

Medicina di laboratorio: quadri leucemici

Prof. Illiano 13/11/2008

Quando io ero al posto vostro questa terribile malattia veniva diagnosticata dal numero dei globuli bianchi, che doveva essere altissimo, e poi dalla presenza di forme aberranti; quindi praticamente erano questi i dati che ci permettevano di fare la diagnosi.

Cosa è cambiato oggi nella diagnosi e nella prospettiva di cura di queste malattie?

Adesso abbiamo l'ausilio dei nuovi contaglobuli.

Non ci si ferma più al fenotipo cellulare, ma grazie all'uso degli anticorpi :

- Anticorpi fluorescenti
- uso della Citometria a flusso (che riesce a rilevare il segnale fluorescente)

siamo arrivati alla determinazione del fenotipo molecolare, per cui nell'ambito di queste cellule abbiamo la possibilità di distinguere quelle che potremmo definire "buone" da quelle leucemiche; queste ultime esprimono una proteina che è tipica delle cellule immature e che quindi non è espressa dalle cellule mature.

Perché in questa immagine, queste pochissime cellule leucemiche, che esprimono questa particolare proteina, danno questa macchia così grande? Perché sono state trattate con l'anticorpo con segnale fluorescente e allora quando sono passate attraverso il punto di osservazione hanno dato questo segnale.

Il riconoscimento del fenotipo leucemico è importante anche nella valutazione dell'efficacia della terapia e nel follow up delle eventuali ricadute; in che modo?

- Efficacia della terapia: scomparsa del fenotipo molecolare tipico della cellula malata con remissione della malattia (e ovviamente anche riduzione del numero delle cellule)
- Ricadute: ricomparsa del fenotipo molecolare della cellula malata e ciò può accadere ancora prima che il numero delle cellule sia significativamente aumentato; questo è un grosso vantaggio perché ci permette di instaurare la terapia prima ancora che i globuli bianchi aumentino.

Oggi siamo andati oltre, perché ci si è resi conto che esistono cellule che possiedono uno stampo genetico per produrre quella proteina patologica ovvero delle cellule che vengono dette "committed" cioè cellula con le potenzialità per diventare una cellula patologica. Quindi la vera guarigione è quando si riesce a eradicare da queste cellule la possibilità di esprimere l'mRNA che poi porta alla produzione della proteina patologica. Solo questa è la guarigione; fino a che c'è mRNA che porta alla produzione di queste proteine noi non avremo mai la completa guarigione; anzi si è visto che la possibilità di ricaduta è direttamente proporzionale alla quantità di cellule che esprimono tale mRNA. A questo proposito è importante quindi dosare l'mRNA patologico per fare

la diagnosi, cioè vedere se l' mRNA patologico è presente e quanto ne è presente, con tecniche di biologia molecolare clinica, che è una branca della biologia molecolare che permette di estrarre tale mRNA da queste cellule e amplificarlo. In che modo?

L' mRNA funge da stampo per formare un DNA complementare (cDNA) attraverso l'azione di una trascrittasi inversa, dopodiché il cDNA viene amplificato. Ora dobbiamo vedere come viene amplificato e com'è che l'amplificato diventa testimone della quantità di stampo che c'era in quelle cellule (cioè il cDNA diventa un indice di quantificazione di quanto mRNA patologico c'era in quelle date cellule) cioè se io amplifico 2 pecore, 10 pecore e le faccio diventare tutte quante 100 come faccio poi a sapere se inizialmente ne erano 10 o 2? questa è la cosa importante perché quello che ci interessa sapere è se questo mRNA c'è e quanto ce n'è. Questa valutazione è utile anche durante la terapia citotossica per valutare, attraverso la riduzione o meno dell' mRNA patologico, se il farmaco è efficace o meno e se sopraggiunge una recidiva. Se l' mRNA diminuisce significa che la terapia sta andando bene, se aumenta devo cambiare sicuramente farmaco.

Come si fa l'amplificazione del cDNA?

Per amplificare uno stampo di DNA noi abbiamo bisogno di alcuni "ingredienti":

- Sonde primers che devono fiancheggiare la sequenza da leggere e amplificare
- Nucleotidi trifosfato (deossinucleotidi trifosfato)
- Dna polimerasi termostabile (termostabile perché, come vedremo, i tempi sono cadenzati da aumenti di temperature)

In un sistema di assi cartesiani sull'asse delle ordinate poniamo la temperatura (°C) che va da circa 50°C e 95°C; noi abbiamo un termostato che ci assicura in questa nostra provetta una temperatura che può oscillare da 55 a 95 gradi e poi tornare indietro; sull'asse delle ascisse poniamo il tempo espresso in secondi.

