
**RICERCA DI METODICHE BASATE
SULL'ANALISI DHPLC PER LA
DIAGNOSI DEI RIARRANGIAMENTI
CLONALI DELLE
IMMUNOGLOBULINE (IG) E DEL T-
CELL RECEPTOR (TCR) NELLE
LEUCEMIE LINFATICHE E NELLE
SINDROMI EOSINOFILICHE CON
VARIANTE LINFOCITARIA (HES-
LV).**

Anna Lucia Peluso

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XIX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XIX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II



**RICERCA DI METODICHE BASATE
SULL'ANALISI DHPLC PER LA
DIAGNOSI DEI RIARRANGIAMENTI
CLONALI DELLE
IMMUNOGLOBULINE (IG) E DEL T-
CELL RECEPTOR (TCR) NELLE
LEUCEMIE LINFATICHE E NELLE
SINDROMI EOSINOFILICHE CON
VARIANTE LINFOCITARIA (HES-
LV).**

Dottoranda: Anna Lucia Peluso

Relatore: Prof. Fabrizio Pane

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

*A Rosanna e a Michele,
per la capacità di gioire
scoprendo e di sorprendersi
per la magia della vita.*

INDICE

Riassunto	Pag.	1
Relazione finale dottorato	Pag.	2
Final PhD relation	Pag.	9
1 INTRODUZIONE	Pag.	14
1.1 La risposta immunitaria	Pag.	14
1.2 I linfociti	Pag.	15
1.3 Le immunoglobuline (Ig): struttura e caratteristiche funzionali	Pag.	21
1.4 Il recettore delle cellule T: struttura e caratteristiche funzionali	Pag.	25
1.5 I riarrangiamenti del DNA	Pag.	29
1.6 Diversità dei recettori antigenici	Pag.	34
1.7 Le leucemie linfatiche	Pag.	36
1.8 L'ipereosinofilia	Pag.	42
1.9 Diagnosi delle leucemie linfatiche	Pag.	44
SCOPO TESI	Pag.	52
2 MATERIALI e METODI	Pag	54
2.1 Scelta dei campioni	Pag	54
2.2 isolamento delle cellule mononucleate ed estrazione del DNA genomico	Pag	55
2.3 Southern Blot Analysis	Pag	55
2.4 Allestimento delle reazioni PCR	Pag	65
2.5 Analisi heteroduplex	Pag	73
2.6 La cromatografia ad elevata pressione in condizioni denaturanti	Pag	73
2.7 Purificazione del DNA amplificato	Pag	77
2.8 Sequenziamento	Pag	77
2.9 Analisi delle sequenze	Pag	78

2.10 Determinazione del Cutoff per la discriminazione dei campioni risultati positivi all'analisi PCR singola per i geni TCR $\gamma\delta$ e IgH	Pag	78
2.11 Calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica	Pag	78
3 RISULTATI	Pag	80
3.1 Scelta campioni	Pag	80
3.2 Analisi Southern Blot	Pag	80
3.3 Allestimento delle reazioni PCR	Pag	83
3.4 Analisi heteroduplex	Pag	91
3.5 La cromatografia ad elevata pressione in condizioni denaturanti	Pag	92
3.6 Purificazione del DNA amplificato	Pag	99
3.7 Sequenziamento	Pag	99
3.8 Determinazione del Cutoff per la discriminazione dei campioni risultati positivi all'analisi PCR singola per i geni TCR $\gamma\delta$ e IgH	Pag	101
3.9 Calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica	Pag	102
4 CONCLUSIONI	Pag	104
BIBLIOGRAFIA	Pag	112
Appendice 1: Locus 14q32.33 IgH dell'homo sapiens	Pag	118
Appendice 2: Locus 7q34 TCR beta dell'homo sapiens	Pag	119
Appendice 3: Locus 7q14 TCR gamma dell'homo sapiens	Pag	120
Appendice 4: Locus 14q11.2 TCR delta/alfa dell'homo sapiens	Pag	121
Appendice 5: Tabella con dati clinici di alcuni dei campioni testati	Pag	122
Appendice 6: Rappresentazione schematica del vettore plasmidico usato per il clonaggio delle sonde Jh6/TCR β C, SOC medium e LB medium	Pag.	124
Appendice 7: Schema localizzazione primer per multiplex PCR e profili di amplificazione dei riarrangiamenti TCR gamma per multiplex PCR	Pag.	125
Appendice 8: Schema localizzazione primer per semi-nested PCR e profili di amplificazione dei riarrangiamenti IgH per semi-nested PCR	Pag.	125
Appendice 9: Esempi di segmenti scelti tra le sequenze in database	Pag.	127

IMGT per il calcolo dell'algoritmo di Stenford e per la predizione della temperatura di quasi denaturazione con il software Wavemaker – Transgenomic riarrangiati senza delezioni o aggiunte nucleotidiche	
Appendice 10: Temperature di quasi denaturazione DHPLC in gradiente lineare di TEAA per la discriminazione dei riarrangiamenti mono-, oligo- e policlonali	Pag. 128
Appendice 11: Tabella dei risultati dell'analisi Southern Blot di alcuni dei 70 campioni testati	Pag. 129
Appendice 12: Tabella dei risultati dell'analisi PCR TCR $\gamma\delta$ e multiplex PCR di alcuni dei 246 campioni testati	Pag. 130
Appendice 13: Confronto dei risultati prodotti con SB, PCR TCR $\gamma\delta$, PCR IgH, multiplex TCR γ e semi-nested PCR IgH di alcuni dei 246 campioni testati	Pag. 132
Appendice 14: Tabella dei risultati dell'analisi PCR IgH e semi-nested PCR di alcuni dei 246 campioni testati	Pag. 134
Appendice 15: Risultati della temperatura mapping DHPLC in gradiente lineare di TEAA dei campioni Jurkat, Reh, 3126, pool amplificati con la coppia di primer V γ J-J γ 1.3/2.3	Pag. 136
Appendice 16: <i>Confronto dei valori ottenuti tramite Temperature mapping, calcolo dell'algoritmo di Stenford e predizione della temperatura di quasi denaturazione con il software Wavemaker Transgenomic.</i>	Pag. 137
Appendice 17: <i>Risultati Temperature Mapping DHPLC in variazione di gradiente di TEAA dei campioni Jurkat (monoclonale), Reh (monoclonale), 3126 (biclonale), pool (policlonale) amplificati con la coppia di primer TCR VγJ-Jγ1.3/2.3.</i>	Pag. 138
Appendice 18: <i>Determinazione del potere discriminante del DHPLC e risultati dell'effetto delle variazioni di sequenza analizzando miscele V/V dei prodotti di amplificazione con i primer VγJ-Jγ1.3/2.3 monoclonali (Reh+Jurkat), mono- e biclonali (Reh+3126, Jurkat+3126), mono- e policlonali (Reh+pool, Jurkat+pool), bi- e policlonali (3126+pool) analizzati in gradiente lineare e in variazione di gradiente di TEAA.</i>	Pag. 140
Appendice 19: Risultato di amplificazioni pseudoclonali dei campioni placenta e pool (segmenti genici IgH in configurazione germinale) e del campione 5164 (LNH) monoclonale (con profilo di eluzione heteroduplex) amplificati con la coppia di primer IgH Dh7-Jh consensus.	Pag. 141
Appendice 20: <i>Rilevazione al DHPLC dei prodotti mono-, oligo- e policlonali di alcuni dei 246 campioni amplificati in Multiplex PCR e Semi-nested PCR analizzati in condizioni lineari di gradiente TEAA.</i>	Pag. 142

Appendice 21: Risultati analisi dell'allineamento delle sequenze dei riarrangiamento amplificati per PCR IgH con quelle presenti nel database ImMunoGeneTics (http://imgt.cones.fr).	Pag. 144
Appendice 22: Risultati analisi dell'allineamento delle sequenze dei riarrangiamento amplificati per PCR TCR$\alpha\beta$ quelle presenti nel database ImMunoGeneTics (http://imgt.cones.fr).	Pag. 145
Appendice 23: Sensibilità diagnostica e specificità diagnostica delle metodiche PCR TCRgd, PCR IgH, Multiplex PCR, Semi-nested PCR e Southern Blot	Pag. 146
ELENCO PUBBLICAZIONI ALLEGATE e IN ABSTRACT	Pag. 147

RIASSUNTO

Ricerca di metodiche basate sull'analisi DHPLC per la diagnosi dei riarrangiamenti clonali delle Immunoglobuline (Ig) e del T-cell Receptor (TCR) nelle leucemie linfatiche e nelle sindromi eosinofile con variante linfocitaria (HES-LV).

Scopo del lavoro è stato quello di individuare nuove metodologie diagnostiche rapide, robuste e affidabili, alternative all'analisi *Southern Blot* (SB), per la diagnosi di leucemia linfatica cronica e acuta (LLA/LLC) e di ipereosinofilia variante linfocitaria (HES-LV) investigando i riarrangiamenti clonali dei geni codificanti i recettori antigenici (Ig/TCR). Il razionale alla base di questo studio è che tutte le cellule leucemiche di un paziente con LLA/LLC e HES-LV, derivando da una singola cellule precursore linfoide trasformata, presentano, almeno in teoria, gli stessi riarrangiamenti genici Ig/TCR, che possono essere rilevati tramite PCR. Attraverso uno studio multifasico, infatti, i riarrangiamenti sono stati rilevati tramite PCR dei geni TCR $\gamma\delta$ e IgH, *Multiplex-PCR* dei geni TCR γ e *Semi-nested PCR* dei geni IgH in 246 campioni, da pazienti con LLA, LLC, HES-LV, Linfomi (LNH), malattie linfoproliferative o immunoproliferative, assieme a 5 campioni usati come controllo positivo e 10 classi di campioni usati come controllo negativo dell'analisi. La mono-, oligo- e policlonalità degli amplificati sono state discriminate con corse cromatografiche in ambiente denaturante (DHPLC) in condizioni di temperatura di quasi denaturazione. Tali temperature sono state stabilite dal confronto dei dati prodotti dalle prove di *temperature mapping*, calcolo dell'algoritmo di *Stanford* e predizione delle stesse con il software *Wavemaker* dello strumento DHPLC. Le analisi hanno prodotto risultati conformi a quelli riportati in letteratura indicando che grande attenzione va posta nel definire il *lineage* B/T e nel definire i risultati, i quali devono essere sempre interpretati nel contesto clinico del campione in studio per evitare *pitfall* di pseudo-monoclonalità. La monoclonalità è stata confermata dal sequenziamento diretto su entrambi i filamenti e le regioni N/P dei riarrangiamenti sono state identificate per allineamento con le sequenze presenti nel database IMGT. È stato, quindi, possibile stabilire che le metodologie *Multiplex-DHPLC* e *Semi-nested PCR* sono strategie d'elezione per la diagnosi *de novo* di LLA/LLC e che le PCR-DHPLC sono strategie d'elezione per il monitoraggio qualitativo della MDR nei *follow-up* e per la diagnosi *de novo* dei casi di HES-LV e LNH. I frutti di questa ricerca si offrono come base per mettere a punto una metodica *Multiplex-DHPLC* e *Semi-nested-DHPLC* ancora più rapida analizzando i campioni col "*multiple fragment*" del DHPLC, che eluisce in maniera sensibile e riproducibile i riarrangiamenti TCR monoclonali dalla lunghezza attesa di 170-230bp e IgH di 240-260bp dopo 4-5min di corsa, lasciando inalterata l'ottima risoluzione ottenuta con le corse lunghe di 20min e la capacità di recupero delle frazioni da sequenziare.

TITOLO: Ricerca di metodiche basate sull'analisi DHPLC per la diagnosi dei riarrangiamenti clonali delle Immunoglobuline (Ig) e del T-cell Receptor (TCR) nelle leucemie linfatiche e nelle sindromi eosinofile con variante linfocitaria (HES-LV).

PREMESSA

Lo scopo del lavoro sperimentale è sviluppare biotecnologie diagnostiche innovative per il rilevamento di marcatori specifici della leucemia linfatica acuta (LLA) e cronica (LLC), neoplasie del sistema emolinfoproliferativo originanti da cellule staminali totipotenti o da progenitori emopoietici deputati allo sviluppo delle cellule B o T, che sostituiscono il tessuto emopoietico midollare, circolano nel sangue periferico e infiltrano gli organi linfoidi⁽¹⁾. La diagnosi delle suddette patologie può essere effettuata, in alternativa all'analisi *Southern Blot*, attraverso la determinazione dei riarrangiamenti clonali dei geni delle immunoglobuline (Ig) e del *T cell Receptor* (TCR)⁽²⁻³⁾. Questi avvengono durante la normale maturazione linfocitaria per ampliare e diversificare il repertorio dei linfociti T e sono finemente regolati nel tempo e nello spazio: i *loci* per la catena δ riarrangiano prima di quelli $\beta\gamma$; pertanto, tutte le cellule T hanno i geni $\gamma\delta$ riarrangiati, sia in maniera funzionale che non. Quando, invece, i riarrangiamenti $\gamma\delta$ risultano non funzionali e si ha la delezione biallelica del *locus* δ , la cellula esprime gli antigeni TCR $\alpha\beta$ riarrangiando i segmenti genici α . Similmente nei riarrangiamenti delle Ig i segmenti genici del *locus* H riarrangiano prima di quelli delle catene leggere $\kappa\lambda$ per delezione dei *loci* κ . Quindi, poiché derivano da una singola cellula precursore linfoide trasformata, tutte le cellule leucemiche di un paziente con LLA, LLC e sindrome linfoproliferativa (SLP) hanno in teoria gli stessi riarrangiamenti dei geni del TCR e delle Ig che sono rilevabili con la *Polymerase Chain Reaction* (PCR)⁽⁵⁾.

ANALISI SOUTHERN BLOT E PCR DI CAMPIONI DA PAZIENTI CON LLA, LLC E SLP.

L'individuazione dei marcatori specifici, quali i riarrangiamenti delle regioni giunzionali nei geni delle Ig e del TCR è stato il primo obiettivo perseguito. A tal fine, 18 pazienti affetti da LLA, 18 con LLC, 23 con SLP, 8 con Linfoma e 2 con Leucemia dei Grandi Linfociti (LGL), in parallelo a 1 campione a tessuto placentare, (che, presentando i geni per TCR e IgH in configurazione germinale non riarrangiati, è stato usato come controllo negativo) sono stati analizzati per la presenza dei riarrangiamenti dei geni del TCR β e delle IgH tramite analisi *Southern Blot* con le sonde specifiche marcate con ³²P per TCR β C e per JH6, rispettivamente. La sonda Jh6 è stata più sensibile di quella per i geni TCR rilevando il 96% di clonalità B sia nei campioni con diagnosi clinica di LLA, che di LLC e LNH. Contemporaneamente sono state disegnate coppie di *primer* specifiche per i segmenti genici delle regioni TCR $\gamma\delta$ (che sono stabili, codificati da pochi segmenti V ed espressi con frequente oligoclonalità alla diagnosi e nelle LLA precursor-B) e delle regioni IgH (che sono spesso oligoclonali alla diagnosi ed instabili a causa delle mutazioni somatiche e dei riarrangiamenti secondari che li interessano) nell'ottica di evitare risultati falsi-negativi durante le analisi *follow-up*. In particolare, per TCR γ sono stati disegnati 3 *primer* membri-specifici per il *locus* V γ : V γ 9V γ 11V γ 11), 2 *primer reverse* a doppia specificità: J γ 1.1/2.1 e J γ 1.3/2.3 e 1 *primer consensus* per rilevare tutti i membri della famiglia V γ 1 riducendo il numero di reazioni PCR alla diagnosi; per TCR δ sono stati disegnati i *primer* per i segmenti genici V δ 1, V δ 2, V δ 3, D δ 2 e i *primer reverse* per i segmenti D δ 3 e J δ 1. Per l'analisi dei geni della catena IgH sono stati disegnati

5 *primer* per le famiglie dei segmenti genici V (2 *primer* a doppia specificità Vh1/7 e Vh4/6 e 3 *primer* segmenti-specifici Vh2-Vh3-Vh5), 7 *primer* per la regione D (da Dh1 a Dh7) e 1 *primer reverse consensus* per la regione J. Le reazioni PCR sono state eseguite, in condizioni di *annealing* non stringente in modo da poter amplificare tutti i possibili riarrangiamenti presenti nel campione in analisi distinguendo poi tra i risultati veri positivi e falsi positivi con una tecnica post-PCR. In questa fase sono stati analizzati anche 5 campioni di sangue periferico da pazienti non affetti da leucemia, 1 pool di 10 campioni di sangue periferico di pazienti non affetti da leucemia e campioni di linee cellulari continue Jurkat (*Southern R/R*) e REH (*Southern R/R*) e Karpas (*Southern R/G*). In parallelo sono state eseguite reazioni di amplificazione del gene costitutivamente espresso RAS-K2e, usato come controllo interno.

CONDIZIONI DHPLC A GRADIENTE TEAA LINEARE PER PCR V γ I-J γ 1.3/2.3.

Tutti i campioni risultati positivi all'amplificazione PCR sono stati discriminati mediante la tecnica di *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC), che, sfruttando il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (RP-IP) ed utilizzando un sistema di controllo della temperatura (colonna, tamponi e campioni sono, cioè, termostatati alla stessa temperatura) ed uno spettrofotometro corredato di microcella a flusso (con lettura a 260nm), è in grado di rilevare differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e steriche con una sensibilità superiore al 97%. Per stabilire la temperatura ideale alla quale risolvere i campioni e distinguere, così, tra amplificazioni di riarrangiamenti clonali, frutto di processi neoplastici, e amplificazioni di riarrangiamenti policlonali, dovuti a reazioni immuni, evitando di incorrere in risultati falsi-positivi, è stato necessario produrre un'analisi della *Temperature Mapping* dei prodotti clonali delle cellule Jurkat e REH e dei prodotti policlonali delle cellule del Pool e di un paziente LLA-B. A tal fine le iniezioni seriali (8ml/iniezione) degli amplificati con la coppia di *primer* V γ I-J γ 1.3/2.3 sono state corse a 13 temperature diverse (da 50°C a 70°C) in gradiente lineare di trietilammonioacetato-acetonitrile (TEAA 0.1mol/l; TEAA 0.1mol/l + 250ml/l acetonitrile 2% aumento; velocità di flusso 0.9ml/min), applicando il metodo *Universal Liner* dello strumento, e la temperatura ottimale determinata per questa mix PCR è risultata essere quella di 58°C (figura 1). Prima di procedere all'analisi DHPLC gli amplificati PCR sono stati denaturati a 95°C x 5 min e rinaturati gradualmente da 95°C a 10°C con decremento di 1°C/min allo scopo di indurre la formazione di eventuali filamenti heteroduplex. In tale fase sono stati valutati sia i tempi (intervallo di 5-30 minuti) sia le temperature di rinaturazione (intervallo di 4-40°C)¹³, ottenendo che la risoluzione e la discriminazione dei prodotti mono- e policlonali non ne era influenzata minimamente; pertanto, tale passaggio è stato omesso nelle analisi successive.

DETERMINAZIONE DHPLC A GRADIENTE TEAA VARIANTE PER PCR V γ I-J γ 1.3/2.3

I prodotti clonali delle cellule Jurkat e REH e quelli policlonali delle cellule del Pool e del paziente LLA-B amplificati con la coppia di *primer* V γ I-J γ 1.3/2.3 sono stati analizzati alle temperature di 54.3-55.3-56.3-58.3-59.3°C in variazione di gradiente di tampone TEAA, applicando il metodo *Mutation Detection* dello strumento. La temperatura ottimale per discriminare tali prodotti è risultata essere 56.3°C. Tale risultato conferma l'assunto che con questa variazione la colonna cromatografica raggiunge le condizioni ideali per la separazione più velocemente (2°C in meno e

corsa cromatografica di 7 minuti) di quanto avvenga in modalità gradiente lineare (corsa cromatografica di 20 minuti), ma ha lo svantaggio di indurre l'operatore in un'interpretazione errata del cromatogramma "slargando" il picco di eluizione e, pertanto, a tale metodica è stata preferita quella che prevede la corsa cromatografica in gradiente lineare di TEAA.

DETERMINAZIONE DEL POTERE DISCRIMINANTE DEL DHPLC

Gli stessi prodotti considerati nella fase precedente sono stati utilizzati per poter stabilire il potere discriminante dello strumento. Analizzando miscele V/V degli amplificati Jurkat-REH, Jurkat-Pool, REH-Pool, Campione LLA-B-Pool, Campione LLA-B-Jurkat, Campione LLA-B-REH si è dimostrato che lo strumento è in grado di distinguere all'interno di una stessa mix i picchi di eluizione monoclonali, quelli policlonali, il rumore di fondo, e anche i picchi biclonali e quelli prodotti da riarrangiamenti biallelici, i quali eluiscono in due picchi separati.

DETERMINAZIONE GRADIENTE TEAA LINEARE DHPLC PER PCR TCR $\gamma\delta$ E IGH

È stata eseguita l'analisi della *Temperature Mapping* per le restanti mix PCR correndo ciascun amplificato a 9 temperature in condizioni di gradiente lineare di TEAA.

CONFRONTO DEI DATI SPERIMENTALI CON I PARAMETRI TEORICI.

I dati sperimentali riguardanti le differenti temperature ottenuti nelle fasi II e V sono stati poi confrontati e confermati dai parametri teorici di temperatura e gradiente ottenuti analizzando le sequenze presenti in *genbank* del sito ImMunoGeneTics di prodotti germinali teoricamente riarrangiati senza delezioni o aggiunte nucleotidiche mediante il calcolo dell'*Algoritmo di Stanford* e il software WAVE-MARKER *Transgenomic*⁽⁶⁾. Con l'algoritmo di *Stanford* abbiamo ottenuto: per le mix TCR valori oscillanti tra 52°-61°C e per le mix IgH valori tra 61°-63°C, mentre con il software WAVE-MARKER valori di 54° -59°C per le mix TCR e di 59.6°-63°C per le mix IgH.

ANALISI DEI CAMPIONI ALLE DETERMINE CONDIZIONI OTTIMALI DHPLC.

I 18 pazienti affetti da LLA, 18 con LLC, 23 con SLP, gli 8 campioni di Linfoma, i 2 campioni con LGL, il campione di placenta e i 5 campioni di sangue periferico di pazienti non affetti da leucemia, sono stati testati per le temperature ottimali ottenute nella fase V, ottenendo i risultati congrui a quelli attesi e rilevando clonalità nel 98% dei casi e pseudo-clonalità in alcuni campioni da pazienti non leucemici.

CONVALIDA DELLA METODICA PCR-DHPLC.

La su descritta metodica è stata applicata per la ricerca dei riarrangiamenti clonali dei geni delle Ig e del TCR in nuovi pazienti affetti da ALL (18 pazienti), CLL (30 pazienti), linfoma (29 pazienti), linfocitosi delle LGL (3 pazienti), SLP (21 pazienti), e in 13 pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica (LMC), in 9 pazienti con malattie immunoproliferative, 2 con leucemia plasmacellulare, 1 con Policitemia Vera (PV), 1 con Leucemia delle cellule capellute (HCL), 1 con Sindrome Mielodisplastica (SMD), 1 con Pancitopenia, 2 con Neutropenia ed un nuovo campione non leucemico, definito Controllo Amplimedical. I risultati così prodotti hanno concordato con quelli attesi e hanno dimostrato che la metodica è altamente sensibile.

APPLICAZIONE PCR-DHPLC ALLA SINDROME IPEREOSINOFILIA IDIOMATICA VARIANTE LINFOCITARIA (VL-HES).

In questa fase la metodica descritta nelle fasi II e V è stata testata su 35 pazienti affetti da Sindrome Ipereosinofila Idiomatica (HES), caratterizzati dall'aver persistente ipereosinofilia⁷ di origine ignota, elevati livelli di interleuchina 5 (IL-5), citochina necessaria per la crescita e la differenziazione degli eosinofili⁸. A differenza della variante mieloide, tipica della leucemia eosinofila cronica e caratterizzata dalla presenza del marcatore gene-fuso FIP1L-PGFRA derivante dall'alterazione cromosomica 4q12, la variante linfocitaria è caratterizzata dall'espansione monoclonale di cellule T (per lo più T-Helper) periferiche esprimenti citochine tipo Th2 (IL-4, 13, 5 portanti all'iperproduzione di IgE) con immunofenotipo aberrante CD3⁺CD4⁺CD8⁻ o CD3⁺CD4⁺CD8⁺ o CD3⁺CD4⁺CD8⁺ e progressione della malattia in linfoma delle cellule T⁹. 4 pazienti, infatti, con conta linfocitaria totale di 15% - 25% - 37% - 20% hanno mostrato un immunofenotipo aberrante di 0.26% - 4% - 0.6% e 2.4% rispettivamente e leggera positività per i riarrangiamenti dei geni del TCR. Allo scopo di confermare i risultati prodotti e convalidare l'applicazione della metodica, 30 pazienti con sospetta HES e la linea cellulare continua EOL1, portante il gene-fuso 4q11, sono stati analizzati sia per la presenza del gene fuso FIP1L-PGFRA sia per la presenza di geni TCR riarrangiati ottenendo risultati coerenti: i pazienti portanti alterazione 4q12 hanno mostrato geni TCR non riarrangiati e viceversa. Ancora una volta la metodica risulta essere molto sensibile.

ANALISI MULTIPLEX-PCR E SEMI-NESTED PCR DI CAMPIONI CON LLA, LLC E SLP.

Allo scopo di velocizzare la procedura, è stata messa a punto una strategia di *Multiplex-PCR* per i geni del TCR, riducendo così il numero di reazioni da 16 $\frac{\text{PCR}}{\text{campione}}$ a 2 $\frac{\text{PCR}}{\text{Campione}}$, e per IgH, riducendo così il numero di reazioni da 12 $\frac{\text{PCR}}{\text{campione}}$ a 1 $\frac{\text{PCR}}{\text{Campione}}$. Per evitare la dimerizzazione dei *primer* ed ottenere l'appaiamento al target per almeno i $\frac{2}{3}$ della loro lunghezza, sono state disegnate nuove coppie di *primer*¹¹: per TCR 9 *primer* senso riconoscenti i segmenti genici codificanti per la catena γ del TCR V2-V3-V4-V5-V8-V9-V10-V11-V12 (ψ VC) e 2 *primer* JGT12 e JGT3 antisense a doppia specificità riconoscenti i segmenti genici J1.1/2.1 e J1.3/2.3, rispettivamente); e per IgH 1 *primer* senso *consensus* per la seconda regione *framework* VH (FR2A) e 2 *primer* antisense LJH, usato nel primo *round* PCR e VLJH, usato nel 2° *round* PCR e che è posto a monte del primo, così da attuare una strategia semi-nested. Le reazioni PCR sono state allestite come indicato in tabella 7. Per quanto concerne le reazioni per i riarrangiamenti TCR, le linee cellulari continue Karpas, Jurkat e Reh ed i campioni di pazienti affetti da ALL-T, ALL-B e CLL analizzati hanno prodotto 1 o 2 bande discrete di grandezza attesa e compresa tra 170 e 230bp, grandezza dipendente dal numero di nucleotidi inseriti o deleti alle giunzioni VJ. Per quanto concerne le reazioni per i riarrangiamenti IgH, le linee cellulari continue Karpas, Jurkat e Reh ed i campioni di pazienti affetti da ALL-T, ALL-B e CLL analizzati hanno prodotto 1 o 2 bande discrete di grandezza attesa e compresa tra 240 e 260bp, grandezza dipendente dal numero di nucleotidi inseriti o deleti alle giunzioni VDJ.

ANALISI DEI PRODOTTI DELLA MULTIPLEX-PCR E SEMI-NESTED PCR PER HETERODUPLEX ANALISI.

Per valutare la presenza delle bande monoclonali nella miscela amplificata, i campioni sono stati denaturati a 94°C per 5 minuti e velocemente rinaturati a 4°C per altri 5 minuti e quindi analizzati tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 3% in

TAE 1X. In tale fase sono stati valutati sia i tempi (intervallo di 5-30 minuti) sia le temperature di rinaturazione (intervallo di 4-40°C)¹³, ottenendo che variazioni di tempo non influenzano la formazione dell'heteroduplex, mentre temperature di circa 30°C migliorano la formazione degli heteroduplex e temperature di 4°C permettono una migliore distinzione tra bande mono- e policlonali (dati non mostrati).

ANALISI MULTIPLEX-PCR, SEMI-NESTED PCR E ANALISI HETERODUPLEX DI CAMPIONI DAPAZIENTI AFFETTI DA LLA, LLC, SLP, LMC, IPEREOsinofilia E LINFOMI.

Tutti i 246 campioni precedentemente analizzati sono stati sottoposti ad analisi *multiplex* e analisi *heteroduplex* insieme ai campioni dei controlli negativi, quali: i pazienti non leucemici, i pazienti affetti da LMC e HES, la placenta e la linea cellulare EOL1, per i quali l'analisi ha mostrato un ampio *smear* di materiale amplificato tipico dei campioni policlonali. I campioni da pazienti affetti da dermatomiosite, neutropenia, linfocitosi LGL, ALL, CLL, SLP e LMC risultati monoclonali alle analisi *Southern* e PCR hanno mostrato bande discrete di 170-230bp. Confermando i risultati della fase IX, il campione del *pool* di 10 pazienti non leucemici ha prodotto una debole banda di 170bp dovuta, probabilmente, alla presenza di un basso repertorio di cellule T nel campione. I campioni da pazienti HES mostrandoti immunofenotipo aberrante ed alcuni campioni di pazienti affetti da SLP e positivi all'analisi *Southern*, invece, hanno prodotto lo *smear* caratteristico della policlonalità e ciò è, probabilmente, imputabile alla bassa sensibilità della PCR, la quale dipende sia dal numero relativo di linfociti T monoclonali e policlonali presenti nel campione in analisi, sia dal suboptimale "*priming*" PCR ai segmenti V inusuali usati nel riarrangiamento in analisi¹². Analoghi risultati sono stati prodotti con le amplificazioni semi-nested per i geni delle IgH.

ANALISI DEI CAMPIONI MEDIANTE DHPLC.

Poiché l'analisi *heteroduplex* dipende dalla visualizzazione di un segnale di amplificazione discreto prodotto dalla popolazione monoclonale e sovrastante un *background* di segnale di amplificazione diffuso derivante dalla popolazione policlonale (in cui il clone leucemico è immerso), gli amplificati *Multiplex* PCR sono stati risolti al DHPLC (8ml/iniezione) in gradiente lineare di trietilammonioacetato-acetonitrile (TEAA 0.1mol/l; TEAA 0.1mol/l + 250ml/l acetonitrile 2% aumento; velocità di flusso 0.9ml/min), applicando il metodo *Universal Liner* dello strumento e la temperatura di 50°C. I campioni monoclonali hanno prodotto profilo di eluizione uguale a quello prodotto dalle linee cellulari continue Reh, Jurkat e Karpas, mentre i campioni policlonali hanno prodotto profili simili a quelli dei campioni di pazienti non leucemici, della placenta e della linea cellulare continua EOL1, confermando i risultati ottenuti dall'analisi *heteroduplex*.

SEQUENZIAMENTO DEI CAMPIONI E DELLE LINEE CELLULARI CONTINUE.

Per confermare i risultati ottenuti, le bande prodotte con l'amplificazione di singole PCR dalle linee cellulari Jurkat e Reh, dalla placenta, dal pool e dai campioni HES, ALL e CLL, sono state purificate dal gel, con il kit QUIAquick GelExtraction (Quiagen), e riamplicati con i rispettivi *primer*. Il prodotto di amplificazione è stato purificato, con il Kit QuiaQuik Purification PCR Product (Quiagen) ed è stato controllato su gel d'agarosio all'1.5% in TBE 1X, corso insieme al *size marker* II (Roche), il quale, avendo bande con peso molecolare noto, ne ha permessa la quantizzazione. Circa 20ng/100bp di ciascun purificato e 2µM di ogni rispettivo *primer* sono stati inviati al laboratorio di Genomica del CE.IN.GE. per il

sequenziamento diretto di entrambi i filamenti secondo metodo Sanger. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti in *GeneBank* (EMBL, National Center for Biotechnology Information) e in *ImMunoGeneTics* per l'individuazione dei segmenti coinvolti nel riarrangiamento. Tale analisi ha evidenziato che: campioni amplificanti con le coppie di *primer* $V_{\gamma x}$ - $J_{\gamma 1.1/2.1}$ e $V_{\gamma x}$ - $J_{\gamma 1.3/2.3}$ (dove x sta per qualsiasi segmento V) hanno il riarrangiamento $V_{\gamma x}$ - $J_{\gamma 1.1/2.1}$ in entrambi i casi e che il segmento $J_{\gamma 1.3/2.3}$ è in configurazione germinale; rari sono i casi in cui i campioni hanno il riarrangiamento Dh7-Jh.

