manifesta artrite a carico del polso e del ginocchio, probabilmente in relazione a trauma delle articolazioni interessate.

Non c'è alcuna evidenza che i pazienti affetti da sindrome TAR presentino una particolare suscettibilità alle infezioni virali [Hall, 1987;1995].

1.3. EREDITARIETÀ

La maggior parte dei bambini affetti da sindrome TAR nasce da parti a termine, non complicati. Non viene riscontrata alcuna anamnesi significativa di esposizione durante la gravidanza a particolari agenti ambientali, farmaci, radiazioni o infezioni note per la determinazione di difetti congeniti. La distribuzione stagionale delle nascite dei bambini affetti e l'appartenenza ad un determinato gruppo etnico non sembrano significative [Hall et al.,1969]. Viene riferita una modesta prevalenza nel

Sesso femminile rispetto al maschile con un rapporto di 7:5. Gli studi cromosomici risultano normali, senza rilievo di rotture o frammenti [Fayen et al., 1980].

Fin dalle prime segnalazioni appare chiara l'implicazione genetica della sindrome, che si manifesta spesso nelle famiglie con eredità autosomica recessiva, comportando per i genitori di un bambino affetto un rischio del 25% di generare un altro figlio affetto dalla stessa sindrome.

Tuttavia è interessante notare che non sembra esservi un aumento d'incidenza di consanguineità nelle famiglie dei pazienti, come ci si dovrebbe attendere per una condizione autosomica recessiva relativamente rara: il primo caso di genitori consanguinei (cugini di primo grado) che hanno generato due fratelli affetti da sindrome TAR risale al 1983 [Teufel, 1983], seguito da un'altra eccezionale segnalazione nel 1992 di fratello e sorella di etnia Maya figli di secondi cugini [Ceballos-Quintal et al., 1992]. Inoltre, la proporzione osservata di fratelli affetti risulta di 1:7, cioè inferiore all'1:4 atteso per un classico carattere recessivo. A tale proposito, Judith G. Hall suggerisce in primo luogo che esistano alleli multipli per il locus della sindrome TAR e che la sindrome non sia in effetti così rara. Ipotizza, inoltre, la simultanea presenza di due mutanti alleli non identici (uno dei quali con una frequenza relativamente alta nella popolazione) che darebbero origine a composti genetici, caratterizzati dall'allele per l'anemia di Fanconi da un lato e da quello per la sindrome di Roberts dall'altro. Altri studi ribadiscono la possibilità che combinazioni di questi potrebbero dare origine alla patologia, mentre altre potrebbero essere responsabili di condizioni fenotipicamente simili come l'anemia di Fanconi o la focomelia di Roberts [Ward et al., 1986].

Per la relativa frequenza del gene, inoltre, la sindrome TAR potrebbe occasionalmente apparire con eredità dominante se un individuo affetto omozigote si unisse ad un portatore del gene (pseudo-dominanza).

La possibilità di trasmissione genitore-figlio, comunque, non è mai stata evidenziata, neppure nell'ampia casistica di Hall et al. (in cui vengono menzionati i casi di due donne affette che unendosi a compagni sani

hanno generato figli normali) finché nel 1986 Ward et al. citano il primo caso documentato in letteratura di trasmissione da madre a figlia.

Appare evidente, quindi, come la sindrome TAR possa facilmente rappresentare un disordine geneticamente complesso o il risultato di un gruppo di alleli correlati, considerando anche l'immediata affinità con la focomelia di Roberts, l'embriopatia da talidomide o alcuni casi di trisomia 18 [Rabinowitz et al., 1967]. Tali quadri si presentano tutti con varie combinazioni di difetti ematologici, cardiovascolari e a carico del radio, lasciando supporre l'esistenza di un dominio di sviluppo politopico o di domini sovrapposti che accomunano lo sviluppo embriologico di cellule del sangue, cuore ed arti (evento che non a caso avviene nel medesimo intervallo di tempo: tra la 4^a e l'8^a settimana di gestazione) [Hall et al., 1969].

Sebbene la maggior parte dei casi sia sporadica ed alcuni siano ereditati con modalità recessiva, alcuni autori sostengono che, se la sindrome TAR risulta dalla combinazione di alleli multipli o da una varietà di anomalie a carico di un definito dominio di sviluppo, si dovrebbe comunque considerare nella consulenza genetica anche la possibilità di un rischio di ricorrenza del 50 % [Ward et al., 1986].

Più cautamente, tuttavia, secondo Judith Hall un singolo caso di trasmissione genitore-figlio, rispetto a numerosi adulti affetti da sindrome TAR che hanno generato prole normale, non sarebbe sufficiente a sostenere tale affermazione [Hall, 1995].

1.4. EMBRIOGENESI

L'esatto meccanismo che durante l'embriogenesi conduce alle multiple anomalie congenite della sindrome TAR non è noto [Hall,1987; 1995],ma l'evidenza che nell'uomo gli arti si formano tra la 4^a e l'8^a settimana di sviluppo embriogenico (le braccia prima delle gambe) contemporaneamente allo sviluppo delle camere del cuore e degli elementi del sangue, suggerisce che il gene responsabile agisca specificamente durante questo intervallo.

Per spiegare gli effetti pleiotropici di un gene mutante che può colpire un sistema solo in un determinato momento dello sviluppo embriologico (difetti del sistema scheletrico e cardiovascolare) e interessarne un altro in modo continuo o intermittente (sistema ematopoietico), Judith Hall ha ipotizzato che una mutazione genica sia responsabile di un cambiamento nella struttura o nella sintesi di una proteina, la cui regolazione si manifesterebbe in modo ed in tempi diversi nei vari sistemi [Hall et al., 1969]; in particolare, tale alterazione potrebbe riguardare determinate citochine, specifici fattori di crescita e/o i relativi recettori.

A causa della presenza di risposte anomale dei globuli bianchi (reazioni leucemoidi ed eosinofile) e della inusuale reazione al latte bovino nei primi anni, sembrano esserci alcune disfunzioni persistenti dei globuli bianchi oltre che dei megacariociti durante i primi anni di vita. Queste anomalie dei globuli bianchi sono perse con l'età. La trombocitopenia migliora e normalmente non è un problema negli adulti TAR. Perciò si ha una condizione che colpisce severamente lo sviluppo degli arti e a volte del cuore durante l'embriogenesi ma che continua ad avere effetti anche nella vita post-uterina [Hall,1987; 1995].

1.5. PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Nei pazienti sintomatici l'assistenza è volta principalmente a risolvere i problemi ematologici, fornendo generalmente un trattamento di supporto. Rimane comunque difficile da stabilire con certezza l'efficacia dei vari tentativi terapeutici, considerata l'estrema variabilità del decorso clinico di questa patologia che può andare incontro anche a miglioramento spontaneo.

Nel primo studio condotto da Hall et al. viene riferito che 6/40 pazienti sono stati sottoposti a splenectomia: soltanto uno ha mostrato un significativo miglioramento; tre di essi hanno manifestato un miglioramento transitorio ed in seguito sono deceduti; gli altri due sono sopravvissuti senza presentare risposta all'intervento. Successivamente è stato segnalato il significativo incremento della conta piastrinica dopo splenectomia in una paziente che aveva un normale numero di megacariociti all'aspirato midollare [Armitage et al., 1978].

Ancora, Hall et al. hanno descritto in 18/40 pazienti la somministrazione di steroidi durante gli episodi di trombocitopenia, risultata di apprezzabile efficacia clinica soltanto in 4 casi; la terapia con testosterone è stata tentata senza beneficio in 2 pazienti; le trasfusioni di sangue e/o piastrine eseguite in 25/40 pazienti non hanno permesso di ottenere risultati duraturi [Hall et al., 1969].

Negli ultimi anni, sono stati individuati ed indicati con il termine generico di citochine numerosi fattori in grado di regolare la proliferazione e la differenziazione di cellule linfoidee ed ematopoietiche. Tra queste IL-6 (Interleuchina-6) ha suscitato particolare interesse clinico, rivelando capacità di stimolo sul sistema ematopoietico, immunitario e sugli epatociti.

IL-6 è una glicoproteina da 26 kDa, prodotta dai linfociti T, monociti, fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti in risposta a svariati stimoli patogeni (infezioni batteriche e virali, traumi, processi infiammatori cronici, malattie autoimmuni). Esplica le sue funzioni pleiotropiche attraverso la mediazione recettoriale di due polipeptidi di membrana,

rappresentati rispettivamente da una molecola legante di 80 kDa e da un trasduttore di segnale non legante di 130 kDa.

L'effetto positivo di IL-6 sull'ematopoiesi è stato descritto per la prima volta nel 1987 da Ikehuchi et al. che hanno osservato l'azione sinergica di IL-3 ed IL-6 nel favorire la proliferazione delle cellule progenitrici multipotenti murine in coltura [Ikehuchi et al., 1987].

Numerosi studi, poi, hanno dimostrato la capacità da parte di IL-6 di indurre in vitro la maturazione dei megacariociti sia murini sia umani, confermata anche da sperimentazioni in vivo eseguite su topi e primati. In particolare, IL-6 ha consentito una ripresa più rapida del numero di piastrine circolanti in animali il cui midollo era stato precedentemente soppresso mediante irradiazione o somministrazione di farmaci chemioterapici [Herodin et al., 1992; Van Allen et al., 1982].

Studi successivi sull'uomo (pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche o soppressione midollare in corso di trattamento antineoplastico) hanno indicato che la citochina agirebbe più come fattore di maturazione ad uno stadio relativamente avanzato, piuttosto che come fattore stimolante le colonie di megacariociti, aumentando nel midollo il volume e la ploidia dei megacariociti presenti, senza incrementarne significativamente il numero. Inoltre, tale ipotesi sarebbe confermata da uno studio giapponese che, indicando nella formazione di fasci di microtubuli citoplasmatici una fondamentale tappa maturativa dello sviluppo megacariocitico, dimostra che IL-6 è in grado di accelerare questo evento [Tajika et al., 1996].

L'individuazione sul cromosoma 7 del gene codificante per IL-6 ha oggi permesso, mediante clonazione del DNA complementare, la produzione e l'ampia disponibilità di rh-IL-6 (recombinant human-IL-6), fornendo il presupposto di eventuali impieghi terapeutici della citochina soprattutto in pazienti con o a rischio di soppressione midollare ed evidenza di trombocitopenia. L'incremento delle piastrine circolanti si manifesta in genere durante la somministrazione di rh-IL-6, raggiungendo i massimi valori una settimana circa dopo la sospensione del trattamento.

Esistono informazioni verbali, comunicate in sede congressuale e non ancora pubblicate, riguardo al tentativo di stimolare l'attività trombocitopoietica midollare nei pazienti affetti da sindrome TAR mediante la somministrazione sperimentale di rh-IL-6. Tre pazienti sono stati sottoposti a tale terapia: in Uruguay un bambino maschio di 8 mesi è stato trattato al regime terapeutico di 5 mcg/Kg/die fino all'età di 1 anno passando da 11000 a 70000 mmc. Nel secondo caso, una bambina statunitense di 23 mesi con costanti valori piastrinici di 5000-10000/mmc ha raggiunto entro 3 settimane di terapia una conta piastrinica di 33000/mmc al dosaggio di 7.5 mcg/Kg/die senza più presentare la necessità di trasfusioni piastriniche. Infine, ancora negli Stati Uniti, un piccolo paziente di 8 settimane trasfusione-dipendente ha raggiunto valori piastrinici di 30000/mmc ricevendo un dosaggio ridotto di 7.5mcg/Kg/die e continua tutt'oggi la terapia con rh-IL-6.

I maggiori effetti collaterali osservati in corso di terapia con rh-IL-6 sono rappresentati da sintomi simil-influenzali: febbre, astenia, brividi, cefalea, vertigini, nausea, vomito, anoressia, ecc., correlabili soprattutto a stimolazione del sistema immunitario (proliferazione, differenziazione e attivazione dei linfociti B e T, stimolazione della secrezione di immunoglobuline) e ad induzione delle proteine della fase acuta nelle cellule epatiche (aumento di proteina C reattiva, fibrinogeno, complemento, alfa2-macroglobulina). Inoltre sia negli studi preclinici che in quelli clinici, durante il trattamento con rh-IL-6, è stata segnalata da più fonti la comparsa di significativa anemia, richiedente in alcuni casi la trasfusione. La rapida insorgenza di questa anemia, una volta esclusa l'emolisi, ha indotto a ricercarne la causa in cambiamenti del volume plasmatico o meccanismi di sequestro splenico. A tale proposito, Atkins e Nieken hanno separatamente dimostrato, mediante dosaggi radioisotopici della diluizione, che l'anemia rh-IL-6-correlata è principalmente dovuta ad emodiluizione secondaria a significativo aumento di volume plasmatico, escludendo il meccanismo di sequestro dei globuli rossi [Atkins et al., 1995; Nieken et al., 1995]. La causa di tale incremento di volume plasmatico resta sconosciuta.

Nel 1994 è stato purificato e clonato un nuovo fattore ematopoietico noto con il nome di Trombopoietina (TPO), citochina considerata da tempo come il maggior regolatore della megacariocitopoiesi e della trombocitopoiesi.

Studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato la sua attività stimolante sulle colonie megacariocitarie, così come la sua funzione di fattore di maturazione megacariocitaria e di regolazione positiva sulla produzione piastrinica in vivo. Il recettore per TPO è risultato essere il prodotto del proto-oncogene c-mpl ed è espresso sull'intera linea megacariocitaria, dallo stadio avanzato di cellula progenitrice fino al prodotto piastrinico. Tale recettore appartiene alla superfamiglia dei recettori per le citochine, con cui condivide il meccanismo di trasduzione del segnale, fondato sulla fosforilazione tirosinica di alcune proteine all'interno di cellule e piastrine.

Uno studio tedesco ha escluso che la patofisiologia della trombocitopenia TAR-correlata sia dovuta a difetto nella produzione di TPO, individuando piuttosto una mancata risposta alla TPO a livello del meccanismo di trasduzione del segnale recettoriale. Infatti, in 5 pazienti affetti da sindrome TAR sono stati evidenziati elevati livelli sierici di TPO ed è stato provato che il relativo recettore c-mpl è normalmente espresso sulla superficie piastrinica con peso molecolare di 86 kD, sovrapponibile a quello espresso sulle piastrine dei controlli sani (4/4); nelle piastrine dei pazienti affetti è stato, invece, possibile rilevare in vitro una mancata risposta a TPO ricombinante, rappresentata da ridotta o assente fosforilazione tirosinica delle proteine piastriniche intracitoplasmatiche. [Ballmaier et al., 1997]

Inoltre, da uno screening mutazionale fatto sul gene per il c-mpl è emerso che mutazioni identificate nell'introne 10 non siano coinvolte nella patogenesi dei difetti della megacariocitopoiesi nei 4 pazienti TAR investigati e si esclude che un recettore anomalo porti ad una risposta inaspettata alla somministrazione clinica di TPO (come invece avviene nel caso delle mutazioni di altri membri della famiglia dei recettori per citochine). [Strippoli et al., 1998].

La trombocitopenia quindi è dovuta ad un difetto nella produzione piastrinica, anche se risultati sperimentali ottenuti nel laboratorio di Ematologia Sperimentale di Bologna mostrano come le CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte) rispondano in vitro alla TPO e crescano in maniera del tutto simile a quella dei soggetti sani (dati non ancora pubblicati). Ciò dimostrerebbe che i progenitori megacariocitari non sono intaccati nella malattia e che il c-mpl è funzionante.

1.6. MALATTIE GENETICHE

Le malattie genetiche sono causate da alterazioni (mutazioni) del patrimonio genetico di un individuo: se le mutazioni interessano le cellule germinali, la malattia si può trasmettere alla prole (malattie ereditarie); se invece la lesione interessa solo le cellule somatiche, la malattia non viene trasmessa alla generazione successiva. Pertanto, la presenza di alterazioni genetiche in cellule somatiche può essere causa di varie patologie, quali ad esempio il cancro (malattia genetica che nella maggior parte dei casi non è ereditaria). Inoltre, una determinata malattia può originare dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali: in tal caso il singolo individuo erediterà la predisposizione ad ammalare, ma la malattia si manifesterà solo per l'intervento di altri fattori non genetici. La probabilità che i figli ereditino una determinata malattia dai genitori dipende dal tipo di difetto e dal modo in cui questo viene trasmesso.

Le malattie genetiche si possono suddividere in:

- *Monogeniche o mendeliane*: dovute all'alterazione di un singolo gene
- *Cromosomiche*: causate dall'alterazione del numero o della struttura dei cromosomi
- *Multifattoriali*: dovute all'interazione fra più geni e l'ambiente.

1.6.1. Malattie mendeliane

Le malattie mendeliane sono causate da mutazioni di singoli geni e trasmesse secondo i principi classici (mendeliani) dell'ereditarietà. Sono malattie importanti nel loro complesso perché molto numerose (se ne conoscono alcune migliaia) e colpiscono complessivamente l'1% dei nati, ma nella maggior parte dei casi le singole malattie sono piuttosto rare (incidenza inferiore a 1:10000 nuovi nati).

Le modalità di trasmissione mendeliana sono tre:

1. Autosomica Dominante: tali mutazioni si manifestano a livello fenotipico anche nei soggetti eterozigoti;
2. Autosomica Recessiva: per manifestarsi a livello fenotipico devono coinvolgere entrambi gli alleli, cioè si manifestano solo negli omozigoti, mentre negli eterozigoti le mutazioni sono silenti;
3. Legata al Cromosoma X.

Una caratteristica di fondamentale importanza, nelle malattie ad ereditarietà autosomica recessiva, è data dall'esistenza di differenti loci non allelici che producono lo stesso fenotipo (eterogeneità genetica). Quando ci si trova di fronte ad un'eterogeneità genetica bisogna identificare sottili differenze fisiologiche e fisiche che possano distinguere l'effetto di locus da quello di altri loci. In questo modo il fenotipo complessivo viene spesso suddiviso in vari sottotipi.

Se per ottenere un risultato biologico sono necessarie numerose tappe sequenziali, ciascuna delle quali è mediata dal prodotto di un differente gene, allora la perdita di una qualsiasi di queste tappe impedisce che si realizzi il risultato finale.

In questo modo, i geni mutanti non allelici che sono coinvolti nella stessa via potrebbero produrre lo stesso fenotipo.

1.6.2. Malattie multifattoriali

La maggior parte dei caratteri umani è determinata dall'intervento di più geni che spesso interagiscono tra loro e con l'ambiente (caratteri multifattoriali). Molti difetti congeniti e malattie dell'adulto sono il risultato dell'interazione tra fattori genetici, spesso multipli, e fattori ambientali e vengono trasmessi secondo modalità diverse da quelle mendeliane classiche.

La distribuzione combinata di questi fattori genetici nelle varie popolazioni e l'esposizione a questi fattori ambientali seguono patterns molto complessi, con una notevole variabilità: per cui il rischio di malattia dei singoli individui, ognuno caratterizzato da una specifica costellazione di caratteristiche genetiche e di esposizione a vari fattori ambientali, segue relazioni di tipo probabilistico molto complesse. Queste relazioni, che determinano il rischio di malattia (alla nascita o in funzione dell'età), sono descritte in maniera poco accurata dai modelli probabilistici oggi utilizzati.

1.6.3. Malattie genetiche rare

La definizione di malattia genetica rara non è uniforme. Tuttavia, generalmente, per malattia rara si intende quella che ha una prevalenza uguale o inferiore a 1:2000 circa. Va però considerato che le malattie rare sono numerose, circa 5000, delle quali almeno il 90% sono malattie genetiche. Per tale motivo, la frequenza complessiva nella popolazione generale italiana può essere significativa. Una diretta conseguenza del loro basso numero di esistenza è correlato alla difficoltà di reperire dati e materiali sui quali lavorare.

1.6.4. Diagnosi delle malattie genetiche

Si basa sull'accurata valutazione clinica e sull'anamnesi familiare che hanno un ruolo primario nel percorso diagnostico. L'esame clinico richiede spesso di essere approfondito e completato con indagini di laboratorio, compresi i test genetici. Infatti, in un numero sempre più elevato di malattie, sono oggi disponibili indagini biochimiche, citogenetiche o molecolari che consentono di definire il difetto genetico e, quindi, di confermare il sospetto clinico, di effettuare la diagnosi in epoca prenatale e di identificare i soggetti a rischio in fase preclinica (o presintomatica).