Il ciclo comincia da una temperatura alta intorno a 92-95°C; cosa succede a questa temperatura? Succede che la doppia elica a questa temperatura si denatura cioè si apre in modo che ciascun filamento possa fare da stampo e questa operazione dura un certo numero di secondi (circa 3-4 secondi); poi a questo punto, dopo questi 3-4 secondi in cui la doppia elica si apre, cominciamo ad abbassare la temperatura, da 95 arriviamo a circa 58°C e questa operazione richiede grossomodo altri 4-5 secondi; in questi 5 secondi si ha l'appaiamento sia del primer sia dei vari nucleotidi trifosfato che si mettono uno appresso all'altro su questo stampo, dopo di che noi produciamo un altro aumento della temperatura, fino a raggiungere una temperatura di 70°C che è quella ottimale per la DNA polimerasi e questa fase in cui opera la DNA polimerasi dura circa 5-6 secondi (nell'intervallo tra 18 e 24 secondi); la dna polimerasi ha cominciato a lavorare anche quando la temperatura era di 60° ma possiamo dire che a 68-70°C la sua attività raggiunge l'optimum.

Se noi fermiamo questi vari momenti cosa otteniamo:

- 1) Partiamo da uno stampo di acidi nucleici a doppio filamento. Come lo vediamo? Attraverso l'elettroforesi su gel di agarosio vediamo questa banda caratteristica.

2) Al punto 2 vediamo che c'è stato uno svolgimento e apertura della doppia elica per cui quando sottoponiamo questo materiale a elettroforesi su gel di agarosio vediamo la comparsa di un elemento più leggero e man mano che passa il tempo questo elemento più leggero aumenta di quantità.

Se noi facciamo il conto di quanto dura tutto un ciclo, vediamo che praticamente in totale dura da 20 a 25 secondi ogni ciclo, cadenzato in tappe da questi cambiamenti di temperatura. Arrivato al 24esimo secondo noi mettiamo di nuovo la temperatura a 95° e allora si ha che i doppi filamenti neoformati e anche quelli precedenti si aprono un'altra volta, sia quelli vecchi che quelli nuovi fanno da stampo, legano i primers, raccolgono i nucleotidi e il ciclo può ricominciare (amplificazione).

Teoricamente basta un solo stampo di cDNA per dare innumerevoli quantità di copie, l'importante è avere una sufficiente quantità di primers e una sufficiente quantità di nucleotidi trifosfato.

Questo processo può essere ripetuto moltissime volte infatti in 10 minuti riesco ad avere almeno 20 cicli, con una notevole amplificazione.

Quello che vi ho fatto vedere prima prevedeva che l'amplificato venisse posto su supporto per elettroforesi e sottoposto a una corsa elettroforetica e poi analizzato ulteriormente con delle sonde specifiche, prima si faceva così.

Poi oggi è venuta fuori l'amplificazione in tempo reale o real time pcr:

cosa significa in tempo reale? Prima vi ho parlato di tempi tecnici, che sono quello che sono e devono essere rispettati, mentre il tempo reale, a vista d'occhio, è la verifica, il dosaggio dell'amplificato; perché se noi mettiamo un segnale fluorescente all'amplificato (poi vediamo come può essere questo segnale fluorescente), ad un certo punto fino a 10 cicli non si vede nulla perché il segnale fluorescente non è di intensità sufficiente (perché questo segnale fluorescente caratterizza soltanto l'amplificato, che non è ancora in quantità sufficienti dopo 10 cicli), ugualmente fino a 25 cicli non si vede nulla, poi improvvisamente l'amplificato raggiunge una soglia di amplificazione (concentrazione) per cui il segnale fluorescente diventa visibile. Per fare 25 cicli io ci metto 10 minuti e quindi dopo 10 minuti io so che devo avere un segnale fluorescente visibile, questo è il tempo reale cioè è quel tempo in cui io raggiungo una certa concentrazione di amplificato che mi dà il segnale fluorescente alla real time pcr.

