RELAZIONE DI ATTIVITÀ FONDAZIONE IME

La Fondazione IME - Mandato

La Fondazione IME, Istituto Mediterraneo di Ematologia, è stata costituita il 28 marzo 2003 da parte del Ministero della Salute, del Ministero degli Affari Esteri, del Ministero dell'Economia e delle Finanze e della Regione Lazio.

L'IME è un istituto di diritto privato con scopi di pubblica utilità, e precisamente:

a) *attivare un centro di eccellenza e di alta specializzazione, con sede in Roma, per la cura e la ricerca sulle malattie ematiche e per il trattamento e lo studio della talassemia e delle emoglobinopatie;*

b) *realizzare, in un contesto di cooperazione e interscambio, un progetto "a rete" che promuova le relazioni e l'integrazione di strutture italiane ed estere, in particolare del bacino del Mediterraneo, specializzate nella ricerca, trattamento e formazione in campo sanitario, con particolare riferimento alla ematologia, inclusa la talassemia;*

c) *richiedere, entro il termine di tre anni dalla data di stipula della costituzione della Fondazione IME, il riconoscimento del centro di cui alla lettera a) quale Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico.*

Per il perseguimento delle predette finalità, l'IME ha, tra l'altro, il compito di coordinare e aggregare le competenze scientifiche, specialistiche e le risorse presenti presso divisioni e strutture di realtà ospedaliere del SSN, mediante apposite convenzioni e accordi.

I Soci Fondatori hanno individuato, nell'Atto Costitutivo e nello Statuto, una fase transitoria della durata di tre anni, durante la quale il Consiglio di Amministrazione, il Presidente e il Vice Presidente non vengono nominati, e di conseguenza anche il Consigliere Delegato, in quanto sostituiti - per detto periodo di tempo - da un Commissario, coadiuvato da un Direttore Generale.

In particolare:

- il Commissario è organo di IME, ne ha la rappresentanza legale ed esercita tutti i poteri riservati al Consiglio di Amministrazione;
- il Direttore Generale ha come compito principale l'attivazione del Centro di Eccellenza e di Alta Specializzazione, con sede in Roma e può sostituire il Commissario, in caso di assenza o impedimento del medesimo.

L'Organo di indirizzo IME (preordinato al Commissario) è la Consulta Generale, composta da 7 membri nominati dai Soci Fondatori.

Il Prof. Franco Mandelli e il Prof. Guido Lucarelli sono stati nominati Direttori clinico-scientifici di IME, rispettivamente, per la cura e la ricerca sulle malattie ematiche e per il trattamento e lo studio della talassemia e delle emoglobinopatie.

Per quanto riguarda il mandato istituzionale di IME, in riferimento puntuale alla creazione di un Centro di Eccellenza e di Alta Specializzazione, le azioni da compiere riguardano la predisposizione degli atti necessari a dimostrare il possesso dei requisiti richiesti per il riconoscimento di IRCCS, così come previsto dal D.Lgs. 288/03.

In merito al requisito *eccellenza delle attività sanitarie e di ricerca, svolte nell'ultimo triennio*, i due Direttori scientifici di IME possono anche avvalersi della documentazione di alto valore nazionale e internazionale, relativa alla produzione delle strutture da loro precedentemente dirette.

Appositi documenti dovranno, poi, illustrare le norme di organizzazione, per la gestione interna; le modalità di collaborazione con soggetti esterni; l'infrastruttura tecnologica e informatica.

Per quanto riguarda la realizzazione della rete di cooperazione e interscambio internazionale, il Progetto EMO-MED - predisposto dai competenti organismi del Ministero della Salute - è da considerarsi come rinforzo e specificazione ulteriore del mandato di IME, quale soggetto di politica sanitaria all'estero, cui è delegata la possibilità di stipulare accordi con i Paesi delle aree Mediterranea e Medio Orientale. Tale Progetto richiederà la messa in opera di infrastrutture informativo-tecnologiche e di comunicazione, infrastrutture sanitarie, di ricerca e formazione (*ospedale "virtuale" euromediterraneo*) e - oltre alla realizzazione di poli di riferimento, per la prevenzione e cura in ematologia - comporterà anche interventi riguardanti la ricerca, la terapia e la formazione di esperti, operanti presso centri ospedalieri polispecialistici.

Stante l'attuale quadro di riferimento epidemiologico delle emoglobinopatie e delle malattie ematiche, l'attività nazionale e internazionale di IME si colloca nel momento in cui se ne avverte maggiormente il bisogno. Molti Paesi in via di sviluppo stanno attraversando un periodo di rivoluzione demografica e di transizione epidemiologica:

- da un lato, assistendo alla progressiva diminuzione della mortalità infantile, che apre però nuovi fronti, nel campo dei disordini dell'emoglobina e dei tumori infantili;
- dall'altro lato, vedendo aumentare la speranza di vita alla nascita, e quindi il numero degli anziani, anche in questo caso con ricadute nel campo della oncoematologia.