In particolare, a seconda del tipo di malattia genetica, queste analisi di laboratorio possono includere: indagini biochimiche (dosaggi enzimatici); indagini citogenetiche (analisi dei cromosomi); analisi molecolari (analisi del DNA e dell'RNA).

Molto importanti risultano essere soprattutto le analisi molecolari che utilizzano gli acidi nucleici estratti dalle cellule e impiegano tecniche sofisticate, le quali prevedono l'impiego di particolari enzimi, come enzimi di restrizione, di retrotrascrizione e di amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Esse consentono di definire le basi molecolari di molte malattie, nonché di identificare specifiche sequenze/geni mediante l'uso di sonde molecolari.

1.7. LA SUPERFAMIGLIA DEI TGF β

1.7.1. La superfamiglia dei TGF β

Il TGF β appartiene ad un gruppo di citochine collettivamente chiamate "The TGF β superfamily", i membri della quale regolano la crescita cellulare epiteliale, il differenziamento, la motilità, l'organizzazione, l'apoptosi e la tumorigenesi. Il ruolo della maggior parte di queste citochine è poco caratterizzato, ma per alcuni, come le BMPs (Bone Morphogenic Proteins), i GDF (Growth and Differentiation Factors) e il MIF (Mullerian Inhibitory Factor), è nota la regolazione dello sviluppo di specifici tipi cellulari.

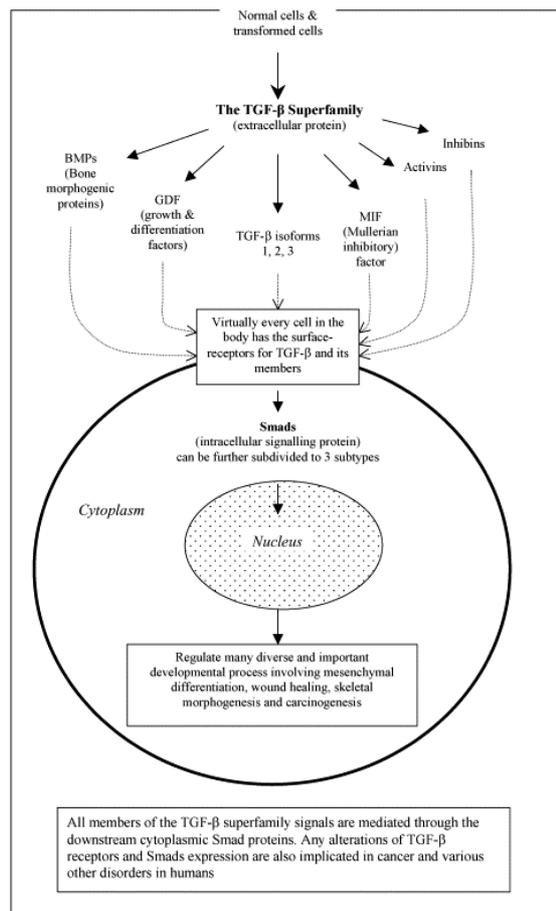


Figura 2. La superfamiglia dei TGF β : nomenclatura e diversità nella funzione cellulare.

Attualmente la superfamiglia comprende almeno 100 distinte proteine con delle sequenze aminoacidiche omologhe, in particolare la C-terminale.

Alcune sono importanti durante le prime fasi dell'embriogenesi, altre controllano la formazione della cartilagine e dell'osso (TGF β e BMPs), degli organi sessuali, inibiscono la crescita epiteliale, o regolano funzioni immunitarie ed endocrine.

1.7.2. Cos'è il TGF β e qual è la sua funzione biologica

Il TGF β è una proteina prevalentemente extracellulare prodotta da un sottotipo di cellule T ed è ubiquitariamente espressa in tutte le cellule. Altre importanti sorgenti di TGF β sono le piastrine, i macrofagi, i granulociti neutrofili, l'osso ed altri tessuti come la placenta, il rene, l'endometrio e molte cellule maligne con effetti autocrini e paracrini.

Nei mammiferi esistono 3 isoforme di TGF β con sequenze aminoacidiche simili. Ogni isoforma deriva da differenti geni e cromosomi: il gene per il TGF β 1 (che è l'isoforma più abbondante) è localizzato sul 19q13 e produce una proteina omodimerica di 25 kDa; il gene per il TGF β 2 sull'1q41; il gene per il TGF β 3 sul 14q24.

Il TGF β ha un effetto regolatorio su un ampio spettro di tipi cellulari. Regola la replicazione cellulare e il differenziamento, la formazione dell'osso, l'angiogenesi, l'emopoiesi, la progressione del ciclo cellulare e la migrazione cellulare con particolare importanza durante lo sviluppo e nei processi riparativi. E' sia stimolatore che inibitore della replicazione cellulare e controlla la produzione di diverse matrici extracellulari. Stimola la sintesi di collagene, fibronectina, proteoglicani, trombospondina etc. Stimola le cellule di derivazione mesenchimale ed inibisce fortemente la proliferazione epiteliale (azione anti-mitogena). Induce l'apoptosi e controlla la morfogenesi modulando la deposizione di matrice extracellulare ed il rimodellamento. E' anche una proteina

neuroprotettrice: stimola la sintesi di NGF (Nerve Growth Factor) in colture di astrociti e in vivo nel cervello nel periodo neonatale; previene la degradazione e la morte di neuroni isolati in coltura.

1.7.3. Recettori e trasduzione del segnale

Virtualmente tutte le cellule hanno dei recettori per il TGF β e sono state descritte nove proteine recettoriali di membrana. Ci sono diverse classi di recettori della superficie cellulare con diversa affinità di legame: i più distribuiti sono i TGF β receptors I e II, rispettivamente di 53 e 70 kDa e la perdita dei recettori I e/o II correla con la perdita della risposta cellulare. Esistono differenze specifiche del tipo cellulare nei sottotipi recettoriali. Tutti i recettori hanno attività serina/treonina intrinseca e talvolta inducono distinte cascate nella trasduzione del segnale.

Nel legare i suoi recettori di superficie il TGF β trasmette il segnale mediante una proteina intracellulare chiamata Smad. Alterazioni o mutazioni nelle proteine Smad o nei recettori di superficie da sole o in combinazione sono inoltre associate a carcinogenesi e altre alterazioni funzionali. La scoperta del coinvolgimento di queste proteine ha consentito di comprendere come molti membri della superfamiglia del TGF β regolano processi di sviluppo come il differenziamento mesenchimale, la morfogenesi scheletrica, la crescita epiteliale, etc. La trasduzione del segnale è piuttosto complessa. Il segnale viene rapidamente trasferito a livello nucleare e si esplica con complessi meccanismi di regolazione genica interagendo con la cromatina e con fattori di trascrizione. Successivamente le Smad vengono degradate nel citoplasma.

1.7.4. Ruolo del TGF β nella formazione delle ossa

La cellule dell'osso sono regolate da fattori sistemici (ormoni) e locali (derivanti dall'osso stesso). Gli effetti ormonali sono ben conosciuti, mentre i fattori di crescita locali dell'osso sono stati identificati e caratterizzati solo negli ultimi 10 anni.

L'osso è la maggiore riserva di fattori di crescita nell'organismo e sono sintetizzati in primo luogo dagli osteoblasti. Il TGF β , come anche le BMPs, gioca un ruolo importante nella formazione dell'osso.

In vivo, la somministrazione locale di TGF β aumenta la formazione ossea e la condrogenesi. Il TGF β , inoltre, altera l'espressione di molti geni correlati direttamente all'attività osteoblastica. Come in molti altri tessuti, il TGF β induce anche la sintesi di varie proteine della matrice, come l'osteopontina e l'osteonectina da parte delle cellule dell'osso.

Il collagene di tipo I costituisce il 90% della matrice organica che si trova nell'osso ed è un elemento essenziale per la calcificazione e struttura ossea. Il TGF β aumenta la sintesi del collagene di tipo I e l'apposizione di matrice contenente collagene nelle colture di cellule isolate dall'osso e nei frammenti ossei come nella osteogenesi.

Attualmente c'è un grande interesse nello sviluppo di applicazioni cliniche delle proteine della superfamiglia dei TGF β per accelerare il riparo osseo, il trattamento della fusione spinale e la rigenerazione ossea nella perdita delle ossa lunghe [Chin et al., 2004].

1.8. PERCHE' PROPRIO IL TGF β 2

1.8.1. Topi knockout per il TGF β 2: difetti multipli nello sviluppo

Studi condotti da L.Philip Sanford et al. nel 1997 hanno rivelato che il TGF β 2 gioca un ruolo fondamentale in molteplici processi di sviluppo, infatti la distruzione mirata del gene TGF β 2 è stata presa in considerazione per dimostrare questo ruolo in vivo.

Topi TGF β 2-null sono soggetti ad una elevata mortalità perinatale e ad un vasto range di difetti nello sviluppo inclusi difetti cardiaci, scheletrici (craniofacciali, arti, colonna vertebrale), agli occhi, all'orecchio interno ed urogenitali. Queste anomalie provocate dalla mancanza del gene per il TGF β 2 durante la gestazione murina sono dimostrazione del ruolo fondamentale svolto da questo fattore di crescita nella trasformazione delle cellule mesenchimali (da cui poi deriveranno numerosi tessuti e l'intero apparato circolatorio) ed avvalorano l'ipotesi che il TGF β 2 sia implicato nella patogenesi della sindrome TAR; ad ulteriore conferma di tutto ciò è la perfetta sovrapposizione del quadro clinico dei topi knockout per il TGF β 2 e quello degli individui affetti da sindrome TAR come mostrato di seguito.

TOPI KNOCKOUT TGF β 2

- Gene TGF β 2: 7 esoni
- Elevata mortalità perinatale
- Difetti cardiaci: aorta, atri, ventricoli, valvole
- Difetti scheletrici: deviazione radiale degli arti anteriori e posteriori, radio ed ulna notevolmente ridotti, coste e colonna vertebrale coinvolte, difetti craniofacciali che comportano ritardo mentale
- Difetti urogenitali

PAZIENTI TAR

- Gene TGF β 2: 7 esoni
- Elevata mortalità nel primo anno di vita
- Difetti cardiaci: setto atriale, tetralogia di Fallot, insufficienza cardiaca
- Difetti scheletrici: assenza bilaterale del radio (raramente tetrafocomelia), deviazione radiale degli arti superiori ed inferiori, coste e colonna vertebrale coinvolte, difetti craniofacciali (mandibola e mascella)
- Difetti urogenitali

1.8.2. Associazione Genetica (Linkage)

Per effettuare questa analisi sono necessari dei marcatori genetici. Questi sono dei caratteri così altamente polimorfici da offrire una ragionevole probabilità che una persona scelta a caso sia eterozigote. Qualsiasi carattere mendeliano e polimorfico può essere usato come marcatore. È meglio che il carattere possa essere individuato facilmente ed a basso costo, utilizzando materiale agevolmente ottenibile (sangue piuttosto che una biopsia cerebrale), ma la cosa più importante è che sia polimorfico. I polimorfismi del DNA hanno fornito per la prima volta un gruppo di marcatori sufficientemente numerosi e distanziati lungo tutto il genoma. Il loro sviluppo ha permesso l'effettivo decollo del mappaggio genetico delle malattie. I marcatori presi in esame da questo studio sono stati i microsatelliti (STR, Short Tandem Repeats) che sono piccoli schieramenti di ripetizioni in tandem che hanno sequenze semplici (1-4bp) e si trovano distribuiti in tutto il genoma, a livello del DNA intergenico o dentro gli introni. Possono essere mononucleotidiche (schiere di A e di T che assieme arrivano a costituire lo 0,3% del genoma nucleare o schiere di G e C che sono invece molto più rare), dinucleotidiche sequenze dell'unità ripetuta CA che costituisce lo 0,5% del genoma e sono spesso altamente polimorfiche; sono diffuse anche le ripetizioni CT/AG, costituenti lo 0,2% del genoma, mentre le ripetizioni CG/GC sono molto rare) e le unità ripetute in tandem di tre e quattro nucleotidi (sono relativamente rare, ma sono spesso altamente polimorfiche e vengono sempre più studiate per individuare marcatori altamente polimorfici).

Oggi i polimorfismi di brevi ripetizioni in tandem (STRP) vengono facilmente valutati mediante PCR e rappresentano lo strumento preferito per gli studi di mappatura.

Se si usa un marcatore polimorfico si possono scegliere delle famiglie per l'analisi di linkage perché presentano la malattia di interesse o perché hanno una buona struttura per il mappaggio, con una ragionevole

speranza che i membri della famiglia non siano tutti omozigoti (e quindi non informativi) per quel marcatore.

Negli studi svolti precedentemente dal nostro laboratorio la casistica presa in esame è costituita da 26 famiglie, 14 delle quali informative (tra le quali una consanguinea, la TAR6), e da 130 individui il cui DNA è stato gentilmente donato dal laboratorio di Oncoematologia Pediatrica dell’Ospedale S.Orsola di Bologna.

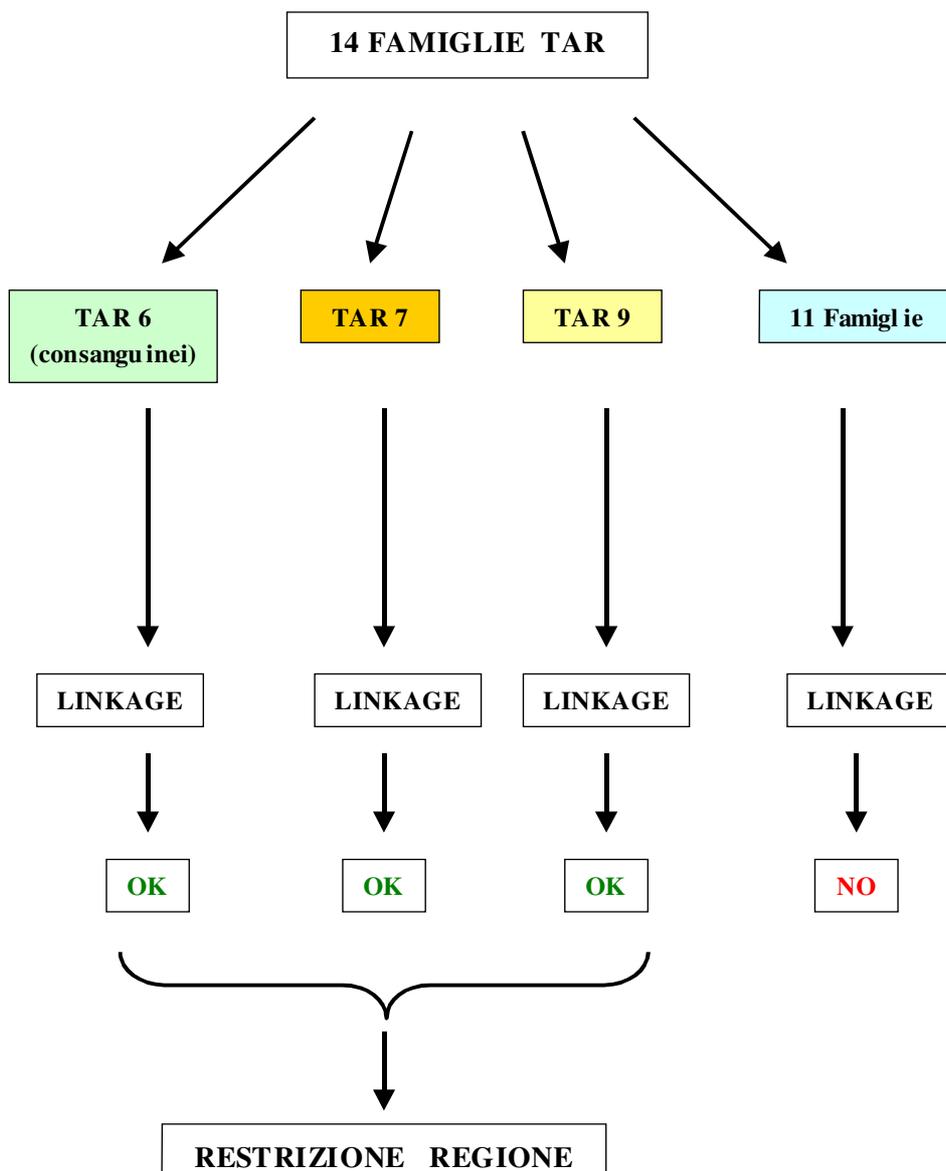


Figura 3. Schema delle 14 famiglie informative prese in esame nello studio.

Grazie a questa analisi di linkage è stato quindi possibile restringere la regione cromosomica candidata a livello del cromosoma 1 nell'area 1q41-42 (dove si trova anche il TGF β 2).

Questo risultato, insieme agli studi sui topi knockout per il TGF β 2 menzionati sopra, ci hanno spinti al sequenziamento automatico del gene.

1.9. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

Nell'ambito dello studio dell'emopoiesi, recenti lavori hanno evidenziato la presenza nel midollo osseo della interessante popolazione di cellule staminali, diversa da quella delle cellule staminali emopoietiche (HSC), localizzata nello stroma. L'interesse dei ricercatori si è così focalizzato non più sul ruolo dello stroma come supporto all'emopoiesi, ma sulle potenzialità delle "nuove" cellule staminali in esso contenute.

Alexander Friedenstein, Maureen Owen e i loro collaboratori sono stati i primi ad utilizzare colture *in vitro* e trapianti in animali da laboratorio per caratterizzare le cellule che costituiscono lo stroma midollare [Friedenstein AJ. et al., 1987]. Essendo lo strato di matrice extracellulare molto sottile, si può facilmente ottenere una sospensione unicellulare di cellule midollari stromali ed emopoietiche con semplice rottura meccanica. Una volta piastrate a bassa densità, le cellule stromali di midollo (BMSCs) aderiscono rapidamente e possono quindi essere separate dalle cellule emopoietiche non aderenti mediante lavaggi ripetuti. Con appropriate condizioni colturali si formeranno distinte colonie, ognuna delle quali derivante da un singolo precursore, che venne inizialmente definito come CFU-F (Colony Forming Unit-Fibroblast) [Bianco P. et al. 2001]

I termini CFU-F o fibroblasti stromali di midollo sono stati per lo più abbandonati e sostituiti attualmente da altri quali cellule stromali midollari, cellule mesenchimali staminali (MSC), cellule progenitrici mesenchimali (MPC); non esiste ancora una nomenclatura univoca, ma tutte le definizioni si riferiscono ad un particolare tipo di cellule aderenti, mononucleate, derivate da midollo, coltivate in un terreno classico supplementato solo con FBS (fetal bovine serum). Tali cellule hanno una morfologia fibroblast-like, con una scarsa quantità di citoplasma, pochi mitocondri ed un apparato del Golgi poco sviluppato; possono essere espanse *ex vivo* e presentano un potenziale differenziativo verso almeno sette tipi cellulari: osteociti, condrociti, adipociti, cellule tendinee,

miotubi, astrociti e stroma di supporto all'emopoiesi [Minguell J. J. et al., 2000].

Mediante il saggio di formazione delle colonie di fibroblasti (CFU-F) è stato possibile stimare le cellule mesenchimali di midollo nel numero di una ogni 10^4 - 10^5 cellule mononucleate. Per verificare l'omogeneità delle colonie sono stati eseguiti dei saggi di differenziamento *in vitro*, i quali hanno evidenziato la presenza di sottopopolazioni nella popolazione stromale mesenchimale, comprendenti cellule con il solo potenziale osteogenico o cellule in grado di differenziare anche in senso adipogenico o condrogenico. L'eterogeneità della popolazione di cellule stromali midollari è stata confermata anche da studi *in vivo* che dimostrano come solo alcune colonie derivino da cellule mesenchimali staminali, mentre le altre originerebbero da precursori più maturi, con un potenziale differenziativo limitato. Si è resa quindi necessaria una caratterizzazione fenotipica che consenta di identificare e isolare le vere cellule staminali mesenchimali [Deans R.J., 2000].

Già nel 1992, grazie agli studi condotti su cellule di fegato fetale, era stata ipotizzata l'esistenza di un precursore comune alla progenie mesenchimale ed emopoietica, caratterizzato come $CD34^+$, $CD38^-$, $HLA\ DR^-$ [Huang S., 1992]. Nel microambiente midollare le cellule stromali producono i fattori di crescita necessari a promuovere l'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali responsive. La maggior parte delle cellule staminali è, in realtà, quiescente (cioè in G_0) e solo una piccola frazione risponde ai messaggi paracrini, differenziando nelle più commissionate $CD34^+$ o nelle cellule mesenchimali staminali [Huss R., 2000].