Ma a noi interessava sapere quanto stampo, quanto mRNA c'era in quella serie di cellule da cui è stato estratto: questa è un'altra cosa fondamentale: il tempo reale è tanto più breve quanto più alta è la concentrazione dello stampo iniziale di partenza e viceversa: se c'è un solo stampo io dovrò fare n cicli per raggiungere la soglia di fluorescenza, se c'è una concentrazione doppia dello stampo di partenza dovrò fare n/2 (n/mezzi) cicli quindi il numero di cicli per raggiungere la soglia di fluorescenza è inversamente correlato alla concentrazione dello stampo.

Vi faccio vedere un po' meglio qui:

la concentrazione di partenza del doppio filamento (mRNA) condiziona il numero di cicli che permettono di raggiungere il valore soglia dosabile di fluorescenza.

Se facciamo un grafico, sull'asse delle ordinate vediamo la soglia di fluorescenza mentre sull'asse delle ascisse il numero dei cicli per raggiungere quella data soglia di fluorescenza.

In sostanza il concetto è che man mano che la concentrazione dello stampo si riduce, il numero dei cicli aumenta linearmente per ottenere la soglia di fluorescenza. Quindi dal numero dei cicli necessari risalgo alla concentrazione dello stampo. Se il mio campione mi dà un segnale fluorescente a questo numero di cicli, ad esempio 20, significa che la concentrazione dello stampo è questa, cioè 10^4 .

Domanda dall'aula: ma questa tabella è applicabile a tutte le analisi che facciamo?

Si! Significa che io a seconda dell' rna messaggero che voglio andare ad esaminare devo avere una curva, che parte dalle concentrazioni alte che con pochi cicli mi fanno raggiungere la soglia di fluorescenza, poi il campione lo diluisco 1:1 e quindi ce ne metto la metà, e quindi vedo che il numero di cicli aumenta, poi lo diluisco un'altra volta, e quindi ce ne metto un quarto, e poi continuo con le diluizioni seriali; non solo faccio questo, ma poi faccio anche 2 prove: una senza il campione, per essere sicuro che la mia polimerasi non è inquinata, quindi se io non ho messo lo stampo non devo mai raggiungerela mia fluorescenza, poi faccio un'altra prova per cui al mio estratto non metto la rna polimerasi e anche in questo caso non devo avere fluorescenza; quindi faccio tutti questi controlli, ma il controllo fondamentale è che io mi devo costruire la curva (di taratura) col mio acido nucleico campione, che riflette quello che io voglio dosare, e poi vado a vedere nel campione del mio pz a quanti cicli io ho raggiunto la soglia di fluorescenza, in modo che io guardando la curva di taratura che mi ero precedentemente costruito posso automaticamente risalire alla concentrazione dell'rna messaggero presente nel campione del mio pz.

Io posso anche valutare la qualità dello stampo con questa real time, perché se io mi trovo di fronte ad un acido nucleico in cui i 2 filamenti non sono perfettamente identici uno all'altro, cioè ho un polimorfismo (anche se si tratta di una sola base) io posso vederlo perché quando raggiungo la soglia di fluorescenza e poi raggiungo un plateau, io se aumento la temperatura la fluorescenza cade perché se la mia fluorescenza è legata a un cromoforo che diventa fluorescente quando sta intercalato nella doppia elica, quando questa doppia elica si apre il cromoforo non è più fluorescente. L'altra volta parlammo dello ioduro di propilio, oggi c'è qualcosa di ancora migliore che si chiama silver green; questa è una sostanza eccezionale perché penetra nelle cellule, viene a contatto con gli acidi nucleici e solamente quando si intercala negli acidi nucleici diventa fluorescente, e allora se dopo che abbiamo avuto questo plateau di fluorescenza riscaldiamo, la fluorescenza cade; abbiamo questa caduta di fluorescenza, allora la cosiddetta temperatura di denaturazione dipende da come sono tra di loro legati i 2 filamenti; se i due filamenti sono fatti l'uno per l'altro avrò una certa temperatura, ma se c'è polimorfismo cioè qualche base impropria significa che c'è un punto debole (la cerniera si apre più facilmente) quindi

non devo raggiungere la temperatura di denaturazione ma ho una caduta di fluorescenza che comincia prima; questo lo posso utilizzare per due cose: primo, per vedere se ci sono dei polimorfismi, anche ad una singola base; secondo, anche per “togliere la zavorra” cioè eliminare i doppi filamenti contenenti qualche errore (“amplificati di contrabbando”!!).