In Italia, d'altra parte, i problemi della immigrazione richiamano l'attenzione sui disordini della emoglobina, in particolare di quelli in precedenza poco presenti, come le falcemie.

Per affrontare questi problemi, l'IME dispone di due grandi figure di medici e scienziati, il Prof. Guido Lucarelli per i disordini dell'emoglobina e il Prof. Franco Mandelli per le malattie ematiche, ai quali occorre assicurare una ben definita e solida struttura, fisica, organizzativa e gestionale.

La Fondazione IME - Missione e Visione

Posto il mandato di IME - ovvero le ragioni istituzionali della sua costituzione - è opportuno richiamarne missione e visione, come dichiarate nel Piano Strategico 2004-2007 della Fondazione medesima.

L'IME nasce da esperienze umane e professionali straordinarie e individuali, come è tipico in Italia, in primis dei due Direttori clinico-scientifici, quella del Prof. Mandelli, particolarmente vissuta e riconosciuta in ambito nazionale, e quella del Prof. Lucarelli, più proiettata in ambito internazionale, anche in conseguenza delle patologie trattate.

Il primo significato nasce proprio dalla "sfida" di mettere insieme i capitali clinici e scientifici di professionisti di tale livello, in un progetto unico e condiviso, il quale parte dal postulato etico che le conoscenze e le competenze conseguite dai singoli determinino la loro autorevolezza e affidabilità, e debbano essere a disposizione di chi ne ha bisogno, ovvero delle comunità, sia dei pazienti sia dei medici e degli operatori sanitari, non solo concentrandole in una "scuola nazionale", bensì impegnandosi per diffonderle in ogni area di confine, presso altre culture.

A partire dal fatto di avere qualcosa in cui l'Italia è "brava" e che serve all'Altro, si è deciso di tentare la forma istituzionale, piuttosto che il volontariato o la forma di Organizzazione Non Governativa, in quanto l'esperienza porta a credere che sia possibile indurre cambiamenti nelle relazioni anche politiche, proprio a partire dalla concretezza dei bisogni e delle loro risposte.

L'opzione istituzionale consegue un posizionamento più trasparente, sia del mandato sia dell'Organizzazione, facendo chiaramente coincidere la condivisione degli scopi e la ragione dei finanziamenti (anziché determinando chiaramente un recesso, anche dal finanziamento, nel caso in cui non si realizzasse l'intesa sulle finalità).

Il mandato istituzionale, poi, soprattutto a livello internazionale, consente l'incontro con le Istituzioni dei potenziali Paesi partner, ossia con le rappresentanze politiche che - volenti o nolenti - tanta influenza hanno sulla vita delle rispettive popolazioni: in questo senso, per l'IME, il viaggio è l'occasione di conoscenza diretta e non mediata, e il mandato rappresenta il permesso riconosciuto "per fare".

Detto ciò, risulta che l'IME vuole essere: *una organizzazione sanitaria per la cooperazione allo sviluppo, in ambito nazionale e internazionale, specializzata in cura, ricerca e formazione, nel settore dell'ematologia, in pianificazione e organizzazione sanitaria.*

Puntualmente, la missione di IME è:

A. offrire le best practice in prevenzione e cura delle malattie ematiche e delle emoglobinopatie;
B. fare ricerca clinica, anche in partnership nazionali e internazionali;
C. fare ricerca organizzativa/gestionale, comprensiva di soluzioni innovative in campo informatico-tecnologico;
D. essere una organizzazione che impara continuativamente e che fa formazione;
E. viaggiare e incontrarsi sulla rete, per fare interscambi di saperi, competenze, aiuti e ospitalità.

La visione di IME è una espansione quali/quantitativa del significato e della missione:

A. riuscire a essere uno strumento di politica sanitaria nazionale e di cooperazione allo sviluppo internazionale;
B. fare la ricerca nel migliore dei modi e in partnership con i migliori centri nazionali e internazionali;
C. offrire la migliore cura e i migliori interventi di prevenzione, a più popolazioni, nei migliori dei modi;
D. offrire formazione, in più ambiti di conoscenze/competenze, a più popolazioni, nel migliore dei modi;
E. realizzare più interventi di interscambio, con la possibilità di intervenire concretamente per la composizione politica del conflitto, nella direzione positiva dell'incontro delle culture, a partire dalla universalità dei bisogni.

Note metodologiche

Con la presente *Relazione* si intende porre in evidenza i risultati ottenuti, a tutto dicembre 2004, dalla Fondazione IME, con particolare riguardo agli indicatori di *output* dell'attività tipica, tradotta nelle aree di risultato Cura, Ricerca e Formazione.