DETERMINAZIONE DI CUTOFF PER LA DISCRIMINAZIONE DEI CAMPIONI RISULTATI POSITIVI ALL'ANALISI PCR PER TCR $\gamma\delta$ E IGH.

Allo scopo di ridurre il numero di positività di linfociti T monoclonali e oligoclonali presenti nei campioni in analisi e che hanno influenzato l'esito della PCR, inducendo l'operatore in erronea interpretazione di biclonalità nel caso di campioni clonali e di *pseudo-clonalità* nel caso di campioni policlonali, come le malattie autoimmuni e le infezioni virali, è stata valutata l'area dei picchi di tutti i profili di eluizione dei 246 campioni analizzati al DHPLC, utilizzando la funzione di calcolo dell'integrale del programma *Wavemaker analysis* (Transgenomic). I valori ottenuti sono stati analizzati con il programma *GraphPad Prism vers. 4.0a 2003* che li ha dispersi in uno *scattergram* in base alla diagnosi clinica e alla coppia di *primer* con cui sono stati prodotti. Il confronto degli *scattergram* ottenuti per i campioni con diagnosi di LLA, SLP, LLC, LNH, LMC, HES, MIP e PLN non ha permesso l'individuazione di una soglia numerica, al di sotto della quale i campioni potevano dirsi negativi e viceversa. Questo perché i valori delle aree dei picchi sono stati distribuiti nella zona dello *scattergram* compresa tra 10^2 - 10^7 , sia per i campioni attesi positivi sia per i campioni usati come controllo negativo. Ciò è spiegabile ipotizzando che l'efficienza dell'amplificazione dei riarrangiamenti *pseudo-clonali* è dipesa esclusivamente dalla capacità della polimerasi di amplificare le regioni di DNA comprese tra i *primer* appaiati, perché, indipendentemente dalla quantità del dato riarrangiamento nel campione, il processo PCR è condotto per 2ⁿ volte, determinando risultati paragonabili in termini di quantità di prodotto finale della reazione PCR.

DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA.

La sensibilità e la specificità diagnostica sono state calcolate su 194/246 campioni testati con diagnosi clinica confermata di LLA, LLC, SLP, HCL, SMD, PV, Mieloma e MGUS, LGL, LNH, LPC, HES, HES-LV, LMC, PNL. Tali parametri sono stati considerati per le metodologie SB, *multiplex-PCR*, *semi-nested-PCR* e singole PCR per i *loci* $\gamma\delta$ del TCR e per i *loci* V e D delle IgH. Considerando insieme i valori di sensibilità e specificità, l'approccio *semi-nested* è risultato migliore rispetto a quello singola PCR, ottenendo solo un leggero abbassamento della sensibilità rispetto al SB. La più bassa sensibilità registrata con la *mix II* della strategia *multiplex-PCR* è dovuta al fatto che i *primer* in essa presenti sono specifici per segmenti V rari ed è ben compensata dall'alta specificità (79% circa) registrata. A conferma di quanto detto nei precedenti paragrafi, la PCR singola per il *locus* TCR γ ha mostrato una specificità estremamente bassa (18%) imputabile alla maggiore produzione di risultati falsi-positivi, a loro volta causati dalla presenza particolarmente frequente di tali riarrangiamenti nei campioni di MB normale, come riscontrato anche da Cavé H *et al.* (1994). La metodologia PCR per i riarrangiamenti TCR e IgH è risultata, pertanto, applicabile solo per il controllo della MRD, perché prendendo in

considerazione più di due *target* PCR previene i risultati falsi-negativi durante i *follow-up* dovuti alla formazione di nuovi riarrangiamenti e alla creazione di riarrangiamenti secondari che portano alla perdita della regione giunzionale inizialmente identificata alla diagnosi, cosa frequente nei geni IgH che sono spesso clonali alla diagnosi.

CONCLUSIONI

L'elevata sensibilità della metodica PCR-DHPLC descritta nelle fasi VI e IX ha fornito dati apparentemente discordanti rispetto alla tecnica del *Southern Blot*, poiché alcuni campioni trovati monoclonali al *Southern* sono risultati biclonali in PCR-DHPLC e alcuni campioni negativi al *Southern* sono risultati monoclonali in PCR-DHPLC. La metodica PCR-DHPLC fornisce ulteriori informazioni: i riarrangiamenti e/o le delezioni del *locus* TCR γ avvengono frequentemente nei pazienti LLA-B analizzati; i riarrangiamenti incompleti V δ 2-D δ 3 e D δ 2-D δ 3 sono usati dai cloni leucemici; i riarrangiamenti completi V γ 9-J γ 1.3/2.3 e V γ 1-J γ 1.3/2.3 sono maggiormente usati dai cloni leucemici; il segmento Dh7-27 (immediatamente a monte della regione Jh) è quasi esclusivamente usato dai cloni leucemici; i segmenti V dei geni della catena IgH sono usati quasi esclusivamente *random*, eccezion fatta per i pazienti affetti da LLC, che mostrano un uso preferenziale dei segmenti Vh3-Jh; i profili di eluizione sono altamente sequenza-specifici con distinti tempi di ritenzione e differenti temperature di analisi (1-2°C), perciò la *performance* di discriminazione in base alla lunghezza a 50°C è dell' 1-3% in gradiente lineare di TEAA, cioè che un prodotto di 530bp con variazione di lunghezza (distribuzione gaussiana) di \pm 20 nucleotidi non è discriminabile; è possibile identificare il tipo di riarrangiamento in circa il 95% dei pazienti alla diagnosi con informazioni sulla sequenza delle regioni giunzionali; i *primer*, pertanto, possono essere usati per l'identificazione alla diagnosi e per analisi di sequenze delle regioni giunzionali e per la detenzione della MMR nei campioni *follow up*; la metodica *multiplex* PCR è da preferirsi rispetto all'altra per *screening* diagnostici. Tra i *pitfall* delle metodiche sopra descritte è da evidenziare che: esiste un alto rischio di *over-interpretazione* dei prodotti PCR dominanti riferiti come diagnosi di leucemia, che può essere evitato ripetendo le determinazioni PCR indipendenti dello stesso campione ed applicando tecniche di separazione ad alta risoluzione come il DHPLC¹⁰; si possono avere risultati "monoclonali" anche quando il numero di linfociti T e B presenti nel campione è piccolo, poiché ogni linfocita B o T verrà amplificato dalla metodica delle fasi VI e IX¹⁰; si possono avere risultati "monoclonali" anche in casi di malattie autoimmuni ed in pazienti con infezioni virali e pertanto non avere significato clinico¹⁰; è necessario interpretare i risultati di analisi di clonalità PCR nel contesto ben caratterizzato della patologia, come quando ci si trova in presenza di campioni di pazienti affetti da LMC con riarrangiamenti dei geni del TCR¹⁰; è importante avere un controllo di qualità dei *primer*, i quali tendono a non *annealare* quando il *target* presenta mutazioni¹⁰; i riarrangiamenti V γ 1-J γ 1.3/2.3 e V δ 2-J δ 1 sono regolarmente presenti nelle cellule non leucemiche e, pertanto, la sensibilità dei *target* PCR parzialmente dipende dalla frequenza dei riarrangiamenti genici nelle cellule normali. In conclusione, i nostri risultati consentono di affermare che la metodica *Multiplex* PCR-DHPLC è sicuramente una tecnica di elezione per lo studio dei riarrangiamenti dei geni per il TCR e IgH di questi pazienti perché è veloce, in grado di fornire maggiori informazioni rispetto al *Southern Blot*, precisa nel risultato, altamente riproducibile, di facile interpretazione e in ultimo, ma non meno importante, sicura per l'operatore.

DHPLC-based assays for clonally rearrangement Immunoglobulin (Ig) and T cell Receptor (TCR) genes in lymphatic leukemia and hypereosinophilic syndrome lymphocytic variant.

Introduction.

The aim of this thesis is developed a new biotechnology for acute/chronic lymphocytic leukemia (ALL/CLL) - specific markers. ALL/CLL is emolymphoproliferative system disease arising by stem cells or emopoietic progenitor committed in B or T line. These pathologies are diagnosed by Southern Blot analysis or clonally rearrangement IgH and TCR receptor detection. This rearrangement occurs for amplify and diversify the B and T lymphocytic repertoires, which are subtly regulated in time and space: the TCRd *loci* rearranges before of TCRb and TCRg *loci*; therefore, all T cells have the d and g rearrangements functionally and not functionally. When the gd rearrangements are not functionally, the d *loci* are deleted on both alleles and the cell show the TCRab, for chain a genes rearrangements. Similarly, the IgH (high) *loci* rearranges before of the IgL (light) *loci* k and l, for deletions k genes.

Since the leukemia clones arise by single cell transformed, all leukemia cells from ALL or CLL patients are same TCR/IgH genes rearrangements, that are detected by Polymerase Chain reaction (PCR).

Southern Blot Analysis and PCR of ALL, CLL and SLP patients samples.

The first object of this thesis was the detection of specific-markers, as rearrangements of Ig and TCR genes. In fact, 18 samples with ALL, 18 with CLL, 23 with SLP, 8 with lymphoma (NHL) and 2 with LGL, together 1 sample by placenta (that has the Ig and TCR genes in germinal configuration), were analyzed for TCR β C and IgH rearrangement detection by specific labeled ^{32}P TCR β C and Jh6 probes Southern Blot. Jh6 probe was more sensible than TCR β C, by detecting 96% of B clonality, both ALL samples and CLL and NHL.

Contemporary, specific primers were designed for the TCR γ δ regions, because they are stable, they have few V genes and they have oligoclonality at diagnoses. Specific primers were designed also for IgH regions, because they are often oligoclonal at diagnoses and instable for somatic mutations and they have secondary rearrangements.

All these primers were designed to avoid false-negative results in follow up analysis. In particular, we had designed 3 V γ gene segment specific for TCR (V γ 9-V γ 10-V γ 11), 2 reverse primers specific: one for both J γ 1.1 and J γ 2.1 and another one for both J γ 1.3 and J γ 2.3, 1 *consensus* primer for all V γ 1 family members, reducing PCR reactions number at diagnosis. Also member specific primers for TCR δ (V1-V2-V3-D2) and reverse primers D3 and J1 were designed. For IgH detection we had designed 5 Vh gene family-specific primers, 2 primers specific: one for both Vh4 and Vh6 and another for Vh1 and Vh7. 7 gene family specific primers for Dh region and one reverse *consensus* primer Jh were designed. The PCR reactions were performed, as in table 1, with not gripping annealing at aim to amplified all possible rearrangements in sample distinguishing between true-positive and false-positive results when analyzed by post-PCR technique.

In this step, 5 peripheral blood samples from healthy donors, 1 pool of 10 healthy donors and cell lines Jurkat (southern R/R), REH (Southern R/R) and Karpas

(Southern R/G) were analyzed. PCR reactions for constitutively active RAS-K2e gene were performed to avoid false/negative results, because this gene was used as internal control.

Establishment of optimal TEAA liner gradient DHPLC conditions for PCR mix V γ 1-J γ 1.3/2.3.

All PCR-positive samples were analyzed by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) at aim to distinguish between false-positive and true-positive rearrangements.

DHPLC have the reverse partition and ionic matching system, that allow control temperature (oven, column, buffers and samples were thermostated at same temperature). It discriminates differ molecules by chemical, physical, sterical characteristic features, with a sensibility at 97%.

To establish the optimal temperature for detect the malign clonally rearrangements between reactive rearrangements, we were make a temperature mapping of Jurkat and Reh monoclonal, Pool polyclonal and ALL patient biclonal samples PCR products. V γ 1-J γ 1.3/2.3 PCR products were runs at serial injections (8ml/injection) 13 differ temperatures (from 50°C at 70 °C, table 2) in linear TEAA gradient (TEAA 0.1mol/l; TEAA 0.1mol/l+250mol/l acetonitrile 2% increase; 0.9ml/min flow velocity) applied Universal Liner method of the DHPLC. The optimal temperature for this PCR mix was 58°C (figure 1).

Before to DHPLC run, the samples were denatured at the 95°C for 5min and gradually renatured from 95°C at 10°C with decrease of 1°C/min, as to induct heteroduplex and homoduplex formation. In this step we had evaluated both the time (range 5-30min) and the renaturation temperatures (range 4-40°C), obtaining that the resolution and discrimination of mono- and polyclonal products not influenced by time and temperature. For that, this step was omitted for follow analyses.

Establishment of optimal TEAA variation gradient DHPLC conditions for PCR mix V γ 1-J γ 1.3/2.3.

The Jurkat and Reh monoclonal, Pool polyclonal and ALL patient biclonal V γ 1-J γ 1.3/2.3 products were detected by variation TEAA gradient DHPLC at the temperatures of 54.3-55.3-56.3-58.3-59.3°C, applying the mutation detection method of the DHPLC.

The optima temperature was 56.3°C (figure 2), confirming the issue that the column was in optimal conditions before than when universal liner was applied, and the runs were shorter (7min *versus* 20min). This method, however, was detrimental because of peaks enlargement and because it induced the operator in drawbacks (figure 3).

Establishment of DHPLC distinguishing power.

The same samples, analyzed in previous step, were used for determine the distinguishing power of the DHPLC. Jurkat+Reh, Jurkat+pool, Reh+pool, Jurkat+ALL patient, Reh+ALL patient, Pool+ALL patient V γ 1-J γ 1.3/2.3 amplified V/V mix were runs at the DHPLC in linear TEAA gradient and variant TEAA gradient at same temperatures. These results were showed that the DHPLC is able to discriminate in same mix between mono-, bi-, poly- and oligoclonal peaks (figure 4).

Establishment of optimal TEAA liner gradient DHPLC conditions for PCR IgH and TCR mixes.

The temperature mappings were carried out for remaining TCR and IgH PCR mixes, running any amplified at 9 temperatures (table 3) in liner TEAA gradient, obtaining the results in table 4.

Comparison between the experimental and theoretic data.

The experimentally obtained temperature for any PCR mix were compared and confirmed by theoretic temperatures. These data were obtained calculating Stenford algorithm with the genbank ImMunoGeneTics sequences products, theoretically rearranged without deletion or insertion bases (table 5). These sequences were used for predict the semi-denaturation temperatures by Wavemaker software Transgenomic. The temperatures obtained with temperature mappings, Stenford algorithm and Wavemaker software were in table 6.

Analysis samples at optimal conditions DHPLC experimental determined.

18 ALL, 18 CLL, 23 SLP, 8 NHL, 2 LGL, 1 placenta and 5 healthy donors samples were tested by DHPLC at optimal temperatures obtained analogous results at that expected. The monoclonality was detected at 98% of samples and the pseudo/monoclonality was detected in some healthy donor samples.

Validation PCR-DHPLC method.

The Ig and TCR rearrangements were found in 18 new patients with ALL, 30 with CLL, 29 with NHL, 3 with LGL, 21 with SLP, 13 with LMC, 9 with immunoproliferative diseases, 2 with plasmacellular leukemia, 1 with PV, 1 with HCL, 1 with SMP, 1 with pancitopenia, 2 with Neutropenia and 1 CNA polyclonal sample. The results were agreed with expected, showing that the method was more sensible.

Analysis HES-LV patients by PCR-DHPLC.

In this step 35 samples from hipereosinophylic syndrome lymphocytic variant (HES-LV), with high level of IL5. The samples without fusion gene FIP1L-PDGFR4 from chromosomic deletion 4q12 had the Th2 type T cells, with aberrant immunophenotype CD3-CD4+CD8- or CD3+CD4-CD8- or CD3-CD4-CD8+. These samples can develop T cells lymphoma.

4 patients with total lymphocytic count of 15% - 25% - 37% -20% showed aberrant immunophenotype of 0.26% - 4% - 0.6% - 2.4%, respectively. These samples were lightly positive for TCR gene rearrangements. To validate these results and PCR-DHPLC method 30 patients with suspect HES and cell line EOL1 with 4q12 were analyzed both for FIP1/PDGFR4 fusion gene and TCR gene rearrangements, obtained results agree with expected: the patients with 4q12 not showed TCR rearrangements and viceversa.

This shows that the method is very sensible.

Analysis by Multiplex PCR and semi-nested PCR of patient samples affected by ALL and CLL and LPS.

To accelerate the process, we made a multiplex PCR for TCR γ gene, reducing the number of the reactions from 16 to 2, and for IgH gene, reducing the number of reactions from 12 to 1. To avoid primers dimerization and to obtain the annealing for 2/3 of the primers lengths, new primers were designed: for TCR γ 9 forward primers

for V2-V3-V4-V5-V8-V9V10-V11-V12 gene segments and 2 reverse primers for J1.1/2.1 and J1.3/2.3, while for IgH 1 forward consensus primer for second framework region (FR2A) and 2 reverse primers LJH and VLJH, upstream of LJH. The PCR reactions were established as in table 7.

The cell line Karpas, Jurkat and Reh and ALL and CLL sample were analyzed by multiplex PCR, producing a 1 or 2 band of 170-230bp.

The cell line Karpas, Jurkat and Reh and ALL and CLL sample were analyzed by semi-nested PCR, producing a 1 or 2 band of 240-260bp.

Analysis by Heteroduplex Analysis of multiplex and semi-nested PCR products.

To evaluate the presence of monoclonal bands in PCR mix, the samples were denatured at 94°C for 5min and quickly renatured at 4°C for 5min and run on agarose 3% gels in TBE1X.

In this step, we evaluated both the time (range 5-30min) and the renaturation temperatures (range 4-40°C), obtaining that the time variations not influenced the heteroduplex formation, while the temperature of 30°C made a better heteroduplex, but temperature of 4°C made a better discrimination between monoclonal and polyclonal rearrangements.

Analysis by multiplex PCR and semi-nested PCR of HES, NHL, ALL, CLL, LPS, CML patient samples.

All 246 samples, analyzed by TCR and IgH PCR, were analyzed in this step by multiplex and semi-nested PCR. The products were discriminated by heteroduplex analysis. The cell line EOL1, HES, placenta and CML samples produced a wide smear of amplified matters typical of polyclonal samples.

The HES-LV samples produced a smear because of suboptimal priming PCR to V unusual gene segments. Same results were produced by semi-nested PCR.

Analysis by DHPLC.

To avoid difficulty of heteroduplex analysis, the multiplex and semi-nested products were run on DHPLC (8ml/injection) at temperature 50°C in liner TEAA gradient applying the universal liner method.

The monoclonal products were showed same peaks for Jurkat, Reh and Karpas cell lines and samples.

Samples and cell lines sequencing.

To confirm the results obtained, the bands by single PCR from cell lines and samples were purified by Qiagen kit and amplified for sequencing. The blast in EMBL database and in IMGT was showed that samples with primer V γ x-J γ 1.1/2.1 and V γ x-J γ 1.3/2.3 (where x is any V segment) had V γ x-J γ 1.1/2.1 in both cases and that the V γ x-J γ 1.3/2.3 rearrangements were in germinal configuration. The cases with Dh7-Jh rearrangements were rare.

Cutoff to distinguish positive IgH and TCR $\gamma\delta$ results.

To avoid erroneous biconality and pseudo-monoclonality interpretations, we evaluated the peak's area of all elution's profiles of 246 samples analyzed by DHPLC, using Wavemaker analysis software.

The results were showed in a scattergram, by Graphpad Prism vers. 4.0a 2003, based on clinical diagnoses. Any threshold was obtained comparing all

scattergrams, because the area's values were distributed in the scattergram range between 10^2 - 10^7 . It is think to derive by amplication efficiency for that the polimerase amplificate DNA regions independently from rearrangement quantity in the samples analyzed.

Determination of diagnostic sensibility and diagnostic specificity.

The diagnostic specificity and sensibility were calculated on 194/246 samples tested by clinical diagnosis ALL, CLL, LPS, HCL, SMD, PV, immunoproliferative diseases, LGL, NHL, HES, HES/LV, CML, NLP (TABLE 8). These parameters were considered for SB, multiplex PCR, semi-nested PCR and single PCR TCR $\gamma\delta$ and IgH. The semi-nested approach was more sensitive and specific respect to a single PCR. The lower registered sensibility with mix II multiplex PCR was due to its primers were specific for inusual V segments. The single PCR for TCR γ *locus* showed a low specificity due to a more false- positive results, caused by the frequency of these rearrangements in MB healthy samples, as reported by Cavé et al. (1994).

The single PCR for TCR and IgH rearrangements was applied for MRD detection, because considering more than 2 target PCR prevent the false-negative results during the follow up.

Conclusions.

The high sensibility of PCR-DHPLC method showed discordant results respect to SB analysis, because any monoclonal samples in SB were found biclonal in PCR-DHPLC, while other negative samples in SB resulted monoclonal in PCR-DHPLC. The rearrangements and/or deletions of TCR γ *locus* are frequent in analyzed ALL-B samples. The incomplete rearrangements Vd2-Dd3 and Dd2-Dd3 are predominantly used by leukemic clones. The complete rearrangements of Vg9-Jg1.3/2.3 and Vg1-Jg1.3/2.3 are more used by leukemic clones. Dh7-27 segment, upstream of Jh region, is exclusively used by leukemic clones. Vh gene segments are used exclusively random, except to Vh3-Jh in CLL patients. The elution profile are highly sequence-specific with many retention time and different analysis temperature (1-2°C), so the performance of discrimination based on length at 50°C is 1-3% in linear gradient of TEAA, because a product of 530bp with length variation of ± 20 bp is not discriminable. It's possible identified the rearrangement types in 95% of patients by diagnosis with informations about junctional regions sequence. Primers may used for identification in diagnosis and anlysis of junctional regions sequence and for MRD detention during follow up. Multiplex PCR is preferred to single PCR for diagnostic screening. The pitfalls methoda are: high risk of over-interpretation of dominant PCR products at diagnosis, that may avoied with repeat separately PCR reactions of the same sample; monoclonal results may occur when the number of lymphocita T and B in sample is small; monoclonal results may occur in autoimmunological diseases and in viral infections patients; the results of PCR monoclonality should interpreted in pathological context; the quality control of primers is necessary, for avoid not annealing primer in mutated targets; the Vg1-Jg1.3/2.3 and Vd2-Jd1 are presents in healthy cells and so the sensibility of PCR targets depends on genic rearrangements frequency in healthy cells. In conclusion, our results confirm that multiplex PCR-DHPLC method is absolutely goldstandard for genic rearrangements studies for TCR and IgH, because it is fast, simple, more informative than SB, specific, reproducible and safe for operator.

Introduzione.

Il sistema immunitario si è evoluto allo scopo di difendere i vertebrati nei confronti delle infezioni di batteri, virus, funghi e parassiti, con una strategia di difesa molto complessa e sofisticata della quale le *cellule fagocitarie* (principalmente *macrofagi* e *neutrofilii*) costituiscono solo una parte. Tale sistema garantisce che l'immunità sia notevolmente specifica: un individuo che guarisce dal morbillo, ad esempio (i.e.) è protetto contro il virus del morbillo, ma non contro altri virus comuni come quello della varicella. Questa specificità è una proprietà fondamentale della risposta immunitaria, che determina la distruzione e l'eliminazione dei vari microrganismi che invadono il corpo umano e di qualunque molecola tossica (proteina o un gruppo attaccato ad una proteina detto *aptene*, il quale deve essere coniugata ad una molecola trasportatrice) da essi prodotta, senza distruggere o interferire con la produzione delle molecole che appartengono all'ospite stesso. Tali sostanze estranee capaci di scatenare una risposta immunitaria sono definite *antigene* (*antibody generator*, Ag). Questo entrato nel flusso circolatorio dell'ospite innesca la produzione di una risposta immunitaria, che dipende dai globuli bianchi: i linfociti T e B ed i macrofagi.

1.1 Le risposte immunitarie.

Il riconoscimento specifico e la distruzione dell'Ag avvengono in maniera diversa secondo chi esegue la risposta, cellule B o T, e del tipo di risposta montata, che dipende a sua volta dalla natura dell'Ag. Questi modi diversi sono raggruppabili in due gruppi principali: la risposta umorale (o innata o anticorpale o primaria) e la risposta acquisita (o cellulo-mediata o secondaria). La prima, importante soprattutto nella difesa contro le infezioni batteriche, prevede la produzione di anticorpi (Ab), detti Immunoglobuline (Ig), da parte delle cellule B in seguito ai segnali forniti dalle cellule *T helper*, perché assistono le cellule B, i quali, circolando nel torrente ematico, permeano gli altri fluidi corporei e si legano specificamente agli antigeni estranei che hanno indotto la loro produzione rendendo i microrganismi invasori riconoscibili alle cellule fagocitiche, le quali possono ingerirli, ed attivando il sistema delle proteine ematiche del complemento, un gruppo di circa 20 proteine che reagiscono tramite una cascata di azioni proteolitiche attraendo i macrofagi. Questi inglobano le cellule bersaglio o i prodotti della loro lisi o direttamente il complesso antigene-anticorpo (Ag-Ab) distruggendolo, come in figura 1. Le risposte immunitarie o cellulo-mediata, importante soprattutto contro parassiti, virus, funghi, tumori e cellule trapiantate non compatibili, coinvolgono la produzione di cellule specializzate, i linfociti, che riconoscono e reagiscono agli antigeni estranei specifici, localizzati sulle MHC (complesso maggiore di istocompatibilità), caratteristiche per ogni individuo e portate sulla superficie delle cellule dell'ospite, provvedendo a attivare le cellule T citotossiche (killer) e a sviluppare i meccanismi effettori che mediano la funzione fisiologica della

risposta, ossia l'eliminazione dell'antigene stesso anche tramite la produzione di segnali chimici attivanti i macrofagi, i quali provvedono poi a distruggere l'invasore, come in figura 1.

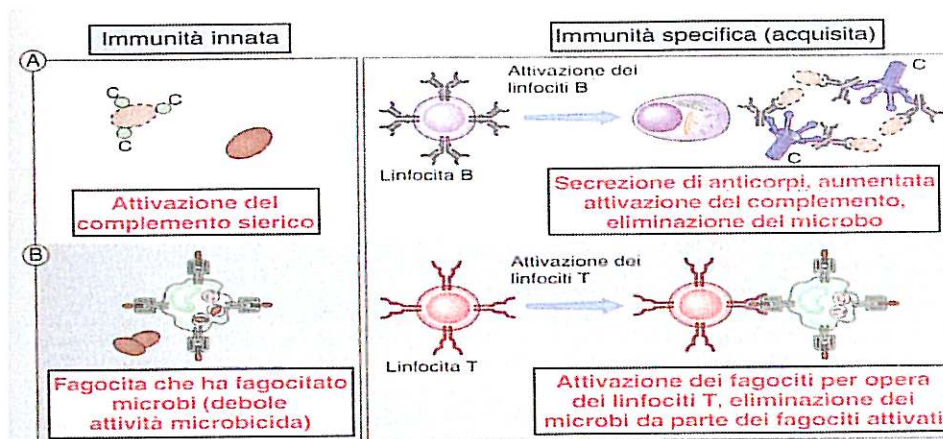


Fig. 1. L'immunità umorale è conferita dall'attacco di anticorpi liberi sugli antigeni, dalla formazione dei complessi Ag-Ab e dalla rimozione attraverso il flusso circolatorio per opera dei macrofagi. Nella immunità cellulo-mediata, le cellule T killer usano il recettore delle cellule T (TCR) per riconoscere un frammento dell'Ag estraneo, presentato sulla superficie della cellula bersaglio dalle proteine MHC.

Dopo la sua eliminazione, la risposta immunitaria declina progressivamente, ed il sistema torna all'omeostasi (figura 2; Alberts B et al., 1997 e Lewin B. et al., 2000).

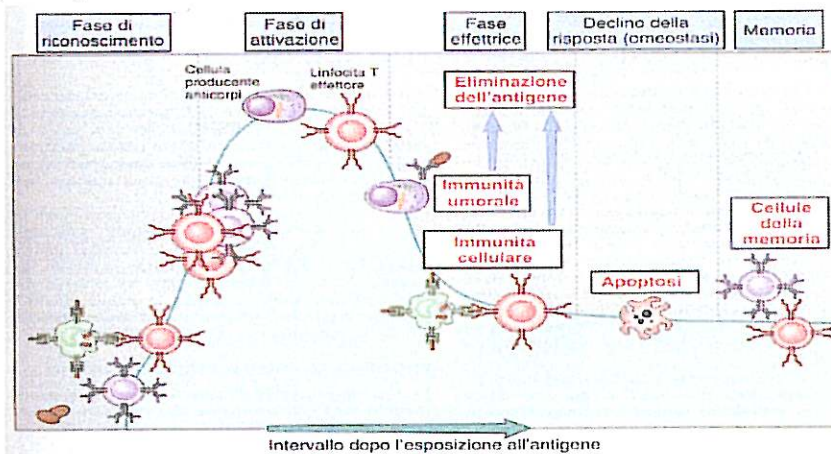


Fig. 2. Le risposte immunitarie specifiche possono essere suddivise in tre fasi: una fase di riconoscimento dell'Ag, una fase di attivazione dei linfociti ed una fase effettrice, dopo la quale la risposta immunitaria declina progressivamente ed il sistema torna all'omeostasi.

1.2 I linfociti.

I protagonisti di entrambi i tipi di risposte immunitarie sono i linfociti, che si trovano in grande quantità circa $2 \cdot 10^6$ per le molecole Ig, $3 \cdot 10^6$ per le

molecole $\text{TCR}\alpha\beta$ e $5 \cdot 10^3$ per le molecole $\text{TCR}\gamma\delta$ (massa cellulare paragonabile al fegato o al cervello), per un totale di circa $>10^{12}$, nel sangue e nella linfa (il fluido incolore che scorre nei vasi linfatici e che connette tra loro i linfonodi dell'organismo) e negli organi linfoidi: timo, linfonodi e milza (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.2.1 Origine dei linfociti e selezione positiva e negativa dei linfociti T.

Ciascun linfocita si sviluppa a partire da un singolo precursore linfocitario T/B il quale deriva dalle *cellule staminali pluripotenti*. Queste, principalmente localizzate nei tessuti emopoietici, danno origine a tutte le cellule ematiche inclusi i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine. A seconda dei tessuti che li producono, i linfociti sono detti **cellule B**, se maturano nel midollo osseo (*bone marrow-BM*) dell'adulto o nel fegato fetale e **cellule T**, se maturano nel timo da precursori T che vi migrano attraverso il torrente circolatorio dai tessuti emopoietici. Il timo e i tessuti emopoietici sono definiti *organi linfoidi primari (centrali)*. Da qui i linfociti maturi migrano e ricircolano continuamente, analogamente ai linfociti B che lasciano il midollo per la periferia sempre attraverso il torrente circolatorio (sangue periferico, PB), agli *organi linfoidi secondari* (periferici): linfonodi, tonsille, milza, appendice, adenoidi, placche di Peyer dell'intestino e tessuti linfoidi associati all'epitelio nel tratto gastrointestinale, respiratorio e della pelle. In tali organi le *cellule che presentano l'antigene* (CPA) specializzate raccolgono gli Ag in modo da assicurarne l'esposizione ai linfociti. Gli antigeni che entrano nell'organismo attraverso l'intestino vengono intrappolati dai tessuti linfoidi associati all'intestino stesso; quelli che entrano attraverso la pelle o il tratto respiratorio, vengono trattenuti localmente e/o vengono trasportati attraverso la linfa ai linfonodi locali; infine, quelli che entrano nel sangue vengono filtrati attraverso la milza.