Se io so che il mio amplificato deve denaturarsi ad una temperatura di 90°C e vedo che ad 80°C già ho una certa caduta dell’intensità del segnale ($-\Delta F$: caduta dell’intensità del segnale fluorescente) che è dovuta ad amplificati anomali che non mi interessano. Quindi la temperatura cui si ottiene la caduta della fluorescenza è importante.

A questo punto mi sembra opportuno darvi qualche dettaglio su come viene visto questo amplificato, quello che viene visto e la visione in tempo reale.

Marcaggio della fluorescenza: come?

- 1) Silver green, questo composto di cui mettiamo una certa quantità e man mano che si formano doppi filamenti questo silver green viene a determinare la fluorescenza; è ottimo anche perché ci dà l’informazione che la fluorescenza cade non appena la doppia elica si apre quando aumentiamo la temperatura. La fluorescenza cade immediatamente all’aumento della T.

Abbiamo: formazione doppi filamenti → comparsa della fluorescenza → plateau → se aumentiamo la T → apertura della doppia elica (il silver green non è più intercalato nella doppia elica) → caduta acuta della fluorescenza. Questo vale per qualunque segnale legato alla ibridizzazione cioè per qualunque segnale che deve legarsi per la complementarità delle basi al filamento che ci interessa. Che significa questo? Significa che noi siamo partiti con i primers; ad esempio il primers si lega allo stampo con il principio della complementarità delle basi; il primers lo possiamo creare come una forcina (come una forcina per capelli) che alle due estremità abbia una molecola fluorescente e all’altra qualcosa che smorza questa fluorescenza. Quindi il primers di per se non è fluorescente perché il segnale fluorescente di un’estremità è smorzato dall’altra estremità schermante. Quando il primers si ibridizza con lo stampo, le due estremità si allontanano e la parte fluorescente non è più schermata da quello che si chiama quencer (termine inglese che dice “che maschera” e quindi si rende fluorescente. I primers ricordiamo che sono degli oligonucleotidi che devono essere perfettamente corrispondenti alla sequenza che ci interessa affinché noi possiamo amplificare la sequenza fiancheggiatrice; noi possiamo legare a questi oligonucleotidi due segnali, uno fluorescente e uno mascherante o antifuorescente, cosicché quando il primers è a forma di forcina e le due estremità sono vicine come in un ferro di cavallo, non si ha fluorescenza; quando però il primers si lega allo stampo e si distende, tale distensione fa sì che la componente fluorescente sia non più mascherata dalla componente antifuorescente (quencer). Allora più primers vengono utilizzati più segnali fluorescenti ci saranno; quando andiamo a aumentare la temperatura, queste interazioni non covalenti dovute alla complementarità, dovute a questi legami di

tipo polare, tendono ad essere rotte per cui anche il primers si allontana ritornando alla sua forma originaria e quindi interrompendo la fluorescenza col quencer.

Questo è il caso del primer a forma di forcina, che praticamente ha una componente fluorescente e una componente antifuorescente; quando il primer si distende queste due estremità sono lontane e si ha la fluorescenza; quando aumentiamo la temperatura si ha il processo inverso con distacco e apertura del doppio filamento e scomparsa della fluorescenza.

Perché è importante? Può capitare che un certo numero di primers si va a legare in maniera non canonica anche ad altri stampi, ma questi amplificati non desiderati saranno tolti di mezzo a una temperatura inferiore a quella del frammento che ci interessa; la temperatura sarà inferiore perché il numero delle interazioni sarà minore.

- 2) Altro tipo di segnale che possiamo dare: mettiamo sul primers 2 segnali ciascuno individualmente debole, che però quando sono vicini si rinforzano a vicenda con risonanza;

quello che ci interessa sapere è che la procedura di cui abbiamo parlato è un'amplificazione in tempo reale perché dopo un certo numero di cicli raggiungiamo la soglia di fluorescenza che l'apparecchio misura e che il numero di cicli per raggiungere tale soglia è inversamente proporzionale alla quantità di stampo presente per cui opportunamente tarato il sistema l'apparecchio ci dice quanto stampo c'era nel materiale a nostra disposizione.

Quindi il progresso della terapia da che cosa è documentato? Dalla diminuzione dello stampo.

La ricaduta da che cosa è documentata? Dall'aumento dello stampo.