La rendicontazione viene effettuata pertanto distintamente per Aree di risultato/attività, rispetto a ciascuna delle quali si descrivono i risultati e gli output realizzati (numero di pazienti e di trapianti realizzati e in corso, numero e caratteristiche dei progetti di ricerca avviati, interventi formativi progettati e realizzati, ecc.).

Si propone tale impostazione nell'ottica (assunta come prioritaria) dell'orientamento agli obiettivi posti, al raggiungimento degli stessi, e alla coerenza tra finanziamenti ottenuti e risultati realizzati nel periodo giugno 2003 – dicembre 2004. In tal senso, verranno solo accennati gli elementi di complessità di processo e attività collegati alla fase di avvio e allo *start-up* dell' organizzazione, all'implementazione di una struttura sanitaria fisica e in rete, alle variabili "esogene" intervenute nel corso del periodo che hanno più volte reso necessaria la modifica delle scansioni temporali, delle modalità organizzative e gestionali, del *mix* di fattori produttivi impiegabili/impiegati, al fine di consentire il raggiungimento dei risultati programmati.

Una quota dei risultati, ovvero degli output in termini di servizi/progetti/prodotti, risulta ad oggi in corso di svolgimento/erogazione: tale quota di risultato è proposta in termini di stato di avanzamento del relativo progetto.

Quadro di riferimento

Nel primo periodo di attività della Fondazione IME (indicativamente secondo semestre 2003 e primo semestre 2004) i finanziamenti *ex* Legge 141/03 hanno rappresentato l'unica fonte di risorse economiche disponibile. Pertanto, ai medesimi si è fatto ricorso per l'avvio dell'attività presso il Centro IME per le Emoglobinopatie di Roma, tenendo conto del vincolo di utilizzo a titolo di spesa corrente e delle conseguenze gestionali che ne sono derivate. A titolo esemplificativo, si è reso necessario - al di là delle valutazioni di convenienza economica e di flessibilità gestionale, che comunque ne avrebbero potuto supportare la opportunità - il ricorso generalizzato a forme di acquisizione in *service*, locazione, etc., per i beni durevoli e le immobilizzazioni materiali e immateriali, in senso lato, necessarie per l'attivazione del Centro medesimo.

Dettaglio dei risultati-output per Area di Risultato

Ricerca clinica

Progetti di ricerca di base

Indicatori di output: n. 2 Progetti di ricerca di base in partnership attivati e in corso di realizzazione

Nel periodo oggetto della presente Relazione sono stati attivati due progetti di ricerca di base, condotti in collaborazione con il TIGET, nell'ambito della *partnership* con l'IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor di Milano.
Nel seguito si riportano, per ciascuno dei due progetti, il Razionale, gli Obiettivi, il Piano Sperimentale e i Risultati preliminari conseguiti.

Progetto 1A

Titolo - *Ruolo delle cellule T regolatorie nell'indurre e/o mantenere uno stato di tolleranza immunologica, in pazienti talassemici con chimerismo misto persistente dopo TMO*

Razionale - I pazienti affetti da Talassemia Major dipendono dalla terapia trasfusionale a cui sono sottoposti. Nonostante questo trattamento sia migliorato sensibilmente in questi ultimi anni, la Talassemia è considerata

una malattia progressiva, con gravi complicazioni, come l'accumulo di ferro in diversi tessuti o l'insorgenza di epatite, con esito letale. Il trapianto di midollo osseo rappresenta, al momento, l'unico trattamento di cura radicale di questa malattia, mostrando una sopravvivenza *disease free survival* valutata pari al 75%, su oltre 1.000 pazienti trattati dalla équipe del Prof. Lucarelli.

Perché il trapianto abbia successo, le cellule del donatore devono sostituire le cellule linfo-emopoietiche del ricevente e produrre un completo attecchimento. La contemporanea presenza di cellule del ricevente e del donatore è stata spesso osservata dopo trapianto di midollo osseo nella Talassemia. Questa condizione, nota come Chimerismo Misto (CM), può essere un fattore di rischio per il rigetto del trapianto, se compare in una fase precoce del trapianto medesimo (Chimerismo Misto Transitorio). Tuttavia, se lo stato di chimerismo misto è presente per un periodo superiore a due anni, questa condizione diviene stabile e non rappresenta più un fattore di rischio per il rigetto. Recenti osservazioni hanno infatti mostrato come, nonostante la presenza di una percentuale elevata di cellule residue del ricevente - anche del 50/70% - tali pazienti producano sufficienti livelli di emoglobina A e siano considerati guariti dalla Talassemia (*Andreani et al. Blood 1996, 87:8*).