Essendo presenti in tutti i tessuti linfoidi secondari, entrambi i tipi di linfociti sono distinti in base alle diverse proteine di membrana presenti. In questo modo è possibile distinguere i linfociti T in due classi principali:

- le *cellule T helper*, che incrementano le risposte di altre cellule bianche ematiche ed aiutano le cellule B a produrre le risposte anticorpali;
- le *cellule T citotossiche* (CTL), che uccidono le cellule infettate svolgendo funzioni *effettrici*;
- le *cellule T suppressor*, che sopprimono la risposta immunitaria B/T, impedendo che diventi pericolosa per l'organismo.

Analogamente, gli Ab (o Ig) possono essere distinti nei 5 tipi presenti nel sangue: IgA, IgE, IgG, IgD, IgM (presente anche sulla membrana dei linfociti B, come le IgD, svolgendo funzione di recettore per l'Ag), IgE, differenti per struttura e composizione chimica. I linfociti ricircolano fra sangue e linfa, così che il processo di dispersione assicura che un Ag, legato nella fessura sulla superficie della proteina MHC, sarà esposto a linfociti di tutte le possibili specificità, agendo soltanto su cellule che sono state infettate da un

Ag estraneo e distinguendo fra proteine "self" (quelle dell'organismo di cui fanno parte) e "nonself" (Ag), per il meccanismo della *tolleranza immunologica naturale* del "self". Tale capacità probabilmente si instaura in una fase precoce dello sviluppo dei linfociti, i recettori delle cellule T, infatti, imparano tale riconoscimento durante lo sviluppo fetale riconoscendo i cosiddetti *antigeni d'istocompatibilità o del trapianto*, presenti praticamente su tutte le cellule e linfociti, attraverso un processo di *selezione negativa*. Questo distrugge per *delezione clonale* o *inattiva funzionalmente*, lasciandole vive (*anergia clonale*), le cellule B e T che riconoscono gli antigeni "self" e montano una risposta contro di essi, quando li incontrano per la prima volta l'antigene negli organi linfoidi primari. Oltre a questa *selezione negativa*, esiste anche una *selezione positiva* per le cellule T che portano certi tipi di recettori. Quando un linfocita incontra un Ag che si lega al suo Ab o al suo recettore, l'amplificazione clonale dà inizio alla risposta immunitaria (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.2.2 L'attivazione dei linfociti.

Nel *pool* dei linfociti immaturi di circa 10^6 - 10^8 cellule generate casualmente ed indipendentemente dall'Ag, le cellule T/B non stimolate (*naive*) sono morfologicamente indistinguibili al microscopio elettronico: piccole, un po' più grandi dei globuli rossi e occupate dal nucleo (fig. 3).

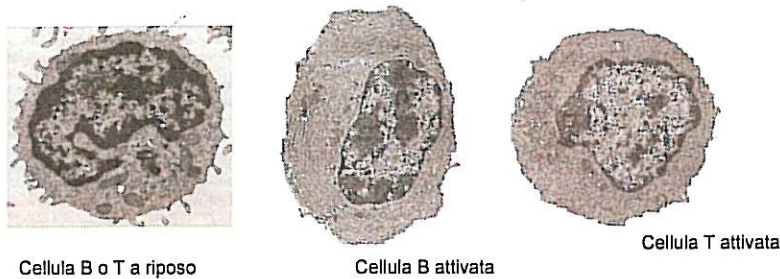


Fig. 3. Fotografia al microscopio elettronico di linfociti a riposo e attivati.

L'attivazione dei linfociti, secondo l'ipotesi del doppio segnale, richiede due segnali distinti, il primo è costituito dalla presenza dell'Ag, che garantisce che la risposta risultante sia specifica, ed il secondo dalla presenza dei ulteriori stimoli forniti dai microbi o da reazioni dell'immunità innata verso di essi, che garantisce invece che le risposte immunitarie si attivino soltanto quando è necessario (i.e. in presenza di patogeni o di sostanze potenzialmente nocive) e non verso gli Ag autologhi. La risposta dei linfociti agli antigeni ed ai secondi segnali si traduce nella sintesi di nuove proteine, nella proliferazione cellulare e nella differenziazione in cellule effettrici e cellule della memoria (fig. 4; Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

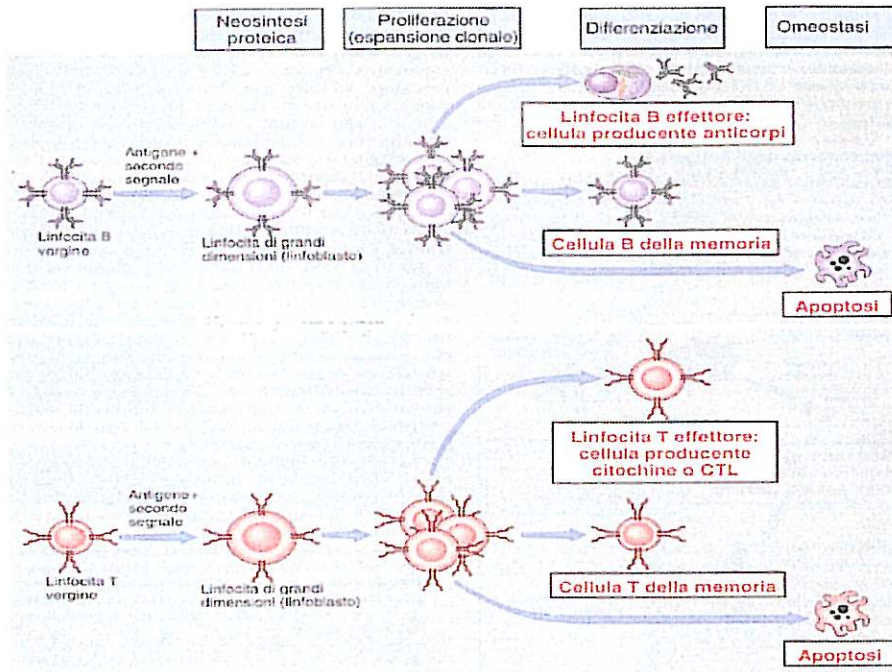


Fig. 4.

1.2.3 Sintesi di nuove proteine e selezione clonale.

In seguito all'esposizione, nei tessuti linfoide specializzati, ad uno dei diversi milioni di Ag (10^9 - 10^{11}), durante la risposta immunitaria primaria (anticorpale o mediata da cellule), i linfociti appena attivati, a causa di qualche *feedback* dalla superficie della cellula dove avviene la reazione Ag-Ab, sono indotti in divisioni mitotiche secondo un meccanismo di *selezione clonale*, con conseguente incremento numerico del clone Ag-specifico, che può passare da un livello basale (prima che il sistema immunitario sia stimolato) di circa una cellula su 10^6 fino ad una cellula su 10-100 (per un totale di circa 10^{12} cellule) durante il picco dell'infezione.

Durante questa selezione i linfociti maturano ulteriormente, acquisendo le caratteristiche tipiche dei linfociti T/B maturi, il cui numero. Queste comprendono, tra le altre, un aumento delle dimensioni della cellula, che è particolarmente pronunciato nelle cellule B divenute *plasmacellule* con esteso reticolo endoplasmatico rugoso, produzione di un grande numero di linfociti T/B specifici per l'Ag in questione, la secrezione in grande quantità di:

- un dato Ab, che può anche arrivare a dominare la popolazione degli Ab, dalle cellule B;
- vari mediatori molecolari detti *linfocine*, *interleuchine* o *citochine*, la cui secrezione stimola la crescita e la differenziazione funzionale dei linfociti stessi, oltre che di altre cellule effettrici, dei recettori per le citochine, che rendono i linfociti responsivi a queste e di numerose altre proteine

coinvolte nella trascrizione genica e nella divisione cellulare dalle cellule T (figura 3).

Questo esempio dimostra in maniera inequivocabile quanto grande sia il potenziale dell'espansione clonale nel corso delle risposte immunitarie agli agenti infettivi. In tal modo, ogni popolazione stimolata selettivamente dall'Ag, il cui numero può arrivare a 10^6 , rappresenta il **clone** linfocitario, le cui cellule, derivando da un progenitore comune, hanno tutte le stesse recettore per l'Ag, diverso dai recettori presenti sulle cellule di tutti gli altri cloni (figura 5; Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

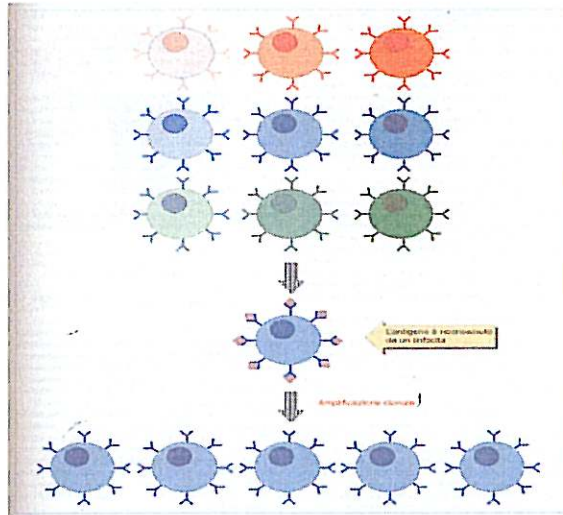


Fig. 5. Il pool dei linfociti immaturi B/T amplifica in maniera clonale il linfocita B/T in grado di riconoscere e legare l'Ag.

1.2.4 Differenziamento in cellule effettrici e declino della risposta immunitaria (ritorno all'omeostasi).

Durante la selezione clonale, parte della progenie dei linfociti stimolati dall'Ag si differenzia in cellule effettrici, la cui funzione precipua è quella di eliminare l'Ag. I linfociti *T helper* differenziati producono le citochine, che stimolano a loro volta i CTL, che, per eliminare i patogeni intracellulari differenziano e lisano le cellule infettate e le cellule tumorali. I linfociti B si differenziano in plasmacellule che secerne anticorpi alla velocità di circa 2000 molecole/secondo per eliminare i patogeni extracellulari. Le plasmacellule hanno destinato una parte tanto imponente del loro apparato di sintesi proteica alla produzione di anticorpi e sono incapaci di crescere e di dividersi ulteriormente muorendo nel giro di alcuni giorni. In tale contesto altre cellule effettrici non linfoidi, quali il sistema del complemento, partecipano al fenomeno insieme ai meccanismi di difesa dell'immunità innata, come i fagociti, che temporalmente intervengono precocemente (Fig. 1), potenziando i meccanismi effettori dell'immunità innata.

Dopo avere montato una risposta immunitaria, il sistema immunitario torna al suo stato iniziale di riposo, soprattutto perchè la gran parte della progenie

di linfociti stimolati dall'antigene va incontro a morte per apoptosi: forma di morte cellulare programmata fisiologica, in cui il nucleo va incontro a condensazione e frammentazione, la membrana cellulare mostra rigonfiamento e vescicolazione, il sequestro interno di alcuni lipidi di membrana è perduto, e la cellula ormai morta viene rapidamente fagocitata senza che il suo citoplasma venga liberato all'esterno. Questo perché la sopravvivenza linfocitaria dipende con molta probabilità dalla presenza dell'Ag e dei fattori di crescita da esso promossi nel corso della risposta immune e, dunque, una volta eliminato l'Ag che ha scatenato la risposta, i linfociti si trovano orfani degli stimoli essenziali per la loro sopravvivenza (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.2.5 Differenziazione in cellule della memoria

Durante la selezione clonale, una parte della progenie dei linfociti T/B attivati, non si differenzia in cellule effettrici, ma è mantenuta dall'organismo sottoforma di cellule funzionalmente quiescenti dette *linfociti della memoria*, come in fig. 6. Esse rappresentano uno stato intermedio fra la cellula immatura e la cellula matura: sopravvivono per lunghi periodi, apparentemente anche in assenza dell'Ag, e possono rapidamente convertirsi in cellule mature, perché l'organismo è diventato *immune* (acquisisce l'immunità), cioè, è capace di ricordare anche a notevole distanza di tempo i precedenti contatti con un Ag riconoscendolo in modo specifico e montando una più intensa *risposta immunitaria secondaria*, nel caso di nuova esposizione allo stesso Ag, che porterà alla sua eliminazione. Questa rapidità di risposta è dovuta al fatto che i recettori delle cellule B di memoria hanno maggiore affinità per l'Ag, mentre quelli delle cellule T di memoria si legano più tenacemente alle altre cellule e trasducono segnali extracellulari con maggiore efficienza (fig. 7).

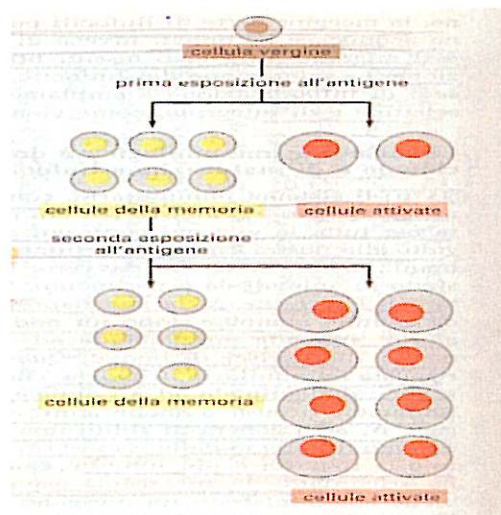


Fig. 6. Modello relativo alle basi cellulari della memoria immunologica.

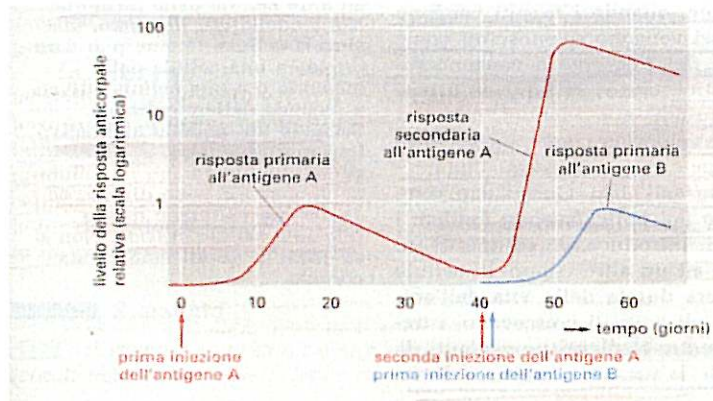


Fig. 7. Risposte anticorpali primaria e secondaria. La risposta secondaria indotta dalla seconda esposizione all'antigene A è più veloce e maggiore entità rispetto alla risposta primaria ed è specifica per A

1.3 Le Immunoglobuline: struttura e caratteristiche funzionali.

Gli anticorpi (Ab) sono sintetizzati esclusivamente dalle cellule B soprattutto dalle plasmacellule e sono prodotti in milioni di forme, ciascuna con una sequenza amminoacidica differente e un differente sito di legame per l'antigene. Complessivamente detti *immunoglobuline* (Ig), rappresentano circa il 20% in peso delle proteine plasmatiche del sangue. Anche se funzionalmente diverse, tutte le Ig hanno la stessa struttura di base tetrameric. Sono, infatti, dei monomeri, ognuno formato dall'unione, con combinazione di legami non covalenti e covalenti (ponti disolfuro), di due coppie di catene: una coppia di *catene leggere* (*light*, L) identiche fra loro ed una coppia di *catene pesanti* (*heavy*, H), più lunghe delle precedenti, ma sempre identiche fra loro, per un totale di 4 catene, identiche a due a due, e di circa 10^3 - 10^4 catene L e H diverse. A differenza della catena H, le catene L sono costituite da un solo dominio e sono di 2 tipi: κ e λ , che sono espresse in maniera esclusiva e irreversibile dal singolo linfocita B.

In ogni catena si riconosce una regione N-terminale a costituzione *variabile* (V), perché mostrante considerevoli differenze nella sequenza tra le diverse Ig e costituita da un solo dominio, ed una C-terminale *costante* (C), con circa 110 amminoacidi omologhi tra le diverse Ig. Gli Ab più semplici, dunque, sono molecole conformate a Y (fig. 10) caratterizzate da due *siti di legame per l'antigene* identici, ciascuno situato in corrispondenza della punta di ognuno dei due bracci della Y e, pertanto, sono *bivalenti* (fig. 8).

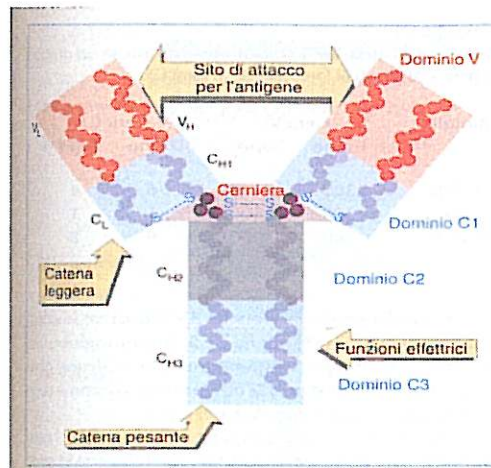


Fig. 8. Le catene leggere e pesanti si combinano per generare un'immunoglobulina con vari domini distinti.

Tale sito è generato dall'associazione delle regioni variabili delle catene L e H che formano il dominio variabile. La regione C delle catene H e L non partecipa direttamente al legame con l'Ag, ma svolge altre importanti funzioni, quali: riconoscimento della placenta permettendo il passaggio delle Ig dalla madre al feto, riconoscimento e attivazione del complemento e dei macrofagi, trasduzione del segnale in cellula, e legame del recettore Fc. Queste regioni C si associano a formare i domini costanti (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), che completano le braccia della Y. Il tipo di regione C legato (μ , δ , γ , α e ϵ) determina una delle 5 classi di Ig che esercitano la funzione effettrice: IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Le prime due sono maggiormente espresse dai linfociti B nel PB, mentre le IgG e IgA sono più rappresentate nei linfonodi e negli altri tessuti linfoidei con le diverse sottoclassi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e IgA1 e IgA2. Alcune classi di Ig sono presenti anche in forma di dimero e di pentamero, in modo che ogni molecola leghi più Ag contemporaneamente. L'efficienza di legame con l'Ag e la capacità di dare origine a strutture più complesse è notevolmente accresciuta dalla flessibile *regione di giunzione (joining, J)* presente negli Ab, che permette di variare la distanza fra due siti di legame per l'Ag. Questa regione cerniera (h) fra le braccia e lo stelo della Y delle catene C_{H1} e C_{H2}, e mostrano la massima flessibilità nelle IgG3, mentre nelle IgM e IgE sono sostituite da un 4° dominio C: C _{μ} e C _{ϵ} . Il piccolo numero di catene H significa che le regioni della molecola con funzioni fisse sono relativamente conservate. Di contro, esiste un gran numero, a seconda della specie, di geni che codificano per le diverse regioni, quali i *geni V*, che codificano per le regioni V, i *geni C*, che codificano per le regioni C, e i *geni J*, che codificano per le regioni J. Nessun dei quali è espresso come unità indipendente, capace di esprimere un'autentica catena L o H. Per costruire un'unità, un gene V deve essere unito fisicamente a un gene C, attraverso il segmento J (*joining*, unione), per ricombinazione somatica.

I geni V di tutte le famiglie Ig hanno un'organizzazione simile. Il primo esone codifica per la sequenza segnale, coinvolta nell'attacco alla membrana, e il secondo codifica per la maggior parte della regione V (lunga <100 codoni), mentre gli introni sono, in genere, relativamente piccoli (circa 300bp; Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.3.1 La catena pesante delle Ig (IgH): assetto genico.

I geni IgH sono posti in orientamento telomerico a centromerico sul cromosoma 14 banda 14q32.3 (fig. 9) in un'area coprente circa 1250kb e comprendente i 123 geni V, 30 segmenti D, 9 geni J e molti C (appendice 1). Dei geni V, 79 sono pseudogeni e 44-52, a seconda dell'aplotipo, sono in *open reading frame*, funzionali, e possono essere raggruppati in 6-7 famiglie di geni Vh in accordo con la loro omologia di sequenza amminoacidica. Di queste la famiglia Vh3 è la più numerosa (64 segmenti), seguita da quella Vh4 (32 segmenti) e Vh1 (19 membri); mentre Vh2, Vh5 e Vh6 contengono solo 4-2-1 membri, rispettivamente. Sebbene sia il primo ad essere attivato durante l'ontogenesi, essendo il più vicino ai *loci* D-J, Vh6 è frequente nelle LLA B e non mostra variabilità polimorfica nei differenti individui e gruppi razziali, suggerendo l'azione di una forte pressione selettiva per evitare mutazioni. (Mortuza.FY *et al.*, 2001). I promotori dei geni Vh contengono un sito legante consistenti fattori di trascrizione, in aggiunta alla TATA box. Questo motivo ottametro, con una sequenza consenso ATGCAAAT, è posto a 70bp a monte del sito di inizio della trascrizione e che è assolutamente richiesto per la trascrizione tessuto-specifica, tanto che il cambio di una singola base previene il legame del fattore di trascrizione linea B specifico Octamer-2. Solo metà di tutti i geni V portano intatti le sequenze segnale di ricombinazione (RSS), che sono importanti elementi *cis*-agenti richiesti per la ricombinazione VDJ.

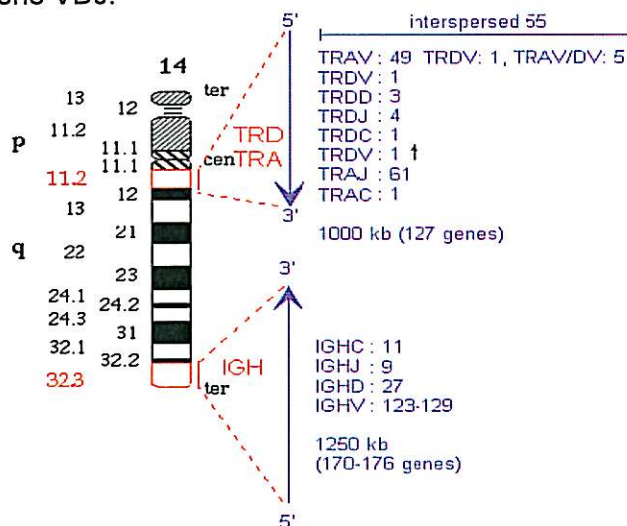


Fig. 9. Cromosoma 14 con i loci IgH alla banda 14q32.33, all'estremità telomerico del braccio lungo, e TCRα e TCRδ alla banda 14q11.2, all'estremità centromerico del braccio lungo. La barra rossa verticale indicano le localizzazioni dei loci, le frecce blu, proporzionali alle

grandezze dei *loci* indicate in kb, ne indicano l'orientamento 5'-3' e l'ordine dei gruppi genici nei *loci*. Il numero totale di geni nei *loci* è tra parentesi. I geni TCR δ -V sono posti all'estremità 3' dei geni TCR δ -C in orientamento di trascrizione invertito (freccia piccola nera).

La regione Dh contiene 27 segmenti, non tutti necessariamente attivi e non intaccati da mutazioni somatiche, organizzati in una serie *in tandem* (4-6 codoni), dei quali 25 sono coinvolti nella creazione degli Ab. Sulla base dell'omologia di sequenza, i segmenti D sono raggruppati in 7 famiglie Dh1 (formalmente nota come DM), Dh2 (DLR), Dh3 (DXP), Dh4 (DA), Dh5 (DK), Dh6 (DN) e Dh7 (DQ52). Tutte le famiglie comprendono almeno 4 segmenti genici, tranne l'ultima che è formata dal solo Dh7-27 frequente nelle LLA (insieme a Dh2-2 e Dh3-9) posto giusto a monte del *locus* J, il quale comprende solo 6 segmenti funzionali che codificano per gli ultimi 13 amminoacidi della regione V formando un singolo esone VJ.

I geni Ch funzionali, ricoprenti 300-320Kb, hanno numerosi esoni (lunghi circa 100 codoni) codificanti le regioni Ch1, la cerniera (C γ , C ϵ e C α), Ch2 e Ch3 e sono preceduti da un gene *switch*, necessario per lo *switching* dell'isotipo, tranne il gene C δ .

L'unione VDJ avviene in due fasi: prima uno dei segmenti D ricombina con un segmento Jh, poi un segmento Vh ricombina con il segmento combinato, tramite un meccanismo di ricombinazione sito diretto, che garantisce che lo stesso segmento D coinvolto nell'unione D-J resti lo stesso anche nell'unione V-D. La ricostruzione porta all'espressione del segmento adiacente Ch (fig. 10).

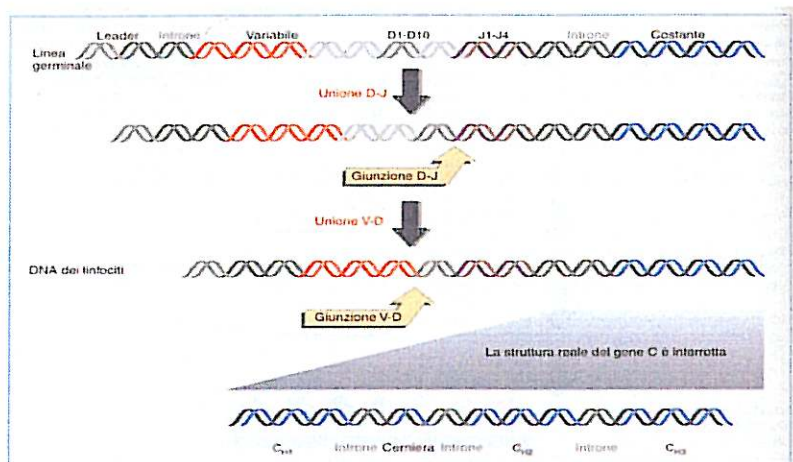


Fig.10.

La catena pesante H delle Ig riarrangiate consiste di 3 regioni altamente variabili dette *regioni determinanti la complementarità* (CDR1-CDR2-CDR3), fiancheggiate da regioni *framework* meno variabili (FR1-FR2-FR3-FR4) e dove FR4 corrisponde alla regione Jh (Aubin J *et al.*, 1995 e Nihal M *et al.*, 2000). L'omologia delle FR deriva o da forte pressione di selezione o da trasferimento di segmenti tra differenti *loci* per conversione genica o

crossing over doppio disuguale, come mostrato dalla CDR2 (Takahashi N *et al.*, 1984). Modificazioni addizionali delle giunzioni VDJ per rimozione di un numero variabile di nucleotidi codificati germinali e/o addizione di nucleotidi codificati non germinali ad opera dell'enzima Terminal deossinucleotidil Transferasi (TdT), crea la regione giunzionale N o CDR3, altamente clone-specifica, perché unica per un dato riarrangiamento (Deane M. and JD Norton, 1991), con un tasso di sostituzione amminoacidica 3 volte più veloce di quello delle FR, e responsabile del riconoscimento con l'Ag e delle mutazioni somatiche.

I repertori genici VDJ sono ristretti e regolati per lo sviluppo negli stadi precoci del differenziamento. Nelle cellule precursori B più immature, le cellule *pro-B*, i geni della IgH restano germinali o sono associati in DJ. Nello stadio successivo, nelle cellule precoci *pre-B*, i geni V sono legati a DJ per completare il riarrangiamento, con un *trend* stadio specifico nell'uso di VDJ, nell'addizione di nucleotidi N e nel tasso di mutazione somatica e nell'*over*-rappresentazione dei segmenti Vh3-Vh5-Vh6-Dh7-Dh2-Dh1-Jh6-Jh3-Jh4 (Li A *et al.*, 2004), dove il segmento Jh6 è maggiormente usato anche dai linfociti di PB (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.3.2 Le catene leggere delle Ig (IgL): assetto genico.

Il *locus* genico IgK consiste di una serie di geni Vk, 5 geni Jk e solo 1 gene Ck. Il *locus* genico Igλ, invece, contiene una serie di geni Vλ e 6 geni Cλ virtualmente identici, ognuno dei quali è preceduto da un segmento genico Jλ. Due di questi geni Cλ sono *pseudo*-geni, permettendo la formulazione dell'ipotesi di una moltiplicazione dei segmenti genici Jλ-Cλ sia avvenuta durante l'evoluzione (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.4 Il Recettore delle cellule T (TCR): struttura e caratteristiche funzionali.

Sulle cellule T, strettamente associati alle molecole CD3 (un insieme di 5 catene proteiche per la traduzione del segnale all'interno della cellula), si trovano due tipi di recettori: TCRαβ, formato dai due tipi di catene chiamate α, e β e TCRγδ, formato dalle catene γ e δ, generalmente associate da un ponte disolfuro (fig. 11) La maggior parte dei linfociti T maturi (85-98%) nel PB e tessuti linfonodali esprimono TCRαβ, mentre una parte più piccola (2-15%) esprime TCRγδ. A differenza dei vari isotipi IgH e IgL, le 4 catene TCR non si appaiono mai a caso, ma sempre α con β e γ con δ. Il recettore γδ è sintetizzato soltanto in una fase precoce dello sviluppo delle cellule T, perché è capace di usare le cellule bersaglio con modalità che non dipendono dalla presenza di proteine MHC. Il TCR αβ, sintetizzato in una fase più tardiva dello sviluppo, è responsabile della funzione delle cellule T *helper* nella immunità umorale e della funzione delle cellule T *killer* nella immunità cellulo-mediata. Ciò lo rende responsabile del riconoscimento sia dell'Ag estraneo che della proteina MHC prodotta dallo stesso organismo sulle cellule presentanti l'Ag (CPA).

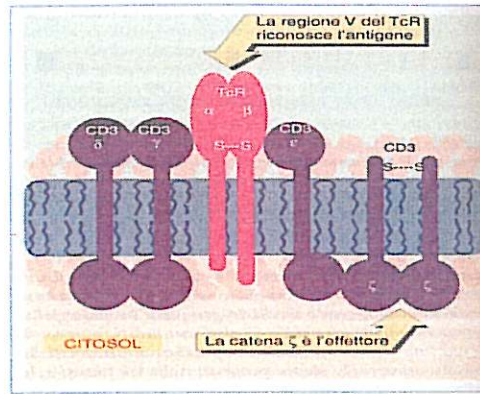


Fig. 11.

Le catene del TCR sono composte di due domini: variabile (V) e costante (C). Il primo è codificato da una combinazione di geni VDJ nel caso di $TCR\beta\delta$ e VJ nel caso di $TCR\alpha\gamma$. I domini C sono codificati da geni C: uno per $TCR\alpha$, uno per $TCR\delta$, 2 per $TCR\beta$ e $TCR\gamma$. Ciascun *locus* è organizzato con segmenti separati che vengono uniti insieme da una reazione di ricombinazione, comprendenti regioni V e C (fig. 12).

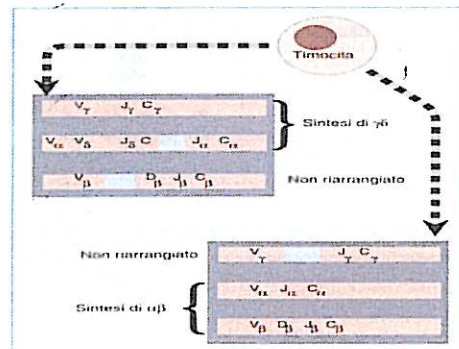


Fig. 12.

La regione C del TCR ha un singolo dominio costante, seguito da porzioni transmembrana e intracitoplasmatiche. La struttura esoni-introni è correlata alla funzione della proteina (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.4.1 Il $TCR\beta$: assetto genico.

Il *locus* umano del $TCR\beta$ è posto sul cromosoma 7 alla banda 7q34 (fig. 13) e ricopre un'area di 685kb, con il *cluster* della regione V simile a quello delle IgH.