Il marker $CD34$, identificato come una sialomucina [Simmons D.L., 1992] è espresso nei progenitori emopoietici e nelle cellule endoteliali vascolari ma non si trova sulle cellule mesenchimali staminali espanse *ex vivo*. È possibile che questo antigene sia espresso nelle cellule direttamente isolate dal midollo, ma venga "down regolato" o modificato in una forma che non reagisce con l'anti- $CD34$ a seguito della coltura *in vitro*, oppure che l'antigene sia presente nelle cellule derivate dal fegato

fetale e non sia, invece, molto espresso nelle cellule di midollo adulto. Va comunque sottolineato che le condizioni di coltura *in vitro* quali l'adesione alla superficie della fiasca, il siero fetale bovino o fattori di crescita possono determinare la perdita o l'acquisizione di recettori di superficie, alterando così il *pattern* di marcatori [Deans RJ., 2000]. Si ritiene, infatti, che il fingerprint fenotipico subisca continue modifiche in risposta al microambiente sia *in vitro* che *in vivo* e per questo motivo non è stata ancora ottenuta una caratterizzazione chiara ed inequivocabile [Bianco P., 2001].

In generale, le cellule mesenchimali staminali esprimono numerosi recettori importanti per l'adesione cellulare e l'interazione con le cellule emopoietiche. Esprimono molecole di adesione, recettori per fattori di crescita e citochine, integrine e altri markers, mentre sono negative per marcatori emopoietici, come il CD45, espresso sulle cellule mieloidi e l'LPS receptor (CD14), espresso sui monoliti [Pittenger MF., 1999].

Sono stati identificati tre antigeni la cui presenza contemporanea sulle cellule mesenchimali ne permette la caratterizzazione.

Primo tra questi è l'antigene SH2, riconosciuto come endoglina CD105 o TGF β 3-R [Pece Barbara N., 1999]; si tratta di una glicoproteina di 97 kDa che lega ad alta affinità il TGF β 1 e 3, ma non il TGF β 2. Svolge un ruolo fondamentale nelle interazioni tra le cellule endoteliali e nello sviluppo dei vasi, media le interazioni tra MSC e le cellule emopoietiche nel midollo e infine potrebbe giocare un ruolo chiave nel differenziamento condrogenico mediante la trasduzione del segnale, nonostante il TGF β 2 sia in grado di iniziare la condrogenesi senza legarlo [Barry FP., 1999].

Gli anticorpi monoclonali SH3 e SH4 riconoscono, invece, due epitopi differenti del CD73 [Barry FP., 2000] un antigene presente in molti tipi cellulari e in particolare nel tessuto linfoide ma non nei precursori emopoietici o negli osteociti. Si tratta di una proteina di membrana di 67 kDa, ancorata mediante glicosilfosfatidilinositolo, con attività nucleotidasica e capacità di trasdurre il segnale. Catalizza la defosforilazione dei ribo/desossi ribonucleotidi nei corrispondenti

nucleosidi; quest'attività potrebbe essere importante nel recupero di purine e pirimidine presumibilmente in tutte le cellule dove CD73 è espresso. Nel microambiente midollare il CD73 potrebbe mediare le interazioni cellula-cellula e rappresentare un elemento comune tra lo sviluppo stromale e linfocitario.

Altro interessante marker delle cellule mesenchimali è l'antigene riconosciuto dall'anticorpo monoclonale SB10, identificato come ALCAM (activated leukocyte-cell adesion molecule) o CD166, una glicoproteina implicata nel differenziamento in senso osteogenico, sebbene il preciso meccanismo di questo processo debba ancora essere chiarito [Bruder SP., 1998].

Già da diversi anni è noto che le cellule mesenchimali staminali legano gli anticorpi monoclonali diretti contro il recettore a bassa affinità per il nerve growth factor (α -LNGFR) [Thomson TM., 1988]. Tale proprietà è stata recentemente sfruttata, con successo, per sviluppare un metodo di selezione delle cellule mediante sorting immunomagnetico; il legame all'anti LNGFR permette di ottenere una popolazione fenotipicamente e funzionalmente omogenea, capace di espandere *in vitro*, di automantenersi, di differenziare in tutta la progenie mesenchimale e di supportare l'emopoiesi [Quirici N., 2002].

1.9.1 Plasticità delle cellule staminali mesenchimali

E' stato mostrato che le MSC umane presentano potenziale osteogenico, adipogenico e condrogenico *in vitro* [Pittenger MF., 1999] e vanno consolidandosi le conoscenze sui fattori necessari per l'induzione in tali *lineage*, benchè non siano ancora state chiarite le vie biochimiche che sottintendono a tali processi. Ma il potenziale differenziativo delle MSC sembrerebbe non fermarsi qui. E' stata messa in evidenza la possibilità che sotto l'azione di ulteriori fattori differenzianti si possano ottenere *in vitro* cellule apparentemente commissionate in *lineage* miocitici [Muguruma Y., 2003] morfologicamente simili a quelle multinucleate striate del muscolo scheletrico, esprimenti fattori di trascrizione implicati

nel commissionamento miogenico quali *Myo-D* e *miogenina* nonché proteine muscolo-specifiche quali desmina, miosina scheletrica, α -actinina; in *lineage* endoteliali [Oswald J., 2004] caratterizzate dall'espressione di proteine quali il fattore di Von Willebrand e dalla capacità funzionale di creare strutture simili ai capillari nel saggio su matrice della membrana basale (Matrigel); in *lineage* neurali [Sanchez-Ramos J., 2000] con l'espressione di alti livelli di proteine specifiche e con l'adozione delle morfologie caratteristiche delle cellule neuronali; in *lineage* epatocitari [Oh SH., 2000, Schwartz RE., 2002], con le caratteristiche funzionali (captazione di Di-Ac-LDL, rilascio di albumina) nonché morfologiche delle cellule epatiche.

Gli studi *in vivo* si basano in gran parte sull'analisi dei tessuti di animali che abbiano ricevuto dosi letali di radiazioni ed un trapianto di midollo osseo o di cellule derivanti da midollo osseo di un donatore. Numerosi studi hanno infatti mostrato la presenza nei vari tessuti del ricevente, benchè con bassissime efficienze, di cellule derivate dal donatore interpretate come differenziate in *lineage* mesodermici diversi dall'ematopoietico. I tessuti in cui è stata osservata contribuzione da donatore includono il muscolo scheletrico [Gussoni E., 1999, Ferrari G., 1998] l'endotelio [Jackson K., 2001, Reyes M., 2002, Grant MB., 2002] e il muscolo cardiaco [Orlic D., 2001, Jackson K., 2001, Orlic D., 2000]. Sono ancora più sorprendenti gli studi che suggeriscono che le cellule di midollo osseo possano differenziare *in vivo* in cellule di tessuti di diversi foglietti embrionali. Sono stati pubblicati numerosi articoli che suggeriscono che cellule di midollo osseo potrebbero differenziare *in vivo* in cellule con morfologia e fenotipo neuroectodermici [Kopen G., 1999, Brazelton TR., 2000]. E' stato mostrato anche il differenziamento di tali cellule mesodermiche in cellule con morfologia e fenotipo endodermici. Petersen e collaboratori furono i primi a mostrare che le cellule ovali in un fegato che si rigenera potrebbero derivare dal midollo osseo [Petersen BE., 1999]. Scoperte simili sono state da allora riportate da numerosi gruppi [Theise ND., 2000, Lagasse E., 2000] e sono state trovate cellule derivate dal midollo osseo di donatore in altri tessuti

epiteliali di trapiantati, come la pelle ed il polmone. Considerando l'insieme, questi studi suggeriscono che nel midollo osseo, e possibilmente in altri tessuti, esistano cellule di natura multipotente, dotate di una notevole "plasticità".

2. SCOPO

La sindrome TAR rappresenta un disordine geneticamente eterogeneo, con quadri clinici caratterizzati da combinazioni di difetti ematologici, cardiovascolari e dell'apparato scheletrico.

Studi su topi knockout per il TGF β 2 hanno messo in luce il ruolo fondamentale svolto da questo fattore di crescita nel differenziamento delle cellule mesenchimali (da cui poi deriveranno numerosi tessuti e l'intero apparato circolatorio) avvalorando l'ipotesi che il TGF β 2 possa essere implicato nella patogenesi della sindrome TAR.

Ulteriori studi che sfruttano il sequenziamento automatico del gene codificante per il TGF β 2 hanno permesso di mettere in luce due mutazioni che potrebbero essere una delle cause della sindrome. Le due mutazioni sono: sostituzione di A con C in posizione 2114 e sostituzione di A con G in posizione 2339 (tali posizioni corrispondono a quelle della sequenza di riferimento GeneBank M87843) appartenenti entrambe alla regione 5'-non codificante del TGF β 2 come mostrato nella suddetta sequenza di riferimento. Da ciò abbiamo ipotizzato che tali mutazioni abbiano un qualche ruolo nella regolazione della trascrizione poiché, in particolare, la prima si trova a monte della TATAbox, mentre la seconda appartiene alla 5'-UTR.

Considerando queste premesse, lo scopo di questa ricerca è saggiare l'effetto delle due mutazioni, in particolare una differenza tra Mutato e Wild-type nella regolazione della trascrizione sfruttando il gene reporter della Luciferasi.

Abbiamo inoltre voluto indagare sull'eventuale coinvolgimento delle cellule staminali mesenchimali nella Sindrome TAR.

3. MATERIALI E METODI

3.1. ANALISI MOLECOLARE DEL GENE CODIFICANTE IL TGF β 2 MEDIANTE PCR E SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

3.1.1. I pazienti

La casistica presa in esame è costituita da 14 famiglie informative (tra le quali una consanguinea -TAR6-) e da 130 individui il cui DNA è stato gentilmente donato dal laboratorio di Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale S. Orsola di Bologna.

3.1.2. Progettazione dei primers

Per determinare la sequenza del gene che codifica per il TGF β -2 sul cromosoma 1 sono state progettate 9 coppie di primers con l'ausilio del programma Amplify (per l'elaboratore Macintosh) disponibile liberamente sulla rete Internet. Si è verificato, per ogni coppia di primers, che non vi fosse omologia di sequenza cioè che non ci fossero regioni di autocomplementarietà e che la temperatura di "melting" dei due primers fosse simile. Tutto questo tramite il programma Blast, con cui si è verificato che le sequenze identificate fossero specifiche per il gene studiato, tra tutte quelle note e conservate nella banca dati Genbank. I primers usati sono stati disegnati sulla sequenza Genebank n° M87843 e sono riportati nelle seguenti tabelle:

della banda(bp)	Primer S	Primer AS
	5' → 3'	5' → 3'
323	caatacctcccgtcttaccct	tccacaagccagtgagcatccat
314	tctgaatctacttaaggtgcatcag	tgtcagactagtagttcatccag
430	gagctagcctactgcagttctca	tctgacaaacaggaattctggagt
428	ggtagctttgcttcaactcaaaac	agtactttgttcgagaccacagtaa
493	gaaaaggtttctctctacaggag	acttcagatgttctctgagttcaga
533	cccactttataggttcatagtgaag	cttgaccttctgctaggctaaac
546	cttctctggattatgctatggaaaga	tgtgggtaagggaggaaggagg
192	tgtccttcaacagacctgtccaa	caaagtgacgtgctaggattacag
844	ctagctagcttcacaaacagaggggtacattg	cgctcgagttcccaacctctgctggcttc

Tabella 1. Primer per la regione 5'UTR del TGFβ 2.

Tabella 2. Primer per i sette esoni del TGFβ2.

Esone	Lunghezza della banda(bp)	Primer S		Primer AS	
		5'	3'	5'	3'
1°	369	gaccgaaccgctccttcttta		ccaacagaaaaacgtatcctgc	
	464	gcccgccccgtattaatatttcc		gtccctggtgctgttagatg	
	452	cgcttttctgatcctgcatctgg		gacaggagaacggaaaagagcga	
2°	325	ctcacgctacagtcttctctg		caactgtactctagcctgtgac	
3° e 4°	540	catgctgtcagaatgccaactcag		aatgaaactccccaggecttacca	
5°	502	tgtctgctttgggtgcatcactg		ctcccttcacttggttactg	
6°	296	cattttctggttggggtagg		tgcacatggtaacccaagaacag	
7°	159	cgaattgcgttcatttccgtctt		ttgtctctcacttacaagtagg	
	414	ggcggtagctagttcagacattt		ggctccactttatacacctgtt	
	390	cagtgagttattattgtgttact		catttcaactggttactaaactgac	

3.1.3 .PCR

I 9 frammenti di DNA che comprendono parte del gene che codifica per il TGF β -2 umano, sono stati amplificati mediante PCR: tecnica che permette l'amplificazione selettiva in vitro di frammenti di DNA senza il trasferimento in cellule viventi. I vantaggi che hanno reso questa tecnica tanto diffusa sono sia di tipo tecnico, sia per quanto riguarda la natura dei campioni stessi. Le altre tecniche di amplificazione richiedono, infatti, l'utilizzo di vettori (plasmidi, virus e cosmidi) per trasferire il DNA da amplificare in cellule viventi dove verranno clonate: tutto questo si traduce in tempi lunghi e costi elevati, mentre la PCR richiede esclusivamente la conoscenza delle sequenze adiacenti al frammento da amplificare e di una polimerasi resistente alla temperatura (viene usata la Taq polimerasi: polimerasi proveniente da *Thermus aquaticus* -batterio termofilo-).

Le sequenze di innesco della reazione, i primer, dei due opposti filamenti si fanno estendere nelle due direzioni l'uno verso l'altro. Alla fine della duplicazione del segmento fra i due primer le due nuove coppie di filamenti complementari vengono denaturate innalzando la temperatura: questi a loro volta fungeranno da stampo per una successiva duplicazione, abbassando la temperatura. Ripetuti cicli di replicazione e denaturazione permettono un incremento esponenziale delle copie del segmento duplicato: si può così ottenere un'amplificazione di un milione di volte. In particolare i passaggi che si susseguono in un programma di PCR sono i seguenti:

1° passaggio: denaturazione della doppia elica di DNA a singole eliche mediante incubazione ad una temperatura di 94°C.

2° passaggio: rinaturazione mediante raffreddamento ad una temperatura che corrisponde a quella di annealing dei primer.

3° passaggio: estensione del neofilamento mediante DNA polimerasi e nucleotidi.

Le reazioni di PCR sono state allestite in un volume finale di 50 μ l. In ogni provetta sono stati utilizzati:

DNA(90 ng)

Taq polimerasi (Takara)(0,6 U)

Buffer 1X (Takara)

Soluzione di MgCl₂ (1.5-3 mM)

Primers (0.4 μM ognuno)

I quattro dNTP (0.2 mM ognuno)

Acqua bidistillata a volume

Le provette sono state sottoposte a 40 cicli di amplificazione ed ogni ciclo comprendeva:

- denaturazione a 94°C per 30''
- appaiamento alla opportuna temperatura di annealing per 30''
- estensione a 72°C per 30''

I cicli sono stati preceduti da un'incubazione a 94°C per 5' (denaturazione iniziale) e seguiti da un'incubazione a 72°C per 7' (estensione finale dei prodotti). Un controllo negativo con H₂O è sempre stato incluso nelle reazioni di amplificazione, in quanto la PCR può essere soggetta a contaminazione con DNA diverso da quello bersaglio a cui si possono legare i primers.

Successivamente l'efficienza delle reazioni di PCR e quindi la presenza e la dimensione dei prodotti sono state valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.4μl/ml di etidio bromuro; 5 μl di ogni campione sono stati caricati nei pozzetti e sottoposti ad elettroforesi in tampone Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5 X. Le dimensioni delle bande ottenute sono state determinate per confronto con un marcatore molecolare noto (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche).

I prodotti di amplificazione sono stati poi purificati dai primers non estesi, dai nucleotidi non utilizzati, dai sali e dall'enzima mediante passaggio su colonnina QiaQuickPCR (Quiagen, Hilden, Germania) che utilizza un gel di silice come principio separatore.

I prodotti purificati sono stati quantificati su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.4μl/ml di etidio bromuro e sottoposti ad elettroforesi in tampone TBE 0.5X per confronto con un marcatore molecolare noto (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche).

3.1.4.Cycle sequencing e precipitazione dei prodotti

Il metodo di sequenziamento utilizzato è quello classico della terminazione della catena con dideossiribonucleotidi [Sanger et al., 1977] nella sua variante che sfrutta cicli ripetuti di polimerizzazione effettuati nel termostato a cicli di temperatura programmabili impiegato per la PCR. Tale variazione è conosciuta col nome di cycle-sequencing [Davis et al.,1994].

Si tratta di una reazione di PCR in cui si mette un solo primer in modo che, per ogni esone, si abbia l'amplificazione del filamento senso e dell'antiseno separatamente. Vengono utilizzati nucleotidi dideossi (ddNTP) privi di un gruppo ossidrilico sul carbonio in 3' e su quello in 2', dove viene sostituito con un atomo di idrogeno. Un dideossinucleotide può essere incorporato in una catena di DNA in crescita mediante la formazione di un legame fosfodiesterico tra il suo atomo di carbonio in 5' ed il carbonio in 3' del nucleotide precedentemente incorporato. Tuttavia, poiché i ddNTP sono privi del gruppo ossidrilico in 3', qualsiasi ddNTP incorporato nella catena di DNA in crescita non può partecipare alla formazione del legame fosfodiesterico con il suo atomo di carbonio 3', causando così la fine repentina della sintesi della catena: quando la Taq polimerasi trova un nucleotide dideossi non è più in grado di proseguire e si interrompe la reazione di allungamento. Di conseguenza alla fine, per ciascun tipo di stampo di DNA a singolo filamento, si genera una miscela di frammenti di DNA che differiscono in lunghezza di una sola base: con un'estremità 5' comune (definita dal primer di sequenziamento) ed estremità 3' variabili. Al lato pratico sono necessari in un volume di 20 µl: 30-90 ng di DNA amplificato e purificato, 1 µl di primer a 4 pmol/µl, 4 µl di una miscela già pronta contenente la Taq polimerasi, nucleotidi dideossi marcati con i fluorocromi, buffer e la soluzione di MgCl₂ (DNA Sequencing Kit, Perkin Elmer), si porta a volume con acqua bidistillata sterile. I campioni vengono caricati sul termostato per PCR e sottoposti a 25 cicli di amplificazione, in cui ogni ciclo è costituito dai seguenti

passaggi: 30" a 96°C, 15" alla temperatura di "annealing" del primer utilizzato, 4' a 60°C.

I prodotti dell'amplificazione sono stati poi sottoposti ad una reazione di precipitazione in modo da separare i frammenti di DNA amplificati da tutto il resto; la precipitazione è stata ottenuta aggiungendo al prodotto della cycle-sequencing 2µl di sodio-acetato 3M a pH 4.6 e 50µl di etanolo al 100% freddo (-20°C), le provette sono state poi agitate e mantenute in ghiaccio per 10', dopo di che sono state sottoposte a centrifugazione a 12000 rpm per 15'.

Il sovrantante è stato scartato prestando molta attenzione poiché il pellet di DNA è quasi invisibile. Il pellet è stato lavato con 200µl di etanolo al 70% freddo (-20°C), che viene poi eliminato dopo 5' di centrifugazione a 12000 rpm. Il pellet è stato fatto asciugare lasciando le provette aperte sul termal cycler a 37°C per qualche minuto.

3.1.5. Sequenziamento Automatico

Il sequenziamento automatico impiega la rilevazione dei fluorocromi legati ai nucleotidi dideossi tramite laser; il sequenziamento è stato effettuato mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 377, secondo le istruzioni del fabbricante.

I frammenti con dimensioni che differiscono anche di un singolo nucleotide sono separati su un gel denaturante di poliacrilamide, in quanto sono individuati mediante l'incorporazione di nucleotidi marcati con i fluorocromi. La sequenza può poi essere ricostruita leggendo il gel dal basso verso l'alto, una direzione che dà la sequenza 5'-3' del filamento complementare allo stampo di DNA fornito.