Nei pazienti con Chimerismo Misto persistente, l'osservazione dello spectrotyping ha evidenziato la perdita della distribuzione gaussiana del repertorio V beta del T Cell Receptor (TCR). Poiché dopo trattamento in vitro delle cellule mononucleate degli stessi pazienti con fitoemoagglutinina A (PHA) lo spectrotyping è risultato normale (*Battaglia et al., Blood 1999, 94: 3432*) si è ipotizzato che le alterazioni osservate in vivo, nei pazienti con Chimerismo Misto persistente, fossero dovute alla presenza di cloni di linfociti T più espansi. Tra questi cloni è possibile supporre la presenza di cellule T regolatorie, che siano in grado di mantenere uno stato di reciproca tolleranza tra le cellule residue del ricevente e quelle del donatore.

Le cellule T regolatorie sono state descritte come popolazioni cellulari con caratteristiche proprie, specializzate nel "controllare" le funzioni immunologiche. Tra i diversi tipi di cellule con queste caratteristiche, le principali sono le CD4+ "T regulatory Type 1" (Tr1) e le CD4+CD25+ Tr (*Roncarolo et al., Immunol Rev 2001,182*). Le cellule Tr1 sono state identificate per il loro pattern di produzione di citochine, poiché producono alte quantità di IL-10, considerevoli livelli di IFN-gamma, TGF-beta e IL-5, bassi livelli di IL-2, ma non producono IL-4. Le cellule Tr1 sopprimono l'attività delle cellule T allogeniche, fondamentalmente attraverso la produzione di IL-10 e TGF-beta. L'esistenza di queste cellule è già stata dimostrata nell'uomo dopo trapianto di fegato fetale HLA non-compatibile (*Bacchetta et al., J Exp Med 1994, 179:493; Bacchetta et al.,Blood 1995, 85:1944*).

Obiettivi

1. Dimostrare la presenza e funzionalità delle cellule T-regolatorie specifiche del donatore e/o del ricevente, in pazienti con Chimerismo Misto persistente, dopo trapianto di midollo osseo nella Talassemia
2. Tipizzare gli antigeni KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) nelle cellule del donatore e del ricevente con Chimerismo Misto persistente.

Piano Sperimentale

(A) - Caratterizzazione dell'assetto immunologico di almeno 5 pazienti con chimerismo misto persistente

- Determinazione delle caratteristiche immunofenotipiche (CD2, CD3, CD4, CD8, CD56, CD16, CD14, CD20, CD25, HLADR, TCRαß, TCR γδ)
- Test della risposta proliferativa a stimoli policlonali (CD3 mAb, PHA, TPA+io) e antigeni specifici (TT, Candida e alloantigeni)
- Valutazione della produzione di citochine (IFN-□, IL-2, GM-CSF, IL-10, TGF-□, IL-4) dopo attivazione policlonale
- Allestimento di controlli con campioni di sangue di individui normali e/o pazienti trapiantati con chimerismo completo

(B) - Isolamento dei cloni maggiormente espansi di cellule T, in base allo spectrotyping dei geni V beta del TCR, eseguito su cellule mononucleate di sangue periferico

- Stimolazione in cultura con CD3/CD28 mAbs o con PHA dei PBMC di pazienti con Chimerismo Misto persistente
- Separazione e clonaggio delle cellule T CD4+ e CD8+, seminate alla concentrazione di 0.3 cellule/pozzetto, in presenza di "feeder mixture", dopo 10 giorni di cultura
- Screening dei cloni al FACS per l'espressione dei geni V beta e per la produzione di citochine
- Analisi mediante spectrotyping dei geni V beta del TCR sui cloni T CD4+ e CD8+ selezionati e successivo sequenziamento diretto del TCR
- In base ai risultati, i cloni maggiormente interessanti vengono caratterizzati funzionalmente per la loro attività soppressiva o effettrice antigene specifica, dopo averne stabilito l'origine donatore/ricevente

(C) - Allestimento di un sistema di *read-out*, che permetta di testare l'attività soppressiva di cloni T regolatori (ottenuti al punto B) costituito da una Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) tra cellule T e DC in una coppia donatore/ricevente HLA identica

- Utilizzazione di cellule dendritiche (DC) derivate da monociti in presenza di GM-CSF e IL-4 e attivate, come APC in MLR tra coppie donatore/ricevente HLA identiche
- Valutazione della proliferazione al giorno 4, 5 e 6, dopo l'allestimento della reazione (è necessario partire da un numero molto elevato di cellule, per ottenere un numero sufficiente di DC)
- Alternativamente si utilizzano monociti come APC e si cerca di aumentare la risposta proliferativa, modificando il rapporto *responders-stimulators*, aggiungendo anti-CD28 mAb per aumentare i segnali di costimolazione o aggiungendo citochine esogene (IL-2, IL-4, IL-15) da sole o in combinazione
- Una volta allestito, al sistema sono aggiunti i cloni specifici per verificare l'attività regolatoria