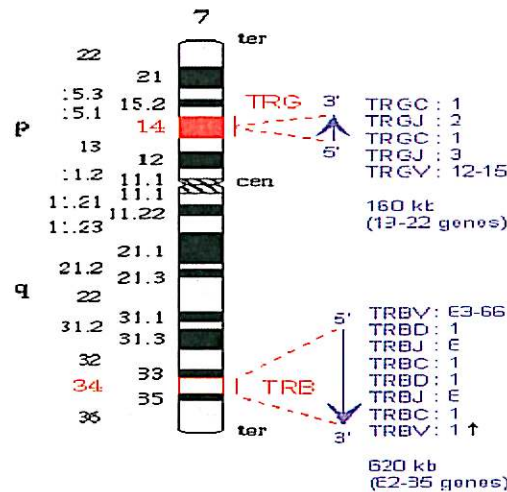


Fig. 13. Cromosoma 7 con il locus TCR β sul braccio lungo alla banda 7q34 e il locus TCR γ sul braccio corto alla banda 7p14. Le barre rosse verticali indicano le localizzazioni dei loci, le frecce blu, proporzionali alle grandezze dei loci indicate in kb, ne indicano l'orientamento 5'-3' e l'ordine dei gruppi genici nei loci. Il numero totale di geni nei loci è tra parentesi. I geni TCR β -V sono posti all'estremità 3' del locus β in orientamento della trascrizione invertito (freccia nera piccola).

Esso contiene 65 elementi raggruppati in 34-30 famiglie a seconda delle due diverse nomenclature con le quali sono identificate (appendice 2). Di queste, le famiglie più numerose sono V5, V6, V8 e V13 con 7-9-5-8 membri rispettivamente. Degli elementi V, 39-47 sono funzionali e appartengono a 23 famiglie. 7/9 elementi v non funzionali hanno un *open-reading frame* con alterazioni nei siti di *splicing*, di RSS e/o degli elementi regolatori. Di questi 10-16 sono classificati come pseudogeni. Un *cluster* di 6 geni V orfani non funzionali, inoltre, sono posti sul cromosoma 9p21, anche se non sono mai stati ritrovati trascritti. Tutti i geni V sono posti a monte dei due *cluster* D β -J β -C β . Entrambi i segmenti C β 1 e C β 2 sono preceduti da un *cluster* D β (D β 1 e D β 2) e da uno J β , che comprende 6 segmenti funzionali J β 1 (J β 1.1- J β 1.6) e 7 J β 2 (J β 2.1- J β 2.7), tutti classificati in 2 famiglie secondo la loro localizzazione genomica. Durante lo sviluppo precoce delle cellule T il riarrangiamento del TCR β consistono di due *step* consecutivi: D a J e V a DJ con un intervallo di un giorno tra i 2 processi. Il D β 1 può legare sia J β 1 che J β 2, mentre D β 2 solo J β 2 per la sua posizione sul locus. Nei geni TCR β esiste una distribuzione non *random* dell'uso dei segmenti: nel PB normale predominano V β 1- V β 5 e sono rari i V β 11, V β 16, V β 18, V β 23, mentre nel timo prevalgono i V β 3-1, V β 4-1, V β 5-1, V β 6-7, V β 7-2, V β 8-2 e V β 13-2. La famiglia J β 2 è più usata della J β 1 (72% *versus* (vs) 28%), con J β 2.1 più usato di J β 2.2 e di J β 2.3 e J β 2.5. Alcune catene TCR β , infine, incorporano due segmenti D, generati dall'unione D-D (dirette da un'organizzazione appropriata delle sequenze nonamerica ed eptamerica). Una differenza fra TCR e Ig è che nei loci TCR non avvengono mutazioni somatiche (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.4.2 Il TCR γ : assetto genico.

Il *locus* umano del TCR γ è sul cromosoma 7 (fig. 13) banda 7p14 e contiene 14 segmenti V, dei quali solo 10 sottostanno al riarrangiamento, in un'organizzazione simile a quella delle Ig λ , con circa 8 geni V funzionali separati da una serie di segmenti J-C (appendice 3). Il repertorio V espresso include solamente sei geni (V2, V3, V4, V5, V8, V9), ma i riarrangiamenti possono avvenire anche con ψ V7, ψ V10 e ψ V11 mentre raro è quello ψ V12. I segmenti V riarrangiati possono essere suddivisi in quelli appartenenti alla famiglia V-I (V2, V3, V4, V5, V8, ψ V7) ed in singoli membri V9, ψ V10, ψ V11. Il *locus* gamma contiene 5 segmenti J: J1.1 (J-P1), J1.2 (J-P), J1.3 (J-1), J2.1 (J-P2) e J2.3 (J2), di questi J1.3 e J2.3 sono altamente omologhi, così come J1.1 e J2.1. La limitata diversità funzionale, causata anche dalla mancanza dei segmenti D, implica relativamente piccola aggiunta di nucleotidi; pertanto, la lunghezza giunzionale VJ varia tra 20 e 30bp, confrontata a circa 60bp per IgH e TCR δ . Popolazioni clonali minori usano frequentemente il riarrangiamento VI-J1.3/2.3. Il più comune riarrangiamento è V9-J1.2 che avviene in circa l'1% di linfociti T. Tali geni, come quelli TCR δ , non possono essere usati per la determinazione del tipo *lineage*, ma possono essere usati in analisi di clonalità. Quando, infine, TCR γ presenta il gene C γ 1 si forma un ponte disolfuro con la catena δ , mentre quando ha il gene C γ 2 tale ponte manca. I linfociti che esibiscono il primo riarrangiamento sono più citotossici dei secondi e mostrano differenze morfologiche, citoscheletriche e di crescita (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.4.3 Il TCR δ : assetto genico.

Il *locus* umano del gene TCR δ è posto sul cromosoma 14q11.2 (fig. 9), tra i segmenti genici V α e J α . La maggior parte del *locus* TCR δ (DJC) è fiancheggiato dagli elementi TCR δ -deletenti, ψ J α e δ REC in modo che tutti i riarrangiamenti con tali elementi o quelli dei geni V α -J α causino la delezione dell'intero *locus* intermedio TCR δ . Tale processo può derivare dal fatto che molti dei geni V possono essere uniti al segmento D δ -D δ -J δ ma che soltanto alcuni (definiti perciò come V δ) possono dare proteine attive. L'organizzazione inframmezzata dei geni implica che la sintesi del recettore TCR $\alpha\beta$ e del recettore $\gamma\delta$ sia mutuamente esclusiva a livello di qualunque allele, perché il *locus* δ è perso interamente, quando avviene il riarrangiamento V α -J α .

Il *locus* δ di 8 segmenti V, 4 J e 3 D (appendice 4), dei quali almeno 5/8 V possono essere riarrangiati con i segmenti J α . Anche segmenti V α possono essere utilizzati, in rari casi, nei riarrangiamenti TCR δ . Sono usati quasi esclusivamente nei riarrangiamenti TCR δ i geni V1 (TCRDV101S1), V2 (TCRDV102s1) e V3 (TCRDV3S1), mentre V4 (TCRADV6S1), V5 (TCRADV21S1) e V6 (TCRADV17S1) possono essere usati in TCR δ o in TCR α , invece V7 (TCRADV28S1) e V8 (TCRADV14S1) sono usati nei

riarrangiamento TCRD in maniera estremamente molto rara. Il repertorio germinale-codificato delle cellule TCR $\gamma\delta$ è piccolo rispetto a quello delle cellule TCRD $\alpha\beta$ ed il repertorio combinatoriale è molto limitato a causa della ricombinazione preferenziale in PB e nei timociti TCR $\gamma\delta$, a differenza dell'ampio repertorio di cellule TCR $\gamma\delta$ del cordone che non appare ristretto o con combinazioni preferite. Durante l'infanzia, tuttavia, il PB è meno ampio finché negli adulti non dominano chiaramente V γ 9/V δ 2. Il repertorio V δ 1 e V δ 2 è ristretto con l'età portando alla manifestazione di cellule oligoclonali in sangue ed intestino. Nei tessuti linfoidei l'espressione preferenziale è ristretta in specifiche localizzazioni anatomiche: molte cellule intraepiteliali nel piccolo intestino e nel cordone esprimono V δ 1, che è espresso anche nella milza mentre nella pelle è espresso V δ 2. Sebbene il numero VDJ sia piccolo la CDR3 o la diversità giunzionale è estesa a causa dell'aggiunta delle regioni N e P e della delezione casuale di nucleotidi ad opera della ricombinasi. Questa diversità è anche ampliata dalla combinazione di 1-3 segmenti D, rendendo tale *locus* ideale per gli studi di clonalità. Questo *locus* è il primo di tutti i *loci* TCR a riarrangiare durante l'ontogenesi delle cellule T. Il primo evento è il riarrangiamento D δ 2-D δ 3, seguiti da V δ 2-(D δ 1-D δ 2)-D δ 3 ed, infine, da V δ -D δ -J δ . Riarrangiamenti immaturi (V δ 2-D δ 3 o D δ 2-D δ 3) avvengono nel 70% di LLA B *precursor*, mentre nelle LLA T predominano i riarrangiamenti maturi V δ 1, V δ 2 e V δ 3 a J δ 1. Ciascuna ricombinazione avviene in meno del 25% di alleli, tuttavia V δ 1-J δ 1-C δ sono quasi sempre legate da ponti disolfuro ai geni della famiglia V γ 1 o V γ 11 ricombinati a J γ 2.3-C γ 2, quadro consistente con l'origine di queste cellule da timociti immaturi (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.4.4 Il TCR α : assetto genico.

I *loci* α e δ del TCR (fig. 9), mostrano i geni V I geni TCR α consistono di molti geni V, separati da un gruppo di segmenti J rimarcabilmente lungo (circa 85kb) che precede un singolo gene C, come in appendice 4. Tali geni sono gli ultimi a riarrangiare, dopo che il *locus* δ è deletato. Il loro uso, pertanto, non è preferibile nell'analisi di clonalità.

I segmenti TCR che ricombinano sono circondati da sequenze consenso nonameriche ed eptameriche identiche a quelle usate dai geni delle Ig (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.5 I riarrangiamenti del DNA.

Ciascuna classe di linfociti usa il riarrangiamento del DNA come meccanismo per produrre le proteine recettoriali di membrana, che le permettono di partecipare alla risposta immunitaria. L'intero processo avviene nelle cellule somatiche. Le Ig e i TCR sono controparti dirette, ciascuna prodotta dal proprio tipo di linfocita: infatti, sono correlate per la loro struttura proteica e per l'organizzazione dei loro geni e per il meccanismo di generazione della variabilità. Essi derivano

dall'assemblaggio di segmenti genici che avviene precocemente nel corso dello sviluppo della cellula, prima che essa abbia incontrato l'Ag, dando vita alla diversità di recettori.

I riarrangiamenti VDJ sono mediati attraverso il complesso enzimatico della ricombinasi. Questo è costituito da varie proteine che possono associarsi con le giunzioni V(D)J comprendono attività che legano l'eptamero, altre che legano il nonamero e molte endonucleasi. Di queste, le proteine RAG1 e RAG2, nelle fasi iniziali, giocano un ruolo molto importante riconoscendo e tagliando il DNA alle specifiche sequenze di giunzione. Tali sequenze consistono di eptameri e nonameri palindromi, separati da una regione *spacer* di 12bp o 23bp. Le sequenze segnale di ricombinazione (RSS) sono poste a valle dei segmenti V, ad entrambe le estremità dei segmenti D e a monte dei segmenti J. Inappropriate sequenze RSS, perché mutate o *crippled*, riducono o prevengono completamente il riarrangiamento.

Un riarrangiamento genico coinvolge prima una fusione *back-to-back* delle sequenze eptamero-nonamero, generalmente, dei segmenti DJ unendoli, e poi dei segmenti V che sono uniti a DJ nel caso dei geni delle IgH, TCR β e TCR δ , o concerne riarrangiamenti diretti dei segmenti V a J nel caso delle Ig κ , Ig λ , TCR α e TCR γ . La rottura e la riunione avvengono come reazioni separate. Un taglio a doppio filamento avviene a livello degli eptameri localizzati alle estremità delle unità codificanti lasciando estremità 3'-OH e 5'-P libere. Poi l'estremità libera 3'-OH attacca il legame fosfato nella posizione corrispondente sull'altro filamento del *duplex*. Ciò crea una forcina all'estremità VDJ, in cui l'estremità 3' di un filamento è unita covalentemente all'estremità 5' dell'altro filamento e lascia un taglio netto a doppio filamento sull'estremità dei terminali tagliati vicino alla forcina. Ciò causa un disappaiamento in quell'estremità che genera una protrusione a singolo filamento. La sintesi di un filamento complementare converte, quindi, l'estremità dei segmenti V-D-J in un *duplex*, con introduzione dei nucleotidi palindromi germinali, detti **nucleotidi P** a tali estremità. Questi consistono in alcune basi extra, correlate alla estremità codificante VDJ originale, ma in orientamento invertito. Alcune basi extra, i **nucleotidi N**, sono inserite, apparentemente con sequenze casuali, anche fra le estremità VDJ per attività dell'enzima TdT sull'estremità codificante 3', generata durante il processo di unione, (fig. 14).

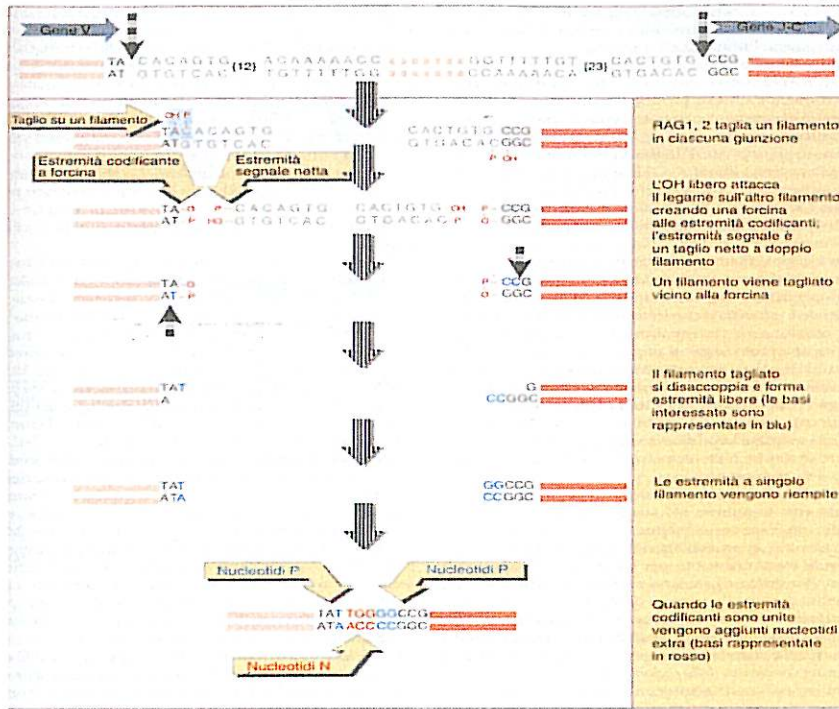


Fig 14.

Se le due estremità dei terminali tagliati sono anch'esse connesse, il frammento escisso forma una molecola circolare, detto *circolo di escissione TCR* (TCRC) e *circolo di escissione del recettore delle cellule B* (van Dongen *et al.*, 2003). La regola generale che governa la reazione di unione è che una sequenza consenso con un tipo di spaziatore può essere unita soltanto a una sequenza consenso con l'altro tipo di spaziatore. Poiché le sequenze consenso dei segmenti V e J possono trovarsi in entrambi gli ordini, i differenti spaziatori non impartiscono alcuna informazione direzionale, ma servono ad impedire che un gene V ricombini con un altro gene V, o che lo stesso succeda a un segmento J. Un gene V, pertanto, non può essere unito direttamente a un segmento J, perché entrambi possiedono lo stesso tipo di sequenza consenso. La spaziatura fra le varie componenti delle sequenze consenso corrisponde quasi a uno o due giri della doppia elica. Ciò può riflettere una relazione geometrica nella reazione di ricombinazione dove le sequenze di riconoscimento eptamere-nonamere di geni Ig e TCR sono state conservate durante l'evoluzione, come illustrato dalla loro alta omologia, e suggeriscono l'uso di una ricombinasi comune per le cellule B/T.

Tutti i segmenti a sinistra del segmento che ricombina sono immediatamente eliminati nell'unione VDJ, mentre quelli a destra dei segmenti J sono trattati come parte dell'introne V-C, questo perché tali segmenti possiedono un segnale ai rispettivi confini sinistro e destro che possono essere usati per lo *splicing* sull'esone C.

Le giunzioni di due segmenti genici possono essere ottenute anche attraverso l'inversione senza delezione dei segmenti genici. Questo processo è occasionalmente trovato nei geni IgH, TRC β e TRC δ , dove i geni V possono essere sul cromosoma in orientamento invertito rispetto ai loci J-C. In questo caso il taglio e la riunione invertono il materiale frapposto invece di eliminarlo. La ricombinazione con un gene V invertito, tuttavia, rende necessario che le estremità segnale siano unite, in quanto in caso contrario ci sarebbe un'interruzione nel locus. I riarrangiamenti dei geni Ig e TCR, generalmente, seguono un ordine gerarchico. Durante la differenziazione delle cellule B, i primi a riarrangiare sono i geni IgH, poi Ig κ , potenzialmente risultanti nell'espressione IgH/ κ e, poi, a seguito dalle delezione del locus Ig κ , riarrangiano i geni Ig λ , potenzialmente seguiti dall'espressione IgH/ λ (fig. 15).

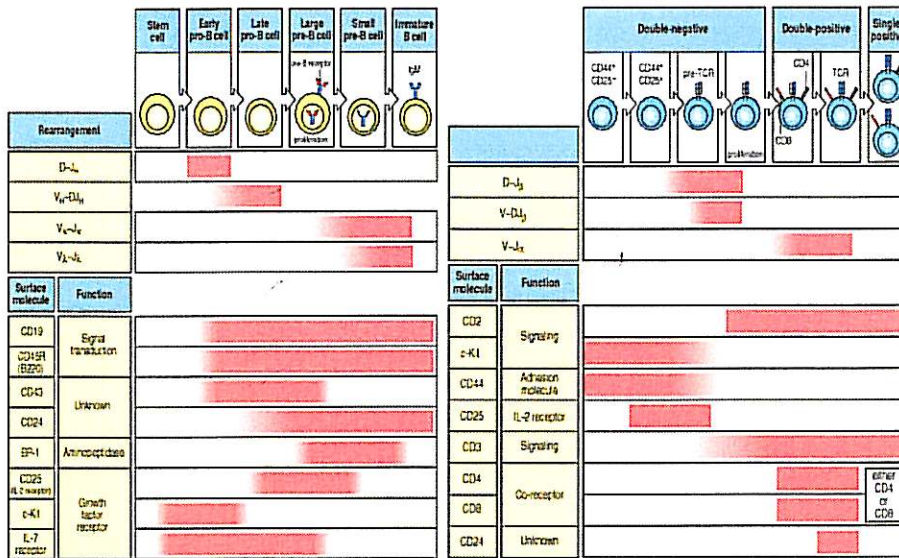


Fig. 15

Durante la differenziazione delle cellule T, i primi a riarrangiare sono i geni TCR δ , quindi, TCR β e quasi in contemporanea TCR γ , risultando nella potenziale espressione di TCR $\gamma\delta$, o seguiti dalla delezione del locus δ e riarrangiamento dei geni TCR α , con potenziale espressione di TCR $\alpha\beta$. Tale ordine temporale di riarrangiamento potrebbe derivare dalla diversa accessibilità dei loci all'enzima in momenti diversi, forse come risultato della trascrizione. Quest'ultima avviene ancora prima del riarrangiamento, anche se i prodotti non hanno ovviamente alcuna funzione codificante. L'evento trascrizionale potrebbe cambiare la struttura della cromatina, rendendo disponibili all'enzima le sequenze consenso per la ricombinazione (Fig 15). Poiché la sequenza a monte di un gene V non è alterata dalla reazione di unione, il promotore deve essere lo stesso nei geni riarrangiati e non. Questi promotori a monte di tutti i geni V, sono inattivi finché non sono riposizionati

nella regione C, con effetto dipendente da sequenze a valle degli *enhancer*. Quest'ultimi sono posti all'interno o a valle del gene C e attivano il promotore del gene V in maniera tessuto-specifico nelle cellule B (fig. 16). Dopo il processo di riarrangiamento il gene è trascritto in un mRNA precoce che matura dopo *splicing* ed eliminazione di tutte le sequenze intermedie non codificanti (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

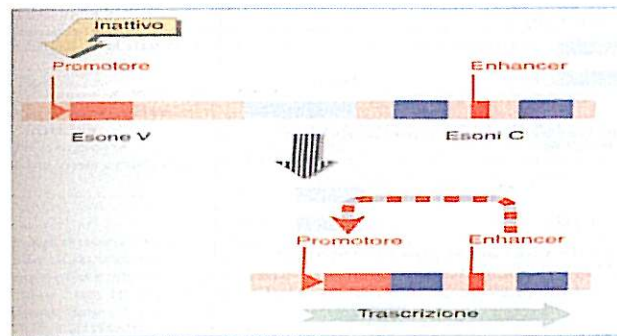


Fig 18.

1.5.1 Il riarrangiamento produttivo e l'esclusione allelica.

I riarrangiamenti ai *loci* TCR, al pari di quelli dei geni per le Ig, possono essere produttivi o non produttivi.

Poiché ciascun evento coinvolge soltanto i geni di uno dei cromosomi omologhi, gli alleli sull'altro cromosoma non sono espressi nella stessa cellula, per il fenomeno dell'*esclusione allelica*, per il quale il riarrangiamento è soppresso una volta che è stato generato un allele produttivo. Tale meccanismo è mostrato dal *locus* IgH, dal *locus* TCR β ; ma non dal *locus* α dove riarrangiamenti continui suggeriscono la possibilità che la sostituzione delle sequenze V possa continuare anche dopo che sia stato generato un allele produttivo.

Quando due cromosomi sono entrambi privi del quadro germinale, in genere soltanto uno di essi è passato attraverso un *riarrangiamento produttivo*, che ha generato un gene funzionante, mentre l'altro ha subito un *riarrangiamento non produttivo*; questo evento può prendere forme diverse, ma in ogni caso la sequenza del gene non può essere espressa sotto forma di una catena di Ig/TCR, perché l'unione D-J è avvenuta ma non è stata seguita dall'unione V-D, o può essere aberrante. Ciò può essere dovuto a controlli *feedback* (fig. 17), per i quali una cellula continua a tentare di ricombinare i geni V e C, fino ad ottenere un riarrangiamento produttivo. L'esclusione allelica è causata dalla soppressione di ulteriori riarrangiamenti non appena è prodotta una catena attiva ed è indipendente per i *loci* delle catene delle Ig e del TCR (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

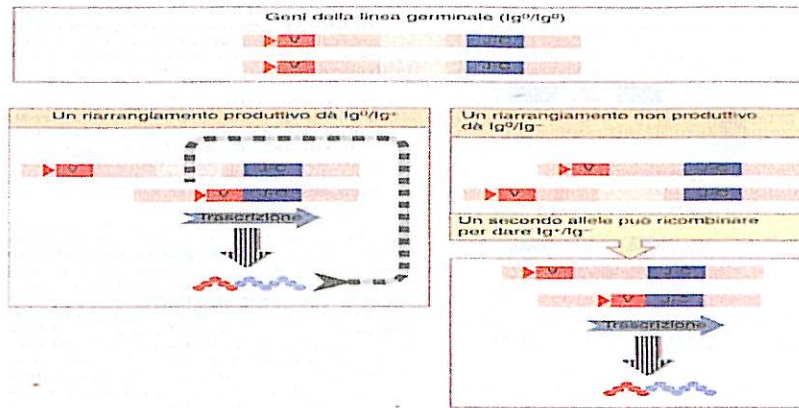


Fig. 17.

1.6 Diversità dei recettori antigenici.

L'estensione del repertorio completo delle molecole Ig e TCR è mediata da: diversità del genoma germinale (numero di segmenti VDJ), diversità giunzionale (diversità dovuta all'imprecisa unione dei segmenti VDJ), trascrizione delle regioni D in tutti e 3 i potenziali schemi di lettura amminoacidica, fusione ed inversione delle regioni D, *switch* isotipico dei segmenti Ch delle Ig, inserzione di nucleotidi palindromi germinali-codificati P e sostituzione di basi (mutazione somatica). Dopo il riarrangiamento VDJ *standard*, possono avvenire riarrangiamento secondari che sostituiscono i riarrangiamenti precedenti. Tutti gli eventi di riarrangiamento genomico insieme generano il repertorio primario dei recettori della Ag (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.6.1 La diversità germinale e la diversità combinatoriale.

Basato su i riarrangiamenti genici molte differenti combinazioni VDJ possono essere ottenute: assumendo un appaiamento casuale dei 100-200 segmenti V_H e 10 D_H e 6 J_H almeno 6000 differenti complessi VDJ possono essere ottenuti, mentre per i geni IgK circa 400 combinazioni e per i geni Igλ almeno 160 combinazioni. Poiché le molecole Ig consistono di catene H e L l'appaiamento risulterà in almeno 2-4 milioni di possibilità combinatoriali. La diversità combinatoriale del recettore TCR $\gamma\delta$ è piccola, almeno 3000 diversità combinatoriali. Cambiamenti nel numero delle bp a livello della giunzione VDJ influenzano lo schema di lettura, rispetto al quale il processo di unione sembra essere casuale, così che probabilmente soltanto $\frac{1}{3}$ delle sequenze unite mantiene lo schema di lettura appropriato anche nelle giunzioni. Se la regione V-J è unita in modo che il segmento sia fuori fase, la traduzione termina prematuramente a causa di un codone non senso, come quando unioni non produttive posizionano J e C fuori fase rispetto al gene V che li precede. Ciascuna proteina è codificata da una grande serie di famiglie geniche correlate (superfamiglia), probabilmente evolutasi a partire da un progenitore comune con risposta immunitaria primitiva (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.6.2 La diversità proteica del sistema immunitario.

Quando un Ag contiene vari determinanti antigenici o epitopi, alcuni possono essere più efficaci di altri nel provocare la risposta immunitaria e dominare completamente la risposta (*immunodominanti*). Questi possono attivare molti cloni, ciascuno dei quali è caratterizzato da un sito di legame per l'antigene dotato di una sua tipica affinità. Quando rispondono solo alcuni cloni, la risposta viene definita *oligoclonale*, mentre quando la risposta viene realizzata da un singolo clone di cellule B o T, viene definita *monoclonale*. Le risposte nei confronti della maggior parte degli antigeni sono *policlonali* (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.6.3 La diversità giunzionale: regione N.

L'imprecisione dell'unione VDJ è manifestata dalla perdita di nucleotidi originali così come dall'inserzione *de novo* di nucleotidi tra i segmenti genici, generando la regione N o CDR3, nella regione V di ogni Ig (fig. 14). Tale inserzione è mediata dall'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), che è presente nel nucleo delle cellule B/T immature e aggiunge nucleotidi all'estremità 3' dei punti di rottura del DNA senza necessità di uno stampo. Le CDR sono nelle Ig 3: 2 sono codificate da sequenze germinali del gene V, mentre la CDR3 è codificata dalla regione giunzionale. Analogamente anche i domini variabili del TCR contengono regioni CDR-equivalenti, dove la CDR3-equivalente è codificata dalla regione giunzionale. La regione N aumenta la diversità dei recettori antigenici ed avviene frequentemente per i geni IgH, TCR γ e TCR δ e limitatamente nei geni IgL. La sua grandezza può variare da pochi nucleotidi fino a 9 o più per una diversità nel sito di legame dell'Ag di circa 5460 varietà dei 5-6 amminoacidi che lo compongono. In tal modo la diversità delle molecole Ig aumenta da 10^4 a 10^{10} , mentre quella del TCR $\alpha\beta$ da 10^6 ad oltre 10^{12} e quella del TCR δ a più di 10^9 (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.6.4 Le mutazioni somatiche.

All'interno del dominio V maggiormente, ma non esclusivamente, nella regione CDR3 (Aubin J *et al.*, 1995 e Levy R *et al.*, 1987), possono essere presenti cambiamenti indotti specificamente dai linfociti attivi, che generano variazioni nelle sequenze dei geni espressi rispetto alle rispettive germinali nell'ordine del 1-4% (corrispondenti a <10 sostituzioni di amminoacidi), poiché altre mutazioni si trovano nella terza base dei codoni e nelle regioni non tradotte. Le mutazioni somatiche avvengono nei centri germinativi durante la proliferazione clonale più o meno a caso, perché esiste una tendenza per alcune mutazioni a ricorrere in molteplici punti detti *hotspot* RGYW, le coppie di basi G/C con mutazioni di transizioni preferite alle trasversioni (Bardwell PD *et al.*, 2002), dovute a preferenze intrinseche del sistema. Le mutazioni hanno effetti imprevedibili sulla funzione della proteina: alcune la inattivano, altre le conferiscono specificità elevata per un particolare antigene. Esse sono comuni nei linfomi delle cellule B di *Burkitt*,

le cui cellule hanno molte caratteristiche dei centri germinativi, e nei linfomi follicolari (Alberts B *et al.*, 1997 e Lewin B. *et al.*, 2000).

1.7 Le Leucemie Linfatiche.

I riarrangiamento dei geni delle Ig e del TCR caratterizzano le cellule leucemiche della linea linfatica e possono essere identificate come *fingerprint* leucemia-specifici (Pongers-Willemse MJ *et al.*, 1999), perché, in linea di principio, tutte le cellule di un paziente hanno gli stessi riarrangiamenti genici Ig e TCR con le regioni giunzionali identiche, derivando da una singola cellula precursore linfoide trasformata. In base alla presenza di numerosi blasti, queste possono essere divise in due gruppi: leucemia linfatiche croniche (LLC) e leucemia linfoblastiche acute. I maggiori tumori linfoidi derivano dalla linea B (90-95%) con solo una parte minore deriva da cellule T (5-7%) o dalla linea delle cellule NK (1-2%). Le LLA di origine T sono del 15-20% di casi, ma nel gruppo di leucemie linfoidi mature e linfomi non Hodgkin (LNH) i tumori T sono relativamente rari eccetto per subgruppi specifici come i linfomi cutanei (Bernasconi P., 2003).

1.7.1 Leucemia Linfatica Acuta (LLA).

La leucemia linfatica acuta (LLA) è una neoplasia ematologica che origina da cellule staminali totipotenti o da progenitori emopoietici differenziati in linfociti B o T, che sostituiscono il tessuto emopoietico midollare, circolano nel PB e infiltrano gli organi linfoidi. Nell'adulto la malattia ha un decorso clinico meno favorevole rispetto a quello osservato nel bambino, con remissione completa (RC) indotta dalla chemioterapia convenzionale nel 40% dei casi rispetto al 90% circa dei pazienti pediatrici, dipendendo dall'età, dalla conta totale dei globuli bianchi e dal tempo impiegato per raggiungere la RC. Sul piano strettamente biologico la citogenetica convenzionale, la FISH e la biologia molecolare hanno indicato che la ploidia e la presenza di anomalie cromosomiche e geniche specifiche influiscono significativamente sulla percentuale di RC e sulla sopravvivenza libera da malattia. I pazienti con t(9;22), t(4;11), monosomia 7 (-7) e trisomia 8 (+8), infatti, hanno un decorso clinico sfavorevole rispetto a quelli con cariotipo normale o con altre anomalie. L'iperdiploidia (con più di 50 cromosomi) avviene nel 5% delle forme dell'adulto e 60% delle forme pediatriche, dove si associa a un basso valore di globuli bianchi, ad un immunofenotipo pre-B, ad un *DNA index* superiore a 1.16, decorso clinico estremamente favorevole determinato da una maggior sensibilità agli antimetaboliti ed una maggiore tendenza della cellula ad andare in apoptosi. Nell'adulto LLA B la ploidia ha le seguenti incidenze: iperdiploidia 5%, pseudodiploidia 55%, diploidia 30%, aploidia 1% e ipodiploidia nel 4% dei casi con prognosi sfavorevole. I geni bersaglio delle traslocazioni cromosomiche sono: c-MYC, E2A, ETV6, MLL. c-MYC, sul cromosoma 8q24, con incidenza del 4% nelle LLA dell'adulto con le traslocazioni t(2;8)(p11;q24), t(8;14)(q24;q32) e t(8;22)(q24;q11). La t(8;14) giustappone il gene c-MYC alle sequenze "*promoter/enhancer*" regolanti l'espressione dei geni IgH, con i punti di rottura in posizione 5' del

secondo dei 3 esoni di c-MYC con punti di rottura nella regione di "switch" o "joining" delle IgH e giustapposizione ai geni Jh in orientamento *testa-testa*. La t(8;22) e la t(2;8) giustappongono c-MYC alle sequenze "promoter/enhancer" controllanti l'espressione dei geni IgL con orientamento *testa-coda*. Queste traslocazioni provocano un'aumentata espressione del gene c-MYC, che altera il programma trascrizionale della cellula, con conseguenti anomalie della proliferazione, differenziazione e apoptosi. Sul piano clinico le LLA B con t(8;14)(q24;q32) presentano adenomegalie mediastiniche e addominali e frequente interessamento del sistema nervoso centrale (SNC). Sul piano morfologico i blasti leucemici sono di tipo L3, presentano cioè dimensioni variabili, nucleo a cromatina finemente dispersa con nucleolo ben evidente e citoplasma intensamente basofilo con numerosi vacuoli. Sul piano prognostico sono favorevoli con trattamenti terapeutici intensivi e RC nell'88% dei pazienti.