I metodi tradizionali di sequenziamento con ddNTP impiegavano la marcatura con radioisotopi come il P o lo S radioattivi, questo però comportava (oltre a tutti i problemi riguardanti la radioattività) la produzione di bande scure: segno di dispersione del segnale che determina bande poco nette. Ora invece c'è stato un notevole

miglioramento dell'efficienza del sequenziamento grazie ad una parziale automazione delle tecnologie: si utilizzano ddNTP legati a fluorofori (gruppi chimici capaci di emettere fluorescenza), durante l'elettroforesi un monitor individua e registra il segnale fluorescente man mano che il DNA passa attraverso un determinato punto del gel. Allo stato pratico i prodotti di tutte e quattro le reazioni vengono caricati in singole corsie di un gel di poliacrilamide da elettroforesi ed i dati sulla sequenza vengono determinati durante la corsa elettroforetica. Durante l'elettroforesi, un raggio laser viene focalizzato su uno specifico punto del gel e man mano che i singoli frammenti di DNA superano questo punto, il laser induce la fluorescenza del colorante: i picchi di fluorescenza si hanno a lunghezze d'onda differenti per ciascuno dei quattro tipi di colorante. Questa informazione viene registrata elettronicamente e la sequenza così determinata viene immagazzinata nella banca dati del computer. L'uso di fluorofori differenti nelle quattro reazioni base-specifiche comporta che, a differenza del convenzionale sequenziamento, tutte e quattro le reazioni possono essere caricate in un'unica corsa elettroforetica. Il risultato consiste nella forma dei profili di intensità di ciascuno dei fluorofori differentemente colorati e nel contemporaneo immagazzinamento elettronico dell'informazione: ciò esclude errori di trascrizione che si fanno quando si digita una sequenza interpretata dentro un file e significa un'accuratezza veramente elevata del sequenziamento automatizzato.

Il sequenziamento ha permesso di mettere in luce due mutazioni che potrebbero essere una delle cause della sindrome: sostituzione di A con C in posizione 2114 ed sostituzione di A con G in posizione 2339 (tali posizioni corrispondono a quelle della sequenza di riferimento GeneBank M87843) appartenenti entrambe alla regione 5'-non codificante del TGF β 2.

3.2. CLONAGGIO

3.2.1. Vettore con il frammento di DNA Wild-type/Mutato

Il vettore utilizzato nel nostro studio è pGL3 Luciferase Reporter Vector (Promega), utilizzato per un'analisi quantitativa di quei fattori che potenzialmente regolano l'espressione genetica nei mammiferi. Questi fattori possono agire in *cis* (come i promotori e gli enhancers) o in *trans* (come vari fattori che legano il DNA). Lo scheletro dei pGL2 Luciferase Reporter Vectors è stato ridisegnato per i vettori pGL3 per ottenere un aumento di espressione e contiene una regione modificata che codifica per la luciferasi di lucciola (*Photinus pyralis*) che è stata ottimizzata dalla ditta produttrice per monitorare l'attività trascrizionale nelle cellule eucariotiche trasfettate. Le modificazioni apportate a pGL2, quindi, riguardano sia il gene per la luciferasi (*luc+*) che lo scheletro del vettore. Le modificazioni che distinguono il gene *luc+* dalla luciferasi nativa generalmente sono quattro: il tripeptide C-terminale è stato rimosso per eliminare il targeting della proteina espressa ai perossisomi; il "codon usage" è stato migliorato per l'espressione in cellule di piante ed animali; sono stati rimossi due potenziali siti di N-glicosilazione; sono stati fatti alcuni cambiamenti nella sequenza di DNA per smembrare palindromi estese, rimuovere siti di restrizione interni ed eliminare sequenze consensus riconosciute da proteine che regolano i geni legandosi al DNA, assicurando così che il gene reporter non sia di per sé influenzato da segnali di trascrizione aspecifici dovuti alla cellula ospite.

Per quel che riguarda le modificazioni allo scheletro del vettore, quattro principali modificazioni sono state apportate al vettore pGL2: il segnale di poly(A) early di SV40 è stato sostituito dal segnale di poly(A) late (anch'esso di SV40) per aumentare l'efficienza nella terminazione della trascrizione e nella poliadenilazione dei trascritti della luciferasi; sono stati posti un sito di poly(A) sintetico e un sito per la pausa trascrizionale a monte del multiple cloning site per terminare la trascrizione aspecifica che può iniziare nello scheletro del vettore; è stato rimosso anche

l'introne small T per prevenire una ridotta espressione del gene reporter dovuta a splicing criptico dell'RNA; è stata inserita una sequenza consensus Kozak per aumentare l'efficienza di inizio di traduzione del gene per la luciferasi. Il saggio di questo reporter genetico è rapido, sensibile e quantitativo.

In figura è mostrato lo scheletro del pGL3-Basic Vector utilizzato nel nostro studio:

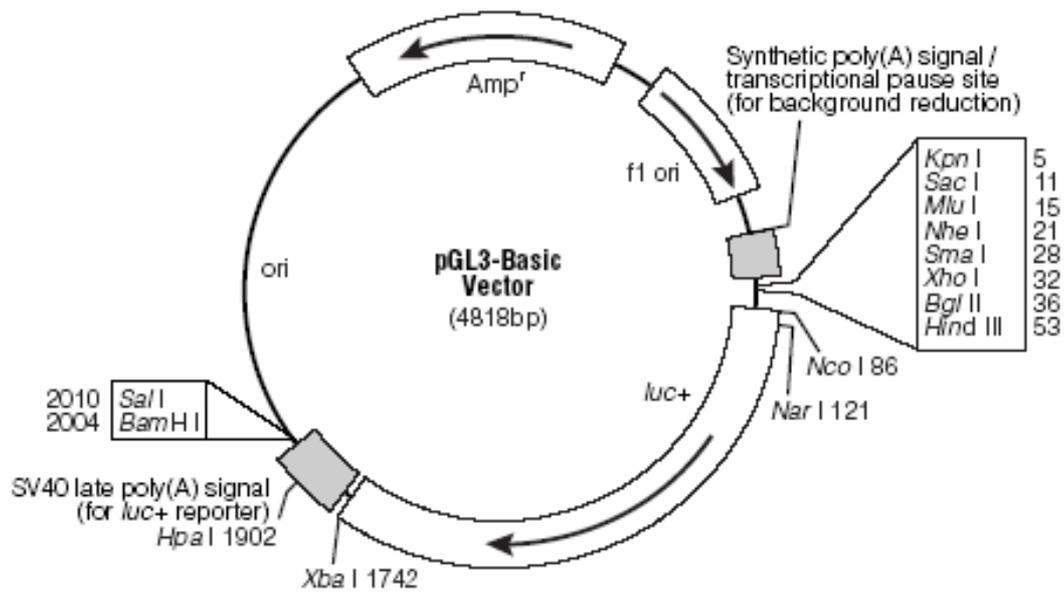


Figura 4. pGL3-Basic Vector circle map.

Multiple cloning region

luc+, cDNA codificante la luciferasi di lucciola modificata

Segnale di SV40 late poly(A)

ori, origine di replicazione plasmidica in E.coli derivata da ColE1

Amp^r, gene codificante la β-lattamasi che conferisce resistenza all'ampicillina in E.coli

f1 ori, origine di replicazione derivata da fago

Segnale poly(A) sintetico

Le frecce dentro luc+ e il gene Amp^r indicano la direzione di trascrizione; la freccia dentro f1 ori indica la direzione della sintesi del filamento del ssDNA.

Il pGL3-Basic Vector non ha un promotore eucariotico né le sequenze enhancer per permettere la massima flessibilità nel clonaggio delle sequenze potenzialmente regolatorie. L'espressione dell'attività della luciferasi nelle cellule trasfettate con questo plasmide dipende

dall'inserzione e dal corretto orientamento del promotore funzionale inserito a monte del gene luc+. Possono essere inseriti elementi enhancer a monte del promotore o nei siti per gli enzimi di restrizione BamH I o Sal I a valle del gene luc+.

3.2.2. Vettore con Green Fluorescent Protein (GFP)

Abbiamo usato il vettore pEGFP-N1 della Clontech che contiene la enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP). Tale vettore è stato costruito per l'espressione in cellule di mammifero e contiene una variante di EGFP (GFPmut1) con una doppia sostituzione amminoacidica (della Phe-64 in Leu e della Ser-65 in Thr) che gli permette di avere un cromoforo 35 volte più intenso della GFP wild-type: questa è attualmente la variante di GFP più intensa. Come altre varianti di GFP, EGFP ha un picco di eccitazione singolo e forte a 488nm (come mostrato in figura).

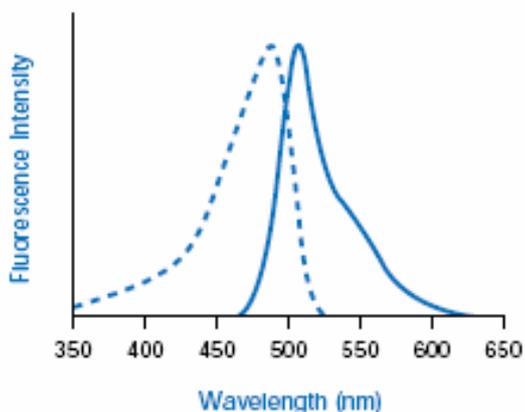


Figura 5. Spettri di eccitazione (linea tratteggiata) e di emissione (linea continua) di EGFP. I dati di eccitazione sono stati ottenuti con un'emissione a 540nm e i dati di emissione sono stati ottenuti con un'eccitazione a 450nm. I picchi delle curve sono normalizzati. Eccitazione massima = 488 nm; emissione massima = 507 nm.

Inoltre la sequenza codificante per la EGFP è stata ottimizzata (dalla ditta produttrice) con un "codon usage" per permettere la massima espressione nelle cellule di mammifero. Infatti essa contiene più di 190 mutazioni silenziose a singola base che creano un open-reading frame composta da codoni riconosciuti dal macchinario traduzionale di mammifero. Le sequenze a monte di EGFP sono state convertite in un sito Kozak di legame per i ribosomi. Queste modificazioni permettono

alle cellule di mammifero di tradurre in maniera efficiente l'mRNA di EGFP e quindi di aumentare l'espressione di EGFP.

Queste caratteristiche fanno sì che EGFP sia un ideale gene reporter nel nostro esperimento. Infatti, combinando la maggiore intensità di cromoforo peculiare di questa variante con l'ottimizzazione della traduzione, si ha un aumento notevole della sensibilità di EGFP come reporter nelle cellule di mammifero.

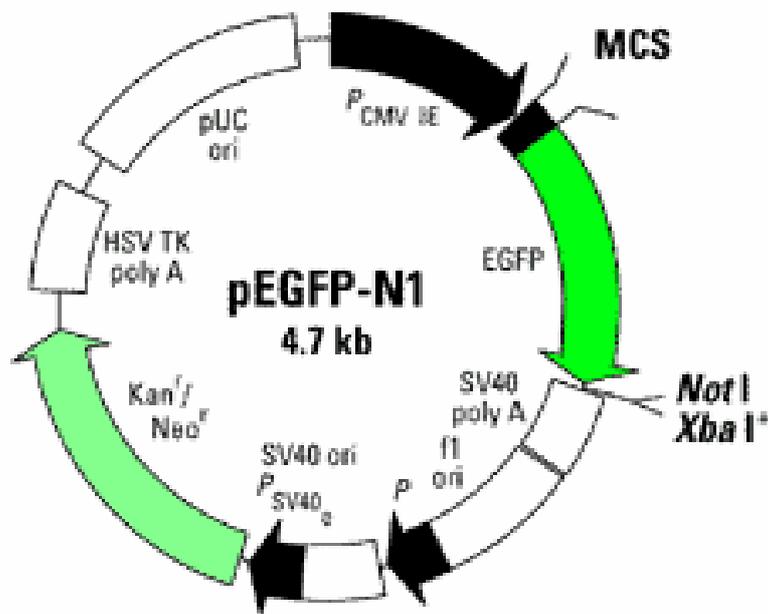


Figura 6. pEGFP-N1 Vector circle map.

P_{CMV} , Promotore precoce-immediato del cytomegalovirus (CMV) umano

MCS, Multi Cloning Site

EGFP, gene per Enhanced Green Fluorescent Protein

SV40 poly A, segnale di poliadenilazione dell'mRNA precoce di SV40

f1 ori, origine f1 di ss DNA

P, promotore batterico per l'espressione del gene che conferisce resistenza alla Kanamicina

SV40 ori, origine di replicazione di SV40

P_{SV40e} , promotore precoce di SV40

Kan^r/Neo^r , gene che conferisce resistenza alla Kanamicina/Neomicina

HSV TK poly A, segnale di poliadenilazione della timidina chinasi (TK) di Herpes simplex virus (HSV)

pUC ori, origine di replicazione del plasmide

Tra le sue numerose applicazioni, pEGFP-N1 può essere utilizzato per produrre proteine di fusione (inserendo il gene d'interesse nella regione MCS N-terminale della sequenza codificante EGFP), ma anche per esprimere semplicemente EGFP in un linea cellulare come marker di trasfezione. Nel nostro approccio lo useremo proprio in quest'ultima modalità.

3.2.3. Amplificazione del DNA

I DNA che abbiamo utilizzato nel nostro approccio sperimentale appartengono al paziente della famiglia consanguinea TAR6 (nel quale sono state identificate le due mutazioni) e alla sorella di tale paziente che è risultata omozigote sana. Da essi abbiamo quindi ottenuto i frammenti mutato e wild type rispettivamente.

Questi frammenti di DNA sono stati amplificati mediante PCR

I primers utilizzati sono i seguenti:

S 5' - ctagctagcttcacaaacagaggggtacattg-3' (1748)

AS 5' -cgctcgagtttcccaacctctgctggcttc-3' (2592)

dai quali si ottiene un frammento di 844bp che comprende entrambe le mutazioni. Le basi evidenziate corrispondono al sito per gli enzimi di restrizione scelti per permettere la successiva digestione.

Le reazioni di PCR per ognuno dei DNA dei pazienti sono state allestite in un volume finale di 50 μ l. In ogni provetta sono state utilizzate le seguenti componenti:

1. DNA (90 ng)
2. Taq polimerasi (Takara)(0.6 U)
3. Buffer 1X (Takara)
4. Soluzione di MgCl₂ (1.5-3 mM)
5. Primers (0.4 μ M ognuno)
6. dNTPs (0.2 mM ognuno)

7. Acqua bidistillata a volume

Successivamente le provette con le soluzioni sono state poste nel termociclatore dove sono state sottoposte mediamente a 40 cicli di amplificazione ed ogni ciclo comprendeva:

- denaturazione a 94°C per 30''
- appaiamento alla opportuna temperatura di annealing per 30''
- estensione a 72°C per 30''

I cicli sono stati preceduti da un'incubazione a 94°C per 5' (denaturazione iniziale) e seguiti da un'incubazione a 72°C per 7' (estensione finale dei prodotti). Un controllo negativo con H₂O è sempre stato incluso nelle reazioni di amplificazione, in quanto la PCR può essere soggetta a contaminazione con DNA diverso da quello bersaglio a cui si possono legare i primers.

Successivamente, l'efficienza delle reazioni di PCR (e quindi la presenza e la dimensione dei prodotti) sono state valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.4µl/ml di etidio bromuro; 5 µl di ogni campione sono stati caricati nei pozzetti e sottoposti ad elettroforesi in tampone Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5 X. Le dimensioni delle bande ottenute sono state determinate per confronto con un marcatore molecolare noto (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche).

I prodotti di amplificazione sono stati poi purificati dai primers non estesi, dai nucleotidi non utilizzati, dai sali e dall'enzima mediante passaggio su colonnina QiaQuick PCR (Qiagen, Hilden, Germania) che utilizza una membrana di silice per legare il DNA in un buffer ad alta concentrazione di sali ed eluirlo con buffer a bassa concentrazione di sali o con acqua.

I prodotti purificati sono stati quantificati su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.4µl/ml di etidio bromuro e sottoposti ad elettroforesi in tampone TBE 0.5X per confronto con un marcatore molecolare noto (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche).

Quanto al vettore pGL3, è stato amplificato tramite coltura di batteri che sono stati trasformati con esso per poi essere estratto con il kit HiSpeed plasmid Midi della Qiagen.

3.2.4. Digestione

Sia il plasmide che i nostri frammenti Wild-type e Mutato vanno digeriti con gli enzimi di restrizione che genereranno estremità compatibili con il clonaggio. Gli enzimi che sono stati scelti soddisfano tre particolari condizioni: sono compatibili tra loro, permettendoci di fare un'unica reazione di digestione; tagliano il plasmide in un solo sito e non hanno siti di taglio interni all'inserto; non richiedono condizioni particolari, rendendo il loro uso semplice ed agevole. Tali enzimi (Roche) ed i rispettivi siti di restrizione sono i seguenti :

Nhe I 5'-GCTAGC-3'

Xho I 5'-CTCGAG-3'

Abbiamo preparato tre soluzioni per le digestioni : una per ognuno dei frammenti da inserire nel vettore e una per il plasmide, tutte e tre ad un volume finale di 50µl, lavorando in ghiaccio.

Considerando che 1U di enzima digerisce 1µg di DNA a 37°C per 1h, abbiamo messo 5U di ogni enzima per ogni soluzione: questa quantità è in eccesso, ma abbiamo deciso di procedere in questo modo per essere certi che la reazione giunga a completamento correttamente.

Perciò ogni soluzione contiene le seguenti componenti e quantità:

1. Frammento o vettore 3 µg
2. Buffer B (10X) (Roche)
3. Xho (I 5 U)
4. Nhe (I 5 U)
5. Acqua bidistillata a volume

Le soluzioni di digestione sono state poi lasciate a 37°C o/n.

Dopo la digestione abbiamo preparato un gel preliminare di agarosio all'1% caricando 2 µl di digerito per verificare che la digestione sia avvenuta completamente e nel modo corretto: per i frammenti, si vede ovviamente una banda a 844 bp; per il plasmide, se questo viene digerito completamente si vede una banda unica di circa 4700 bp, altrimenti si vedranno tre bande per le tre forme conformazionali del plasmide (circolare, lineare e superavvolto). Il digerito è stato poi passato sulle

colonnine del kit HiSpeed plasmid Midi (Qiagen). Infine si prepara il gel finale caricando sempre 2 μ l di digerito per quantificare l'eluato.

3.2.5. Ligazione

Il frammento e il plasmide digeriti sono stati posti nella stessa provetta e sottoposti all'azione della T4 DNA ligasi (Takara). Abbiamo messo il doppio dell'inserto rispetto al plasmide per aumentare la probabilità che il frammento si inserisca nel vettore. Anche in questo caso si lavora in ghiaccio, preparando la seguente soluzione in un volume finale di 10 μ l:

1. Plasmide 1 μ g
2. Inserto 2 μ g
3. Ligasi 10 U

che viene poi lasciata a 16°C o/n.

A seguire abbiamo inattivato la ligasi per 20' a 65°C e, lavorando sempre in ghiaccio, abbiamo preparato la seguente soluzione di digestione in un volume finale di 50 μ l :

1. Soluzione di ligazione 10 μ l
2. Buffer A 10X (Roche) 4 μ l
3. Sma I 10 U
4. Acqua bidistillata a volume

Si lascia la soluzione per circa 2h a 25°C per poi inattivare nuovamente per 20' a 65°C.

Quest'ultima digestione viene fatta per eliminare il vettore parentale (senza inserto). Questo, infatti, ha un sito per Sma I nella multiple cloning region proprio tra i siti per i nostri enzimi Xho I e Nhe I, mentre il plasmide con l'inserto ha escisso il sito per Sma I: perciò con quest'ultima digestione verrà tagliato solo il vettore parentale.

3.2.6. Preparazione di ceppi batterici competenti

Per coltivare i batteri abbiamo utilizzato un terreno LB costituito dalle seguenti componenti:

1. Yeast extract 5 g/L
2. Triptone 10 g/L
3. NaCl 10 g/L
4. Acqua distillata a volume

Dopo aver aggiustato il pH a 7.0 con NaOH, lo abbiamo posto in autoclave e poi vi abbiamo aggiunto Ampicillina (100 µg/ml) prima di mettervi in coltura i batteri.