(D) - Tipizzazione degli antigeni KIR

- Tipizzazione in SSP di antigeni KIR su DNA ottenuto da almeno 10 coppie donatore/ricevente con Chimerismo Misto persistente
- Confronto della tipizzazione degli antigeni KIR con i risultati ottenuti da un controllo di 10 coppie donatore/ricevente con Chimerismo completo
- Tipizzazione molecolare del *locus* HLA-C

Metodiche utilizzate

DETERMINAZIONE DEL CHIMERISMO

Il chimerismo viene determinato sui PBMC totali e sulle sottopopolazioni di monociti, linfociti B, linfociti T e cellule NK, utilizzando le metodiche di seguito descritte.

Ibridazione in situ con impiego di marcatori fluorescenti (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) - si tratta di una tecnica che utilizza sonde molecolari fluorescenti, che riconoscono sequenze geniche localizzate sui cromosomi umani. In questo caso vengono utilizzate sonde centromeriche per i cromosomi X ed Y, marcate con fluorocromi che emettono rispettivamente fluorescenza rossa e verde. Tali sonde vengono messe a contatto con i nuclei delle cellule da analizzare. Nel caso la coppia donatore/ricevente sia di sesso diverso, è possibile stabilire quali cellule originano dall'uno o dall'altro in base al pattern di fluorescenza espresso (rosso/rosso per la femmina, rosso/verde per il maschio). La conta al microscopio a fluorescenza dei nuclei che appartengono al donatore e al ricevente permette di quantificare il chimerismo sui PMBC totali e in ogni sottopopolazione cellulare.

Tipizzazione del DNA tramite determinazione del numero variabile delle ripetizioni a tandem (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) - questa metodica di determinazione del chimerismo viene utilizzata quando la coppia donatore/ricevente è di uguale sesso, poiché in questo caso non è possibile applicare la tecnica FISH sopra descritta. I marcatori utilizzati consistono ciascuno di un frammento mini o micro satellite di DNA in cui sono contenute corte sequenze identiche, arrangiate a tandem, testa a coda; le differenze tra gli individui derivano dalla grande variabilità nel numero delle ripetizioni a tandem. Il protocollo prevede l'estrazione del DNA dai PMBC totali o dalle singole sottopopolazioni, seguita da amplificazione tramite PCR di sequenze mini o micro-satellite di specifici *loci* altamente polimorfici.

Il DNA amplificato, che avrà dimensioni diverse in ogni individuo a causa delle VNTR, viene sottoposto a migrazione elettroforetica su gel di poliacrilamide. Le bande vengono poi visualizzate tramite impregnazione argentica. Confrontando i risultati ottenuti dal donatore e dal paziente, prima e dopo il trapianto, si può concludere se la popolazione cellulare in esame origina dal donatore (banda corrispondente al donatore), dal ricevente (banda corrispondente al paziente) o presenta un chimerismo misto (duplice banda).

TECNICHE DI SELEZIONE DI POPOLAZIONI CELLULARI

Purificazione della sottopopolazione cellulare CD4+ tramite selezione positiva con anticorpi monoclonali coniugati a biglie magnetiche (Microbeads) - le cellule T CD4+ sono state ottenute dalle PMBC totali

tramite selezione positiva, usando anticorpi monoclonali anti-CD4, direttamente coniugati a biglie magnetiche. Il protocollo di utilizzo prevede di lavare le cellule e risospenderle in MiniMacs Buffer (80 µl/10^7 cellule), costituito da PBS 0,5% HS e EDTA 2 mM. Si aggiungono poi 20 µl di biglie CD4+/10^7 cellule e si lascia incubare a 4°C per 15 minuti. Al termine dell'incubazione, si effettua un lavaggio aggiungendo MiniMacs Buffer fino a raggiungere un volume di 15 ml. Il pellet di cellule e biglie viene quindi risospeso in 500 µl di MiniMacs Buffer e applicato sulla colonnina magnetica, precedentemente equilibrata con 500 µl di MiniMacs Buffer. Si effettuano 3 lavaggi della colonnina con 500 µl di MiniMacs Buffer: in questo modo, le cellule CD4-, che non sono state legate dagli anticorpi coniugati con le biglie, defluiscono dalla colonnina magnetica e vengono raccolte in una provetta. Si separa quindi la colonnina dal magnete e, dopo aver aggiunto 1 ml di MiniMacs Buffer, si opera un'eluizione delle cellule CD4+, legate dagli anticorpi e precedentemente adese al magnete, utilizzando uno stantuffo. La sospensione cellulare ottenuta contiene quindi esclusivamente la popolazione CD4+ purificata. Solitamente la purezza delle cellule ottenuta tramite questa metodica è intorno al 95% e la perdita cellulare può variare dal 5 al 10%. Le cellule così purificate possono essere utilizzate come tali in quanto le biglie hanno diametro molto ridotto, che non interferisce con la funzionalità cellulare in vitro.