E2A, sul cromosoma 19p13, con incidenza del 5% nelle LLA dell'adulto con t(1;19)(q23;p13), di razza non Caucasica, e fenotipo *pre-B* con CD9⁺, CD10⁺ e CD19⁺. La traslocazione può essere sia bilanciata che sbilanciata con formazione del cromosoma 19 derivativo, der(19). La maggior parte delle t(1;19) determinano la giustapposizione del gene E2A, alla banda 19p13 e codificante per il fattore di trascrizione E12, con il gene PBX1, alla banda 1q23 codificante per il fattore di trascrizione E47, entrambi necessari per la normale differenziazione del linfocita B. Il gene chimerico E2A-PBX1 sul der(19) induce il blocco differenziativo. In un ristretto numero di pazienti la citogenetica dimostra una t(1;19), ma alla PCR non si osserva alcun riarrangiamento E2A-PBX1. In questi casi si ritiene che il punto di rottura a livello del cromosoma 19 cada al di fuori del gene E2A. Sul piano prognostico l'andamento clinico è sempre severo, specie per i pazienti con traslocazione bilanciata; per quelli con traslocazione sbilanciata la prognosi sembra essere intermedia, richiedendo l'impiego di protocolli di chemioterapia intensiva. Il gene E2A è anche coinvolto nella traslocazione t(17;19)(q21;p13), nell'1% delle LLA *pre-B*, con gene fuso E2A-HLF che causa il blocco dei meccanismi che regolano l'apoptosi. I pazienti con questa traslocazione mostrano ipercalcemia e spesso sviluppano una coagulazione intravasale disseminata. La loro prognosi è sfavorevole, ma la malattia residua, *sempre persistente, può essere monitorata con RT-PCR quantitativa*. ETV6, sul cromosoma 12p13.3 e riarrangiante con numerosi *partner* cromosomici in disordini mielo- e linfoproliferativi, è coinvolto nelle traslocazioni t(12;21)(p13;q22) e t(9;12)(p24;p13) a fenotipo *pre-B*. Identificate per FISH e non per citogenetica convenzionale, perché coinvolgenti regioni cromosomiche poco colorate al bandeggio convenzionale. La t(12;21) si osserva nel 16-32% delle LLA pediatriche e nel 3-4% delle LLA dell'adulto, con fusione dei geni ETV6 e AML-1, alla banda 21q22, creando i due geni di fusione AML-1-ETV6 sul cromosoma 21 traslocato e ETV6-AML-1 sul cromosoma 12 espresso in proteina che dimerizza con se stessa e con la proteina ETV6 normale, causando la perdita della repressione sequenza-specifica della trascrizione. Sul piano clinico le cellule

sono CD10⁺, CD13⁺ e CD33⁺, mentre da quello prognostico hanno prognosi favorevole indipendentemente dall'età e dal valore dei globuli bianchi, con RC prossima al 90% e il "*timing*" della recidiva dipendenti dalla presenza di alcune anomalie aggiuntive, come la trisomia 21, o la trisomia per il cromosoma 21 derivato dalla traslocazione, l'ampiezza della delezione del secondo allele ETV6 e infine la quantità di cellule che presentano questa seconda delezione.

Il gene ETV6 è coinvolto anche nella molto rara t(9;12)(p24;p13), formando il gene di fusione ETV6-JAK2, che codifica per una chinasi costituzionalmente attiva e fenotipo precoce *pre-B*.

MLL, sul cromosoma 11q23, è coinvolto in traslocazioni con almeno 40 *partner* cromosomici diversi, ma nelle LLA forma la t(4;11)(q21;q23), presente nel 60% delle forme del neonato, nel 2% delle forme dell'infanzia e nel 3-6% delle forme dell'adulto colpendo giovani di sesso maschile. I punti di rottura nel gene cadono in una regione di 8.3 kb, tra gli esoni 5 e 11. Il gene chimerico, MLL-AF4, sul cromosoma 11, funzionando da fattore trascrizionale, capace di controllare l'espressione di geni dell'inizio del differenziamento linfocite normale B/T, che causa un aumento nell'espressione di MLL e un arresto del programma differenziativo allo stadio *pre-B* per un'aberrante espressione dei geni bersaglio o per una loro mancata espressione. Frequentemente si associa ad iperleucocitosi, organomegalie, interessamento del sistema nervoso centrale. Nella t(11;19)(q23;p13.3) si forma il gene di fusione MLL-ENL con fenotipo *pre-B* e prognosi dipendenti dall'età del paziente, migliore nel bambino di età compresa tra 1 e 10 anni, e dal fenotipo T. Nell'adulto la LLA t(4;11) ha decorso clinico sfavorevole, richiedendo il trapianto di midollo osseo allo genico quale strumento terapeutico.

Altre traslocazioni sono la t(9;22)(q34;q11) con formazione del cromosoma Ph, tipico delle LMC, con i punti di rottura nel gene BCR nella "*minor breakpoint cluster region*" (m-bcr), tra gli esoni e'2 ed e2, e del gene ABL il primo e il secondo esone, producendo il gene chimerico BCR-ABL, che codifica per una proteina di 190kD ad attività tirosin-chinasica costitutiva. In un piccolo numero di pazienti può trovarsi la proteina P210 derivante dalla fusione dei punti di rottura in BCR della "*Major breakpoint cluster region*" (M-bcr), tra gli esoni 13 e 14 o tra gli esoni 14 e 15. Entrambe le proteine inducono una ridotta adesività allo stroma midollare, un'eccessiva proliferazione e un blocco dell'apoptosi. Nell'adulto la LLA Ph⁺ si associa ad iperleucocitosi, morfologia L2, positività per il CD10 e per antigeni mieloidi, decorso clinico sfavorevole e cura con il farmaco TK-inibitore STI571.

La t(5;14)(q31;q32) è rara nelle LLA e causa aumento degli eosinofili nel PB, giustapponendo il gene che codifica per l'interleuchina 3 alle sequenze "promoter/enhancer" dei geni IgH.

La Delezione delle braccia lunghe del cromosoma 6, nel 4-10% delle LLA del bambino, è causata dalla delezione delle bande 6q14 e 6q21, come mostrato dalla FISH, tra le bande 6q15 e 6q21.

Le Anomalie delle braccia corte del cromosoma 9, nel 10% delle forme pediatriche in associazione ad un fenotipo T, causano la delezione 9p e la perdita dei geni che controllano il ciclo cellulare, quali p14^{ARF}, P15^{INK4b} e

soprattutto p16^{INK4a} con significato prognostico sfavorevole solo nelle forme B. L'anomalia clonale del cromosoma 9 va accuratamente definita con FISH, specie nei casi in cui questi forma cromosomi di centrici con i numeri 12 e 20 dic(9;20)(p11-13;q11), rispettivamente, che possono essere erroneamente etichettati come casi di monosomia 20.

Nelle LLA T solo il 30% dei pazienti mostra riarrangiamenti a carico delle bande cromosomiche del TCR. Quelle della banda 14q11, che contiene i geni per le subunità α e δ , e della regione 7q32-36, che contiene il gene per la subunità β , sono le più frequenti (30-35%) che giustappongono un proto-oncogene alle "promoter/enhancer" del TCR, come le traslocazione della banda 7p15, che contiene il gene per la subunità γ . Nella LLA T i geni coinvolti sono: HOX11, c-MYC, TAL1/2, LMO1/2.

HOXC11, alla banda 10q24 nel 4% delle LLA pediatriche e nel 14% dell'adulto, che è attivamente trascritto durante l'ontogenesi T ed è coinvolto nella t(10;14)(q24;q11) e t(7;10)(q35;q24), che giustappongono il gene alle sequenze "enhancer/promoter" per TCR δ e β , inducendo aumentata espressione del gene stesso, alterazione del ciclo cellulare, per interazione con le fosfatasi che controllano la fase G2, e prognosi favorevole.

c-MYC, all'8q24, è coinvolto nella t(8;14)(q24;q11), con giustapposizione di c-MYC alle sequenze "promoter/enhancer" del TCR δ .

TAL1 e TAL2, fattori trascrizionali con struttura costante (regione "elica-giro-elica", HLH), sul cromosoma 1p33, consentono all'emoangioblasto di differenziarsi dal mesoderma durante l'emopoiesi, perché TAL1 interagisce con la regione HLH ai fattori trascrizionali E12 ed E47 codificate da E2A, bloccando la trascrizione di vari geni bersaglio. Nella LLA T il gene TAL1 è coinvolto nella t(1;14)(p33;q11) nel 3% dei casi, mentre è colpito da delezione interstiziale nel 30%. Questa pone l'estremità 5' del gene (promotore) sotto l'azione di sequenze "enhancer/promoter" del gene SIL, che è espresso durante l'ontogenesi T. I pazienti con t(1;14) e delezione di TAL1 presentano iperleucocitosi e cellule leucemiche CD2⁺ e CD10⁻, con prognosi favorevole. Il gene TAL2 è, invece, bersaglio della t(7;9)(q34;q32).

LMO1 e LMO2, fattori trascrizionali mappati in 11p15 e in 11p13, rispettivamente, che sono coinvolti in riarrangiamenti che li giustappongono alle sequenze "enhancer/promoter" dei geni per il TCR, causando l'aumento della loro espressione e la formazione di complessi trascrizionali aberranti, con conseguente anomalia dei programmi differenziativi della cellula, come quello per lo sviluppo del SNC, che richiede l'espressione di LMO1. I riarrangiamenti TCR rappresentano uno degli eventi precoci dello sviluppo delle cellule T normali, con ricombinazioni TCR δ frequenti nelle LLA B precursor con 56% di casi monoclonali e 83% di casi monoallelici, nell'80% di cellule B normali e mature con V δ 2-D δ 3/ D δ 2-D δ 3 e V δ 2-D δ 3 (Szczepanski T *et al.*, 2004). Nell'adulto è, quindi, ovvia la necessità di ricercare nuovi fattori prognostici indipendenti per una corretta stratificazione terapeutica dei pazienti (Bernasconi P., 2003).

1.7.2 Leucemia Linfatica Cronica (LLC).

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una neoplasia ematologica caratterizzata da eccessiva proliferazione e conseguente accumulo nel PB di piccoli linfociti maturi. Nel 98% dei casi il fenotipo della cellula leucemica è B. Frequentemente insorge nell'adulto di razza bianca, con età media di 63 anni ed ha un decorso estremamente variabile: alcuni pazienti muoiono ad alcuni mesi dalla diagnosi, mentre altri sopravvivono per più di 20 anni. Due sistemi di stadiazione consentono di prevedere la sopravvivenza generale della malattia, ma non sono in grado di stabilire alla diagnosi il reale rischio di progressione e la probabilità di sopravvivenza per il singolo paziente. L'anomalia cromosomica identifica in modo attendibile sottogruppi di pazienti a prognosi diversa e candidabili, quindi, a differenti terapie. Le più comunemente identificate sono la delezione 13q14, la trisomia 12, la delezione 11q22.3-q23.1, la delezione 6q21-q23 e, infine, la mutazione o delezione di 17p13. L'analisi molecolare dei geni delle Ig in soggetti con trisomia 12 ha dimostrato che tale alterazione cromosomica si accompagna più frequentemente ad una configurazione "germline" Ig, per cui tali geni non sono colpiti da mutazione somatica. Considerando il fenotipo leucemico, i pazienti con scarsa espressione dell'antigene CD38 mostrano una bassa incidenza di anomalie alla FISH. I più recenti avanzamenti tecnologici costituiti dalla "Comparative Genomic hybridization" (CGH), dalla "Multicolor Karyotyping", dallo "Spectral Karyotyping", oltre che dalle metodiche di sequenziamento genico, definiscono i meccanismi patogenetici della LLC. Sul piano prognostico il tipo di alterazione cromosomica determina il decorso clinico e la risposta alla chemioterapia: una delezione 17p13 si accompagna alla più breve sopravvivenza (soli 32 mesi), mentre una delezione 13q14 alla più lunga sopravvivenza (circa 133 mesi). Le delezioni 17p13 e 11q, inoltre, si associano ad una malattia in stadio più avanzato.

La Delezione 13q, sebbene possa essere presente all'esordio della malattia, viene sempre considerata un evento secondario nella patogenesi della LLC. Dal punto di vista prognostico i pazienti con del(13)(q14) presentano una mediana di sopravvivenza dalla diagnosi pari a 133 mesi, e un intervallo mediano di non trattamento pari a 92 mesi e mostrano delezione del gene LEU5, che ha una struttura simile a quella di un gene soppressore del tumore (TSG): lunghezza di 40kb ed elementi ricchi in CpG (zone ricche in Citosina e Guanina), il cui mancato funzionamento, anche solo ad un allele è sufficiente per la patogenesi della LLC.

La Trisomia 12, nelle forme tipiche di malattia ha l'incidenza pari al 2-13%, mentre nelle forme atipiche al 45-65%. Alcuni pazienti mostrano il difetto cromosomico in piccoli cloni (2% di cellule con +12), che possono scomparire nel tempo. Talvolta invece l'anomalia fa parte di un cariotipo complesso, con più di 3 alterazioni citogenetiche. Si correla ad un fenotipo *naïve* della cellula con configurazione "germline" dei geni Ig. La presenza di +12 è in grado d'influenzare la prognosi dei pazienti con LLC-B tipica, ma non di quelli con morfologia atipica, mostrando tutti una prognosi intermedia.

Le analisi FISH ha mostrato che la regione più comunemente deleta del cromosoma corrisponde alle bande 12q13-15, che contiene vari oncogeni tra cui il "*murine double minute gene 2*" (MDM-2), codificante per una proteina di 90kD, la quale si complessa con TP53, impedendo a quest'ultimo di controllare l'apoptosi.

La Delezione 11q elimina la porzione di 2-3Mb a livello delle bande 11q22-23, contenenti il gene ATM (ataxia telangiectasica). Dal punto di vista clinico la delezione si accompagna più frequentemente ad una malattia in stadio avanzato con importanti linfadenomegalie, bassi livelli di emoglobina e di piastrine, e frequente riscontro di sintomi B (febbricola, calo ponderale, sudorazioni notturne). La mediana di sopravvivenza di questi pazienti è pari a 79 mesi e l'intervallo medio di non trattamento è di 13 mesi. La delezione causa la disregolazione dei processi di apoptosi, mutando il gene ATM anche negli adulti con LLC T con una frequenza del 6% circa. La perdita di un allele del gene ATM si associa abbastanza frequentemente alla mutazione dell'altro allele.

La Delezione 17p, in 5% circa, causa la perdita del gene TP53, che può essere colpito da mutazione, più spesso a carico dei suoi esoni, anche nel 20% circa dei pazienti senza del(17)(p13). I pazienti hanno sintomi B e spesso presentano importanti linfadenomegalie, bassi livelli di emoglobina e di piastrine. All'esame microscopico dello striscio di sangue periferico si osservano numerosi prolinfociti e i valori della lattico-deidrogenasi e della fosfatasi alcalina sono sovente elevati, mentre quelli dell'albumina sono al di sotto della norma. La mutazione del gene è tanto più frequente quanto più avanzato è lo stadio della malattia. La mediana di sopravvivenza è di soli 32 mesi e l'intervallo medio di non trattamento è di soli 9 mesi.

La Delezioni 6q, nel 6-9% dei pazienti con LLC B porta alla perdita delle bande cromosomiche q15, q23, q25-27 e q21, che è la più frequente. Dal punto di vista clinico la delezione è più spesso associata ad una diagnosi di linfoma linfocitico e non sembra avere un particolare impatto prognostico.

Uno dei parametri biologici correlante il decorso clinico della LLC B è la configurazione "*germline*" o con mutazioni somatiche dei geni che codificano per IgH-V, che permette di dividere i pazienti con LLC-B in due sottogruppi ad aspettativa di vita diversa: quelli con mutazione presentano una mediana di sopravvivenza significativamente migliore (24 anni) rispetto ai pazienti con assetto "*germline*" (6-8 anni). Ciò è forse determinato dalla presenza di alterazioni cromosomiche diverse nei due gruppi di pazienti. Quelli a lunga sopravvivenza (con mutazione Vh) presentano più frequentemente una del(13)(q14), mentre quelli senza mutazione mostrano più spesso una trisomia 12 o una del(17p). La tecnologia *microarrays* ha dimostrato che il gene per la proteina 70 associata alla catena zeta del complesso recettoriale di membrana (ZAP-70) è caratteristicamente correlato alla LLC B senza mutazioni Vh, con decorso clinico sfavorevole. La proteina ZAP70 ad attività tirosin-chinasica è assolutamente necessaria per l'attivazione dei linfociti T e la sua inappropriata espressione nella LLC B altera l'attività di altre chinasi agendo da antagonista dei meccanismi che *down-regolano* l'attività del BCR nelle cellule anergiche, aumentandone il *signaling*. L'attivazione del linfocita B indotta dal legame tra recettore BCR

e Ag è più efficace in presenza di ZAP-70. L'analisi di questi pazienti può essere effettuata, oltre che con la FISH o il sequenziamento dei geni IgH-V amplificati per PCR, attraverso la citoflussometria della molecola CD64 e CD38, che non sempre ha mostrato avere significato clinico unico e inconfutabile, o meglio ancora attraverso la detenzione dell'mRNA per Zap70, la cui concentrazione può anche essere monitorata tramite analisi RQ-PCR, rilevando la MRD. Prove evidenti indicano un ruolo importante dell'Ag nella patogenesi di alcuni tipi di LLC B, quali: l'attivazione dei geni Ig, la bassa espressione delle catene Ig sulla superficie di membrana, la ridotta responsività alla stimolazione IgM, che consistono con lo stato anergico indotto dall'esposizione cronica all'Ag (Bernasconi P., 2003; Wiestner A. 2005).

1.8 L'ipereosinofilia (HES).

La sindrome ipereosinofila idiomatica è una malattia molto eterogenea definita dalla marcata presenza di eosinofili (fino a 1500/ μ l) di origine ignota complicata da danni di fine-organo. Gli eosinofili derivano da progenitori mieloidi (GEMM-CFU) nel midollo per azione delle tre citochinine ematopoietiche: GM-CSF, IL3 e IL5, che è specifica per il differenziamento degli eosinofili, presenti anche nelle cellule tumorali di pazienti con linfoma non-Hodgkin's, sindrome di Sézary e nei tumori solidi del polmone, nonché in malattie allergiche e parassitiche. L'IL5 può essere prodotta oltre che dalle mastocellule, dai basofili e dagli eosinofili, anche da cellule T *helper* (CD4⁺) produttori un profilo di citochinine di tipo 2. Queste cellule Th2 producono anche IL4 e IL13 che favoriscono la sintesi di IgE e mediano le risposte immuni producendo alti livelli sierici di IgE ed eventualmente ipergammaglobulinemia policlonale con aumentati livelli di IgM e/o IgG. Gli eosinofili maturati migrano alla mucosa bronchiale e alla pelle, dove, per la probabile presenza di molecole di adesione specifiche o dei recettori delle citochinine, si localizzano le maggiori infiltrazioni HES. Queste sono frequenti anche nel cuore e nel sistema nervoso (SNC/P), polmoni, fegato, milza, sistema digestivo e articolazioni. Fenomeni di trombocitemia microvascolare risultano da danni degli eosinofili e dell'attivazione della coagulazione all'endotelio. I danni locali da alti livelli di IgE sono dovute al rilascio di sostanze tossiche, quali: proteine cationiche, enzimi, specie reattive dell'ossigeno, citochinine proinfiammatorie e mediatori lipidici.

Indicatori prognostici negativi sono: livelli di eosinofili maggiori di 10000/ μ l, aumentati livelli di vitamina B12 sierica, alterato tasso di fosfatasi alcalina dei leucociti, presenza di anomalie cromosomiche, anemia o trombocitopenia, epatomegalia, splenomegalia e presenza di precursori dei leucociti circolanti. Tali pazienti rispondono negativamente ai corticosteroidi sistemici ed aumentano la possibilità di sviluppare severe complicazioni cardiache o leucemie acute. L'accumulo di eosinofili in PB e tessuti possono risultare o da disordini di un precursore mieloido (eosinofilia primaria) o dalla produzione di citochine eosinofiloipietiche da parte di cellule non mieloidi (eosinofilia secondaria), inducente approcci terapeutici differenti. Lo STI571,

infatti, è la terapia di prima linea per i pazienti con il gene di fusione FIP1L1-PDGFR α , mentre i corticosteroidi restano il maggior trattamento dei pazienti nei quali l'HES è secondaria alla *over*-produzione di interleuchina 5 (IL5) da cellule T anormali. Anche la prognosi è diversa: i pazienti con FIP1L1-PDGFR α possono sviluppare leucemia mieloide acuta eosinofilia, mentre quelli con cellule T produttrici IL5 possono sviluppare linfoma (Bernasconi P., 2003; Roufosse F. *et al.*, 2006).

1.8.1 Ipereosinofilia variante mieloide (m-HES).

L'aumento della produzione di eosinofili da parte del midollo osseo (per un periodo di tempo superiore a sei mesi, in assenza di parassitosi o di allergie) con conseguente infiltrazione tissutale e danni d'organo (specie a livello del SNC/P, polmone e cute), in cellule ematopoietiche della linea mieloide colpisce maggiormente soggetti di sesso femminile di età tra 20-50 anni, che rispondono al farmaco Tk-inibitore STI571, perché aventi la chinasi responsiva FIP1L1-PDGFR α . Questa deriva dalla traslocazione intracromosomica (criptica alla citogenetica convenzionale ma identificabile per FISH e biologia molecolare), che fonde il gene FIP1L1, sul cromosoma 4q12 a 800kb a monte del gene PDGFR α , con il gene PDGFR α , sul cromosoma 4q12. La FIP1L1-PDGFR α è sempre espressa e può essere interessata da fenomeni di mutazioni puntiformi con cambi degli aminoacidi del sito di legame dell'ATP, che ne conferisce resistenza allo STI571. Il gene di fusione reciproco, PDGFR α -FIP1L1 non viene invece mai espresso (Bernasconi P., 2003; Roufosse F. *et al.*, 2006).

1.8.2 Ipereosinofilia variante linfocitaria (HES-LV).

La HES variante linfocitaria (HES-LV) mostra cellule T del PB ad attività eosinofiloipoietica, coinvolte nella patogenesi della malattia attraverso il rilascio di fattori solubili Th1/Th2, che causano alti livelli di IgE e IgM sieriche. A differenza della mHES, la HES-LV colpisce sia donne che maschi con precedente storia di malattia atopica tipica, i quali presentano prurito, eczema, eritroderma, orticaria e angioedema episodico. Alcuni pazienti hanno un profilo clinico indistinguibile da quello della sindrome di Gleich's. Tutti mostrano migliore prognosi nel breve tempo rispetto a quelli con mHES, ma nel lungo periodo possono sviluppare tumori di cellule T, che conservano l'iniziale fenotipo aberrante, indicando che la popolazione patogena è premaligna. Queste cellule T sottostanno all'espansione clonale e producono IL5, IL4, IL2, TNF α , GM-CSF, se di tipo Th2, o IFN γ , se sono di tipo Th1, mostrando un unico fenotipo di superficie CD3⁺CD4⁺(CD2⁺TCR α/β ⁻). Altri fenotipi aberranti sono: CD3⁺CD4⁺, che è il più frequente, e CD3⁺CD4⁻CD8⁻. Tutte le cellule T aberranti, generalmente, esprimono Ag di superficie caratteristici delle cellule attivate (HLA-DR⁺ o CD25⁺) di memoria (CD45RO⁺) e, in particolare, le CD3⁺CD4⁺ spesso mostrano alti livelli di espressione CD5 e frequente perdita dell'espressione di CD7 di superficie, una caratteristica delle cellule T della pelle, o di CD27 di superficie e degli antigeni linfoidi cutanei. Tali cellule CD3⁺CD4⁺ clonali possono presentare anche anomalie cromosomiche, quali: rottura del

cromosoma 16q, parziali delezioni dei cromosomi 6q, 6qdel(q13-q22) e 6qdel(q11-q23) con perdita di geni soppressori dei tumori ivi mappati, o 10p e trisomia 7. L'evento primario portante all'espansione delle cellule T clonale può differire tra i pazienti con diverse anomalie fenotipiche: quelli con fenotipo CD3⁺CD4⁺CD8⁻ mancano dell'espressione di CD95/Fas-R e non presentano l'apoptosi Fas-mediata, mentre quelli CD3⁺CD4⁺ esprimono Fas-R e sono altamente sensibili all'apoptosi. L'evento portante alla perdita del complesso TCR/CD3 può essere un comune agente patogenico, come suggerito dalle cellule CD3⁺CD4⁺. Queste, prive delle infezioni da HTLV₁, il quale annulla o riduce l'espressione del complesso TCR/CD3 nelle cellule T CD4⁺, mostrano trascrizione difettiva della catena CD3 γ e trascrizione normale delle altre catene appartenenti al complesso. Ciò causa la mancata traslocazione del complesso alla membrana, la quale dipende dall'espressione di CD3 γ . La perdita dell'espressione di superficie TCR/CD3 nelle cellule CD4⁺ è presente anche nelle malattie ataxia-telangiectasia e linfadenopatia angioimmunoblastica, che possono evolvere in linfoma, indicando che il fenotipo aberrante può predisporre le cellule T alla trasformazione maligna, esponendole all'attivazione di *pathway* alternativi, che possono non sono associati con meccanismi di regolazione negativa generando l'espansione clonale non controllata. Tale espansione associata ad alti livelli di IgE sierici costituisce un buon marcatore per l'HES ed è un fattore a prognosi positiva (Roufosse F. *et al.*, 2006).

1.9 Diagnosi delle leucemie linfatiche.

Diverse strategie sono state messe a punto per determinare la clonalità, quali le analisi:

- citogenetiche convenzionali, eseguite tramite bandeggio statico o dinamico, che però non fornisce dettagli sul tipo di replica di ogni cromosoma durante la fase S, ma sviluppa un *pattern* di bande caratteristico per ogni coppia di cromosomi omologhi e possono essere eseguite solo su isolati di campione freschi e soffrono della difficoltà di ottenere cellule tumorali in metafase. (van Dongen JJM and Wolvers-Tettero LM, 1991). Un esempio è fornito dalle LLC, dove la scarsa attività mitotica (frazione di crescita inferiore all' 1 % con la maggior parte delle cellule in G0) è responsabile dell'elevata percentuale d'insuccessi, dimostrando la presenza di anomalie clonali del cariotipo nel 40-50% circa dei pazienti. L'osservazione, pertanto, di un normale assetto cromosomico nelle LLC, non esclude la presenza di difetti clonali del cariotipo, poiché i mitogeni sono attivi su cellule B e T.
- citogenetiche molecolari, in particolare la FISH, che non richiede cellule in mitosi e dimostra anomalie cromosomiche diverse per frequenza e tipo (numeriche e strutturali) anche nelle regioni poco colorate col bandeggio, quando condotta su cellule in interfase (non in divisione). L'incidenza, infatti, di alterazioni del cariotipo per del(17)(p13) è del 65% nei pazienti LLC all'esordio o con malattia stabile, e dell'88% nei pazienti con malattia in progressione, sostenendo l'ipotesi che la LLC potrebbe originare da due diverse cellule B: *naive* o della memoria, correlando il dato citogenetico a

quello molecolare ed immunofenotipico. La semplicità della metodica, l'elevata sensibilità (maggiore nei casi di trisomia, minore in casi di monosomia) e specificità della metodica, la possibilità di determinare la linea linfocitica coinvolta nel processo leucemico, il monitoraggio della MRD, la definizione della chimera nei trapianti allogenici di MB da donatori di sesso diverso, unitamente alla rapidità con cui può essere condotta influenza le decisioni terapeutiche, ma è difficile su tessuti congelati e paraffinati, dove aumenta la possibilità di artefatti alterando la struttura e determinando risultati falsamente positivi.

- Immunofenotipiche, che indaga a livello proteico i disordini linfoproliferativi B maturi, identificando al citofluorimetro i tipi di molecole Ig/TCR che le cellule esprimono. Permettono, mediante l'uso di diverse combinazioni di anticorpi monoclonali e antisieri eterologhi coniugati a fluorocromi (Coustan-Simth E *et al.*, 2002), la rilevazione di marcatori presenti sulle di Ig/TCR di superficie, Ig citoplasmatiche e dei domini monotipici V β (con 20-25 Ab/famiglia), V γ , V δ , che, in aggiunta all'identificazione del *lineage* cellulare, possono confermare la monoclonalità sulla base della restrizione IgL (valori tra >4.0 o <0.5). Uno dei *pitfall* presentanti è la non discriminazione dei piccoli linfociti T TCR $\alpha\beta$ /CD8⁺ clonali presenti nel <40% di PB da anziani sani, così come pure per i numerosi linfociti TCR $\gamma\delta$ ⁺ policlonali, in particolare, V γ 9-J γ 1.2 e V δ 2-J δ 1 di individui sani. Sebbene facili per le analisi di PB e MB, la citofluorimetria è difficile in campioni tissutali e non sempre diagnosticano la monoclonalità in maniera definitiva e inconfondibile, per l'assenza dell'espressione delle Ig, o per la presenza di oligoclonalità delle molecole Ig solubili che sottostanno all'espressione delle Ig cellulari, o per la cattiva qualità del campione o per il basso numero di cellule tumorali (Garcia-Sanz R *et al.*, 1999).
- di biologia molecolare (Bernasconi P., 2003).

1.9.1 Analisi di biologia molecolare.

In alcuni disordini linfoproliferativi la distinzione tra processi maligni e reattivi o la determinazione *lineage* del tumore, possono essere difficoltose o impossibili sulla base delle precedenti analisi. In tali casi la clonalità e l'origine della popolazione cellulare dei linfonodi coinvolti può essere determinata studiando la configurazione dei geni Ig e TCR, poiché cellule B/T hanno riarrangiamenti di questi geni diversi per ciascun linfocita, ma identici nel clone linfocitario.

Tali analisi sono generalmente state eseguite con il *Southern Blot*, che è realizzabile, ma è un metodo *time consuming* e *labor intensive*.

1.9.1.1 Analisi Southern Blot (SB).

Il *Southern Blot* (SB), descritta nel 1975 da Southern, per un lungo periodo è stata la tecnica *goldstandard* per gli studi di clonalità molecolare, è basato sul trasferimento di frammenti di DNA da un gel di agarosio, dove non possono essere manipolati, ad un filtro di nitrocellulosa o di *nylon* dove può essere eseguita una reazione di ibridazione con sonde di DNA, marcate con

un isotopo radioattivo o con un tracciante fluorescente, complementari alla sequenza del frammento in studio e posizionate a valle dei segmenti J. È possibile identificare una specifica sequenza di DNA tra vari frammenti rilevando sia le aberrazioni cromosomiche coinvolgenti i segmenti genici J sia i riarrangiamenti di, virtualmente, tutti i geni Ig e TCR non-germinale (riarrangiati), che sono prodotti per digestione con più enzimi di restrizione (ER), i quali tagliano il DNA genomico a livello di una specifica sequenza riconosciuta (detta sito di restrizione), in frammenti di 2-15kb. La tecnica si focalizza sulla diversità di riarrangiamento, che si concretizza in bande d'ibridazione posizionate in base al peso molecolare del frammento in studio, visualizzati tramite autoradiografia (Fig 18).