Prima di trasformare i batteri, abbiamo dovuto renderli competenti e questo si ottiene in vari modi, ad esempio trattandoli con il CaCl₂ come descritto di seguito, lavorando ovviamente in sterilità:

- Prendere una singola colonia (2-3 mm di diametro) da una piastra posta a 37°C per 16-20h e trasferirla in 100 ml di terreno LB in una beuta da 1 litro. Incubare la coltura per circa 3h a 37°C in agitazione (circa 300 cicli/min). Per una trasformazione efficiente è essenziale che il numero di cellule vitali non ecceda 10⁸ cellule/ml. Per monitorare la crescita della coltura, determinare la OD₆₀₀ ogni 20-30 minuti. Poiché la relazione tra la OD₆₀₀ e il numero di cellule vitali per ml varia sostanzialmente da ceppo a ceppo, è essenziale calibrare lo spettrofotometro misurando la OD₆₀₀ di una coltura in crescita del ceppo batterico che si sta usando a diversi tempi del ciclo di crescita e determinare il numero di cellule vitali a ognuno di questi tempi piastrando diluizioni della coltura su Agar fatto con LB senza antibiotici.
- Trasferire le cellule in provette da 50 ml Falcon 2070 in polipropilene sterili e lasciare in ghiaccio per 10'.
- Recuperare le cellule centrifugando a 4000 rpm per 10' a 4°C.
- Eliminare il terreno e lasciare le provette rovesciate per 1' per permettere alle ultime tracce di terreno di scendere.

- Risospendere ogni pellet in 10 ml di una soluzione fredda di CaCl_2 0,1M e conservare in ghiaccio per circa 10'
- Recuperare le cellule centrifugando a 4000 rpm per 10' a 4°C
- Eliminare il sovrantante dai pellet e lasciare i tubi rovesciati per 1' per permettere alle ultime tracce di terreno di scendere.
- Risospendere ogni pellet in 2 ml di soluzione fredda di CaCl_2 per ogni 50 ml di coltura originale.
- A questo punto le cellule possono essere aliquotate mettendone 200 μl /eppendorf (visto che si utilizzano 200 μl /trasformazione) e congelate a -70°C: le cellule si mantengono competenti sotto queste condizioni. Possono anche essere lasciate a 4°C nella soluzione di CaCl_2 per 24-48h, ma l'efficienza di trasformazione aumenta 4-6 volte durante le prime 12-24h per poi diminuire al livello originale.

3.2.7. Trasformazione di batteri competenti e purificazione del DNA plasmidico

Abbiamo unito il prodotto di ligazione ad ogni eppendorf con 200 μl di batteri competenti e lasciato le eppendorf in ghiaccio per ½h.

In seguito i batteri sono stati sottoposti a uno shock termico e posti a 42°C per 90''; poi messi subito in ghiaccio.

Si sono aggiunti 0.8 ml di terreno e si è messo il tutto in una provetta da 15 ml (perché i batteri crescono in aerobiosi) ad incubare 40'-1h a 37°C in agitazione: in questo modo il plasmide che è stato incorporato dai batteri si replica.

Poi abbiamo preparato 3 piastre Petri contenenti terreno LB Agar (che si distingue dal terreno LB liquido per avere in più 15 g/L di Agar) con Ampicillina per ogni frammento ligato: nella prima abbiamo seminato una diluizione 1:100 (90 μl di terreno+10 μl di sospensione batterica), nella seconda una diluizione 1:10 (100 μl di sospensione batterica) e nell'ultima tutta la sospensione rimasta non diluita (si "spina" la sospensione per 5' e si lasciano dentro 100 μl di terreno in cui si

risospende il pellet). Perciò in questo modo si piastrano 100 µl per ogni Petri.

Abbiamo lasciato crescere le colonie o/n a 37°C.

Il giorno dopo abbiamo raccolto circa una ventina di colonie singole e inoculato ognuna in una provetta da 15 ml contenente circa 2 ml di terreno LB e Ampicillina 100 µg/ml. Abbiamo poi incubato le provette per circa 16h a 37°C, in agitazione.

Tra queste colonie raccolte potrebbero essere comprese alcune date da batteri che contengono il plasmide legato al frammento, ma anche alcune contenenti il plasmide richiuso su se stesso.

Per vedere quali sono i batteri trasformati col plasmide legato al frammento di interesse, abbiamo estratto il DNA da ciascuna provetta nel seguente modo: si prelevano 1.5 ml di coltura e si pongono in una eppendorf, si centrifuga a velocità massima per 30" a 4°C e si butta il sovrinatante. Si risospende il pellet in 100 µl di soluzione composta da Tris-EDTA-glucosio con RNasi A (100 µg/ml) e si aggiungono a ciascuna eppendorf (uno alla volta) i seguenti componenti risospendendo bene:

1. NaOH-SDS 100 µl
2. KAc pH 5.3 150 µl

Si centrifuga per 5'. Ora il sovrinatante contiene DNA plasmidico perciò lo si pone in una seconda eppendorf e lo si precipita con NaAc pH 5.3 0.3 M ed etanolo. Si lascia in questa soluzione ¼h a -20°C, si centrifuga per 15' e si fa asciugare bene il pellet e poi lo si risospende in 20-50 µl di acqua sterile.

Si mettono 2.5 µl in una terza eppendorf e si digerisce il DNA estratto da ogni clone con gli enzimi di restrizione usati nella digestione precedente (Nhe I e Xho I) e si fa una elettroforesi di controllo:

- se compare una singola banda → clone trasformato con il plasmide richiuso su se stesso
- se ci sono 2 bande, una della dimensione del mio frammento → clone trasformato col plasmide contenente il frammento di interesse.

A questo punto abbiamo scelto alcuni cloni positivi e abbiamo sequenziato il DNA da essi estratto per essere certi che l'inserimento del frammento sia avvenuto nel modo corretto: a questo scopo sono stati utilizzati i primers GLprimer2, RVprimer3 e RVprimer4 per pGL3 (Promega). A questo punto sono stati poi amplificati sia i ceppi batterici il cui DNA ha dimostrato un sequenziamento corretto sia il vettore con GFP nel seguente modo:

- Per ogni ceppo sono stati inoculati 10 µl di coltura (prelevati dalla rispettiva provetta) in 200-500 ml di terreno LB con Ampicillina e lasciati a 37°C o/n;
- Si inoculano 100 µl di coltura in 1.5 ml di terreno LB contenente l'antibiotico corrispondente per 3-4h in una provetta da 15 ml;
- Si centrifuga in una eppendorf e si toglie il sovrnatante, risospesando poi il pellet in 1.5 ml di terreno LB al 30% di Glicerolo mescolando bene e si congelano i batteri -80°C.

Successivamente si possono recuperare di nuovo questi ceppi per amplificarli: si preleva una piccola quantità con un ansina sterile o un bisturi sterile e lo si sciaccia in 200-500 µl di terreno LB con Ampicillina per poi lasciarlo a 37°C o/n in agitazione. Il passaggio successivo consiste nell'estrazione del DNA plasmidico che abbiamo fatto utilizzando il kit HiSpeed plasmid Midi kit Qiagen. Infine abbiamo quantificato i campioni estratti allo spettrofotometro.

La misurazione della concentrazione può essere effettuata tramite l'assorbanza a 260 nm poiché è noto che una soluzione di DNA con densità ottica di 1.0 ha una concentrazione pari a 50 µg/ml in una cella con cammino ottico di 10 mm. di conseguenza si ha:

$$\text{Concentrazione DNA} = A_{\lambda 260} * \text{Fattore } (=50)$$

Inoltre è possibile usare il rapporto di assorbanza per rivelare la presenza di impurità; le due lunghezze d'onda che interessano in questo caso sono i massimi di assorbanza degli acidi nucleici (260 nm) e l'impurità delle proteine. (280 nm) Una deviazione dal

rapporto di assorbanza previsto per le due lunghezze d'onda per la sostanza pura rivela la presenza di impurità nel campione.

$$\text{Rapporto di Abs} = A_{\lambda 260}/A_{\lambda 280}$$

Il rapporto per il DNA puro è pari a 1.8

In questo modo conosciamo concentrazione e purezza del Dna plasmidico e siamo in grado di lavorare con volumi corrispondenti alle precise quantità richieste dalle nostre esperienze (Si veda oltre).

3.3.SAGGIO DELLE LINEE CELLULARI COMPATIBILI CON L'APPROCCIO SPERIMENTALE

3.3.1. Analisi bioinformatica sui fattori di trascrizione che si legano alla sequenza

La sequenza recante le mutazioni è stata sottoposta ad un'indagine bioinformatica per verificare la presenza di fattori di trascrizione che si legano nell'intorno delle nostre mutazioni. L'analisi è stata eseguita sui siti www.alibabà.com e www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess.

Per quel che riguarda la prima mutazione (in posizione 2114) è emerso che sul codone **ccc** a monte si lega AML-1; mentre sulla seconda mutazione (in posizione 2339) sembra trovarsi il fattore IRF-1 che si lega 6 basi a valle e riconosce la sequenza **ctgacaagagaAag** (abbiamo evidenziato la nostra base A in esame, che verrebbe sostituita con G nel mutato).

3.3.2.RT-PCR

L' RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) è una tecnica che permette l'amplificazione di frammenti di DNA a partire da

RNA. E' una tecnica estremamente utile nella quantificazione dell'RNA, nel clonaggio e nella costruzione di librerie a cDNA solo per citarne alcuni usi. L'RT-PCR si basa su due steps principali.

Durante il primo step, chiamato "First strand reaction" viene sintetizzato a partire da mRNA precedentemente estratto, DNA(cDNA) tramite l'uso di dNTP's e della trascrittasi inversa. La trascrittasi inversa da noi utilizzata è l'AMV-RT (Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase).I Primers a DNA, necessari a fare iniziare la reazione, possono essere di tre tipi:

- Random primers, costituiti da corti nastri di 6-10 basi di desossinucleotidi in sequenza random. Sono usati per generare cDNA da RNA a singolo filamento;
- Oligo (dT) primers , costituiti da corti nastri di 12-18 basi di desossinucleotidi timinici che ibridano con la coda poliadenilata dell'mRNA;
- Primers gene-specifici , costituiti da corti nastri di desossinucleotidi sintetizzati su una sequenza complementare di un gene di interesse.

Il cDNA sintetizzato in questo modo viene poi amplificato mediante PCR . Questo passaggio è chiamato "Second strand reaction".

Per la scelta del tipo cellulare più consono al nostro approccio sperimentale sono state considerate le seguenti linee cellulari:

HL-60 (cellule in sospensione derivanti da una leucemia promielocitica)

Cos1 (cellule adese del rene di scimmia)

CaCO₂ (cellule adese di adecarcinoma di colon)

5637 (cellule epiteliali adese del cancro alla vescica)

Hep-G₂(cellule adese di carcinoma di fegato)

SaOs (cellule adese derivanti dall'osteosarcoma)

Le HL-60, le Cos1, le 5637 e le SaOs crescono in un terreno IMDM al 10% di FCS mentre le CaCO₂ e le Hep-G₂ crescono in un terreno IMDM al 20% di FCS. Prima di aggiungere il siero, però, è necessario aggiungere all'IMDM una soluzione di Penicillina-Streptomicina alla concentrazione finale di 5ml/L.

Da ciascuna coltura è stato estratto l'RNA tramite L'RNasi Mini Kit della Qiagen. Si procede togliendo il terreno dalle colture, facendo un lavaggio con PBS e infine staccando le cellule con una soluzione 1:2 di Tripsina e PBS. Si procede quindi alla conta considerando che il Kit agisce efficientemente fino a un massimo di $3-4 \times 10^6$ cellule. Una volta contaminate le cellule vengono pellettate in centrifuga a 1000 rpm per 10 minuti. Il pellet infine viene risospeso in uno specifico volume di Buffer di lisi (calcolato in base al numero di cellule). Una volta lisate si procede alla vera e propria estrazione seguendo il protocollo del Kit. Infine si procede all'RT-PCR.

Il protocollo della RT-PCR richiede che l'RNA sia ad una concentrazione di $15\text{ng}/\mu\text{l}$ è necessario diluirlo con acqua RNasi free.

Le reazioni di retrotrascrizione(first strand reaction) sono state allestite in un volume finale di $20 \mu\text{l}$. In ogni provetta sono state utilizzate le seguenti componenti:

1. Cloned AMV RT ($15\text{U}/\mu\text{l}$)
- 2.DTT (0,1 M)
3. Buffer 5X
4. RNasiOUT ($40\text{U}/\mu\text{l}$)
- 5.RNA ($15 \text{ng}/\mu\text{l}$)
- 6.dNTP's Mix (10 mM)
7. Oligo dT (Primers $50 \mu\text{M}$)
- 8.Acqua DEPC a volume

Successivamente le provette con le soluzioni sono state poste nel termociclatore dove sono incubate per 45 minuti a 50°C .

I primers utilizzati per l'amplificazione(Second Strand Reaction) sono i seguenti:

- Per AML1:

S 5'-tctagctcagcactgctcca-3'

AS 5'-tcatgcaaaaactggcttcag-3'

Dai quali si ottiene un frammento di 232 bp che comprende la mutazione 2114 (A->C);

- Per IRF1:

S 5'-agctcagctgtgcgagtgtga-3'

AS 5'-tagctgctgtggatcatcagg-3'

Dai quali si ottiene un frammento di 185 bp che comprende la mutazione 2339 (A->G). Le reazioni di PCR per ognuno dei cDNA di ciascuna linea cellulare sono state allestite in un volume finale di 50 μ l. In ogni provetta sono state utilizzate le seguenti componenti:

1. cDNA
2. Taq polimerasi (5U/ μ l)
3. Buffer 10X
4. Soluzione di MgCl₂ (50 mM)
5. Primers ad una concentrazione di 10 μ M ognuno
6. dNTPs mix di 10mM ciascuno
7. Acqua DEPC a volume

Successivamente le provette con le soluzioni sono state poste nel termociclatore dove sono state incubate per 15 minuti a 95°C (denaturazione iniziale) e successivamente sottoposte a 40 cicli di amplificazione ed ogni ciclo comprende: denaturazione a 94°C per 30", appaiamento alla opportuna temperatura di annealing per 15" (57°C), estensione a 72°C per 10". Come controllo positivo si considerano le HL-60 per AML1 e le HEP-G2 per IRF1. Un controllo negativo con H₂O è sempre stato incluso nelle reazioni di amplificazione, in quanto la PCR può essere soggetta a contaminazione con DNA diverso da quello bersaglio a cui si possono legare i primers. Successivamente, l'efficienza delle reazioni di PCR (e quindi la presenza e la dimensione dei prodotti) sono state valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.4 μ l/ml di etidio bromuro; 5 μ l di ogni campione sono stati caricati nei pozzetti e sottoposti ad elettroforesi in tampone Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5 X. Le dimensioni delle bande ottenute sono state determinate per confronto con un marcatore molecolare noto (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche).

3.4. TRASFEZIONE DI LINEE CELLULARI

3.4.1. Coltura delle linee cellulari

Il tipo cellulare che abbiamo scelto per il nostro approccio sperimentale è stata la linea cellulare 5637 (cellule epiteliali del cancro alla vescica). Queste, infatti si sono dimostrate particolarmente resistenti alla metodica della trasfezione (che comprende uno shock con glicerolo) e permettono di avere di conseguenza una maggiore efficienza di trasfezione. Le 5637 sono cellule adese e crescono in un terreno IMDM al 10% di FCS. Prima di aggiungere il siero, però, è necessario aggiungere all'IMDM una soluzione di Penicillina-Streptomicina alla concentrazione finale di 5ml/L.

Il nostro esperimento inizia con la semina di 300.000 cellule/pozzetto in una piastra generica a 6 pozzetti in un volume finale di 2 ml di IMDM al 10% di FCS. Si lasciano crescere in incubatore a 37°C e 5% CO₂ o/n .

3.4.2. Trasfezione e risemina nelle piastre schermate

Il metodo che abbiamo utilizzato per la trasfezione è quello del CaCl₂ ed abbiamo utilizzato le seguenti soluzioni:

- HBS 2X pH 7.07 sterile, in un volume finale di 500 ml composta da:
 1. NaCl (274 mM)
 2. KCl (10 mM)
 3. Na₂HPO₄ (1.4 mM)
 4. Destrosio (15 mM)
 5. HEPES (42mM)
- CaCl₂ (2.5 mM) in 10 mM HEPES (pH 7.07) sterile, in un volume finale di 100 ml composta da:
 1. HEPES (10mM)
 2. CaCl₂ (2.5 mM)

- 15% Glicerolo in PBS 1X

Si preparano due sets di eppendorf (un eppendorf per ogni pozzetto da trasfettare). In un set si mettono 40 μ l di HBS 2X in ogni eppendorf e si lascia equilibrare in incubatore a 37°C; nel secondo set si prepara una soluzione di DNA/CaCl₂ (volume finale 40 μ l): si unisce il DNA ad acqua sterile e poi si aggiungono 4 μ l di CaCl₂. Si trasferisce il contenuto delle eppendorf contenenti la soluzione di DNA/CaCl₂ nelle rispettive eppendorf con HBS 2X e si lasciano al buio per 20' a temperatura ambiente.

Nel frattempo si toglie il terreno dai pozzetti contenenti le cellule lasciandone 0.8 ml per ogni pozzetto e poi vi si aggiunge la soluzione di DNA/CaCl₂/HBS. Si lasciano ad incubare a 37°C e 5% CO₂ per 6h.

Complessivamente abbiamo trasfettato 3 pozzetti (che abbiamo chiamato GFP+MUT, numerati da 1 a 3) con 7.07 μ g di plasmide con il frammento mutato e 1.53 μ g di plasmide con GFP e 3 pozzetti (che abbiamo chiamato GFP+WT, numerati da 1 a 3) con 7.07 μ g di plasmide con il frammento wild-type e 1.53 μ g di plasmide con GFP. Passate le 6h di incubazione si fa uno shock al Glicerolo: si rimuove il terreno dalle cellule, si aggiungono 2 ml di glicerolo 15% e si lascia ad incubare per 3' a 37°C. Viene rimossa la soluzione con Glicerolo, si lava due volte con PBS sterile e si aggiungono 2 ml di terreno fresco. Si lasciano le cellule ad incubare a 37°C e 5% CO₂ o/n.

Il giorno successivo si seminano le cellule in una piastra da 96 pozzetti schermata (che permette la rilevazione di GFP e della luminescenza senza avere l'inconveniente della contaminazione di luce tra pozzetti) procedendo nel seguente modo:

- si aspira il terreno dalle cellule di tutti i pozzetti, si lava una volta con PBS 1X e si lasciano le cellule in 1 ml/pozzetto di Tripsina 1:2 in PBS per circa 15'; si inibisce l'azione della Tripsina con un ugual volume di terreno completo e si pongono questi 2 ml in una provetta in ghiaccio (il ghiaccio infatti impedisce che le cellule aderiscano alla parete della provetta)

- si contano le cellule di ogni pozzetto risospendendo 10 µl di coltura in una soluzione di 25 µl di Tripan Bleu e 15 µl di PBS per riporre 10 µl di questa mix in una camera da conta Neubauer.
- si seminano 30.000 cellule/pozzetto della piastra schermata : per ogni pozzetto originario sono stati fatti tanti pozzetti schermati quanto era il numero di cellule che ce lo permetteva, allo scopo di avere dati più robusti da un punto di vista statistico.

3.5. RILEVAZIONE DEL SEGNALE

3.5.1. Reported- based Assays

I geni reporter codificano per proteine che possiedono un'unica attività enzimatica o che emettono luce in fluorescenza se vengono eccitate ad una certa lunghezza d'onda. Essi sono inseriti in costrutti che possono avere diverse caratteristiche ed essere finalizzati a diversi scopi (es. localizzare una proteina in diversi compartimenti cellulari, per verificare la trasfezione di cellule, per saggiare una possibile attività regolatoria di un frammento di DNA ed altro ancora. Un tipo di costrutto con un gene reporter può consistere in un elemento trascrizionale di controllo inducibile che guida l'espressione del gene reporter. Il DNA da testare è legato a monte della regione che codifica per il gene reporter: tale DNA può essere un promotore oppure può essere inserito in maniera tale da dare origine ad un gene chimerico. Inoltre a monte del promotore possono essere posti elementi funzionali come gli enhancer che possono aumentare la trascrizione. Il costrutto con un elemento trascrizionale inducibile che guida l'espressione del gene reporter regolerà anche la sintesi della proteina reporter in risposta ad un'attivazione recettoriale.