Purificazione di sottopopolazioni cellulari tramite selezione negativa con anticorpi monoclonali coniugati a biglie magnetiche (Dynabeads) - le PBMC utilizzate in alcuni esperimenti sono state aricchite nella percentuale di linfociti T CD3+ tramite selezione negativa, utilizzando una miscela di anticorpi monoclonali anti-CD14 e anti-CD19, direttamente coniugati a biglie magnetiche, allo scopo di eliminare rispettivamente i monociti e i linfociti B. Il protocollo di utilizzo prevede di aliquotare le biglie in provette da 14 ml a fondo tondo, considerando un rapporto di 6-8 biglie/numero di cellule positive attese, e di lavarle due volte in PBS 2% FCS utilizzando il separatore magnetico. Tale lavaggio è necessario per eliminare il tampone sodio/azide, in cui sono conservate le biglie, che può essere tossico per le cellule. La sospensione cellulare, ad una concentrazione di 107 cellule/ml in PBS 2% FCS, viene quindi aggiunta alle biglie; l'incubazione avviene in ghiaccio per 30 minuti, agitando delicatamente le provette ogni 5 minuti. Le provette vengono poi poste nel separatore magnetico: si preleva quindi la sospensione cellulare, che contiene le cellule che non sono state riconosciute dagli anticorpi e che sono quindi selezionate "negativamente". Tali cellule vengono poi lavate e risospese nel terreno di coltura, alla concentrazione adeguata all'esperimento da svolgere. Lo stesso protocollo di separazione cellulare è stato seguito per ottenere una popolazione cellulare depleta dai linfociti T CD3+, e quindi arricchita di monociti e linfociti B atti a svolgere la funzione di APC.

DETERMINAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOMONOCITARIE PERIFERICHE

L'immunofenotipo si basa sull'identificazione di molecole di membrana, che caratterizzano sottopopolazioni cellulari, con diverso significato biologico. Questo scopo è raggiunto attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali, che si legano a tali antigeni cellulari di superficie in maniera specifica. Gli anticorpi sono a loro volta coniugati a fluorocromi, che permettono di acquisire i dati relativi al campione cellulare utilizzando il citofluorimetro a flusso. La citometria a flusso è una tecnica che consente di analizzare singole cellule che

scorrono in un flusso liquido dopo essere state eccitate da sorgenti luminose. I fluorocromi, coniugati agli anticorpi monoclonali che riconoscono i marcatori cellulari di superficie, vengono colpiti da un raggio laser ad una caratteristica lunghezza d'onda ed emettono luce secondo uno spettro specifico per il fluoro cromo utilizzato. La luce emessa viene poi letta da un sistema di sensori, che, mediante speciali filtri e fotomoltiplicatori, permettono di discriminare contemporaneamente diversi parametri relativi alla singola cellula. I parametri fisici analizzati sono la dimensione e la complessità cellulare, rispettivamente indicati dal FSC (Forward Scatter) e dal SSC (Side Scatter): queste due informazioni sono essenziali per individuare la popolazione cellulare d'interesse, rispetto ad esempio ai detriti cellulari o ad altre cellule presenti nel preparato. Le caratteristiche antigeniche della singola cellula vengono invece valutate in base alla fluorescenza emessa e letta dai sensori FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6. Utilizzando diversi fluorocromi per marcare la stessa cellula è possibile analizzare l'espressione di più antigeni di superficie contemporaneamente. I fluorocromi utilizzati in questi esperimenti sono: fluoresceina-isotiocianato (FITC), il cui spettro di emissione verde (λ 525 nm) viene letto in FL1; ficoeritrina (PE), per la fluorescenza arancione-rossa (λ 575 nm) in FL2; tricolor (TC) per la fluorescenza blu-verde (λ 667 nm), ottenuta tramite il legame covalente dei fluorocromi FITC e PE e letta nel canale FL3.