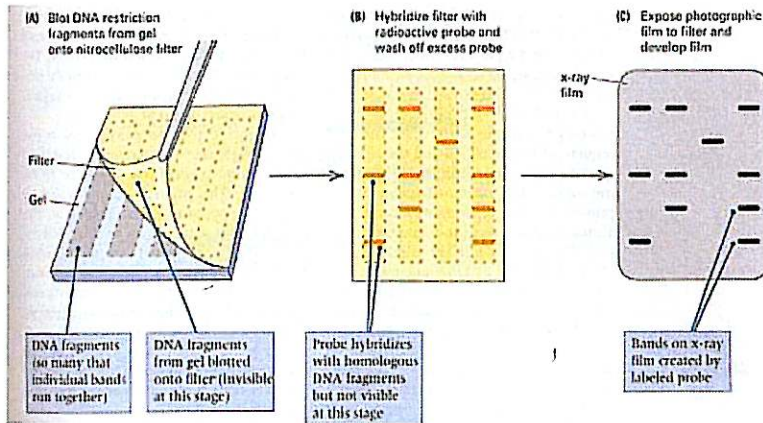


Fig. 18

Ottimi risultati sono prodotti per i saggi di clonalità IgH, IgK e TCR β (perché quasi tutte le cellule T ospitano tali geni funzionalmente riarrangiati, come evidenziato a livello proteico), che hanno un repertorio combinatoriale esteso, così come una struttura genica relativamente semplice valutabile solo con 1 o 2 sonde di DNA. I geni IgL e TCR α sono più complessi e richiedono set multipli di sonde. I geni TCR γ e TCR δ , invece, hanno un repertorio combinatoriale limitato, che è meno ottimale per discriminare tra monoclonalità e policlonalità per SB (Bernasconi P., 2003).

A differenza delle analisi degli iso-enzimi, cariotipiche, degli idiotipi Ig e dei riarrangiamenti genici, che suggeriscono l'origine della leucemia dall'espansione clonale di una singola cellula emopoietica trasformata, l'analisi SB ha mostrato che più del 25% di LLA contengono più di 2 riarrangiamenti IgH e che tali *pattern* possono cambiare nel corso della malattia (Davi F *et al.*, 1996). Sebbene questo saggio può rilevare la clonalità nella gran parte di malattie linfoproliferative T e linfomi, i molti *drawbacks* che la caratterizzano, come bassa sensibilità del 5-10%, necessità di grandi quantità di campione da testare (10-20 μ g) di buona qualità, l'uso di sonde radiattivamente marcate, il *time consuming* e il *labor intensive*, la escludono come mezzo diagnostico generale.

1.9.1.2 Analisi di *Polymerase Chian Reaction* (PCR).

A causa dei diversi *drawbacks* del SB, le tecniche PCR, introdotte nel 1985 da Mullis, sono state ampiamente valutate, perché permettono di ottenere, partendo da scarse quantità di DNA o RNA da campioni di PB, MB e tessuti paraffinati, l'identificazione e/o la tipizzazione di un campione in studio rispondendo ai requisiti di specificità, sensibilità di 10^4 - 10^6 , riproducibilità, rapidità, semplicità e basso costo, richiesti per qualsiasi protocollo che voglia essere effettivamente buono (Mullis & Falona, 1987). In campo oncoematologico sono applicate all'amplificazione specifica di un DNA chimerico, prodotto dalla fusione di parte dei geni coinvolti nelle più comuni traslocazioni cromosomiche leucemia-specifiche e delle regioni giunzionali clone-specifiche dei riarrangiamenti Ig e TCR (Pongers-Willemsse MJ et al., 1999). Per questo richiedono precise conoscenze dei segmenti genici riarrangiati allo scopo di disegnare *primer* appropriati ai siti ad essi complementari nelle regioni giunzionali e alle regioni di fusione dei *breakpoint*, rispettivamente. Nel 1999, pertanto, la metodica per la detenzione della clonalità dei geni Ig/TCR è stata standardizzata dal gruppo di lavoro europeo BIOMED-1 sulla base dei diversi principi propri della selezione clonale del sistema immunitario, in particolare (Trainor KJ et al., 1990): durante il differenziamento dei linfociti le regioni VDJC ricombinano in un segmento relativamente breve di circa 400bp, per cui è preferibile usare 2 *primer* distanti tra loro 500kp-1-Kb per i campioni di PB e MB e *primer* distanti meno di 300bp per i tessuti fissati in formalina; all'interno di VDJ ci sono sequenze sufficientemente conservate, quali le FR delle IgH-V, e parte di DJ, da poter costruire i *primer consensus*; i geni Dh-Jh non sono intaccati dalle mutazioni somatiche. Le analisi PCR producono, quindi, risultati correlati al tipo di cellule in analisi: una popolazione di cellule non linfoidi o linfociti T con i geni Ig germinali non mostrerà amplificazione del frammento di DNA Ig, perché le regioni VJ sono troppo lontane; invece, una popolazione di linfociti B mostrerà amplificazione del DNA, poiché il gene Ig è riarrangiato. La monoclonalità dei linfociti, in elettroforesi, è visualizzata da una banda discreta di DNA amplificato da frammenti con lunghezza omogenea, mentre la policlonalità è visualizzata da banda ampia o *smear* per amplificazione di frammenti di DNA di lunghezza eterogenea.

Ottimi risultati sono ottenuti per l'analisi dei riarrangiamenti IgH e TCR $\gamma\delta$, perché necessitano di un limitato numero di *primer*. Una delle strategie più usate per la rilevazione dei riarrangiamento clonali delle IgH è l'amplificazione della regione CD3-FR3 (JH) con i *primer consensus*; un'altra usa una miscela di *primer* specifici per la famiglia FR1, o per la regione FR2, o diretti contro la regione leader 5' dei segmenti Vh (Aubin J et al., 1995), sulle quali è possibile disegnare *primer* con alta specificità e sensibilità per i tessuti linfoidi, ematopoietici ed extranodali, come la pelle. Per TCR $\gamma\delta$, vari saggi sono stati disegnati, perché riarrangiati anche nelle cellule T $\alpha\beta^+$, essendo marcatori precoci e informativi nelle leucemie T e *target* ideali della PCR a causa del loro limitato repertorio di geni V, l'estesa

diversità giunzionale ed uso non causale dei segmenti V, che richiede l'uso di pochi *primer* specifici per VJ, rilevando l'80% dei possibili riarrangiamenti con la singola coppia di *primer* V γ 1-J γ 1/2 (Bottaro M *et al.*, 1994) e applicabili su estrazioni di DNA da tessuti fissati in formalina, sebbene presenti una sensibilità di 10-50% di linfomi T non rilevati. Ciò non può essere ovviato utilizzando come *target* PCR il *locus* del TCR β , perché, avendo 65V β e 13J β , richiede l'uso di molti *primer consensus* anche in strategie *multiplex-PCR* (Assaf C *et al.*, 2000). Per evitare questo problema, è possibile amplificare mRNA dei riarrangiamenti TCR β , sebbene tale approccio sia limitato dalla possibilità di campioni freschi e non sia applicabile alle specie tissutali fissate in formalina. Sebbene le metodiche PCR presentino i vantaggi di velocità, richiesta di bassa quantità di DNA, anche di bassa qualità permettendo l'uso di piccole biopsie o di tessuti paraffinati, relativamente buona sensibilità del 1-5% (meno dell'1% per alcuni riarrangiamento), presentano 2 *drawback* nello studio della clonalità: 1) generano risultati falsi-positivi, per il *background* da amplificazione dei geni riarrangiati in linfociti policlonali e reattivi; 2) generano risultati falsi-negativi, quando i riarrangiamenti coinvolgenti particolari segmenti V che non sono omologhi ai *primer consensus* usati. Quest'ultimo può essere disegnata una strategia con più *target* di amplificazione PCR.

1.9.1.3 Analisi post-PCR.

I metodi che sono stati applicati per risolvere risultati falsi-positivi derivanti dall'amplificazione *background* di riarrangiamenti simili presenti nei linfociti B/T reattivi e/o nelle cellule normali della popolazione in studio includono:

- sequenziamento diretto dei prodotti PCR, sostituibile con la PCR o con la RQ-PCR;
- analisi l'analisi dei polimorfismi conformazionali a singolo filamento (SSCP), che è abile a rilevare doppi ma non singoli cambi di nucleotidi (Bardwell PD *et al.*, 2002);
- elettroforesi su gel con gradiente denaturante (DGGE) o con gradiente di temperatura (TGGE) o con costante denaturazione (CDGE);
- Gene Scanning (GA), che in base alla migrazione differenziata di molecole elettricamente cariche all'interno di un gel ad alta risoluzione, o polimeri, in un campo elettrico separa i prodotti PCR ssDNA per lunghezza visualizzandoli in un cromatogramma come singolo picco (prodotti monoclonali) e più picchi vicini in una curva Gaussiana (prodotti policlonali) I risultati sono più facili da interpretazione di quelli TGGE e DGGE, la tecnica è sensibile con un tasso di detenzione di 0.5-1% più alto dell'HD, sicura per l'operatore usando sonde coniugate a fluorocromi, può essere automatizzata e monitorare la MRD durante i *follow-up* dei pazienti (Dippel E *et al.*, 1999), ma necessita di un equipaggiamento costoso (Garcia-Sanz R *et al.*, 1999).
- analisi heteroduplex (HA).

Tutte queste sono, però, *time consuming e labor intensive* (Bernasconi P., 2003).

1.9.1.3.1 Analisi *heteroduplex* (HD).

Per determinare il carattere omogeneo o eterogeneo, i prodotti PCR sono analizzati per analisi *Heteroduplex* (HD), nata per lo *screening* di mutazione nelle malattie genetiche (Garcia-Sanz R *et al.*, 1999). I prodotti PCR da popolazioni di cellule linfoide monoclonali e policlonali sono denaturati ad alta temperatura e successivamente rinaturati in *homo-* ed *heteroduplex* e discriminati in base alla lunghezza e composizione delle regioni giunzionali. I prodotti PCR con identiche regioni giunzionali formano gli *homoduplex*, mentre prodotti PCR con regioni giunzionali eterogenee producono gli *heteroduplex* (fig. 20), visualizzati su gel di sequenza come bande discrete o *smear*, rispettivamente.

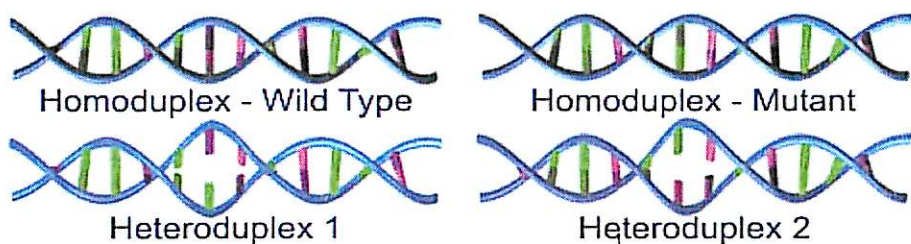


Fig. 19

Nonostante il consumo di parte del prodotto PCR durante la formazione degli *heteroduplex*, la tecnica è rapida, semplice ed economica, utile per l'analisi dei *loci* con ristretta diversità giunzionale, con limite di detenzione di 5%, dipendente dalla frequenza dei linfociti policlonali nel campione e, perciò, può essere utilizzata per analisi diagnostiche, non richiedendo costosi equipaggiamenti (Sandberg Y *et al.*, 2003 e Langerak AW *et al.*, 1997).

1.9.2 La Cromatografia ad elevata pressione in condizioni denaturanti (DHPLC).

La Cromatografia ad Elevata Pressione in condizioni Denaturanti (DHPLC) è una tecnica messa a punto per la rilevazione di mutazioni (SNPs, inserzioni, delezioni e *tandem repeat*) in frammenti di DNA di 100-170bp con una sensibilità pari al 95-97%. Può essere utilizzata anche per la separazione di frammenti di DNA tagliati con enzimi di restrizione e per purificare i prodotti provenienti dalla PCR, per la purificazione di proteine e peptidi, per la separazione dei frammenti di DNA sulla base delle dimensioni al fine di valutare la qualità e la purezza del prodotto amplificato, come nel presente studio.

La tecnica si basa sulla differente velocità di migrazione di *heteroduplex* e *homoduplex*, formati quando frammenti amplificati di DNA mutato e non mutato presenti nella stessa reazione sono denaturati termicamente e

lasciati ibridare, in modo da combinare due catene di DNA a singolo filamento (ssDNA) non perfettamente corrispondenti, con conseguente. Questa non perfetta corrispondenza forma una "bolla" di denaturazione che contiene la mutazione (Xiao & Oefner, 2001), come in figura 20. Proprio questa bolla costituisce la chiave di volta del sistema DHPLC. I frammenti di DNA, infatti, corrono nella colonna a temperatura di parziale denaturazione, in modo che gli *heteroduplex* abbiano una porzione maggiore di singola elica nella zona di non appaiamento perfetto rispetto agli *homoduplex*. Tali bolle, inoltre, hanno una minore densità di gruppi fosfato ed una minore densità di carica rispetto al doppio filamento. Questa caratteristica permette la separazione delle bolle degli *heteroduplex* da quelle degli *homoduplex*, alla stessa temperatura, perché l'*homoduplex* presenta ancora lo stato di doppio filamento (dsDNA), mentre l'*heteroduplex* quello di parziale ssDNA in corrispondenza del sito di missappaiamento. Tale temperatura è detta di "quasi-denaturazione" (Xiao & Oefner, 2001), e definita come la temperatura alla quale i prodotti derivanti da amplificazione non specifica non mostrano picco di eluizione sul cromatogramma DHPLC. La tecnica consente di caratterizzare, quindi, differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e steriche dimensionali e strutturali.

Il DHPLC impiega il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (RP-IP), che separa le molecole e le eluisce sulla base della dimensione crescente delle molecole stesse. Questa tecnica utilizza un sistema HPLC completamente inerte, privo di elementi metallici a contatto col circuito idraulico e cromatografico, per evitare il rilascio e l'accumulo di ioni Fe nella colonna, costituita da una matrice micropellicolare ad alta risoluzione, ed un sistema di controllo della temperatura particolarmente preciso dove colonna, tamponi e campione sono termostatati alla stessa temperatura (Xiao & Oefner, 2001). Il principio su cui si fonda è la differente interazione che le molecole da separare, sotto la modulazione chimica e meccanica dei tamponi TEAA, mostrano nei confronti del materiale cromatografico. Il risultato è l'eluizione delle molecole secondo un ordine stabilito in funzione della qualità e quantità di interazioni: la molecola caratterizzata dal minor numero di interazioni con la fase stazionaria è eluita più velocemente per la presenza della "bolla" e, quindi, con temperature minore rispetto all'*homoduplex*, come in figura 20.

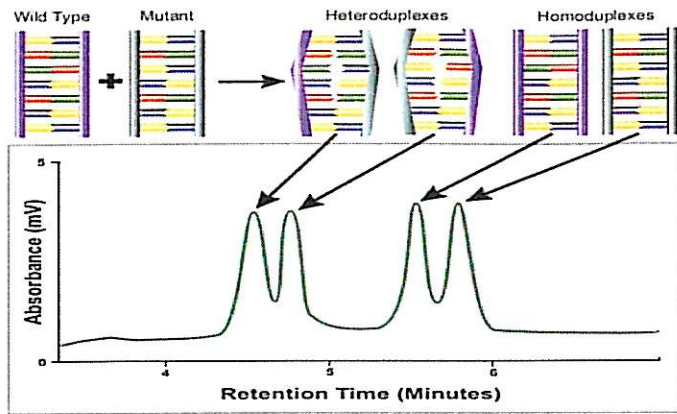


Fig. 20

Il DHPLC è stato usato da zur Stadt U *et al.* (2001) per discriminare i riarrangiamenti TCR γ monoclonali, policlonali e oligoclonali nei campioni di PB o MB di bambini affetti da LLA nuovamente diagnosticata con corse brevi (3-5min/campione) risolventi le differenze tra le diverse regioni N e P (regioni di nucleotidi palindromi generate per la giustapposizione di nucleotidi di un segmento genico non riarrangiato e non ordinato), che si originano al momento del riarrangiamento dei segmenti genici VDJ in ogni campione analizzato (zur Stadt U *et al.*, 2001) e ottenendo che: campioni policlonali con molte variazioni di sequenza delle regioni giunzionali hanno eluito alle condizioni di parziale denaturazione in picchi *heteroduplex* e mai in singolo picco clonale, prodotto, invece, dai frammenti PCR clonali con una sola sequenza altamente dominante. Sebbene richieda costose spese per l'apparecchiatura iniziale, il metodo ha il vantaggio di essere automatizzato, rapido (5-10min/campione), poco laborioso e facile da interpretare e applicabile per lo studio dell'ipermutazione somatica delle IgH-V, rilevandone circa il 90% delle regioni V mutate precedentemente sequenziate (Bardwell PD *et al.*, 2002).

Scopo tesi

La presente tesi di dottorato si inquadra nell'ambito delle leucemie linfatiche. Le indagini, rivolte all'attualità alla caratterizzazione molecolare di campioni con leucemia linfatica cronica e acuta e con ipereosinofilia variante linfocitaria, prevedono nella loro fase applicativa l'utilizzo di semplificate biotecnologie risultate idonee per le analisi di *routine* dei riarrangiamenti clonali dei geni IgH/TCR nella diagnosi precoce di leucemia in tutti i casi in cui prove cliniche, istologiche ed immunologiche sono consistenti ma non del tutto tipiche di una linfoproliferazione maligna. La capacità di una metodica ad individuare cloni leucemici quando la carica tumorale è bassa dipende non solo dalla specificità e sensibilità della tecnica stessa, ma anche dalla sua robustezza. Nel caso, poi, dello studio dei riarrangiamenti clonali dei geni IgH/TCR la loro rilevazione indipendente dalla linea linfocitaria implicata nel processo leucemogenico dei campioni in studio ha permesso di comprendere che nelle fasi precoci del differenziamento linfocitario i *loci* B/T sono ugualmente accessibili al complesso enzimatico della ricombinasi e che il processo leucemogenico è un processo dinamico che porta al continuo riassortimento del repertorio linfocitario clonale attraverso meccanismi di sostituzione dei segmenti di variabilità V e neoformazione di regioni N tramite i meccanismi "*open and shut*", mutazioni somatiche nei segmenti V e differenziazione di subcloni diversi.

Per questo la nostra attenzione è stata rivolta ai riarrangiamenti clonali sia in LLA che in LLC ma soprattutto in HES-LV con sistemi PCR e DHPLC, poiché offrono vantaggi sostanziali rispetto alle tecniche SB, HD e GS finora utilizzate, quali:

1. sicurezza per l'operatore, non prevedendo l'uso di sonde radioattive;
2. velocità procedurale, non prevedendo l'uso di ulteriori passaggi *post-PCR* come PCR *nested* o preparazioni di gel di sequenza o marcatura dei prodotti PCR con fluorocromi, riducendo anche il rischio di contaminazioni;
3. facilità di interpretazione del risultato di clonalità che è dato in tempi rapidi (48h al massimo) e in maniera standardizzata;
4. automatizzazione della metodica con minimi costi (1 euro per campioni).

Una migliore comprensione delle potenzialità espresse da una metodica biotecnologica è anche alla base di ogni programma d'individuazione di nuovi *target* diagnostici sia per patologie onco-ematologiche che no.

Un successo in tal senso è stato ottenuto da molti autori per la rilevazione tramite DHPLC come l'identificazione di mutazioni nel dominio Abelson (ABL) dell'mRNA per la proteina oncogenica BCR-ABL prodotta dalla traslocazione bilanciata t(9;22) nelle leucemie mieloidi croniche (LMC) nei campioni con fenotipo di resistenza ai farmaci tirosin-inibitori (STI571).

Sebbene uno studio sulla clonalità linfocitaria non implichi necessariamente deduzioni cliniche, come nel caso di questa tesi, anche la clinica può ricevere contributi significativi dall'esame di "gruppi numerosi di pazienti

analizzati indipendentemente dalla diagnosi", dato che molte implicazioni dei linfociti nel decorso delle diverse malattie non sono ancora chiare. I caratteri valutati sono stati, soprattutto, la capacità di rilevare e discriminare linfociti mono-, oligo- e policlonali nelle diverse patologie linfatiche.

Il nostro lavoro, dunque, potrà portare alla costruzione di un modello di indagine esportabile per la diagnosi di altre patologie diverse da quelle onco-ematologiche, grazie anche all'uso delle nuove tecnologie e di procedure sempre più specifiche ed attendibili, ma, nello stesso tempo, sufficientemente semplici e rapide da poter essere applicate ad un gran numero di campioni.

2 Materiali e Metodi

2.1 Scelta dei campioni

Sono stati testati 246 campioni da prelievi di sangue periferico (PB), da agoaspirati di midollo osseo (MB) e da tessuti bioptici, scelti tra quelli raccolti, dopo consenso informato del paziente, tra il 1997 e il 2006, in base alla diagnosi clinica. Per alcuni campioni sono testati anche i campioni da *follow-up* e le eventuali ricadute della malattia. I campioni scelti sono stati così raggruppati (tabella I): 34 da pazienti con sospetta Leucemia Linfatica Acuta (LLA), 48 con Leucemia Linfatica Cronica (LLC), 44 con Sindrome Linfoproliferativa (SLP), 39 con linfoma (LNH), 9 con Malattie Immunoproliferative (MIP), 2 campioni da paziente con Leucemia Plasmacellulare (LPC), 1 con Policitemia Vera (PV), 1 con Leucemia delle Cellule Capellute (HCL), 1 con Sindrome Mielodisplastica (SMD), 1 con Pancitopenia, 2 campioni da paziente affetto da Neutropenia e 5 campioni con Leucemia dei Grandi Linfociti (LGL).

Come controlli positivi sono stati usati:

1. le linee cellulari:

- Jurkat, stabilizzata da sangue periferico (PB) di un ragazzo di 14 anni in prima ricaduta di leucemia delle cellule T nel 1976 da Scheider U *et al.* (1977).
- Reh, stabilizzata da PB di una ragazza Nord-Africana di 15 anni con leucemia linfatica acuta (LLA B) in prima ricaduta di leucemia delle cellule B nel 1973 da Rosenfeld C *et al.* (1977) e Matsuo Y e HG Drexler (1998).
- Karpas 299, stabilizzata da PB di un uomo di 25 anni con linfoma non Hodgkin delle cellule T nel 1986 da Fiche P *et al.* (1988) e riclassificata da Mason DY *et al.* (1990) e da Drexler HG e RA MacLeod (2004).

2. i campioni CPA1 e CPA2 (Linfoma T e B, rispettivamente) dell'Amplimedical.

Come controlli negativi sono stati usati:

1. la linea cellulare EOL1, stabilizzata nel 1984 dal PB di un uomo di 33 anni con leucemia mieloide (LMA) eosinofila acuta alla diagnosi e successiva Sindrome ipereosinofila (HES) da Saito H *et al.* (1985), Mayumi M (1992), Quentmeier H *et al.* (2003) e Cools J *et al.* (2004),
2. i campioni:
 - CNA, un campione policlonale dell'Amplimedical Bioscience,
 - i campioni PNL1 a PNL5 da popolazioni policlonali di linfociti da PB di donatori con patologie non legate a malignità ematologiche e definiti pazienti non leucemici;
 - 48 campioni da pazienti affetti da sospetta Sindrome Ipereosinofila (HES) e/o Leucemia Mieloide Cronica (LMC);
 - Placenta;

- Pool costituito dall'unione di 10 campioni di PB da donatori non leucemici.

Alcuni dei campioni usati nell'analisi e le loro caratteristiche sono stati raccolti nella tabella in appendice 5.

2.2 Isolamento delle cellule mononucleate ed estrazione del DNA genomico.

Le cellule di campioni di sangue midollare o periferico, in provette contenenti EDTA o ACD come anticoagulante, sono state isolate con le seguenti due tecniche alternative: l'isolamento della frazione di cellule mononucleate per i campioni di MB per stratificazione delle cellule su *Ficoll-Hypaque* (densità 1.077g/ml; Pharmacia Biotech) e Isolamento dell'intera frazione di cellule nucleate per i campioni di PB, secondo le indicazioni dei produttori (Pharmacia Biotech e Quiagen). La concentrazione delle cellule mononucleate ottenute è stata determinata per conta al citofluorimetro Necton Dickinson e/o con camera di Burkner, come indicato dai produttori, così da poter avere aliquote di cellule con concentrazione di almeno $35 \cdot 10^6$ cellule/ml per l'estrazione del DNA genomico integro da sottoporre alle successive analisi di *Southern Blot* (SB) e di amplificazione *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dei geni IgH e TCR. Questa è stata eseguita con il *Nucleon Bacc2 Kit* (Amersham Biosciences), secondo le indicazioni del produttore e con l'estrazione Fenolo-Cloroformio, seguendo il protocollo (Sambrook IE *et al.*, 1989).

La concentrazione dei DNA estratti è stata determinata con lo spettrofotometro (*Pharmacia*) eseguendo letture alla lunghezza d'onda di 260 nanometri (nm). La purezza dell'estrazione è stata controllata calcolando il rapporto (R) tra le letture a 260nm e 280nm, lunghezza alla quale è rilevata la presenza di proteine nel campione. L'integrità del DNA estratto e la concentrazione approssimativa dei campioni estratti sono state verificate tramite corsa elettroforetica. Solo i campioni con valori di R ottimali, compresi 1.6-2.0 sono stati utilizzati per le successive analisi.

2.3 Southern Blot Analysis

Poiché durante i riarrangiamenti dei geni delle Ig e TCR alcuni segmenti di DNA sono deleti, con conseguente rilocalizzazione di altri segmenti, le variazioni nella distanza tra i siti di taglio specifici delle endonucleasi di restrizione (ER) possono essere valutate mediante analisi *Southern Blot* (SB), che permettono la localizzazione delle sequenze del DNA genomico delimitate da specifici siti di restrizione studiandone dimensioni e integrità attraverso una serie di procedure, quali: digestione con ER, flottaggio dei frammenti di DNA dal gel alla membrana, preparazione e purificazione delle sonde, marcatura delle sonde, ibridazione della membrana con le sonde marcate e visualizzazione dei prodotti ibridati dopo lavaggio della membrana.

2.3.1 Digestione con enzimi di restrizione e corsa elettroforetica

Nella prima fase i DNA dei campioni da analizzare è stato trattato con uno o più ER, come indicato in tabella:

Indagine	Sonda Adoperata	E.R.
Riarrangiamento clonale della catena pesante delle immunoglobuline (IgH), per la diagnosi di malattie linfoproliferative della serie B;	JH Porzione 3' regione Joining	BglII + HindIII + Eco RI
Riarrangiamento clonale della catena beta del recettore dei linfociti T (TCR β), per la diagnosi di malattie linfoproliferative della serie T;	β TCR cDNA per gli esoni C β 2	HindIII + Eco RI + BamHI

Le ER sono enzimi idrolitici di origine batterica capaci di tagliare il legame fosfodiesterico in punti specifici del DNA a doppio filamento (dsDNA), in determinate sequenze di basi specifiche (*target*) nel genoma, che sono diverse ed uniche per ciascun enzima e sono i palindromi di 4-6-8bp, cioè sono sequenze di basi a simmetria binaria lette in direzione 5'→3' su entrambe le eliche del DNA. L'uso di tali enzimi permette di frammentare il DNA genomico con precisione ed in modo assolutamente riproducibile, ottenendo tagli ricorrenti 1 volta ogni centinaia di basi. Parallelamente, è stato digerito il DNA estratto da tessuto non ematopoietico, quale la placenta, così da valutare per comparazione i risultati della autoradiografia (controllo qualità). La procedura utilizzata per la digestione è stata eseguita secondo le condizioni di reazione indicate dal produttore:

Buffer specifico 10X	5 μ l
BSA (diluita 1:4)	2 μ l
DNA	15ng
Enzima (75U)	8-4 μ l
H ₂ O millipor autoclavata	Quanto basta a 50 μ l

E.R.	Produttore	Buffer consigliato	BSA
BglII	Biolabs	Buffer 3	No
Hind III	Biolabs	Buffer 2	No
Bam HI	Biolabs	Buffer x Bam HI	Si
Eco RI	Biolabs	Buffer x Eco RI	No

La quantità di DNA da utilizzare in reazione è stata stabilita in base alla proporzione del genoma complementare alla sonda, alla grandezza della sonda (maggiore 500bp), all'attività specifica della sonda e alla quantità di DNA genomico trasferito alla membrana.

Dopo mescolamento su *vortex* per alcuni secondi, la soluzione di restrizione è stata incubata in un bagnetto termoriscaldato a 37°C ON e, quindi,

bloccata aggiungendo 6 μ l di DYE ed incubando a 70°C per 10min, così da rompere gli appaiamenti di basi tra estremità coesive. 20 μ l di ciascuna soluzione sono stati separati in base alla grandezza dei frammenti ottenuti su gel d'agarosio 0.8% in TAE1X corsi in modo standardizzato per ON a 80V e applicando all'apparecchiatura elettroforetica una pompa peristaltica allo scopo di mantenere omogenea la concentrazione degli ioni nel tampone di corsa, i quali tendono a migrare secondo il senso della corrente elettrica applicata. La corsa è stata effettuata caricando anche 3 μ l di DYE a 3 μ l di DNA del batteriofago *Lambda* digerito con l'ER *HindIII* (DNA λ *HindIII*, 500ng/ μ l – bande di 1-15Kb) e marcato con il deossinucleotide radioattivo [α ³²dAMP] (Amersham) come SM tramite marcatura terminale, incubando per 30min a 37°C la seguente soluzione:

Lambda/HindIII	2.5 μ l
α ³² [AMP] (10*10 ⁶ /ml)	1 μ l
Buffer M	2 μ l
Klenow (1U/ml)	1 μ l
H ₂ O millipor autoclavata	13.5 μ l

La radioattività della marcatura del SM pari a 500.000cpm è stata valutata al β -counter dopo centrifugazione (BHG HERMLE Z231M) a 1000rpm per 3min. Una volta terminata la corsa, il gel è stato colorato immergendolo per 10-20min in una soluzione di EtBr (50 μ l/l) e visualizzato al transilluminatore UV in modo da verificare che la quantità di DNA digerita fosse stata uniforme e che la digestione sia stata completa.

2.3.2 Blotting

In tale fase i frammenti separati sul gel sono stati trasferiti e fissati su una membrana di *nylon* con alta stringenza meccanica, legando il DNA tramite interazioni idrofobiche e irreversibili, e con alta resistenza chimica, permettendo il riutilizzo per ibridazioni del filtro per l'analisi dei frammenti legati con più sonde. Tra i tre metodi possibili per il trasferimento del DNA, trasferimento elettroforetico, t. per capillarità e t. sotto vuoto, è stato utilizzato il secondo, perché ha un tasso di trasferimento di DNA proporzionale alla grandezza del frammento e alla concentrazione di agarosio del gel. Per rendere i frammenti separati a singolo filamento (ssDNA), necessaria per la successiva ibridazione, il gel è stato immerso per 40min totali in costante agitazione in una soluzione alcalina denaturante costituita da:

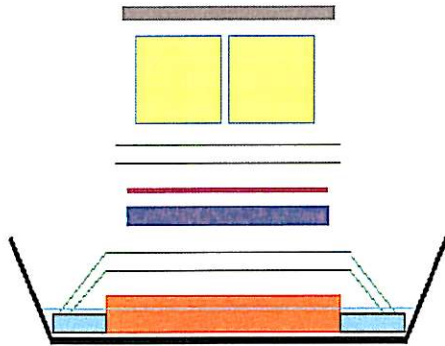
NaOH 0.5M	20g
NaCl 1.5M	87.66g
H ₂ O	2000ml

e per altri 20min in una soluzione neutralizzante contenente:

TRIS base 1M	121.14g
--------------	---------

NaCl 1.5M	87.66g
H ₂ O	600ml
pH 7.4	

Dopodiché, è stato equilibrato per immersione per 10min nella soluzione SSC 10X (150mmol/l Citrato di sodio tribasico, 1.5mol/l NaCl, pH 7.0) e posto ON o *over week end* (OW) nella camera di blottaggio allestita:



- lastra di vetro per generare e mantenere il flusso capillare del tampone attraverso il gel;
- strato di carta assorbente;
- strato di carta Watthmann 3MM equilibrato in SSC 10X;
- membrana di *nylon* Hybond+ (Amersham) equilibrata in SSC 10X;
- gel equilibrato in SSC 10X;
- ponte salino carta Watthmann 3MM pescante il tampone SSC.