Fino a che non c'è stampo possiamo stare tranquilli, quando ci sta siamo sempre in pericolo perché solo se non c'è, non ci sarà la possibilità del fenotipo molecolare patologico.

Allora a questo punto possiamo rendere più pratico il sistema:

es. LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA: si è scoperto già parecchio tempo fa l'alterazione cromosomica del cromosoma philadelphia: trasposizione 9→22, q34→q11 che produce un gene chimera con fenotipo proteico di un enzima tirosinocinasi (BCR/ABL →p210) cioè un'enzima che va a fosforilare alcune proteine nei residui di tirosina; moltissime sono le tirosine chinasi, molte sono recettori di ormoni..qual è il senso? Il senso è che queste tirosine chinasi sono tirosine chinasi potenziali cioè per funzionare hanno bisogno di essere attivate da una molecola che può essere l'ormone; esempio l'insulina è una tirosina chinasi, il recettore per fattore di crescita epidermico è una tirosina chinasi, il recettore per il fattore di crescita delle piastrine è una tirosina chinasi, tutti i fattori di crescita vanno ad attivare delle tirosine chinasi che in assenza del segnale sono solo allo stato potenziale; si è scoperto che questo prodotto proteico BCR/ABL invece non ha più bisogno di avere il segnale esterno ma è costitutivamente attivo; siccome si è scoperto come è fatto si è capito anche come bloccarlo infatti oggi esiste un ottimo inibitore di questa tirosinocinasi che permette a questi ammalati di guarire; però si è scoperta anche un'altra cosa importante cioè che tutti gli ammalati di LMC hanno questa trasposizione ma, proprio grazie alla real time PCR, si è

scoperto che esistono dei soggetti che pur avendo tale trasposizione non sono malati il che significa che se tutti gli ammalati hanno questa trasposizione ma che non tutti quelli che hanno tale trasposizione sono ammalati, significa che tale trasposizione 9-22 è indispensabile ma non sufficiente; quindi se noi conosciamo con la ricerca quali sono le altre condizioni "sufficienti" che rendono possibile passare dalla situazione di potenzialità alla situazione di malattia in atto, noi possiamo mettere il nostro pz predisposto in condizioni di non ammalarsi proprio; questa è una cosa importantissima!

Tutti gli ammalati di LMC hanno questa trasposizione, questo gene chimera e questa tirosinchinasi costitutivamente attiva, però esistono persone che hanno questa anomalia genetica e che non sono ammalate e se noi conosciamo quali sono le cause aggiuntive possiamo evitare che si ammalino!

Altre emopatie caratterizzate da alterazioni cromosomiche sono quelle delle leucemie acute (AML); hanno in comune il carattere improvviso: il pz a cui potreste improvvisamente diagnosticare una banale influenza, improvvisa febbre alta, ma non passa con le comuni cure, la situazione peggiora e si fa l'emocromo, si vede che le piastrine sono diminuite, i globuli bianchi sono aumentati improvvisamente soprattutto alcune forme immature e ognuno di questi quadri leucemici ha una trasposizione caratteristica che porta cmq ad un gene chimera con fenotipo proteico che è un fattore di trascrizione (che è quello che permette ad un pezzo di acido nucleico di essere tradotto); si forma una proteina alterata; allora si capisce perché in circolo ci sono forme immature, perché il processo di maturazione si arresta. Da solo però non basta a spiegare l'insieme della patologia perché questo può spiegare la presenza di forme immature ma non l'aumento del numero di bianchi, per cui ci devono essere anche altre alterazioni.

La cosa importante è questa: le trasposizioni diverse noi le possiamo vedere con opportuni primers!

È importante quindi fare la diagnosi dell'alterazione genetica che è alla base della emopatia spt ai fini terapeutici; questa scoperta che ha dato grossi risultati nel campo delle emopatie adesso si sta estendendo a tutti i campi oncologici perché anche in quei casi possiamo sapere cosa c'è di sbagliato dal punto di vista genetico, qual è il fenotipo proteico alterato e quindi avere una base razionale per sapere come e dove intervenire.

Quindi la specificità del primer è importante e il primer funziona se trova lo stampo complementare; la polimerasi non può funzionare se non c'è uno stampo che sia reso leggibile dal primers, ha bisogno che lo stampo sia reso leggibile e chi lo rende leggibile è il primers.