Gli esperimenti di citofluorimetria a flusso prevedono diverse fasi: 1. preparazione delle cellule e incubazione con anticorpi specifici coniugati a fluorocromi; 2. acquisizione dei dati relativi a ciascun campione; 3. analisi quantitativa e qualitativa dei parametri acquisiti per ciascun campione. Nella prima fase, le cellule vengono lavate e risospese in 50 µl di PBS 2% FCS addizionato al 2% di siero murino. Tale incubazione, che avviene a temperatura ambiente per 10 minuti, permette di saturare i siti di legame aspecifici, che riconoscono cioè il Fc delle Ig murine, evitando quindi falsi positivi alla successiva colorazione con anticorpi monoclonali fluoriscinati di origine murina. Al termine dell'incubazione, vengono aggiunti gli anticorpi specifici per i marcatori di superficie che si vogliono determinare (2 µl di anticorpo/campione in 50 µl di PBS 2% FCS). Il pannello di marcatori analizzati sulle PBMC di ogni paziente è il seguente: CD2, presente sui linfociti T, sulle cellule NK e su una piccola percentuale di monociti; CD3, espresso dalla linea T; CD4, che identifica i linfociti Th; CD8, che identifica i linfociti Tc; CD14, marcatore dei monociti; CD19, espresso dai linfociti B; CD56, presente sulle cellule con attività NK; TCR$\alpha\beta$ e TCR$\gamma\delta$, che identificano le corrispondenti popolazioni di linfociti T in base al tipo di TCR; CD45RA, espresso dai linfociti vergini; CD45RO, espresso dai linfociti memoria; CD2/CD28 e CD4/CD25, espressi maggiormente dalle cellule attivate. Tali molecole vengono riconosciute da anticorpi monoclonali direttamente coniugati ai fluorocromi FITC, PE o TC. Vengono inoltre inseriti controlli negativi con appropriati anticorpi isotipici. L'incubazione avviene a 4°C per 20 minuti ed è seguita da tre lavaggi in PBS 2% FCS per eliminare i residui di anticorpo che non sono stati legati. Le cellule vengono poi risospese e fissate in PBS 2% e FCS 0.1 % di formaldeide, in un volume finale di 300 µl, e conservate a 4°C fino al momento della lettura al citofluorimetro. L'acquisizione viene effettuata dallo strumento FACScan, dopo opportuna taratura. Per stabilire l'autofluorescenza di fondo si analizzano i campioni di controllo, privi di colorazione specifica. Successivamente, si compensano le parziali sovrapposizioni degli spettri di emissione

dei diversi fluorocromi, utilizzando appositi comandi dello strumento. Il programma software utilizzato per la gestione e l'analisi multiparametrica dei dati è Cell Quest.

ANALISI DEL REPERTORIO LINFOCITARIO T

La complessità del repertorio periferico dei linfociti T è stato studiata tramite spectrotyping della regione CDR3 della catena Vβ del TCR. Tale regione è implicata nella specificità del riconoscimento antigenico ed è perciò unica per ogni clone di linfociti T. L'analisi è stata effettuata a partire dalle PBMC totali, il cui RNA è stato estratto e retro trascritto in cDNA; i frammenti contenenti la regione CDR3 sono stati poi amplificati tramite Polymerase Chain Reaction (PCR) e fatti migrare elettroforeticamente su apposito gel, in modo da separarli in base alle loro dimensioni.

Le "bande" così ottenute vengono poi analizzate: l'aumento o la riduzione d'intensità di una banda rispetto alla normale distribuzione all'interno di una famiglia Vβ sta ad indicare rispettivamente l'espansione o la contrazione del clone di linfociti T, che esprime quel particolare frammento CDR3 nel proprio TCR.

Il protocollo si articola nelle seguenti fasi:

- congelamento rapido in azoto liquido del pellet di cellule da esaminare;
- estrazione del RNA mediante RNAZol. Il pellet di cellule scongelato viene risospeso in 200 µl/10^6 cellule di RNAZol (Duotech, Milano), utilizzando un volume minimo di 600 µl per campione. Si aggiungono 60 µl di cloroformio (0,1 volume), si agita la soluzione e si lascia in ghiaccio per 10 minuti. Si centrifuga per 10 min a 12.000 rpm a 4°C: si formano così due fasi separate da un'interfaccia in cui si deposita il materiale proteico. La fase superiore, contenente RNA, va trasferita in una nuova provetta, a cui si aggiungono glicogeno (1 µl/100 µl di volume) e un volume di isopropanolo uguale al volume già presente. Dopo aver centrifugato per 1 ora a 12.000 rpm a 4°C, si aspira il sovranatante e si lava il pellet con 1 ml di etanolo al 75%. Si centrifuga per 15 min a 12.000 rpm a 4°C, si aspira accuratamente il sovranatante e si asciuga il pellet per qualche minuto a 60°C. Il pellet viene poi risospeso in un volume adeguato di H20 distillata sterile e il campione viene riscaldato per 3 min a 60°C;
- quantificazione dell'RNA tramite spettrofotometro. La quantità di RNA estratta a partire da 10^6 PBMC totali in questo studio sperimentale è variata da 3 a 8 µg;
- digestione con DNAasi. Si pone un volume pari a 2 µg di RNA in una provetta a cui si aggiungono 2 µl di sodio acetato 1 M, 4 µl di cloruro di magnesio 25 mM, 2 µl di DNAasi e una quantità di H2O che permetta di raggiungere un volume finale di 20 µl. Il campione viene riscaldato a 25°C per 15 minuti e successivamente a 95°C per 5 minuti;
- retrotrascrizione del RNA. Si ripartisce il volume di 20 µl ottenuto dalla precedente digestione in due provette, a ciascuna delle quali vengono aggiunti 4 µl di RT buffer 5X, 0,5 µl di dNTPs (miscela di deossinucleosidi-trifosfato) 25 mM, 2 µl di DTT (ditiotreitolo) 100 mM, 1 µl di oligodT, 0,5 µl di inibitore di RNAasi, 1 µl di MLV-RT (trascrittasi inversa) e 1 µl di H2O. Si riscaldano i campioni per 1 ora a 42°C;