In commercio ci sono diverse tipologie di vettori con geni reporter e contengono un promotore od enhancer, siti di clonaggio appropriati, il gene reporter, il sito di poli-A, la resistenza antibiotica e l'origine per la replicazione nei procarioti. I costrutti del gene reporter sono inseriti in cellule di mammifero attraverso una varietà di metodi di trasfezione. I più comuni utilizzano: calcio-fosfato (CaP), DEAE-destrano, lipofecatamina e metodi di elettroporazione. Sono disponibili diversi geni reporter con una scelta di diversi vettori per la linea cellulare adatta. I sistemi reporter più comuni sono la Firefly Luciferasi, la fosfatasi alcalina secreta (SEAP, Secreted Alkaline Phosphatase), la Cloramfenicolo Acetiltransferasi (CAT, Chloramphenicol Acetyltransferase), la β -galattosidasi e la Green Fluorescent Protein (GFP). Il saggio che si decide di effettuare è quello basato sull'utilizzo della Firefly Luciferasi.

3.5.2. Firefly Luciferasi

La luciferasi è il gene reporter di scelta in molti laboratori per diversi motivi:

- è un saggio più sensibile di quello per CAT o altri geni reporter usati comunemente. La sensibilità eccezionalmente alta di questo saggio permette l'analisi di promotori deboli e l'utilizzo di piccole quantità di DNA e cellule negli studi di trasfezione;
- il saggio non richiede l'utilizzo di materiale radioattivo ;
- il saggio è lineare oltre otto ordini di grandezza (perciò piccole quantità di lisato delle cellule trasfettate può essere sufficiente per saggiare l'attività enzimatica) e tutti i confronti tra pozzetti sono possibili;
- il buffer usato per lisare le cellule è compatibile con altri saggi per geni marker come ad esempio CAT, altri geni per luciferasi e β -galattosidasi. Questo semplifica il processo di normalizzazione ed in alcuni casi permette l'analisi di due geni marker nella stessa aliquota di lisato cellulare;

- il saggio della luciferasi può essere realizzato in piastre da 96 pozzetti per facilitare l'analisi di un ampio numero di cellule trasfettate.

Per rilevare la luce emessa dall'azione dell'enzima si possono usare luminometri o contatori di scintillazione standard. Quest'ultimo è più sensibile ma richiede più tempo.

La Firefly luciferasi è un monomero di 61 kDa che catalizza la mono-ossigenazione della luciferina di coleottero, come mostrato in figura.

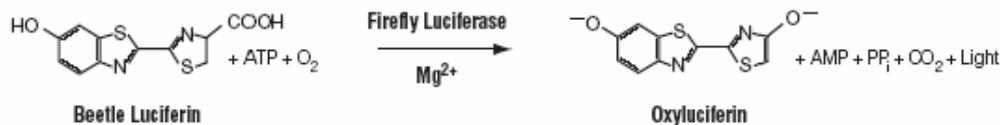


Figura 7. Reazione catalizzata dalla luciferasi. La mono-ossigenazione della luciferina è catalizzata dalla luciferasi in presenza di Mg²⁺, ATP e ossigeno molecolare.

Tale luciferina è una molecola relativamente stabile trovata solo nei coleotteri luminosi (che comprendono le lucciole). L'enzima usa l'ATP come cofattore, sebbene gran parte dell'energia per la produzione di un fotone venga dall'ossigeno molecolare. La luciferina ossidata produce un flash di luce ($t_{1/2} = 0.3$) con una resa quantica di bioluminescenza di circa 0.9. Il segnale è rilevato dal luminometro dopo che il reagente è stato messo nel lisato cellulare.

3.5.3. Reagenti utilizzati

Steady-Glo[®] Reagent

Per poter rilevare il segnale abbiamo utilizzato, come reagente per l'enzima, lo Steady-Glo[®] Reagent che fa parte del Luciferase Assay System della Promega. Questo è disegnato per la quantificazione ad alta resa dell'espressione della luciferasi nelle cellule di mammifero che viene fatta comunemente dall'elaborazione sequenziale di piastre da 96,

384 e 1536 pozzetti. Questo saggio permette di ottenere un'emi-vita della luminescenza di oltre 5 ore a 22°C. Generalmente, però, all'aumento dell'emi-vita della luminescenza corrisponde una diminuzione della sensibilità del saggio: così anche lo Steady-Glo® Reagent permette sì di rilevare la luminescenza per un lungo tempo (cambiando solo del 10% ogni ora), ma per ottenere questa lunga durata si riduce la sensibilità del saggio.

Inoltre, lo Steady-Glo® Reagent fornisce una maggiore precisione del saggio rispetto ad altre formulazioni perché è più tollerante alle variazioni nelle concentrazioni dei reagenti. Grazie a questa tolleranza, gli scostamenti nella luminescenza tra i pozzetti dovuti a vari motivi (come mescolare in modo incompleto le soluzioni, errori di pipettamento o evaporazione dei campioni) sono minimizzati. Questo è particolarmente importante nel nostro caso in cui, usando piastre da 96 pozzetti, risulta più difficile raggiungere un accurato pipettamento e mescolamento dei campioni.

Glo Lysis Buffer

Glo Lysis Buffer, 1X, è una formulazione brevettata che promuove la rapida lisi (entro 5 minuti) delle cellule di mammifero in coltura, senza che sia richiesto lo scraping delle cellule aderenti ed ovviamente è compatibile con lo Steady-Glo® Assay Reagent per l'analisi dell'espressione della Firefly Luciferasi.

3.5.4. Rilevazione dei segnali in fluorescenza e luminescenza

Abbiamo valutato il segnale in fluorescenza per i pozzetti GFP+Mutato e GFP+Wild-type innanzitutto osservando le cellule con il microscopio a fluorescenza invertito ad un ingrandimento 10X prima a fresco e poi in fluorescenza: questo è stato necessario per valutare con certezza che la trasfezione fosse avvenuta e per valutare empiricamente l'efficienza di trasfezione. Successivamente, dopo aver tolto il terreno dai pozzetti per

evitare che influenzasse la lettura, abbiamo valutato il segnale della fluorescenza emessa/secondo dai singoli pozzetti con il contatore Victor² della PerkinElmer sfruttando il software Wallac 1420: in questo secondo modo abbiamo ottenuto una valutazione numerica che ci ha permesso poi di normalizzare i dati ottenuti in luminescenza. Nella lettura lo strumento utilizza un filtro a 485 nm per l'eccitazione e uno a 535 nm per l'emissione. Solo dopo la lettura della fluorescenza si può procedere alla lettura in luminescenza poiché quest'ultima richiede la lisi cellulare. La lettura della luminescenza emessa dalla luciferasi è stata fatta utilizzando sempre il contatore Victor² sfruttando la sua attività come luminometro. Come abbiamo già detto, la lettura deve essere preceduta dalla lisi cellulare e dall'aggiunta dell'opportuno substrato nel seguente modo:

- si rimuove il terreno dai pozzetti della piastra e si lava con PBS 1X
- si aggiungono 100 µl di Glo Lysis Buffer ad ogni pozzetto, si scuote la piastra e si lascia ad incubare per 5' a temperatura ambiente per permettere la lisi cellulare
- si aggiungono 100 µl di Steady-Glo[®] Assay Reagent e si attendono 5'
- si procede alla misurazione della luminescenza con un tempo di misurazione pari ad 8" e facendo anche più letture della stessa piastra.

3.5.5. Elaborazione dei dati

Le trasfezioni con GFP sono necessarie per verificare l'avvenuta trasfezione (e quindi che la metodica utilizzata sia corretta) e per normalizzare i dati che otterremo in luminescenza: si tratta di un controllo interno che ci rende indipendenti dal numero di cellule trasfettate.

Dopo aver valutato la fluorescenza sulla piastra da 96 pozzetti schermata, abbiamo elaborato i dati ottenuti facendo innanzitutto una media dei valori dei pozzetti che provenivano dallo stesso pozzetto della piastra da 6, in modo da ottenere un unico valore per ogni trasfezione

indipendente. Sugli stessi pozzetti schermati è stato poi letto il segnale in luminescenza considerando i CPS (colpi per secondo) e su questi dati è stato fatto lo stesso calcolo. I valori ottenuti sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati ricavati da ogni pozzetto della piastra da 6. La normalizzazione è stata effettuata nel seguente modo:

$$\frac{\text{Valore in Luminescenza Calcolato}}{\text{Valore in Fluorescenza Calcolato}} = \text{VALORE in LUMINESCENZA NORMALIZZATO (indipendente dal numero di cellule trasfettate)}$$

Questi valori vengono confrontati tramite analisi statistica (test t di Student) per valutare se esiste una differenza di segnale tra i pozzetti GFP+MUT e GFP+WT e quindi una differenza di espressione tra il plasmide con le mutazioni e quello wild-type.

3.6 ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE DI MSC DA SANGUE MIDOLLARE

Da un prelievo di sangue midollare di un paziente affetto da Sindrome TAR abbiamo isolato, espanso, caratterizzato e indotto al differenziamento *in vitro* in senso osteogenico una popolazione di cellule staminali mesenchimali.

3.6.1 - Isolamento

L'aliquota di sangue midollare è stato diluito 1:4 con soluzione PBS, stratificato su FICOLL in una provetta da 15 ml a fondo conico e centrifugato per 30' a 1500 rpm. Lo strato all'interfaccia di FICOLL e plasma contenente cellule staminali mesenchimali, linfociti, monociti, precursori e progenitori emopoietici è stato in seguito raccolto, lavato per due volte in PBS mediante centrifugazione per 5 minuti a 1000 rpm. Il nuovo pellet è stato risospeso in 5 ml di DMEM 20% FBS. E' stata condotta una prima aderenza in fiasca mediante incubazione di 1h a 37°C e al 5% CO₂. I monociti aderiscono per primi sulla plastica, il sovrnatante è stato raccolto e nuovamente centrifugato per 5' a 1000 rpm. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di DMEM 20% FBS; 10ul di tale sospensione sono stati prelevati e uniti a 90 ul di soluzione di metilvioletto: sono state dunque contate le cellule mononucleate. Le cellule sono state riseminate in ragione di 10⁶ mononucleate su cm² di superficie di aderenza in fiasche T25 con 5 ml di DMEM al 20% FBS. Le fiasche sono state riposte in incubatore a 37°C e al 5% CO₂. Dopo 7 giorni sono state eliminate le cellule non aderenti eliminando il terreno esausto e sostituendolo con DMEM al 10% FBS.

3.6.2 - Espansione in coltura

Dopo alcune settimane di coltura, con controlli quotidiani al microscopio ottico invertito e cambi di terreno DMEM addizionato al 10% di FBS ogni tre giorni, le colture primarie così isolate hanno raggiunto la confluenza e sono state distaccate dalle fiasche a confluenza per essere seminate espanse su una superficie doppia.

Il protocollo di taglio prevede l'eliminazione dalle fiasche del normale terreno di coltura, il doppio lavaggio della superficie di aderenza con PBS in ragione di 130 ul su cm², l'impiego di una soluzione proteolitica di Tripsina/EDTA diluita in PBS in rapporto 1:5 da aggiungere in ragione di 27 ul su cm² di superficie di aderenza.

Dopo circa 3 minuti di incubazione a 37°C si osserva il distacco delle cellule: si neutralizza immediatamente la tripsina aggiungendo un volume di DMEM al 10% di FBS pari o superiore al volume di soluzione proteolitica utilizzata.

Tale risospensione viene centrifugata per 5 minuti a 1000rpm, si elimina il sovrantante contenente frammenti cellulari, eventuale matrice extracellulare e tripsina, si risospende il pellet in 1 ml di DMEM 10% FBS.

Viene eseguita una conta cellulare per mezzo della camera di Neubauer con colorazione vitale di Trypan Blue ad ogni taglio.

Il volume di sospensione viene diviso in due aliquote equivalenti riseminate in fiasche con l'aggiunta di 11,5ml di DMEM al 10% FBS per fiasca; le due nuove fiasche vengono messe in incubazione a 37°C e atmosfera al 5% CO₂.

3.6.3 - Caratterizzazione immunofenotipica

E' stata eseguita una caratterizzazione immunofenotipica delle cellule isolate da midollo osseo mediante saggio al citofluorimetro. Il saggio è stato effettuato per i seguenti anticorpi fluorescinati* o coniugati con anticorpo secondario fluorescinato^o: mAb* anti CD29, mAb* anti

CD166, mAb* anti CD14, mAb* anti CD 34, mAb *anti CD45, mAb° SH2, mAb° SH3, mAb° SH4 (Osiris Therapeutics).

Le cellule sono state distaccate, raccolte e contate; sono state distribuite nella ragione di 10^5 per saggio e trattate con $1\mu\text{g}$ del rispettivo anticorpo per 45 minuti in ghiaccio e al buio, poi lavate due volte con PBS.

Per l'analisi citofluorimetrica 10^4 eventi per saggio sono stati acquisiti tramite FACS Calibur Instrument e l'analisi eseguita con il software CellQuest.

3.6.4 - Differenziamento osteogenico in vitro

Le cellule vengono recuperate, contate e seminate ad una concentrazione di 3000 su cm^2 in fiasche T25 (FALCON) e chamber slides in permanox con terreno DMEM 10% FBS e lasciate aderire per una notte. Il giorno seguente il terreno viene sostituito con di terreno di induzione nella ragione di $200\mu\text{l}$ su cm^2 . Il terreno di induzione, acquistato da Stem Cell Technologies, contiene MesenCult Basal Medium, Osteogenic stimulatory supplements 15%, soluzione di acido ascorbico $0,5\mu\text{M}$, dexamethasone $0,1\mu\text{M}$, β -glicerol fosfato 10mM.

L'induzione procede per due settimane con cambi di terreno di induzione ogni 3 giorni. Al termine dell'induzione le cellule coltivate in fiasca vengono staccate e trattate per l'estrazione dell'RNA per successive PCR, le chamber slides vengono smontate e le cellule fissate in formalina 10% per il saggio di Von Kossa.

Saggio istochimico di Von Kossa

Per rilevare il differenziamento osteogenico si esegue un saggio funzionale sulla deposizione di sali di calcio da parte delle cellule. I vetrini sono stati inizialmente fissati in etanolo, di seguito idratati e trattati per 10-15 minuti in una soluzione acquosa di nitrato di argento allo 0,5-1%, infine esposti alla luce ultravioletta. Sono stati sciacquati in acqua distillata, immersi per 5 minuti in una soluzione acquosa al 5% di

tiosolfato di sodio e lavati in acqua corrente. I nuclei si colorano aggiungendo per 30 secondi una soluzione acquosa all'1% di rosso neutro. Infine sono stati montati i vetrini in mezzo acquoso, chiarificando in xilene e montando in resina sintetica. Fosfato e carbonato di calcio appaiono colorati in nero, i nuclei in rosso.

4. RISULTATI

4.1. RISULTATI DELL'ANALISI MOLECOLARE DEL GENE CODIFICANTE IL TGF β 2

Il sequenziamento automatico del gene codificante per il TGF β 2 (effettuato con il sequenziatore ABI-PRISM 377) ha permesso di mettere in luce 2 mutazioni che potrebbero essere una delle cause della sindrome.

Le due mutazioni trovate sono mostrate nelle figure.

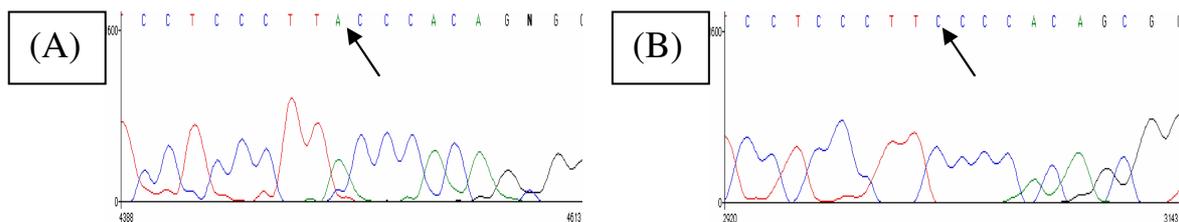


Figura 8. Elettroferogrammi del sequenziamento automatico (sequenziatore ABI-PRISM 377) della regione 5'-non codificante del gene per il TGF β 2: sostituzione di A con C in posizione 2114. (A) Wild-type; (B) Mutato.

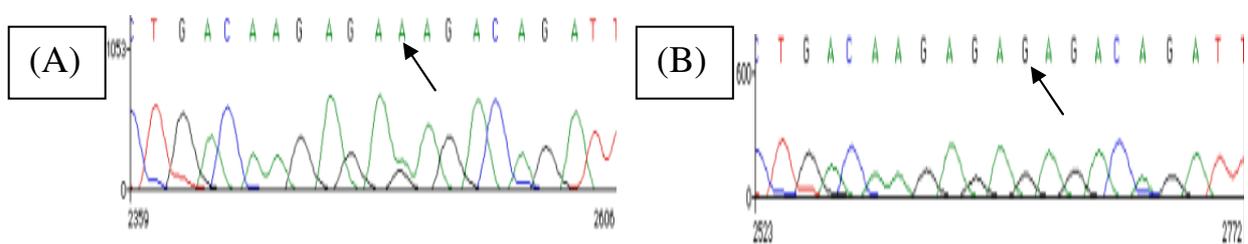


Figura 9. Elettroferogrammi del sequenziamento automatico (sequenziatore ABI-PRISM 377) della regione 5'-non codificante del gene per il TGF β 2: sostituzione di A con G in posizione 2339. (A) Wild-type; (B) Mutato.

Come si nota le due mutazioni sono: sostituzione di A con C in posizione 2114 ed sostituzione di A con G in posizione 2339 (tali posizioni corrispondono a quelle della sequenza di riferimento GeneBank M87843) appartenenti entrambe alla regione 5'-non codificante del TGFβ2.

Oltre a queste ce ne sono molte altre nella zona regolatoria del gene, le quali però non si possono definire mutazioni ma polimorfismi, in quanto sono presenti anche in individui normali sequenziati.

Le posizioni menzionate sono numerate in base alla sequenza di riferimento GeneBank M87843, lunga 5579bp, che comprende la regione 5'-non codificante del TGFβ2 umano. Ciò che ci ha portato ad analizzare il ruolo di queste due mutazioni è stata anche la loro posizione. Nello studio dal quale è stata ottenuta la sequenza GeneBank M87843 [Noma et al., 1991] si sottolinea il ruolo regolatore della medesima sequenza nell'espressione del gene del TGFβ2. Questa regione, infatti, contiene la regione regolatoria TATAbox (posizione 2248), l'inizio del 5'-UTR (posizione 2278), alcuni siti di legame per fattori di trascrizione (AP-1, AP-2, CRE e SPJ-like DNA consensus sequences), 2 ORF rispettivamente di 5 e 45 aminoacidi che stanno a monte dell'ATG che dà inizio alla coding sequence (CDS) del TGFβ2. Le nostre mutazioni, in particolare, si trovano una a monte della TATAbox e l'altra a valle dell'inizio del 5'-UTR.

Abbiamo cercato di riassumere questi dati nella figura seguente:

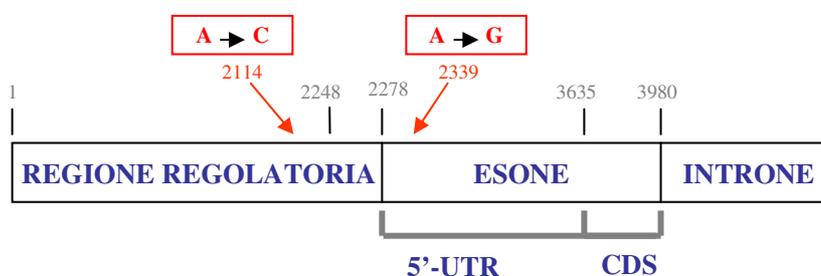


Figura 10. Schema della regione 5'-non codificante del gene del TGFβ2 estrapolata dall'articolo di Noma et al., 1991.

4.2. RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI BIOINFORMATICA

La sequenza recante le mutazioni è stata sottoposta ad un'indagine bioinformatica per saggiare la presenza di fattori di trascrizione che si legano nell'intorno delle nostre mutazioni. L'analisi è stata eseguita sui siti www.alibabà.com e www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess.