Una volta *blottato*, il gel è stato immerso per 10min in una soluzione di EtBr diluiti (5 μ L/100mL H₂O) per controllare al transilluminatore UV l'avvenuto trasferimento; la membrana, invece, è stata lavata per 10min in SSC 10X, asciugata a temperatura ambiente e fissata in stufa a secco a 80°C sotto vuoto per 120min.

2.3.3 Preparazione delle sonde utilizzate tramite amplificazione e clonaggio.

In tale fase sono state amplificate tramite clonaggio le sonde da utilizzare secondo la seguente procedura. Per ottenere la sonda Jh è stata amplificata per PCR la regione 3' dei segmenti di *Joining* (J) della placenta, grazie all'uso di *primer* sequenza-specifici chiamati Jh6F/Jh6R e disegnati dalla sequenza del gene Jh6, come indicato da van Dongen JJM and IJM Wolvers-Tettero, (1991), in modo da avere una temperatura di fusione (*melting*, T_m) di 70°C e 94°C, rispettivamente, e le sequenze:

Jh6F: 5'GGT AAG AAT TCC CAC TCT AGG GCC TT 3'

Jh6R: 5'ACA CAA GCT TCC TAA AAT AGA CTC TCG CGG TG 3'

Per ottenere la sonda β TCR è stato amplificato per PCR il cDNA del frammento contenente gli esoni C β 2 del gene TCR da un pool di pazienti non leucemici, grazie all'uso di *primer* sequenza-specifici chiamati TCRF/TCRR e disegnati dalla sequenza dell'mRNA codificante la regione costante C del TCR, come indicato da van Dongen JJM and IJM Wolvers-Tettero, (1991), in modo da avere una T_m di 52°C e 46°C rispettivamente e sequenze:

TCRF: 5'TGA CCG GCA GCA AAA TG 3'

TCRR: 5'AAC AGC TAT GAC CAT G 3'.

I prodotti di amplificazione, un frammento di 0.9Kb e uno di 1.1Kb,

rispettivamente, sono stati ottenuti tramite l'uso di una miscela di 50 μ l contenente:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templatato	50ng	2 μ l
Buffer-PCR (10x) (Applied Biosystem)	1X	5 μ l
MgCl ₂ (25mM) (Applied Biosystem)	2.5mM	3 μ l
Mix dNTP (100 μ M) (Invitrogen)	2.5 μ M (each)	4 μ l
Primer Fw	10 μ M	1 μ l
Primer Rv	10 μ M	1 μ l
<i>Taq Gold</i> -polimerasi (5U/ μ l) (Applied biosystem)	0.5U/100 μ l	0.5 μ l
H ₂ O distillata sterile		33.5 μ l

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (2400/9700) al controllo rapido della temperatura, con un programma *hot-start* e profilo termico di:

denaturazione a 95°C per 10min così da attivare la polimerasi e 30 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente: 95°C per 1min,
56°C per 1min,
72°C per 1min.

50 μ l del prodotto di PCR e 6 μ l di DYE sono stati controllati su gel all'1% d'agarosio in TBE1X corsi a 100V, per poi essere purificato da gel come previsto dal *kit Qiagen Gel Extraction* (Qiagen). Una volta terminata la purificazione, 2 μ l di purificato sono stati controllati come descritto in precedenza insieme 4 μ l di SM IX, indicante sia il peso del DNA purificato sia l'esatta quantizzazione. Le aliquote da 50ng ciascuna conservate a -80°C fino al momento dell'analisi.

Per poter avere una quantità maggiore di sonda amplificata è stato realizzato il clonaggio, trasformando cellule competenti di *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante *shock* termico con un vettore plasmidico contenente il frammento PCR "Jh6" o "TCR" purificato.

I cloni ricombinanti sono stati opportunamente selezionati e i vettori plasmidici sono stati eliminati dal frammento di interesse.

2.3.4 Preparazione e purificazione dell'inserto-"Jh6/TCR β ".

Per entrambe le sonde, i prodotti dell'amplificazione rispettivamente ottenuti sono stati purificati dal gel di agarosio mediante il *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), che, solubilizzato l'agarosio, permette il passaggio selettivo degli acidi nucleici attraverso la membrana di colonnine cromatografiche, quando è applicata una forza centrifuga come descritto dal produttore. La

resa della purificazione è stata controllata gel all'1% d'agarosio in TBE1X corsi a 120V caricando 5µl di purificato uniti a 5µl di DYE insieme a 4µl di SM IX e 4µl di DYE per permetterne la quantizzazione approssimativa.

2.3.5 Preparazione dei cloni ricombinanti.

Gli inserti purificati, indipendentemente, sono stati inseriti in un vettore di clonaggio plasmidico (pCRII-TOPO o pCR2.1-TOPO) del *kit TOPO-TA Cloning*, che è un vettore attivato, cioè è linearizzato che lega covalentemente la topoisomerasi I del *Vaccinia Virus* e una singola 3'-T *overhangs* per TA-cloning (appendice 6). Il frammento da inserire è legato alla 3'-T tramite la singola A aggiunta, per attività terminaltransferasica indipendente dal templatato, dalla *Taq* Polimerasi. La topoisomerasi lega il dsDNA al sito specifico e taglia lo scheletro fosfodiesterico dopo la sequenza 5'-CCCTT su un filamento. L'energia liberata dal taglio è utilizzata per il legame covalente tra il 3'-PO₄ del filamento tagliato e il residuo di tirosina 274 (Tyr 274) della topoisomerasi I. Tale legame è successivamente attaccato da un 5'idrossile dell'originale filamento tagliato con rilascio della topoisomerasi I. È stato possibile, in tal modo, clonare frammenti PCR con alta efficienza e bassa percentuale di falsi-positivi attraverso i seguenti *step*: ligazione e trasformazione.

La ligazione è effettuata incubando in ghiaccio, dopo gentile agitazione e incubazione a T amb per 4min, una soluzione contenente:

Inserto	6µl
Soluzione salina (200mM NaCl e 10mM MgCl ₂) per aumentare di 2-3 volte il numero di trasformanti	1µl
Vettore pCR2.1-TOPO (3.9Kb)	1µl

Le piastre Petri sono state preparate sciogliendo:

Ampicillina o Kanamicina (50µg/ml)	20µl
Xgal in dimetilformamide (40mg/ml)	20µl
IPTG in acqua (100mM)	70µl

La trasformazione è stata effettuata tramite *shock* termico secondo le indicazioni del produttore. Le cellule competenti di *E. coli*, fornite dal *kit*, sono state incubate in ghiaccio per 30min dopo aggiunta dei 6µl della soluzione di ligazione. Le stesse sono state incubate a 37°C per 30sec e immediatamente trasferite in ghiaccio, così da creare pori nella membrana citoplasmatica dei batteri per permettere l'ingresso del plasmide con il DNA d'interesse inserito. Dopo aggiunta di 250µl di *SOC Medium* (Appendice 6), le cellule sono state incubate a 37°C in agitazione per 1h. Il *pellet*, ottenuto per centrifugazione a 6000g per 6min, è stato sospeso in 100µl di LB (Luria-Bertani) *medium* (Appendice 6) e 100µl di soluzione con le cellule batteriche così trasformate sono state piastrate per spatolamento su substrato di LB *medium* agarizzato ed incubate ON a 37°C.

2.3.6 Selezione dei cloni.

I cloni positivi per la trasformazione sono stati selezionati sfruttando le proprietà dei geni marcatori selezionabili del plasmide codificanti rispettivamente per la resistenza all'ampicillina e per la metabolizzazione dell'Xgal: soltanto le cellule di *E. coli* contenenti almeno una copia del plasmide sono capaci di crescere su un mezzo selettivo contenente il suddetto antibiotico e soltanto quelle con fenotipo bianco/blu chiaro sono quelle con plasmide legato all'inserito. Questo perché il gene per la metabolizzazione dell'Xgal è stato distrutto dall'inserzione del frammento d'interesse. Di queste, 10 colonie sono state raccolte e inoculate in 3ml di LB *medium* addizionati di 30 μ l di ampicillina (1:100) ed incubate a 37°C con moderata agitazione per 16h, finché l'assorbanza del terreno non ha raggiunto il valore di densità ottica (OD) alla lettura spettrofotometrica di OD₆₀₀ = 0.5-0.7.

2.3.7 Estrazione plasmidica da MiniPrep.

La brodocoltura così ottenuta è stata utilizzata per l'estrazione plasmidica così da controllare i cloni che effettivamente hanno mantenuto il plasmide ricombinante seguendo le indicazioni del produttore della *Qiaprep Spin Miniprep kit* (Qiagen), basato sul metodo della lisi alcalina descritto da Birnboim HC & J Doly (1979). La procedura ha permesso di purificare 20 μ g di DNA plasmidico ad alto numero di copie partendo da 1.5ml di coltura ON in LB *medium* centrifugati a 6000g (10000rpm) per 5 min e seguendo le indicazioni del produttore. I plasmidi così estratti sono stati digeriti per poi essere controllati su gel all'1% d'agarosio in TBE1X corsi a 150V caricando 5 μ l di ciascun purificato con 5 μ l di DYE. La digestione è stata eseguita incubando per ON a 37°C la seguente miscela di reazione da 20 μ l:

Plasmide	10 μ l
Buffer <i>EcoRI</i>	1 μ l
<i>EcoRI</i>	2 μ l
H ₂ O sterile	7 μ l

2.3.8 Estrazione plasmidica da MaxiPrep.

1ml della brodocoltura è stato incubato a 37°C con moderata agitazione per 16h in 100ml di LB *medium* addizionato di 100 μ l di ampicillina (1:100). Per poterle utilizzare le sonde è stato necessario eliminare il vettore plasmidico e purificarle usando il *Qiaprep Spin Plasmid Purification Maxiprep kit* (Qiagen), che ha permesso di preparare fino a 500 μ g di plasmidi ad alto numero di copie, come indicato dal produttore. I plasmidi così estratti sono stati digeriti per poi essere controllati su gel all'1% d'agarosio in TBE1X corsi a 150V, caricando 100 μ l di ciascun purificato con 10 μ l di DYE, e purificati dal gel di agarosio mediante il su descritto protocollo *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). La digestione è stata eseguita incubando per ON a

37°C la seguente miscela di reazione da 100µl:

Plasmide	50µl
Buffer <i>EcoRI</i>	10µl
<i>EcoRI</i>	5µl
H ₂ O sterile	35µl

La brodocoltura non utilizzata per l'estrazione plasmidica è stata centrifugata a 6000g per 5min a 4°C e il *pellet* risospeso in soluzione di congelamento contenente:

LB <i>medium</i> autoclavato	850µl
Glicerolo sterile (15%)	150µl

vortexato e posto a -80°C immediatamente.

2.3.9 Marcatura delle sonde

Dopo averle quantizzate, le sonde sono state marcate con il deossiribonucleotide radioattivo [³²a]dCTP 3000Ci/mmol (10mCi/mL, Amersham), tramite la tecnica del "*Random Priming*" con il kit "*Ready-to-go*" (Pharmacia), che contiene nella miscela di reazione, pronta in forma anidra, il *buffer* di reazione, i dATP, dGTP, dTTP, esameri random e l'enzima *Klenow*, che assicura l'incorporazione di più del 70% di ³²P-dNTP nella sonda. Un'aliquota di sonda di DNA da 50ng (5µl/100µl) è stata diluita in acqua bidistillata fino ad un volume di 45µl ed incubata a 95°C per 10min nel DNA *Thermal Cycler* per denaturare la sonda, *spinnata*, e poi posta immediatamente in ghiaccio per 2min per impedire il riappaiamento dei suoi filamenti. La sonda denaturata è stata aggiunta al tubo contenente le bilie con la miscela di reazione insieme a 5µl di [³²a]dCTP, così da avere una quantità totale di [³²a]dCTP nella reazione di *Random Priming* di 50µCi ed il tutto è stato incubato a 37°C per 1.5h. Al termine della reazione, è stata controllata l'efficienza della stessa contando (in cpm o dpm) l'attività totale (AT) della sonda con il *β-counter* 1µl di soluzione contenente la sonda marcata non purificata e purificata, rispettivamente.

2.3.10 Purificazione della sonda

Al termine della reazione di marcatura, la sonda è stata purificata mediante cromatografia ad esclusione molecolare, con colonnine centrifugazione a 2200rpm per 5min di una colonnina BIOSPIN 30 (BIO-RAD) equilibrate per centrifugazione (BHG HERMLE Z231M) a 2200rpm (1000g) per 3min. 1µl della sonda purificata è stato contato al *β-counter*, leggendo i valori dpm, per calcolarne l'attività specifica (AP, in dpm/µg) con la formula semplificata a:

$$AS = \frac{(110 \cdot 10^{10}) \cdot (F)}{50 + [(1300) \cdot (F) \cdot (0.01666)]} = \text{dpm}/\mu\text{g}$$

Dove: il numeratore è stato derivato moltiplicando tre fattori: le dpm totali della reazione (μCi^{10^6})*($2.2*10^6$), la frazione incorporata (F) e un fattore di conversione (10^3) da dpm/ng a dpm/ μg ; mentre il denominatore è stato derivato dalla massa totale di DNA in ng alla fine della reazione ricavata sommando la massa iniziale in ng (Di) con il DNA neosintetizzato (in nmol) e calcolato dal dCTP incorporato, con la formula $(F)(\mu\text{Ci}/S)$, e moltiplicando il peso molecolare medio di un dNTP*4 ($325*4=1300$).

Solo le sonde con valori di dpm maggiori di $1*10^6$ e sono state usate per la reazione di ibridazione previa denaturazione a 95°C per 10min e incubazione in ghiaccio per 2min almeno, per impedire il riappaiamento delle eliche.

2.3.11 Ibridazione della membrana di nylon blottata con la sonda radiomarcata.

Prima di procedere all'ibridazione vera e propria, la membrana è stata preibridata, nell'ibridatore a tamburi rotanti (Techne Hybridizer HB-1D), a 65°C per 2h, allo scopo di bloccare l'ibridazione della sonda complementare ai segmenti direttamente coinvolti nel riarrangiamento dei geni IgH e TCR β , ai siti non specifici della membrana, in presenza di 40ml di soluzione di pre-ibridazione riscaldata a 60°C e costituita da:

Acqua bidistillata	31ml
SSPE 20X	12.5ml
SDS 20%	2.5ml
Soluzione Denhard's 50X	2ml
Salmon-sperma (5mg/ml)	2.5ml (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

La soluzione *Denhard's* 50X (Denhard's , 1966) è stata preparata aggiungendo:

Acqua bidistillata	500ml
Ficoll Tipo 400	5g
BSA (Boehringer Mannheim)	5g
Polivinilpirrolidone	5g

mentre lo sperma di salmone (Sigma Tipo III NaSalt) è stato preparato facendo bollire 0.25g di DNA suddetto in 50ml di acqua bidistillata. Questo è stato frammentato meccanicamente per legarlo efficientemente ai siti aspecifici della membrana, tramite siringamento (ago da 22G) e denaturato a 95°C per 10min e incubati in ghiaccio per 2min, per impedirne il riappaiamento delle eliche.

Al termine delle 2h, la soluzione di preibridazione è stata sostituita con 40ml di soluzione di ibridazione contenente:

Costituenti	Quantità in reazione
Acqua bidistillata	31ml
SSPE 20X	12.5ml
SDS 20%	2.5ml
Soluzione Denhard's 50X	2ml
Sperma di Salmone (5mg/ml)	2.5ml

Sonda denaturata	50 μ l
------------------	------------

e la membrana è stata incubata per ON come segue:

SONDA	TEMPERATURA DI IBRIDAZIONE
JH	65°C
β TCR	65°C

2.3.12 Lavaggio della membrana ibridata.

Al termine della reazione di ibridazione, per allontanare la sonda non legata o ibridata a sequenze aspecifiche, senza perdere i frammenti di DNA trasferiti, sono stati eseguiti opportuni stringenti lavaggi della membrana, sostituendo la soluzione di ibridazione con 30ml delle seguenti soluzioni di lavaggio preriscaldate a 60°C:

SOLUZIONE LAVAGGIO	TEMPO DI INCUBAZIONE	TEMPERATURA DI LAVAGGIO
SSC 2X + SDS 0.1X (45ml)	5min	65°C
SSC 0.3X + SDS 1X (45ml)	20min	65°C
SSC 0.1X + SDS 1X (45ml)	10min	65°C
SSC 0.1X + SDS 1X (45ml)	a seconda del fondo di radiazione	65°C

Dopo il terzo lavaggio, la radioattività della membrana è stata valutata con un contatore *Geiger* paragonando la radioattività in corrispondenza delle bande del SM con quelle dei campioni analizzati.

2.3.13 Autoradiografia della membrana.

Per visualizzare la presenza e le dimensioni del frammento di DNA in studio una volta lavata, la membrana è stata esposta nella cassetta di esposizione del *PhosphorImager* (20*25cm) con di 1 schermo intensificante per l'autoradiografia lasciata per OW ad impressionare lo schermo a cristalli di fosforo. Questo è stato, quindi, inserito nello *scanner* del rivelatore computerizzato del *PhosphorImager* per rilevare la radioattività fissata al filtro utilizzando il *software QuantlyOne -GelDoc FC* (Biorad), seguendo le indicazioni del produttore. Il peso molecolare e l'intensità delle bande rivelabili sulle varie corsie dell'immagine autoradiografica, espressa come area delle bande in PDU, sono stati calcolati utilizzando il *software "Molecular Analyst"* e seguendo le istruzioni del produttore. Una volta stampata l'autoradiografia, lo schermo a cristalli di fosforo è stato pulito per esposizione a luce solare diretta per 30min sull'*PhosphorImager Eraser* ed i filtri sono stati conservati dopo decadimento della radioattività.

2.3.14 Deprobing

Quando necessario e possibile la membrana è stata riutilizzata come supporto per ulteriori ibridazioni dopo aver rimosso la sonda ibridata immergendola per 30min in moderata agitazione a temperatura ambiente, con il lato da ibridare verso l'alto, nella seguente soluzione:

Costituenti	Quantità in reazione
Acqua bidistillata	Q.b. a 1000ml
SSC 0.5X	12.5ml (20X)
SDS 0.1%	2.5ml (20%)

Una volta asciugato a T amb, il filtro è stato ibridato con l'opportuna sonda come prima descritto.

2.4 Allestimento reazioni PCR

2.4.1 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle catene gamma e delta del recettore delle cellule T (TCR $\gamma\delta$)

Per poter identificare la presenza di riarrangiamenti clonali delle cellule T è stata amplificata per PCR la regione genomica del complesso TCR $\gamma\delta$, grazie all'uso di *primer* segmento-specifici insieme con alcuni campioni non ematopoietici, quali la placenta, ed ematopoietici non interessati da leucemia linfatica ed usati come riferimento (appendici 3 e 4).

I *primer* sono stati disegnati, come indicato da Pongers-Willemse MJ *et al.* (1999), in un approccio *multiplex*, per esempio un *primer* a monte deve dare una robusta PCR con tutti i *primer* a valle e viceversa, ma le reazioni sono state eseguite in tubi separati e seguendo le linee guida sotto elencate:

- lunghezza dei *primer* compresa tra 18-25bp senza aggiunta di siti di restrizione;
- posizione dei *primer* ad almeno 50-75bp a monte o a valle delle sequenze segnale di ricombinazione (RSS) coinvolte;
- strutture secondarie non presenti, come dimeri di *primer* e forcine;
- temperature di *melting* (T_m) comprese tra 68°C±3°C;
- complementarità dei *primer* a tutti i segmenti genici VDJ frequentemente coinvolti nei riarrangiamenti dei geni TCR γ e TCR δ in LLA;
- *primer consensus* per la rilevazione di tutti i membri della famiglia V γ 1 del complesso TCR γ , allo scopo di ridurre il numero di reazioni PCR come indicato in tabella:

Primer per TCR δ	Sequenza 5'→3'	T _m °C
V1f	ACT CCA GGC CAG TCA TCA GTA TCC	74
V2f	ACC AAA CAG TGC CTG TGT CAA TAG G	74
V3f	GAC CAG ACG GTG GCG AGT GGC	72
D2f	CCA CAT TGG GAG TGT CAA CAT TT	66
D3r	CCC AAG GAA GAA CAG CAG TGA GT	70
J1r	ACC TCT TCC CAG GAG TCC TCC	68
Primer per TCR γ	Sequenza 5'→3'	T _m °C

V1f	CAG GCC GAC TGG GTC ATC TGC	70
V9f (VIIIf)	CAG CCC GCC TGG AAT GTG TGG	70
V10f (VIIIIf)	GAC ATA CCT TGC AAG ATA TCG AGC	70
V11f (VIIVf)	CTG AAA TAT CTA TTT CCA GAC CAG C	70
J1.1/2.1	TTA CCA GGT GAA GTT ACT ATG AGC	68
J1.3/2.3	CCG TAT ATG CAC AAA GCC AAA TC	66

I *primer* sono stati utilizzati in modo da eseguire le seguenti 16 reazioni PCR per ciascun campione:

Mix PCR TCR δ	Coppie di primer	Mix PCR TCR γ	Coppie di primer
1	V1-D3	9	VI-J1.1/2.1
2	V2-D3	10	V9-J1.1/2.1
3	V3-D3	11	V10-J1.1/2.1
4	D2-D3	12	V11-J1.1/2.1
5	V1-J1	13	VI-J1.3/2.3
6	V2-J1	14	V9-J1.3/2.3
7	V3-J1	15	V10-J-1.3/2.3
8	D2-J1	16	V11-J1.3/2.3

Almeno un controllo negativo ed uno positivo sono stati usati in ciascun esperimento e tutti i campioni sono stati analizzati almeno due volte in differenti occasioni.

I prodotti di amplificazione, frammenti di 318-558bp, sono stati ottenuti tramite l'uso di singole reazioni PCR da 50 μ l ciascuna contenenti:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templatato	50ng	4 μ l
Buffer-PCR 10X (Applied Bio system)	1X	5 μ l
MgCl ₂ (25mM) (Applied Bio system)	2.5mM	5 μ l
Mix dNTP (100nM) (Invitrogen)	10mM (each)	1 μ l
Primer F	6pmol/ μ l	1 μ l
Primer R	6pmol/ μ l	1 μ l
Ampli <i>Taq Gold</i> -polimerasi (Applied Biosystem)	1U/ μ l	0.2 μ l
H ₂ O distillata sterile		32.8 μ l

È stato preferito l'uso della *Taq Gold* polimerasi per eliminare prodotti PCR addizionali non voluti, i quali possono causare erronee detenzioni di clonalità come suggerito da Assaf C *et al.*, 2000.

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc, Watertown, MA, USA) al controllo rapido della temperatura, secondo il programma *hot start* con il seguente profilo termico caratterizzato da un ciclo di pre-PCR con: denaturazione a 94°C per 10min per attivare la polimerasi

annealing a 60°C per 1min
polimerizzazione a 72°C per 1min e 30sec,
e 35 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente i seguenti step:
denaturazione a 94°C per 30sec,
annealing a 60°C per 30sec,
polimerizzazione a 72°C per 1min e 30sec.

È stato eseguito, infine, un trattamento termico a 72°C per 6min per stabilizzare i dsDNA nuovamente formati.

25µl dell'amplificato e 6µl di DYE sono stati controllati su gel all'1,5% di agarosio in TBE1X a 120 V.

2.4.2 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici della catena pesante delle immunoglobuline (IgH)

Per poter identificare la presenza di riarrangiamenti clonali delle cellule B è stata amplificata per PCR la regione genomica del complesso IgH, grazie all'uso di *primer* famiglia-specifici insieme con alcuni campioni non ematopoietici, quali la placenta, ed ematopoietici non interessati da leucemia linfatica ed usati come riferimento (appendice 1).

I *primer* per i segmenti di diversità D sono stati disegnati, come indicato da Szczepanski T. *et al.* (1999), a partire dalla sequenza di DNA germinale del locus IgH umano EMBL accession n. X97051 e sono stati degenerati in specifiche posizioni in modo da renderli complementari ad un numero maggiore di segmenti appartenenti alle rispettive famiglie Ig. I *primer* per i segmenti di variabilità V sono stati disegnati, come indicato da Willems P. *et al.* (2000), in modo da marcare una regione Fr1 famiglia-specifica dei segmenti V ed una regione costante dei segmenti J. Le seguenti linee guida sono state seguite per il loro disegno:

- lunghezza dei *primer* compresa tra 22-24bp senza aggiunta di siti di restrizione;
- posizione dei *primer* ad almeno 50bp a monte delle sequenze segnale di ricombinazione (RSS) coinvolte;
- strutture secondarie non presenti, come dimeri di *primer* e forcine;
- Tm comprese tra 68°C±3°C;
- complementarità dei *primer* a tutti i segmenti genici V, D, J frequentemente coinvolti nei riarrangiamenti dei geni IgH in LLA;
- *primer consensus* per la rilevazione di tutti i membri della famiglia JH, allo scopo di ridurre il numero di reazioni PCR come indicato nelle seguenti tabelle.

Primer per VH	Sequenza 5'→3'	Tm °C
V1/7f	TCT GGG GCT GAG GTG AAG AA	62
V2f	ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT	64
V3f	GGG GGT CCC TGA GAC TCT C	64
V4/6	GCC CAG GAC TGG TGA AGC	60
V5	CTG GTG CAG TCT GGA GCA G	58
Jcons	ACC TGA GGA GAC GGT GAC C	62

Primer per DH	Sequenza 5'→3'	Tm °C
D1f	A(C/T)CC AGG AGG CCC CAG AGC(A/T) CA	68
D2f	CAG CAC TGG GCTCAG AGT CCT CTC	78
D3f	CCT CCT C(A/C)GG TCA GCC C(C/T)GG ACA T	74
D4f	CCC AGG ACG CAG CAC C(A/G)C TGT CAA	76
D5f	ACC CAG CCT CCT GCT GAC CAG AG	76
D6f	CAG GCC CCC CA(A/G)A ACC AG(T(G)G(A/T) T	64
D7f	GGG CTG GGG TCT CCC ACG TGT TTT	78

I primer sono stati utilizzati in modo da eseguire 12 PCR per ogni campione:

Mix PCR IgH	Coppie di primer	Mix PCR DH	Coppie di primer
1	V1/7-Jcons	7	D2-Jcons
2	V2-Jcons	8	D3-Jcons
3	V3-Jcons	9	D4-Jcons
4	V4/6-Jcons	10	D5-Jcons
5	V5-Jcons	11	D6-Jcons
6	D1-Jcons	12	D7-Jcons

Almeno un controllo negativo ed uno positivo sono stati usati in ciascun esperimento e tutti i campioni sono stati analizzati almeno due volte in differenti occasioni.

I prodotti di amplificazione, frammenti di 130-345bp, sono stati ottenuti tramite l'uso di singole reazioni PCR di 50µl ciascuna contenenti:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templatato	50ng/µl	4µl
Buffer-PCR 10X (Applied Biosystem)	1X	5µl
MgCl ₂ (25mM) (Applied Biosystem)	2.5mM	3µl
Mix dNTP (100nM) (GibcoInvitrogen)	10mM (each)	1µl
Primer F	6pmol/µl	2µl
Primer R	6pmol/µl	2µl
Ampli Taq Gold-polimerasi (Applied Biosystem)	1U/µl	0.2µl
H ₂ O distillata sterile		32.8µl

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc, Watertown, MA, USA) al controllo rapido della temperatura, secondo il programma *hot start* con il seguente profilo termico caratterizzato da:

- denaturazione a 94°C 10min, per attivare la polimerasi
- 35 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente i seguenti step:
- denaturazione a 94°C per 30sec,

annealing a 60°C per 45sec,
polimerizzazione a 72°C per 1min

e, infine, un trattamento termico a 72°C per 7min per stabilizzare i dsDNA nuovamente formati.

25µl dell'amplificato e 6µl di DYE sono stati controllati su gel all'1,5% di agarosio in TBE1X a 120 V.

2.4.3 Amplificazione PCR del gene costitutivamente espresso *RasK2e*

Per poter confermare come veri-negativi i risultati delle PCR per i riarrangiamenti genici IgH e TCR che non hanno prodotto bande di amplificazione, e, pertanto, escludere il dubbio di inibizione della PCR per i riarrangiamenti genici, tutti i campioni sono stati testati, in parallelo, per l'amplificazione dell'esone 2 del gene costitutivamente espresso *RasK*, usato come controllo della PCR. A tal fine sono stati usati *primer* sequenza-specifici, quali:

Primer per VH	Sequenza 5'→3'	Tm °C
<i>RasK2eF</i>	TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG	58
<i>RasK2eR</i>	CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA	62

I prodotti di amplificazione, frammenti di circa 250bp, sono stati ottenuti tramite l'uso di singole reazioni PCR di 25µl ciascuna contenenti:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templato	50ng/µl	4µl
Buffer-PCR	1X	2.5µl
MgCl ₂	2.5mM	2.5µl
Mix dNTP	25µM (each)	0.5µl
Primer F	6pmol/µl	0.5µl
Primer R	6pmol/µl	0.5µl
Ampli <i>Taq Gold</i> - polimerasi (PE Biosystem)	1U/µl	0.25µl
H ₂ O distillata sterile		14.25µl

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc, Watertown, MA, USA) al controllo rapido della temperatura, secondo il programma *hot start* con il seguente profilo termico caratterizzato da denaturazione a 95°C 10min, per attivare la polimerasi, e 30 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente i seguenti step:

denaturazione a 95°C per 40sec,
annealing a 55°C per 40sec,
polimerizzazione a 72°C per 50sec

e, infine, un trattamento termico a 72°C per 10min per stabilizzare i dsDNA

nuovamente formati.

25µl dell'amplificato e 6µl di DYE sono stati su gel all'1,5% di agarosio in TBE1X a 120 V.

2.4.4 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle catene gamma del TCR (TCR γ) mediante strategia *multiplex*-PCR.

Per poter velocizzare la procedura è stata messa a punto una strategia *Multiplex*-PCR per amplificare i geni riarrangiati del TCR, riducendo il numero di reazioni PCR per campione da 16 a 2. È stata amplificata la regione genomica del complesso TCR γ , grazie all'uso di *primer* segmento-specifici, dei campioni precedentemente analizzati per singola PCR TCR $\gamma\delta$ (appendice 7).

I *primer* sono stati disegnati, come indicato da Trainor KJ *et al.*, (1991), in modo da avere:

- lunghezza compresa tra 21-34bp senza aggiunta di siti di restrizione;
- assenza di strutture secondarie, come dimeri di *primer* e forcine;
- Tm comprese tra 60-108°C \pm 3°C;
- complementarità dei primer a tutti i segmenti genici V, D, J frequentemente coinvolti nei riarrangiamenti dei geni TCR γ in LLA, come indicato in tabella.

Primer per TCR γ	Sequenza 5'→3'	Tm °C
V2	CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC AAC TCC AAG GTT G	96
V3	CTT CCT GCA GAT GAC GTC TCC ACC GCA AGG GAT G	108
V4	CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC ACC TCC AGCG TTG	106
V5	TTC CTG CAG ATG ACG TCT CCA ACT CAA AGG ATG	98
V8	CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC AAC TCC AGG GTT G	104
V9	GG ^{AGCT} ACT GCA GGA AAG GAA TCT GGC ATT CCG	80
V10	CTC TGC AGA ATC CGC AGC TCG ACG CAG CA	94
V11	CAC TGC AGG CTC AAG ATT GCT CAG GTG GG	92
V12 (ψ VC)	ACT CTG CAG CCT CTT GGG CAC TGC TCT AAA	92
JGT12	AAG TGT TGT TCC ACT GCC AAA	60
JGT3	AGT TAC TAT GAG C ^{TCT} AGT CCC	60

I *primer* sono stati utilizzati in modo da eseguire 2 reazioni PCR distinti per ogni campione:

	Coppie di primer
Mix I	V1-V2-V3-V4-V8-V9-JGT12-JGT3
Mix II	V5-V10-V11-V12-JGT12-JGT3

Almeno un controllo negativo ed uno positivo sono stati usati in ciascun esperimento e tutti i campioni sono stati analizzati almeno due volte in differenti occasioni.