- precipitazione del cDNA. Si aggiungono ad ogni campione retrotrascritto 250 µl di H2O, 30 µl di ammonio acetato 5 M, 3 µl di glicogeno e 300 µl di isopropanolo. Si lascia il campione per 12 minuti a -20°C e si centrifuga per 30 minuti a 12000 rpm a 4°C. Si lava quindi il pellet ottenuto con 1 ml di etanolo al 70%, centrifugando per 15 minuti a 12.000 rpm. Si risospende infine il pellet di cDNA in un volume adeguato di H2O e lo si mantiene a -20°C;
- amplificazione del cDNA tramite Polymerase Chain Reaction (PCR). Si esegue dapprima una PCR, titolando il cDNA in modo opportuno, per decidere la quantità adeguata di cDNA da utilizzare per l'analisi delle famiglie Vβ. In ogni provetta viene posto il cDNA da amplificare, 2 µl di primer Vβ24 20 µM, 2 µl di primer Vβ22 20 µlM, 4 µl di primer β chain constant 20 µM, 4 µl di buffer 10X, cloruro di magnesio 3,75 mM, dNTPs 0,2 mM e Taq Gold 0,5 µl/100 µl volume finale; si raggiunge il volume finale di 40 µl aggiungendo H2O sterile. La PCR viene così impostata: 1 ° ciclo a 94°C per 10 minuti; 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C da ripetersi per 30 cicli; ciclo finale a 72°C per l0 minuti. Gli amplificati vengono poi fatti migrare su gel di agarosio al 2%. Una volta scelta la quantità di cDNA che fornisce il pattern di migrazione elettroforetica migliore, si effettua la PCR utilizzando i prirners relativi alle famiglie Vβ da analizzare, accoppiati in modo opportuno: Vβ 1, 2, 3, 4, 5.1, 5.3, 6.1, 6.2, 7, 8, 10, 11, 12, 13. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24;
- migrazione elettroforetica degli amplificati su gel di acrilamide e lettura dei risultati. I campioni amplificati dalla PCR vengono fatti migrare per 1 ora su gel di acrilamide, preparato con la seguente ricetta: 15 g di urea, 3,7 ml di acrilamide/bis 40%, 3 ml di TBE 10X (ricetta per 1 l: Tris base 108 g, acido borico 55 g, EDTA 0.5 M pH 8 40 ml, H2O per raggiungere il volume finale) e H2O per raggiungere un volume finale di 30 ml. Prima di lasciare solidificare il gel per 1 ora, si aggiungono alla miscela preparata 200 µl di ammonio persolfato sciolto in H2O al 10% (APS) e 20 µl di TEMED. La lettura del gel viene effettuata dal Typhoon e i risultati vengono quindi analizzati da un apposito software (Image Quant) che converte il pattern di migrazione delle bande di ciascuna famiglia Vβ in una curva di distribuzione.

STUDIO DELLA FUNZIONALITÀ LINFOCITARIA

La corretta funzionalità dei linfociti T e B viene valutata in base alla loro capacità di riprodurre in vitro l'andamento della risposta immune in vivo, cioè di attivarsi, di proliferare e di produrre citochine e immunoglobuline in seguito a stimolazioni adeguate.

Risposta proliferativa a stimoli policlonali e antigenici – la funzionalità dei linfociti T è stata indagata osservando la loro capacità di attivarsi e proliferare in presenza di stimoli a diverso significato biologico. Gli stimoli policlonali sono in grado di attivare indiscriminatamente tutti i linfociti T, mentre gli stimoli antigenici agiscono selettivamente su quei cloni linfocitari che riconoscono la molecola in maniera specifica, attraverso il proprio TCR. Gli stimoli policlonali utilizzati in questo studio sono: la fitoemoagglutinina (PHA 1µg/ml), che esercita un'azione mitogena calcio-indipendente e non condizionata dalla corretta funzionalità del TCR; l'estere del forbolo (TPA 10 ng/ml) insieme alla ionomicina (io 150 ng/ml), che trasmettono lo