Per quel che riguarda la prima mutazione (in posizione 2114) è emerso che sul codone ccc a monte si lega AML-1; mentre sulla seconda mutazione (in posizione 2339) sembra trovarsi il fattore IRF-1 che si lega 6 basi a valle e riconosce la sequenza **ctgacaagagaAag** (abbiamo evidenziato la nostra base A in esame, che verrebbe sostituita con G nel mutato).

Inoltre tramite consultazione di PubMed che questi due fattori siano strettamente correlati. In particolare IRF-1 è molto probabilmente un attivatore di AML1 la cui inattivazione implica diversi disordini ematopoietici.

4.3. RISULTATI DELL' RT-PCR COME SAGGIO DI LINEE CELLULARI COMPATIBILI

Per verificare in quali linee cellulari sono o non sono presenti i fattori di trascrizione che si legano alla regione delle mutazioni, dopo RT-PCR esaminiamo il gel di agarosio al transilluminatore:

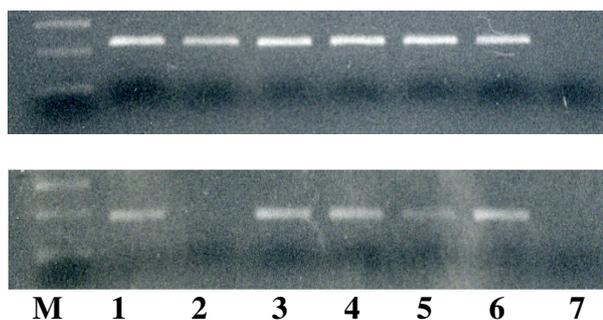


Figura 11. Gel della RT-PCR per AML1 e IRF1.

1- HL-60; 2- Cos1; 3-5637; 4- HepG₂; 5- CaCo₂; 6- SaOs; 7- Controllo negativo

Dopo l'analisi delle linee candidate si è quindi concluso che le Cos1 non possono essere usate nel nostro saggio perché non contengono la sequenza di interesse. Si procede quindi ad una serie di trasfezioni preliminari per verificare quale linea sia più adatta.

Si decide quindi di utilizzare le 5637 in quanto resistenti alla metodica della trasfezione (che comprende uno shock con glicerolo) e permettono di avere di conseguenza una maggiore efficienza di trasfezione.

4.4. RISULTATI OTTENUTI DALLE TRASFEZIONI CON GFP+MUT E GFP+WT: NORMALIZZAZIONE DEI VALORI RILEVATI IN LUMINESCENZA

Innanzitutto abbiamo valutato la fluorescenza osservando le cellule al microscopio a fluorescenza invertito ad un ingrandimento 10X, prima a fresco e poi in fluorescenza:

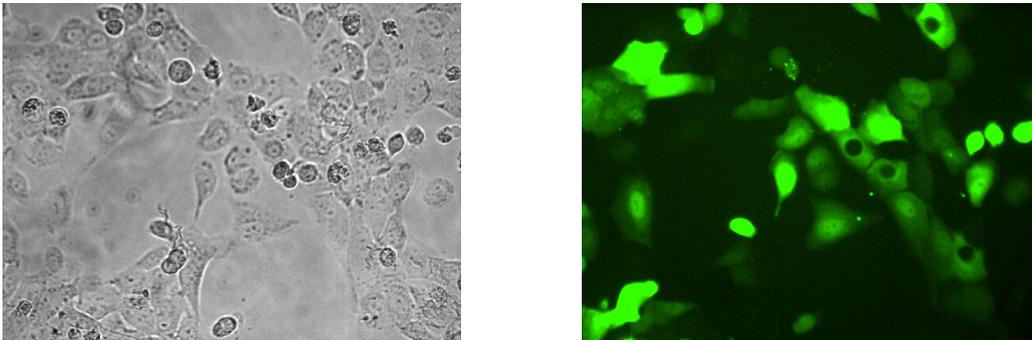


Figura 12. Trasfezioni con GFP+MUT a fresco e in fluorescenza.

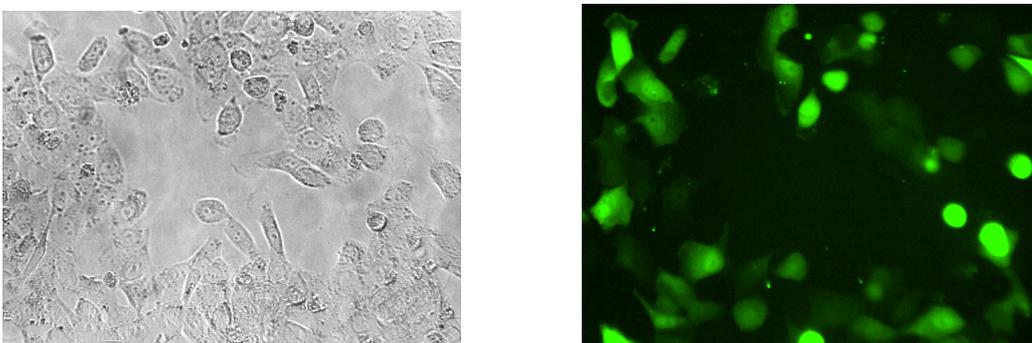


Figura 13. Trasfezioni con GFP+WT a fresco e in fluorescenza.

Osservando in questo modo le cellule al microscopio, abbiamo valutato empiricamente l'efficienza di trasfezione. Come è visibile anche dalle figure sopra riportate, essa è risultata maggiore del 50%.

Dopo la lettura al Victor² sia in fluorescenza che in luminescenza dall'elaborazione dei dati sono state ottenute le rispettive normalizzazioni (abbiamo moltiplicato i valori normalizzati per 1000 allo scopo di rendere i dati più leggibili):

	GFP+MUT	GFP+WP
1	1,3424008	1,36402945
2	1,01806062	0,80822173
3	1,29056047	1,6559033
4	1,79354324	1,69262018
5	1,27379995	1,07847491
6	0,44785478	0,45506947
7	0,22613471	0,18868815
8	0,29798646	0,45631647
9	0,29074463	0,30661824
10	0,34055596	0,35101267
11	0,67782183	0,56557856
12	0,87148522	0,91906516
13	1,02079094	1,05213415
14	0,33964507	0,26963868
15	1,26546682	1,18694362
16	1,28139416	0,99745096
17	2,24550898	2,35072873
18	1,08577633	1,21482081
19	1,13177041	1,20793788
20	1,02082483	0,98619329
21	0,84638172	1,27186010
22	1,25444282	1,22599101
23	0,89319200	1,36774000
24	1,65900000	2,06000000
Media	0,99646428	1,04304323

Tabella 3. Valori in luminescenza normalizzati ottenuti da ogni singola trasfezione con GFP+MUT e GFP+WT.

Poiché ogni pozzetto della piastra da 6 rappresenta una trasfezione indipendente, l'approccio statistico che abbiamo sfruttato è stato proprio quello del confronto di campioni indipendenti, in altre parole il test t di Student. I campioni confrontati sono dati dall'insieme delle medie calcolate presenti in tabella.

Ognuna di queste medie è dunque rappresentativa di una prova indipendente. Ed anche i campioni sono totalmente indipendenti l'uno dall'altro nel senso che le unità sperimentali che li compongono (l'insieme di cellule di un pozzetto) si suppone che siano state estratte dalla stessa popolazione e assegnate a caso all'uno o all'altro trattamento di trasfezione.

L'ipotesi nulla che si premette (cioè quella con cui dobbiamo confrontare i risultati da noi ottenuti) è che la differenza che osserviamo tra i due campioni è dovuta al caso: in altre parole, che non esistano differenze in guadagno di espressione tra i due campioni, cioè $\mu_1 = \mu_2$.

Si calcola il t di Student :

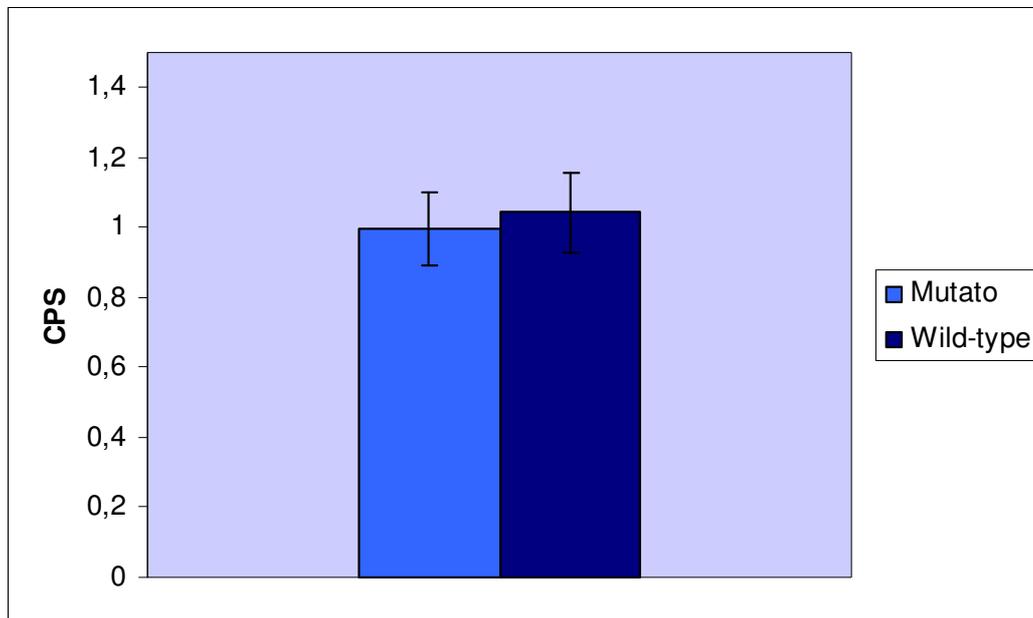
$$t = \frac{(\bar{X}_{WT} - \bar{X}_{MUT}) - (\mu_1 - \mu_2)}{es}$$

Ma poiché $\mu_1 = \mu_2$, allora $\mu_1 - \mu_2 = 0$, perciò il t diventa (con 24 gradi di libertà):

$$t = 1,59112296$$

Confrontando questo valore con quelli tabulati non possiamo rifiutare l'ipotesi nulla, sostenendo che il WT mostra un'espressione analoga a quella MUT. Di conseguenza si conclude che la mutazione non ha alcun effetto.

L'istogramma che rappresenta al meglio i risultati ottenuti è il seguente:



L'errore standard rappresentato (ES) è quello calcolato sulle medie, ricavato dalla formula:

$$ES = \frac{\text{Deviazione standard}}{\sqrt{n}}$$

4.5. RISULTATI DELL'ISOLAMENTO ED ESPANSIONE DI MSC DA MIDOLLO OSSEO

Sono state isolate cellule aderenti su plastica di aspetto simil fibroblastico che raddoppiano in numero, venendo dunque tagliate ed espanse, ogni circa 7 giorni.

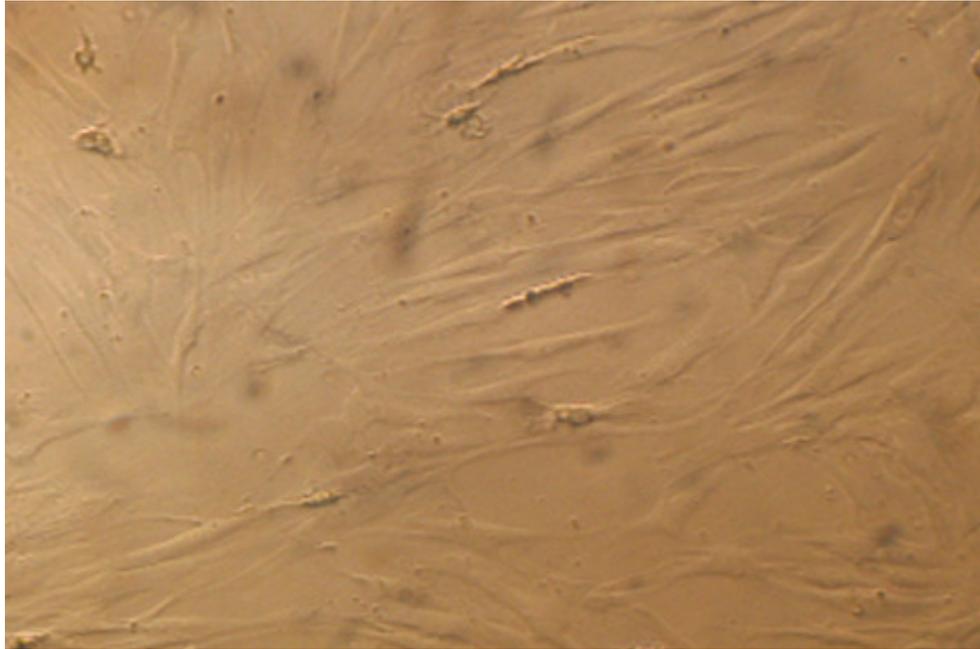


Figura 14. Cellule staminali mesenchimali, isolate da prelievo di sangue midollare di un paziente TAR, fotografate a fresco.

4.6. RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA

Le cellule selezionate dalla coltura in vitro sono state analizzate fenotipicamente mediante citometria a flusso. E' stata valutata la presenza o l'assenza di antigeni di superficie utilizzando una serie di anticorpi monoclonali anti CD29, anti CD166, SH2, SH3, SH4 (che risultano solitamente positivi nelle MSC isolate da midollo osseo normale) e anti CD14, anti CD 34, anti CD45 che risultano negativi.

La caratterizzazione immunofenotipica ha messo in risalto una caratteristica peculiare di queste cellule che risultano essere negative (Fig.) all'SH2 (anti CD105) che riconosce i recettori per il TGF β 1 e TGF β 3 .

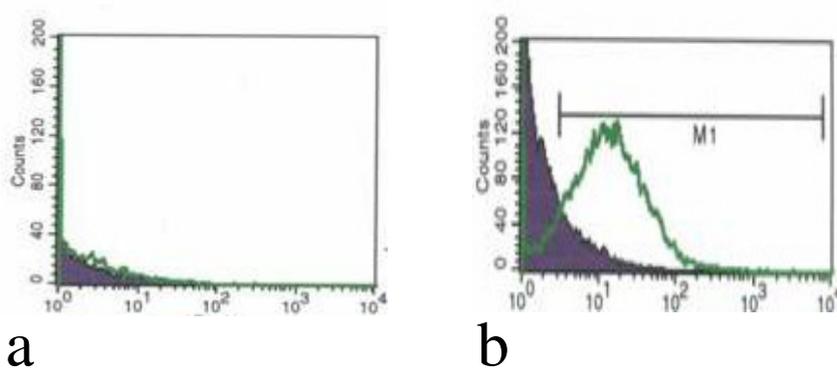


Figura 15. Grafici che mostrano in **a** la negatività all'SH2 e in **b** positività all'SH3.

4.7. RISULTATI DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

Grazie all'induzione con acido ascorbico, dexamethasone e β -glicerol fosfato le cellule mesenchimali staminali isolate sono risultate in grado di differenziare funzionalmente *in vitro* in cellule capaci di mineralizzare con sali di calcio la matrice extracellulare, come rivelato dalla colorazione istochimica di Von Kossa. (Fig)

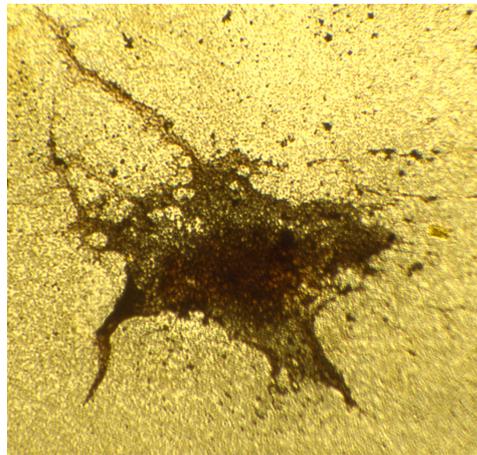


Figura 16. Differenziamento Osteogenico: colorazione di Von Kossa.

5. DISCUSSIONE

La sindrome TAR è una rara associazione di trombocitopenia ed aplasia bilaterale del radio, la cui espressione e gravità possono essere molto varie ma comprendono in genere anomalie ematologiche, anomalie scheletriche, disfunzioni cardiache ed altre anomalie minori.

La trombocitopenia congenita o neonatale (che si evidenzia in quasi il 90% dei casi entro i primi 4 mesi) è associata a ipomegacariocitosi midollare. Quanto all'assenza del radio, essa si presenta nel 100% dei casi, tanto che la diagnosi di sindrome TAR non può prescindere dalla completa assenza del radio bilateralmente per essere presa in considerazione. Anche l'ulna presenta anomalie, mancando bilateralmente in circa il 20% ed unilateralmente nel 10% dei casi; è comunque malformata in tutti i pazienti. Un quadro di tetrafocomelia, caratterizzato da aplasia degli arti inferiori oltre che superiori, è stato documentato solo in 5 pazienti: queste osservazioni sono importanti per sottolineare come la sindrome possa essere caratterizzata da una espressività clinica estremamente variabile. Dunque è importante sottolineare il fatto che la trombocitopenia e la mancanza bilaterale del radio sono le manifestazioni principali, ma la sindrome è caratterizzata da una espressività clinica estremamente variabile.

Fin dalle prime segnalazioni (1969), appare chiara l'implicazione genetica della sindrome che si manifesta nelle famiglie con eredità autosomica recessiva, comportando quindi, per i genitori di un bambino affetto, un rischio del 25% di generare un altro figlio affetto dalla stessa sindrome. E' interessante notare che non sembra esservi un aumento di incidenza di consanguineità nelle famiglie dei pazienti come ci si dovrebbe attendere per una condizione autosomica recessiva relativamente rara, inoltre la proporzione osservata di fratelli affetti risulta di 1:7, cioè inferiore all'1:4 atteso per un classico carattere recessivo. A tal proposito si ipotizza in primo luogo che la sindrome non sia in effetti così rara ed inoltre si pensa alla simultanea presenza di due

mutanti alleli non identici (uno dei quali con frequenza relativamente alta nella popolazione) che darebbero origine a diversi composti genetici, caratterizzati dall'allele per l'anemia di Fanconi da un lato e da quello della sindrome di Roberts dall'altro [Hall et al., 1969]. Altri studi, invece, ribadiscono la possibilità che esistano alleli multipli per il locus della sindrome TAR, combinazione dei quali potrebbero dare origine alla medesima, mentre altre essere responsabili di condizioni fenotipicamente simili come l'anemia di Fanconi o la focomelia di Roberts [Ward et al., 1986]. Per la relativa frequenza del gene, inoltre, la sindrome TAR potrebbe occasionalmente apparire con eredità dominante se un individuo affetto omozigote si unisse ad un portatore del gene (pseudodominanza).

Appare evidente, quindi, come la sindrome TAR rappresenti un disordine geneticamente eterogeneo o il risultato di un gruppo di alleli correlati, considerando l'immediata affinità con la focomelia di Roberts ed alcuni casi di trisomia 18. L'esatto meccanismo che durante l'embriogenesi conduce alle multiple anomalie congenite della sindrome TAR non è noto, ma l'evidenza che nell'uomo gli arti si formano tra la 4^a e l'8^a settimana di sviluppo embriogenico (le braccia prima delle gambe) contemporaneamente allo sviluppo delle camere del cuore e degli elementi del sangue, suggerisce che il gene responsabile agisca specificamente durante questo intervallo [Hall, 1987; 1995]

Per spiegare gli effetti pleiotropici di un gene mutante che può colpire un sistema solo in un determinato momento dello sviluppo embriologico (difetti del sistema scheletrico e cardiovascolare) e interessarne un altro in modo continuo o intermittente (sistema ematopoietico), è stato ipotizzato che una mutazione genica sia responsabile di un cambiamento nella struttura o nella sintesi di una proteina, la cui regolazione si manifesterebbe in modo ed in tempi diversi nei vari sistemi; in particolare, tale alterazione potrebbe riguardare determinate citochine, specifici fattori di crescita e/o i relativi recettori.

Nel 1994 è stato purificato e clonato un nuovo fattore ematopoietico noto con il nome di Trombopoietina (TPO), citochina considerata da tempo

come il maggior regolatore della megacariocitopoiesi e della trombocitopoiesi. Studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato la sua attività stimolante sulle colonie megacariocitarie, così come la sua funzione di fattore di maturazione megacariocitaria e di regolazione positiva sulla produzione piastrinica in vivo. Il recettore per TPO è risultato essere il prodotto del proto-oncogene c-mpl ed è espresso sull'intera linea megacariocitaria, dallo stadio avanzato di cellula progenitrice fino al prodotto piastrinico.

Uno studio tedesco ha escluso che la patofisiologia della trombocitopenia TAR-correlata sia dovuta a difetto nella produzione di TPO, individuando piuttosto una mancata risposta alla TPO a livello del meccanismo di trasduzione del segnale recettoriale. Infatti, in 5 pazienti affetti da sindrome TAR sono stati evidenziati elevati livelli sierici di TPO ed è stato provato che il relativo recettore c-mpl è normalmente espresso sulla superficie piastrinica con peso molecolare di 86 kD, sovrapponibile a quello espresso sulle piastrine dei controlli sani (4/4); nelle piastrine dei pazienti affetti è stato, invece, possibile rilevare in vitro una mancata risposta a TPO ricombinante, rappresentata da ridotta o assente fosforilazione tirosinica delle proteine piastriniche intracitoplasmatiche. [Ballmaier et al., 1997]

Inoltre, da uno screening mutazionale fatto sul gene per il c-mpl è emerso che mutazioni identificate nell'introne 10 non siano coinvolte nella patogenesi dei difetti della megacariocitopoiesi nei 4 pazienti TAR investigati e si esclude che un recettore anomalo porti ad una risposta inaspettata alla somministrazione clinica di TPO (come invece avviene nel caso delle mutazioni di altri membri della famiglia dei recettori per citochine) [Strippoli et al., 1998].

La trombocitopenia quindi è dovuta ad un difetto nella produzione piastrinica, anche se risultati sperimentali ottenuti nel laboratorio di Ematologia Sperimentale di Bologna mostrano come le CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte) rispondano in vitro alla TPO e crescano in maniera del tutto simile a quella dei soggetti sani (dati non

ancora pubblicati). Ciò dimostrerebbe che i progenitori megacariocitari non sono intaccati nella malattia e che il c-mpl è funzionante.

Per quanto riguarda il danno osseo è la superfamiglia dei TGF β quella che sembra giocare un ruolo importante nell'osteogenesi.

E' stato di conseguenza sequenziato il gene che codifica per il TGF β 2 (presente sul cromosoma 1) al fine di dimostrare l'ipotesi che questo fattore di crescita, che gioca ruoli fondamentali nei processi di sviluppo e di differenziazione mesenchimale, sia implicato nella patogenesi della sindrome TAR. Questa ipotesi è ulteriormente avvalorata da studi condotti su topi knockout per il TGF β 2 [Philip Sanford et al., 1997] i quali presentano anomalie multiple nello sviluppo, le quali non sono sovrapponibili ai fenotipi dei topi knockout per altri TGF β .

La distruzione mirata del gene codificante per il TGF β 2 è stata presa in considerazione appositamente per determinare i ruoli essenziali che esso ha in vivo: la casistica riferita a questi topi knockout evidenzia una elevata mortalità perinatale ed un range molto vasto di anomalie del sangue, dello scheletro e di altri organi. Queste anomalie provocate dalla mancanza del gene per il TGF β 2 durante la gestazione murina, sono dimostrazione del ruolo fondamentale svolto da questo fattore di crescita nella trasformazione delle cellule mesenchimali (da cui poi deriveranno numerosi tessuti e l'intero apparato circolatorio) ed avvalorano l'ipotesi che il TGF β 2 sia implicato nella patogenesi della sindrome TAR (ad ulteriore conferma di tutto ciò è la perfetta sovrapposizione del quadro clinico dei topi knockout per il TGF β 2 e quello degli individui affetti da sindrome TAR).

Il sequenziamento automatico del gene codificante per il TGF β 2 ha permesso di mettere in luce mutazioni che potrebbero essere una delle cause della malattia. Sono stati sequenziati tutti gli individui malati delle famiglie TAR e si sono trovate 2 mutazioni nel paziente della famiglia: sostituzione di A con C in posizione 2114 e sostituzione di A con G in posizione 2339 della sequenza di riferimento GeneBank M87843, lunga 5579 bp, che comprende la regione 5'-non codificante del TGF β 2 umano. Le due mutazioni non sono state individuate nei 60 individui

normali. Oltre a queste ce ne sono molte altre nella zona del promotore del gene, le quali però non si possono definire mutazioni ma polimorfismi in quanto sono presenti anche in individui normali sequenziati.

Ciò che ci ha portato ad analizzare il ruolo di queste due mutazioni è stata anche la loro posizione. Nello studio dal quale è stata ottenuta la sequenza GeneBank M87843 [Noma et al., 1991] si sottolinea il ruolo regolatore della medesima sequenza nell'espressione del gene del TGF β 2. Questa regione, infatti, contiene la regione regolatoria TATAbox (posizione 2248), l'inizio del 5'-UTR (posizione 2278), alcuni siti di legame per fattori di trascrizione (AP-1, AP-2, CRE e SPJ-like DNA consensus sequences), 2 ORF rispettivamente di 5 e 45 aminoacidi che stanno a monte dell'ATG che dà inizio alla coding sequence (CDS) del TGF β 2. Le nostre mutazioni, in particolare, si trovano una a monte della TATAbox e l'altra a valle dell'inizio del 5'-UTR.

Abbiamo voluto sottoporre la nostra sequenza recante le mutazioni ad un'indagine bioinformatica. Da questa sono emersi alcuni fattori di trascrizione che si legano proprio nell'intorno delle nostre mutazioni : per quel che riguarda la prima mutazione è emerso che, nella sequenza di 6 bp subito a valle, si lega AML-1; mentre sulla seconda mutazione sembra legarsi il fattore IRF-1. Questo ci ha permesso di saggiare tramite RT-PCR linee cellulari differenti e successivamente di scegliere come linea da utilizzare quella delle 5637.

Tutte queste supposizioni ci hanno spinti a questo primo approccio sperimentale per valutare l'attività delle due mutazioni. Innanzitutto abbiamo amplificato tramite PCR il frammento recante le mutazioni e lo abbiamo clonato all'interno di un plasmide a monte del gene codificante la luciferasi di lucciola: questo enzima, in presenza dell'opportuno substrato, emette luce rilevabile al luminometro. Abbiamo anche utilizzato un plasmide codificante la GFP (Green Fluorescent Protein) da utilizzare come controllo interno nelle singole trasfezioni per poter essere indipendenti dal numero di cellule trasfettate.

Essendo il numero delle prove di trasfezione sufficiente per diminuire l'errore standard delle medie è stato calcolato t di Student per rendere così più sicuro il nostro risultato. Appare quindi chiaro che le due mutazione non hanno alcun effetto sull'espressione del gene e che le cause della TAR dovrebbero essere ricercate altrove.

I nostri sforzi finora si sono principalmente concentrati sul ruolo del TGF β 2 tuttavia anche il TGF β 1 e il TGF β 3 e i loro recettori potrebbero giocare un ruolo importante nella fisiopatologia della sindrome TAR. La nostra attenzione si è di recente spostata sull'isolamento delle cellule staminali mesenchimali da midollo osseo e fonti alternative. Da un prelievo di sangue midollare di un paziente TAR siamo riusciti ad isolare un numero sufficiente di cellule mesenchimali totipotenti che abbiamo caratterizzato immunofenotipicamente e indotto al differenziamento *in vitro*. Abbiamo quindi riscontrato che queste cellule sono capaci di differenziare *in vitro* in senso osteogenico ma appaiono negative, all'indagine citofluorimetrica, all'anticorpo SH2 (CD105 o endoglobina) che riconosce il recettore per il TGF β 1 e TGF β 3. Sappiamo che il TGF β 1 è il più potente inibitore della megacariocitopoiesi mentre il TGF β 3 è un fattore di crescita importante per la condrogenesi. Alla luce dei risultati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica i recettori per il TGF β 1 e il TGF β 3 potrebbero essere coinvolti nella sindrome TAR, bisognerebbe quindi approfondire il ruolo delle 3 isoforme di TGF β e dei loro recettori considerato che la superfamiglia dei TGF β è coinvolta nella replicazione e nel differenziamento delle cellule mesenchimali soprattutto nel differenziamento in senso osteogenico e condrogenico. Questo risultato, seppur isolato a causa della rarità della malattia e della scarsità di prelievi di midollo, suggerirebbe che la Sindrome TAR rappresenta un mosaicismo di anomalie genetiche coinvolgenti anche le cellule mesenchimali staminali.

BIBLIOGRAFIA

Anyane-Yeboah K.; Jaramillo S.; Nagel C.; Grebin B.: **Tetraphocomelia in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii (TAR syndrome)**. *Am. J. Med. Genet.* 20: 571-576, 1985.

Armitage J. O.; Hoak J. C.; Elliott T. E.; Fry G. L.: **Syndrome of thrombocytopenia and absent radii: qualitative normal platelets with remission following splenectomy (sic)**. *Scand. J. Haemat.* 20: 25-28, 1978.

Atkins M. B.; Kappler K.; Mier J. W.; Isaacs R. E.; Berkman E. M.: **Interleukin-6-associated anemia: determination of the underlying mechanism**. *Blood* 86: 1288-1291, 1995

Ballmaier M.; Schulze H.; Strauss G.; Cherkaoui K.; Wittner N.; Lynen S.; Wolters S.; Bogenberger J.; Welte K.: **Thrombopoietin in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii: elevated serum levels, normal receptor expression, but defective reactivity to thrombopoietin**. *Blood* 90: 612-619, 1997

Barry F.; Boynton R.; Murphy M.; Zaia J.: **The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells**. *Biochem and Biophys Res Comm* 289: 519-524, 2000

Barton, D. E.; Foellmer, B. E.; Du, J.; Tamm, J.; Derynck, R.; Francke, U. : **Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta-2 and beta-3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family**. *Oncogene Res.* 3: 323-331, 1988.

Beffagna G.; Occhi G.; Nava A.; Vitello L.; Ditadi A.; Basso C.; Baule B.; Carraio G.; Tiene G.; Towbin J.A.; Danieli G. A.; Rampazzo A.: **Regulatory mutations in transforming growth factor- β 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1**. *Cardiov. Res.* 65:366-373, 2005

Bianco P.; Riminucci M.; Gronthos.; Gehron Robey P.: **Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications**. *Stem Cells* 19(3):180-192, 2001

Blobe, G. C.; Schiemann, W. P.; Lodish, H. F. : **Role of transforming growth factor beta in human disease**. *New Eng. J. Med.* 342: 1350-1358, 2000.

Brazelton TR.; Rossi FMV.; Keshet GI.; Blau HE.: **From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice**. *Science.* 290:1775-1779. 2000

Bruder SP.; Ricalton NS.; Boynton RE.; Connolly TJ.; Jaiswal N.; Zaia J.; Barry FP.: **Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation**. *J Bone Miner Res* 13(4): 655-63, 1998

- Ceballos-Quintal J. M., Pinto-Escalante D., Gongora-Bianchi R. A.: **TAR-like syndrome in a consanguineous Mayan girl.** *Am J Med Genet* 43:805-807, 1992
- Chin D.; Boyle G. M.; Parsons P. G.; Coman W. B.: **What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)?** *Br J Plast Surg.* 57:215-21, 2004
- Deans RJ.; Moseley AB. **Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses.** *Exp Hem* 28: 875-884, 2000
- Fayen W. T.; Harris J. W.: **Thrombocytopenia with absent radii (the TAR syndrome).** *Am J Med Sci* 280:95-99, 1980
- Ferrari G.; Cusella-De Angelis G.; Coletta M. et al. **Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.** *Science.* 279:528-530, 1998
- Fleishman R.A.; Letestu R.; Mi K.; Stevens D.; Winters J.; Debili N.; Vainchenrer W.: **Absence of mutations in the hox A10; hox A11; and hox D11 nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome.** *Brit. J. Haemat.* 116: 367-375, 2002
- Friedenstein AJ.; Chaikhjan RK.; Gerasimov UV. **Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.** *Cells Tissue Kinet* 20: 263, 1987
- Grant MB.; May WS.; Caballero S. et al. **Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization.** *Nat Med.* 8:607-612 2002
- Greenhalgh K.L.; Howell R.T.; Bottani A.; Ancliff P.J.; Brunner H.G.; Verschuuren-Bemelmans C.C.; Vernon E.; Brown K.W.; Newbury-Ecob R.A.: **Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study.** *J.Med.Genet.* 39:876-881, 2002
- Gross H.; Groh C.; Weippl G.: **Kongenitale hypoplastische Thrombopenie mit Radius-Aplasie, ein Syndrom multipler Abartungen.** *Neue Oest. Z. Kinderheilk.* 1: 574 only, 1956.
- Gussoni E.; Soneoka Y.; Strickland C. et al. **Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.** *Nature.* 401:390-394, 1999
- Hall J. G.; Levin J.; Kuhn J. P.; Ottenheimer E. J.; Van Berkum K. A. P.; McKusick V. A.: **Thrombocytopenia with absent radius (TAR).** *Medicine* 48: 411-439, 1969.
- Hall J. G.: **Thrombocytopenia and absent radius (TAR) syndrome.** *J. Med. Genet.* 24: 79-83, 1987.
- Hall J. G.: **Thrombocytopenia and absent radius (TAR) syndrome.** In: Congenital Malformation Syndromes. Donnai D, Winter R M. Chapman and Hall Medical, London-New York : 283-290, 1995

Hauser F.: **Uber hereditare und symptomatische congenitale thrombopenie.** *Ann paediat (Basel)* 171: 86, 1948

Herodin F.; Mestriers J. C.; Janodet D.; Martin S.; Mathieu J.; Gascon M. P.; Pernin M. O.; Ythier A.: **Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons.** *Blood* 80: 688-695, 1992

Huang S.; Terstappen LWMM. **Formation of hematopoietic micro-environment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells.** *Nature* 360: 745, 1992

Huss R. **Isolation of primary and immortalized CD 34⁺ hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources.** *Stem Cells* 18: 1-9, 2000

Ikebuchi K.; Wong G.G.; Clark S.C.; Ihle J.N.; Hirai Y.; Ogawa M.: **Interleukin-6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 9035-9039, 1987

Jackson K.; Majka SM.; Wang H. et al. **Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.** *J Clin Invest.*107:1395-1402, 2001.

Kopen G.; Prockop D.; Phinney D. **Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10711-10716, 1999

Menghsol S.C.; Harris R.D.; Ornvold K.: **Thrombocytopenia and absent radii, TAR syndrome: report of cerebellar dysgenesis and newly identified cardiac and renal anomalies.** *American J. of Genet.* 123A: 193-196, 2003

Minguell J. J.; Conget P.; Erices A. **Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells.** *Brazilian journal of Medical and Biological Research.* 33:881-887. 2000

Muguruma Y. ; Reyes M. ; Nakamura Y et al. **In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells.** *Exp Hem* 31:1323-1330. 2003

Nieken J.; Mulder N. H.; Buter J.; Vellenga E.; Limburg P. C.; Piers D. A.; de Vries E. G.: **Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients.** *Blood* 86: 900-905, 1995

Noma T.; Glick A. B.; Geiser A. G.; O'Reilly M. A.; Miller J.; Roberts A. B.; Sporn M. B.: **Molecular cloning and structure of the human transforming growth factor-beta 2 gene promoter.** *Growth Factors.* 4: 247-255, 1991

Oh SH.; Miyazaki M.; Kouchi H. et al. **Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun.* 279:500-504, 2000

Orlic D.; Kajstura J.; Chimenti S. et al. **Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10344-10349, 2000

Orlic D. ; Kajstura J. ; Chimenti S. et al. **Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.** *Nature.* 410:701-705, 2001

Oswald J.; Boxberger S.; Jorgensen B.; Feldmann S.; Ehringer.; Bornhauser M.; Werner C. **Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.** *Stem Cells* 22:377-384, 2004

Pece Barbara N, Wrana JL, Letarte M. **Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily.** *Journal of Biol Chem* 24(2):584-594 1999

Petersen BE.; Bowen WC.; Patrene KD. et al. **Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.** *Science.* 284:1168-1170, 1999

Pfeiffer R. A.; Haneke C.: **The phocomelia-thrombocytopenia syndrome: a follow-up report.** *Humangenetik* 26: 157-158, 1975.

Philip Sanford L.; Ormsby I.; Gittenberger-de Groot A. C.; Sariola H.; Friedman R.; Boivin G. P.; Cardell E. L.; Doetschman T.: **TG β 2 Knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TG β knockout phenotypes.** 1997

Pittenger MF.; Mackay AM.; Beck SC et al. **Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells.** *Science* 284:143-147, 1999

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Lambertenghi Delilieri G. **Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies.** *Exp Hem* 30: 783-791. 2002

Rabinowitz J. G.; Moseley J. E.; Mitty H. A.; Hirschhorn K.: **Trisomy 18, esophageal atresia, anomalies of the radius, and congenital hypoplastic thrombocytopenia.** *Radiology* 89: 488-491, 1967.

Ray R.; Zorn E.; Kelly T.; Hall J. G.; Sommer A.: **Lower limb anomalies in the thrombocytopenia absent-radius (TAR) syndrome.** *Am. J. Med. Genet.* 7: 523-528, 1980.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. **Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.** *Exp Neurol.*164:247-256, 2000

Reyes M.; Dudek A.; Jahagirdar B.; Koodie K.; Marker PH,Verfaillie CM. **Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.** *J Clin Invest.*109:337-346 2002

Schoenecker P. L.; Cohn A. K.; Sedgwick W. G.; Manske P. R.; Salafsky I.; Millar E. A.: **Dysplasia of the knee associated with the syndrome of thrombocytopenia and absent radius.** *J. Bone Joint Surg.* 66: 421-427, 1984.

Schwartz RE.; Reyes M.; Koodie L. et al. **Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.** *J Clin Investigation.* 96:1291-1302, 2002

Shaw S.; Oliver R. A. M.: **Congenital hypoplastic thrombocytopenia with skeletal deformities in siblings.** *Blood* 14: 374-377, 1959.

Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. **Molecular cloning of a cDNA encoding CD34 sialomucin of human hematopoietic stem cells.** *J Immunol* 148:267-271, 1992

Strippoli P.; Savoia A.; Iolascon A.; Tonelli R.; Savino M.; Giordano P.; D'Avanzo M.; Massolo F.; Locatelli F.; Borgna C.; De Mattia D.; Zelante L.; Paolucci G.; Bagnara G. P.: **Mutational screening of thrombopoietin receptor gene (c-mpl) in patients with congenital thrombocytopenia and absent radii (TAR).** *Brit. J. Haemat.* 103: 311-314, 1998.

Tajika K.; Ikebuchi K.; Suzuki E.; Okano A.; Hirashima K.; Hirosawa K.; Nakahata T.; Asano S.: **A novel aspect of the maturational step of megakaryocytes in thrombopoiesis : bundle formation of microtubules in megakaryocytes.** *Exp Hematol.* 24:291-8, 1996

Temtamy S. A.; McKusick V. A.: **The genetics of hand malformations.** *Birth Defects Orig Artic Ser.* 14: 1-619, 1978

Teufel M.; Enders H.; Dopfer R.: **Consanguinity in a Turkish family with thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome.** *Hum. Genet.* 64: 94-96, 1983.

Theise ND.; Badve S.; Saxena R. et al. **Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation.** *Hepatology.* 31:235-240, 2000

Thompson A.A.; Woodruff K. ; Feig S.A.; Nguyen L.T. ; Schanen N.C.: **Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: A new familial syndrome.** *Brit. J. Haemat.* 113: 866-860, 2001

Thomson TM.; Rettig WJ.; Chesa PG.; Green SH.; Mena AC.; Old LJ. **Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers.** *Exp Cell Res* 174: 533. 1988

Van Allen M. I.; Hoyme H. E.; Jones K. L.: **Vascular pathogenesis of limb defects. I. Radial artery anatomy in radial aplasia.** (Abstract) *J Pediatr.* 101:832-8, 1982

Ward R. E.; Bixler D.; Provisor A. J.; Bader P.: **Parent to child transmission of the thrombocytopenia absent radius (TAR) syndrome.** *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 2: 207-214, 1986.

Whitfield M. F.; Barr D. G. D.: **Cow's milk allergy in the syndrome of thrombocytopenia with absent radius.** *Arch. Dis. Child.* 51: 337-343, 1976.