I prodotti di amplificazione, frammenti di 170-230bp, sono stati ottenuti tramite reazioni PCR di 50µl ciascuna contenenti:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templatato	100ng	2µl
Buffer-PCR 10X (Applied Biosystem)	1X	5µl
MgCl ₂ (25mM) (Applied Biosystem)	2.5mM	5µl
Mix dNTP (100nM) (GibcoInvitrogen)	0.1mM (each)	0.5µl
Primer F	0.4µmol/µl	0.5µl
Primer JGT12	0.8µmol/µl	1µl
Primer R	0.4µmol/µl	0.5µl
Ampli ^{Taq} Gold-polimerasi (Applied Biosystem)	0.2U/µl	2µl
H ₂ O distillata sterile		35.1µl -35.6µl

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc, Watertown, MA, USA) al controllo rapido della temperatura, secondo il programma *hot start* con il seguente profilo termico caratterizzato da: denaturazione a 94°C per 10min per attivare la polimerasi e 35 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente: denaturazione a 94°C per 6 sec, *annealing* a 55°C per 60sec, polimerizzazione a 72°C per 60sec, e trattamento termico a 72°C per 20min per stabilizzare i dsDNA nuovamente formati. 15µl dell'amplificato e 5µl di DYE sono stati controllati su gel al 3% di agarosio in TBE1X a 100 V (appendice 7) dopo induzione dell'*heteroduplex*.

2.4.5 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle IgH mediante strategia *semi-nested* PCR.

Per poter velocizzare la procedura, è stata messa a punto una strategia di *semi-nested* PCR per amplificare i geni riarrangiati delle IgH, riducendo il numero di reazioni PCR per campione da 12 a 1. È stata amplificata la porzione *framework* (FR) 2 della regione V, grazie all'uso di un *primer consensus*, e la porzione compresa tra i codoni 109 a 113 e 103 a 110 della regione J, grazie all'uso di 2 *primer nested*, quali LJH e VLJH, posto giusto a monte del *primer* LJH (appendice 8), dei campioni precedentemente analizzati per singola PCR IgH.

I *primer*, fiancheggiati la regione CDR3 delle IgH, sono stati disegnati, come indicato da Trainor KJ *et al.*, (1991) e da Nihal M *et al.*, (1999), in modo da avere:

- lunghezza compresa tra 15-23bp senza aggiunta di siti di restrizione;
- assenza di strutture secondarie, come dimeri di *primer* e forcine;
- T_m comprese tra 48-78°C±3°C;
- complementarietà dei *primer* degenerati in siti specifici a tutti i segmenti genici V e J frequentemente coinvolti nei riarrangiamenti dei geni IgH in

LLA, LLC, come riportato in tabella.

Primer per IgH	Sequenza 5'→3'	Tm °C
FR2A	TGG ^{AG} TC CG ^{CA} CAG ^{GC} TC TC ^C AGCT	60
LJH	TGA GGA GAC GGT GAC	48
VLJH	GTG ACC AGG GTT ^{AGCT} CC TTG GCC CCA G	78

I primer sono stati utilizzati nel modo seguente così da eseguire 2 singole PCR successive per ciascun campione:

PCR	Coppie di primer
1 round	FR2A-LJH
2° round	FR2A-VLJH

Almeno un controllo negativo ed uno positivo sono stati usati in ciascun esperimento e tutti i campioni sono stati analizzati almeno due volte in differenti occasioni. I prodotti di amplificazione, frammenti di 240-260bp, sono stati ottenuti tramite l'uso di singole reazioni PCR di 50µl ciascuna contenenti:

Componenti	Concentrazione in reazione	Quantità in reazione
DNA templatato	100ng	2µl
Buffer-PCR 10X (Applied Biosystem)	1X	5µl
MgCl ₂ (25mM) (Applied Biosystem)	2.5mM	5µl
Mix dNTP (100nM) (GibcoInvitrogen)	0.1mM (each)	0.5µl
Primer F	0.4µmol/µl	0.5µl
Primer R	0.4µmol/µl	0.5µl
Ampli ^{Taq} Gold-polimerasi (Applied Biosystem)	1U/µl	0.5µl
H ₂ O distillata sterile		36µl

Le reazioni per il 2° round PCR sono state allestite come le precedenti con la sola eccezione che è stato usato 1µl del prodotto amplificato nel 1° round PCR allo scopo di incrementare sia la sensibilità che la specificità della reazione.

I cicli di amplificazione sono stati svolti in un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc, Watertown, MA, USA) al controllo rapido della temperatura, secondo il programma *hot start* con il seguente profilo termico per il 1° round PCR: denaturazione a 94°C per 10min per attivare la polimerasi, 30 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente: denaturazione a 94°C per 45sec, *annealing* a 50°C per 45sec, polimerizzazione a 72°C per 45sec. È stato eseguito, infine, un trattamento termico a 72°C per 10min per

stabilizzare i dsDNA nuovamente formati.

Per il 2° round PCR, dopo l'*hot start* eseguita a 94°C per 10min, sono stati eseguiti 20 cicli d'amplificazione ognuno dei quali comprendente i seguenti step: denaturazione a 94°C per 45sec,

annealing a 50°C per 45sec,

polimerizzazione a 72°C per 45sec.

È stato eseguito, infine, un trattamento termico a 72°C per 10min per stabilizzare i dsDNA nuovamente formati.

15µl dell'amplificato e 5µl di DYE sono stati controllati su gel al 3% di agarosio in TBE1X a 100 V (appendice 8), dopo induzione dell'*heteroduplex*.

2.5 Analisi *Heteroduplex* (HD)

Per l'analisi *heteroduplex* (HD) i prodotti PCR sono stati denaturati a 94°C per 5min e successivamente rinaturati a temperature più basse per indurre la formazione del *duplex*. La rinaturazione è stata eseguita a differenti temperature (tra 4-40°C) per differenti intervalli di tempo (15-60min) in esperimenti separati.

Dopo la formazione del *duplex*, i campioni in analisi sono stati divise in 2 aliquote da 25µl ciascuna: un'aliquota è stata immediatamente controllata su gel come descritto in paragrafo 2.4 ed usando il SM DNAλII (Roche), mentre l'altra è stata utilizzata per l'analisi al Denaturing High Performance Liquid Chromatography (paragrafo DHPLC).

2.6 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC).

Poiché le reazioni singole PCR per la rilevazione dei riarrangiamenti IgH e TCR sono state eseguita in condizioni di temperatura di *annealing* non stringente, per evitare risultati falsi positivi i campioni amplificati sono stati separati sulla base della loro dimensione e composizione con la Cromatografia ad Elevata Pressione in condizioni Denaturanti (DHPLC, zur Stadt *et al.*, 2001). Questo è stato costituito da diversi elementi (fig. 21), quali:

- una colonna cromatografia, con fase stazionaria C18 formata da particelle non porose di poli-stirene-divinilbenzene di dimensioni di 2.1µm sottoposte a reazione di alchilazione con molecole di octadecilsilano, necessaria per l'analisi ad alta risoluzione degli acidi nucleici, ottenendo così uno scheletro a 18 atomi di carbonio (DNASep, Transgenomic);
- due piastre su ciascuna delle quali possono essere posizionati fino a 96 campioni di DNA da analizzare;
- un sensore spettrofotometrico di rilevamento del DNA corredato di microcella a flusso, dove l'eluato passa di continuo e ne viene effettuata la lettura nell'UV a 260nm;
- una pompa con testata in acciaio per assicurare un flusso costante (900µl/min) attraverso la colonna di separazione cromatografia.



Fig. 21.

Il sistema cromatografico ha utilizzato un tampone di corsa (fase mobile) formato da una miscela di due soluzioni dette A e B. La soluzione A è stata composta da 0.1M di acetato di trietilammonio (TEAA) pH 7.0, formato per azione dell'acido acetico sulla trietilammina, mentre la seconda soluzione è stata composta da 0.1M di TEAA e 25% di acetonitrile pH 7.0. Nella formulazione dei tamponi è stata inclusa una discreta quantità di sale disodico di EDTA per complessare ed eliminare gli ioni metallici, il cui accumulo avrebbe interferito con la riproducibilità della separazione. Per il lavaggio della colonna è stata adoperata una soluzione di acetonitrile al 75%, mentre per il lavaggio della siringa di iniezione dei campioni nella colonna è stata adoperata una soluzione di acetonitrile all'8%.

Le molecole di TEAA presenti nel tampone di corsa hanno funzionato da ponte, da controione, in modo che la fase stazionaria C18 fosse meno polare della fase mobile, in quanto:

- con la loro porzione carica positivamente hanno interagito con i gruppi fosfato del DNA e
- con la porzione idrofobia hanno interagito con la fase stazionaria della colonna cromatografia.

L'acetonitrile, inoltre, competendo per il legame del TEAA alla resina della colonna ha determinato il rilascio del frammento di DNA dalla stessa. Le percentuali relative delle due soluzioni A e B nel tampone di corsa sono state variate durante la migrazione dei frammenti in essa a seconda del metodo selezionato. In generale, al momento del caricamento del campione le percentuali sono state di 58% A e 42% B, mentre al termine della corsa sono stati registrati valori di 25% A e 75% B, con un $2\%/_{\text{min}}$ di incremento della fase mobile B (4.5min gradiente). La durata di ogni singola corsa è stata di circa 30min ed il volume da iniettare di $8\mu\text{l}$ per campione, circa 80ng di DNA, e velocità di flusso di 0.9ml/min e tempo di ritenzione misurato *online* attraverso l'assorbanza a 254nm dell'eluato,.

Il sistema DHPLC è stato connesso ad un *computer* e controllato attraverso due distinti programmi installati su di una piattaforma *Windows NT* (Xiao & Oefner, 2001):

- *Wavemaker software*
- *HSM (Hitachi System Manager)*

Il primo è servito per gestire l'analisi del DNA consentendo di: archiviare le sequenze nucleotidiche dei frammenti analizzati, analizzare il profilo di

denaturazione delle sequenze, definire il gradiente per l'analisi del frammento (Xiao & Oefner, 2001).

Il secondo, invece, è stato utilizzato per la gestione diretta dello strumento consentendo di: registrare i metodi di analisi, definire la tabella con le informazioni necessarie al caricamento dei campioni in automatico (quali la posizione delle provette, il volume da iniettare, il metodo da utilizzare per l'analisi), acquisire i dati dell'assorbanza, rianalizzare e confrontare i dati (Xiao & Oefner, 2001).

Prima di ogni analisi la colonna è stata equilibrata con tampone 50% A e 50% B (zur Stadt *et al.*, 2001). I profili traccia HPLC risultanti, esaminati col *Wavemaker software*, sono stati visualizzati in un cromatogramma con un profilo che riporta il tempo di ritenzione in minuti sulle ascisse e l'intensità di assorbimento in millivolt/minuto (mV/min) sulle ordinate.

Un tipico cromatogramma di un frammento di DNA con mutazione è stato composto di vari picchi: i primi due, in ordine di tempo di eluizione, hanno raccolto l'*heteroduplex*, i successivi l'*homoduplex*. Anche la presenza di uno "shoulder" sul picco è indice dello stato mutato del campione (Bardwell PD *et al.*, 2002). Nel caso dei prodotti IgH e TCR da singole PCR, la presenza e/o la mancanza dei picchi di eluizione sul cromatogramma sono stati indici di risultati falsi-positivi o veri-positivi quando eluiti alla temperatura di "quasi denaturazione".

2.6.1 Induzione dei *duplex*.

Per valutare la migliore formazione di *duplex* i campioni amplificati sono stati denaturati e rinaturati secondo diversi protocolli in esperimenti separati:

- Denaturazione a 96°C per 5min e rinaturazione veloce a 4°C per 5min;
- Denaturazione a 95°C per 5min e graduale rinaturazione da 95°C a 10°C con decremento di 1°C/min e incubazione a 4°C per 5min;
- Denaturazione a 96°C per 5min e rinaturazione a 30-40°C per 5-10min;
- Denaturazione a 95°C per 5min e rinaturazione a temperatura ambiente per 30min – ON.

2.6.2 Determinazione delle condizioni di corsa DHPLC in gradiente lineare TEAA.

Per discriminare tra riarrangiamenti policlonali, monoclonali e/o oligoclonali dei geni del TCR e IgH da singole PCR è stato necessario determinare la temperatura di "quasi denaturazione", definendola come la temperatura alla quale i prodotti derivanti da amplificazione non specifica non mostrano picco di eluizione sul cromatogramma.

È stata prodotta una "*temperature mapping*" specifica per le singole *mix* PCR IgH/TCR in esame sia sperimentalmente, sia calcolando l'algoritmo di *Stanford* (zur Stadt *et al.*, 2001), sia predicendola con il *Wavemaker software*.

2.6.2.1 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite "temperature mapping".

I frammenti di DNA dei prodotti monoclonali di Jurkat e Reh, policlonali del pool e biclonali del campione 3126 (LLA B) ottenuti per amplificazione con la coppia di *primer* V γ 1-J γ 1.3/2.3 (mix 13 delle PCR TCR $\gamma\delta$, paragrafo 2.4.1) sono stati valutati per iniezioni seriali in gradiente lineare di TEAA a tutte le seguenti temperature:

50°C (prodotto completo dsDNA)-52-54-55-56-57-58-59-60-61-62-63-64-67-70°C (prodotto completo ssDNA).

2.6.2.2 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite Algoritmo di Stanford.

Per calcolare la temperatura di "quasi denaturazione" è stato adoperato il software "Melting point" che calcola l'algoritmo di Stanford, messo a disposizione dal sito dell'Università di Stanford (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>), per valutare le sequenze germinali della Genebank del sito *ImmunoGeneTics* (IMGT, <http://imgt.cines.fr>), riarrangiate in maniera casuale senza delezioni o aggiunte nucleotidiche (appendice 9).

2.6.2.3 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite Wavemaker - Transgenomic.

Le sequenze utilizzate per il calcolo dell'algoritmo di Stanford sono state usate come basi per predire la suddetta temperatura utilizzando il software Wavemaker (Transgenomic) dello strumento (zur Stadt *et al.*, 2001).

2.6.2.4 Confronto dei risultati delle corse prodotte dai metodi mutation detection ed universal liner.

Per stabilire il metodo, i prodotti dei suddetti campioni e le miscele V/V dei prodotti monoclonali (Jurkat+Reh), di quelli monoclonali con i biclonali (Reh+3126, Jurkat+3126), di quelli monoclonali con i policlonali (Jurkat+pool, Reh+pool) e di quelli policlonali con i biclonali (pool+3126) derivanti dall'amplificazione della mix 13 PCR TCR $\gamma\delta$ (paragrafo 2.4.1) sono stati analizzati attraverso iniezioni seriali, sia in condizioni di variazioni di gradiente di TEAA repentine, applicando il metodo *mutation detection* dello strumento e riducendo i tempi di ritenzione a 7min, sia in condizioni di gradiente lineare di TEAA, applicando il metodo *universal liner* dello strumento, alle seguenti temperature: 54.3-55.3-56.3-58.3-59.3°C.

2.6.2.5 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite "temperature mapping" per le mix PCR TCR ed IgH.

È stata effettuata la *temperature mapping* in gradiente lineare di TEAA per tutte le altre mix PCR testando i prodotti monoclonali di Jurkat e Reh, policlonali del pool e biclonali di 3126 e dei campioni 5315, 3050, 3391,

3369, 5637, 3561, 5164, 3647, 4696, 5538, 3333, 3814, 5960, 5858, 5181, 3879, 5493, 3255, 3555 per il TCR e 5084, 4696, 3608, 5538, 3669, 5181, 4757, 5379, 5279, 5164 per le IgH alle seguenti temperature: per TCR $\gamma\delta$ 50-52-54-55-56-57-58-60-62°C

e per IgH 50-54-56-58-59-60-62-64-66°C.

I restanti campioni dei 246 in analisi sono stati risolti con singole corse DHPLC da 20min ognuna alle temperature riportate in appendice 10.

2.6.3 Discriminazione tramite DHPLC in gradiente lineare TEAA dei prodotti derivanti dall'amplificazione *multiplex*-PCR e *semi-nested* PCR.

I campioni amplificati con la strategia *multiplex*-PCR e *semi-nested* PCR sono stati analizzati al DHPLC allo scopo di migliorare l'interpretazione dei risultati dell'analisi *heteroduplex*, dipendendo quest'ultima dalla visualizzazione di un segnale di amplificazione discreto prodotto dalla popolazione monoclonale e sovrastante un *background* di segnale di amplificazione diffuso derivante dalla popolazione policlonale, nella quale il clone leucemico è immerso. A tal fine, i campioni sono stati analizzati per iniezioni seriali di 8 μ l di ognuno alla temperatura di 50°C in gradiente lineare di acetonitrile con inizio al 45% di tampone B e fine della corsa con 60% dello stesso tampone ed incremento del $2\%/_{\text{min}}$ del gradiente di *buffer* B e velocità di flusso di 0.9ml/min.

2.7 Purificazione del DNA amplificato

Per poter sottoporre gli amplificati risultati dalle analisi DHPLC a sequenziamento diretto di entrambi i filamenti, gli stessi sono stati purificati da gel mediante il *kit Quiaquick Extraction Gel* (Qiagen), riamplicati nelle rispettive condizioni ed i prodotti ottenuti purificati mediante il *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen), che ha permesso l'eliminazione dei *primer*, dei dNTP non utilizzati nelle reazioni di amplificazione, della polimerasi e dei sali della reazione PCR per passaggio selettivo degli acidi nucleici (di 100bp-10Kb) attraverso la membrana delle colonnine cromatografiche *Quiaquick Spin* fornite dal *kit* quando è stata applicata la forza centrifuga di 13000rpm, come indicato dal produttore. La resa della purificazione è stata controllata su all'1.5% d'agarosio in TBE1X corsi a 120V caricando 5 μ l di purificato e 5 μ l di DYE insieme a 4 μ l di SM IX (o SM II o SM XVI) e 4 μ l di DYE per permetterne la quantizzazione relativa.

2.8 Sequenziamento

Le soluzioni contenenti almeno 25ng/100bp di DNA purificati e quantizzate insieme ad aliquote di 2 μ M di ciascun *primer* senso e antisenso specifici sono stati usati per il sequenziamento di entrambi i filamenti, effettuato dal "Laboratorio di Genomica" del CE.IN.GE.-Biotecnologie Avanzate di Napoli, secondo metodo di Sanger automatizzato (Sanger, 1988).

2.9 Analisi sequenze

Le sequenze ottenute sono state valutate usando i programmi *MacDNasis* vers.1.0 e vers.3.0, girante su piattaforma *Macintosh*, il quale ha permesso di ottenere un unico dominio sovrapponendo le sequenze prodotte con i rispettivi *primer* senso e antisense. Questi sono stati usati per identificare con stretto *matching* ai geni germinali umani noti disponibili nella *Genebank* del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, Altschul SF *et al.*, 1997) i segmenti partecipanti al riarrangiamento.

Allo scopo di valutare se le sequenze ottenute erano il prodotto di effettivi riarrangiati o di amplificati in configurazione germinale, è stato utilizzato il *software online ImMunoGeneTics* (IMGT, <http://imgt.cines.fr>), che è un *database* integrato ad alta qualità specializzato nel computare e disegnare alberi filogenetici, con l'uso dell'algoritmo Neighbor-Joining (Saitou N. and Nei M., 1987), per sequenze nucleotidiche delle regioni V delle Ig e del TCR, utilizzando uno dei 5 moduli complementari in esso presente (Kimura M, 1980). Una volta selezionati la specie, il subgruppo e il gene in analisi, la sequenza in formato FASTA è stata analizzata con il *database* IMGT/DNAPLOT (Lefranc M.P. *et al.*, 1999), che, utilizzando tabelle di geni germinali di TCR e Ig, ha allineato alleli e ha evidenziato il riarrangiamento effettivo. Le sequenze utilizzate per il confronto sono identificate con le *accession number* dell'*EMBL/GenBank/DDBJ* e i risultati sono stati espressi come annotazioni IMGT, file *flat* delle regioni codificanti con traduzione proteica e frammenti corrispondenti ai particolari riarrangiamenti, utilizzando quali criteri per la determinazione dei segmenti D una minima omologia di almeno 6 *match* in una riga o 7 *match* interrotti da 1 *mismatch*, come indicato da Li A *et al.*, 2004.

2.10 Determinazione di un *cutoff* per la discriminazione dei campioni risultati positivi all'analisi PCR singola per i geni del TCR $\gamma\delta$ e IgH.

Poiché il numero relativo di linfociti T monoclonali e policlonali presenti nel campione in analisi influenza l'esito della PCR, inducendo l'operatore nell'interpretazione dei risultati "monoclonali", anche in casi di malattie autoimmuni ed in pazienti con infezioni virali, e, pertanto, non avere significato clinico, è stata calcolata l'area dei picchi prodotti nell'analisi DHPLC dei campioni amplificati con le strategie PCR descritte nei paragrafi 2.4.1 e 2.4.2. Tali valori sono stati visualizzati in uno *scattergram* prodotto con il programma *GraphPad Prism* vers. 4.0a 2003, girante su piattaforma *Macintosh* e valutati comparando la dispersione degli stessi nel piano.

2.11 Calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica.

I campioni precedentemente testati per i riarrangiamenti dei geni delle IgH e del TCR $\gamma\delta$ con le strategie descritte nei paragrafi 2.4 e 2.5 sono stati valutati

come falsi-positivi (FP), veri-positivi (VP), falsi-negativi (FN) e veri-negativi (VN) alla luce delle informazioni diagnostiche cliniche.

I dati così ottenuti sono stati utilizzati per calcolare la sensibilità e la specificità diagnostica applicando le seguenti formule:

$$\text{Specificità Diagnostica} = \left(\frac{VN}{VN+FP} \right) * 100$$

$$\text{Sensibilità Diagnostica} = \left(\frac{VP}{VP+FN} \right) * 100.$$

3 Risultati e discussioni

3.1 Scelta dei campioni

Poiché le Leucemie Linfatiche Acute T (LLA T) possono derivare da cellule progenitrici naturalmente residenti nel timo e poi migranti al midollo attraverso la circolazione sanguigna e poiché le LLA B originano da cellule progenitrici midollari, i 246 campioni sono stati scelti tra prelievi di sangue periferico (PB) e tessuti bioptici, oltre che da agoaspirati midollari (MB). I primi sono risultati informativi tanto quanto gli studi su campioni di BM, sebbene con livelli di MDR più bassi (Brisco MJ *et al.*, 1997), suggerendo che la valutazione di tali campioni dipende dalle specifiche caratteristiche biologiche delle cellule leucemiche, piuttosto che dalla distruzione fisica della barriera MB-PB, ed indicando la presenza di una più aggressiva leucemia con propensione delle cellule a risiedere permanentemente nel midollo, come riscontrato da Coustan-Smith E *et al.*, (2002).

I campioni, sottoposti ad analisi di *routine*, sono stati scelti in base alla diagnosi clinica, stabilita con analisi morfologiche, citochimiche e immunofenotipiche, di malattia linfoproliferativa; in particolare 32 campioni sono stati diagnosticati affetti da LLA, 47 da Leucemia Linfatica Cronica (LLC), 44 da Sindrome linfoproliferativa (SLP) e 37 da linfoma (LNH).

Dei campioni affetti da LLA 14 sono della linea B, mentre dei 48 con LLC 24 sono delle linea B (appendice 5).

Per valutare la specificità della tecnica sono stati scelti anche 9 campioni da pazienti affetti da malattie immunoproliferative (MIP: 4 MGUS, 1 amiloidosi, 4 mieloma), 2 campioni da paziente con Leucemia Plasmacellulare (LPC), 1 campione da paziente con Policitemia Vera (PV), 1 con Leucemia delle Cellule Capellute (HCL), 1 con Sindrome Mielodisplastica (SMD), 1 da paziente affetto da Pancitopenia, 2 campioni con Neutropenia e 5 campioni con Leucemia dei Grandi Linfociti (LGL). Come controlli positivi sono stati usati: le linee cellulari Jurkat (LLA T), Reh (LLA B) e Karpas (LNH T); i campioni CPA1 (Linfoma T) e CPA2 (Linfoma B) dell'Amplimedical.

Come controlli negativi sono stati usati la linea cellulare EOL1 (HES) e i campioni: CNA, PNL1 a PNL5, 48 campioni da pazienti affetti da sospetta Sindrome Ipereosinofila (HES) e/o Leucemia Mieloide Cronica (LMC); Placenta e Pool, costituito dall'unione di 10 campioni di PB da donatori non leucemici. Tutti i 246 campioni sono stati studiati per strategia DHPLC basata sulle strategie *Multiplex-PCR* dei geni del TCR γ , PCR *semi-nested* dei geni IgH e per strategia DHPLC basata su singole PCR dei geni IgH e TCR $\gamma\delta$. Di questi, 70 tra quelli scelti con LLA, LLC e LNH, sono stati analizzati per l'analisi Southern Blot (SB) dei geni IgH e TCR β .

3.2 Analisi Southern Blotting (SB)

Il DNA estratto, come riportato in materiali e metodi, di 70 campioni è stato usato per l'analisi SB allo scopo di identificare i riarrangiamenti clonali dei geni delle Ig e del TCR. L'interpretazione dei risultati è stata basata

discriminando in base alle differenze nelle grandezze delle bande corrispondenti ai frammenti germinali e riarrangiati. 52 campioni con diagnosi clinica di LNH, SLP, LLA B e LLC sono stati investigati usando sonde Jh complementari al sito 3' della regione J per rilevare i riarrangiamenti dei geni IgH, dopo digestione del DNA con gli enzimi di restrizione (ER) *Bgl*II, *Hind*III ed *Eco*RI. Di questi, soltanto 3 campioni, con diagnosi clinica di LNH e SLP, rispettivamente, sono risultati negativi mostrando un profilo di restrizione identico a quello ottenuto dalla digestione del DNA del tessuto placentare (G1/G2): frammenti di restrizione germinali di grandezza approssimativa di 3.9Kb per digestione con l'enzima *Bgl*II, 9.5kb per *Hind*III, e 16.0kb per *Eco*RI. Hanno presentato un clone IgH 44 campioni e sono stati definiti monoclonali, rilevando il 100% di detenzione della clonalità IgH nelle LLA B, l'83% nelle LLC e il 92% nelle SLP (appendice 11). I campioni 3358, 3369, 3255, 3126 e 3557, tutti con diagnosi clinica di SLP e LLA, hanno mostrato 2 cloni IgH e sono stati definiti biclonali. Questa sicuramente non è stata causata da un artefatto dovuto all'iperploidia del cromosoma 14 con indipendenti riarrangiamenti IgH presenti su ogni cromosoma (Davi F. *et al.*, 1996), visto anche che in base ai criteri utilizzati per l'identificazione della diversità clonale delle cellule leucemiche per il SB e le PCR, quali la presenza di un eccesso di bande al SB e il numero di prodotti PCR in relazione al numero di alleli (per esempio, più di 2 bande sul SB o più di 2 prodotti PCR quando solo 2 copie di cromosoma rilevante sono presenti), hanno mostrato l'esistenza di bande di uguale densità sul SB. (Green E *et al.*, 1998) e un numero di amplificati PCR tali da non essere considerati né mono- né policlonali. Il quadro allelico più frequentemente mostrato da tutti i campioni monoclonali è stato quello con entrambi gli alleli riarrangiati R1/R2 (32/52 campioni testati) soprattutto nei casi di SLP e LLA; solo 9 campioni hanno riarrangiato un solo allele R1/G2 o G1/R2, mentre 3 campioni (5084, 3010, 3309) hanno un allele deleto (R1/D2 o D1/R2), discriminato in base alla diminuzione di circa metà dell'intensità della banda ibridata rispetto alla placenta. L'interpretazione dei risultati ottenuti è stata per alcuni campioni complicata dalla presenza della regione polimorfica ipervariabile (HVP) localizzata tra la regione Jh e il primo sito di restrizione al 5' della regione Jh degli enzimi *Eco*RI e *Hind*III, portando a variazioni nella grandezza dei frammenti germinali. I digeriti *Eco*RI, inoltre, hanno mostrato per alcuni campioni una grandezza maggiore a 20kb quando i segmenti Jh ed i geni Ch *switched* erano posti sullo stesso frammento di restrizione germinale. Per la rilevazione dei riarrangiamenti dei geni TCR, 18 campioni con diagnosi clinica di LNH, SLP, LLA T, MIP e LGL (appendice 11) sono stati investigati usando sonde C β complementari al sito 5' della regione C β 2 (omologa alla regione C β 1) dopo digestione del DNA con gli ER: *Hind*III, *Eco*RI e *Bam*HI. È stata scelta questa strategia perché è in grado di evidenziati anche i riarrangiamenti alla regione J β 1, quando la sonda C β è usata in combinazione con *Eco*RI. Sulla base dei *pattern* dei riarrangiamenti i pazienti sono stati divisi in due gruppi:

- campioni negativi (4/18), con diagnosi clinica di SLP e LLA rispettivamente, e profilo di restrizione identico a quello ottenuto dalla digestione del DNA del tessuto placentare (G1/G2): frammenti di restrizione germinali di grandezza approssimativa di 22.5kb per l'enzima *BamHI* (comprendente entrambi i segmenti genici $C\beta$), 3.5kb e 7.5kb comprendenti, rispettivamente, i geni $C\beta 1$ e $J\beta 2+C\beta 2$ per *HindIII* e 10.5kb e 3.8kb (con i geni $J\beta 1+C\beta 1$ e $C\beta 2$, rispettivamente) per *EcoRI*;
- campioni monoclonali (13/18) con quadri allelici D1/R2-R1/G2 e D1/R2-G1/G2 (10/18 campioni testati), R1/G2-G1/G2 per il riarrangiamento su un solo allele (2/18), e R1/G2-G1/R2 (2/18 campioni).

Per la presenza di due regioni separate $D\beta$ - $J\beta$ nei geni $TCR\beta$, per alcuni campioni i riarrangiamenti sono stati rilevati su un solo allele.

L'interpretazione dei risultati ottenuti è stata per alcuni campioni complicata dalla presenza di un sito di restrizione per *EcoRI* e *HindIII* con parziale resistenza alla digestione nella regione $C\beta 2$ tra i geni $J\beta 2$ e $C\beta 2$, determinando così una banda germinale *extra* di 7.9kb, che, contenendo i segmenti genici $J\beta 2$ e $C\beta 2$, ibrida con la sonda $C\beta 2$ e confondibile con una banda riarrangiata (van Dongen JJM and IJM Wolvers-Tettero, 1991). In DNA completamente digeriti, invece, questi segmenti genici sono posti su due frammenti *EcoRI* di 4.1kb e 3.8kb, rispettivamente. L'interpretazione dei risultati è stata anche complicata dalla co-migrazione della banda riarrangiata con quella germinale, dalla presenza di bande riarrangiate multiple e sinonimo di oligoclonalità o dalla presenza di aberrazioni cromosomiche e dal limite di detenzione della tecnica, come riscontrato da van Dongen JJM and IJM Wolvers-Tettero, (1991). La comigrazione delle bande germinali e riarrangiate è risultata essere frequente sia per i frammenti inferiori a 10kb che per quelli maggiori a 18kb, soprattutto nei geni TCR quando studiati con l'ER *BamHI*. La presenza di bande multiple riarrangiate è stata riscontrata maggiormente per i geni IgH dei campioni con LLA, in parte dovute alla presenza della regione HVP, quando soltanto 2 bande sono state rilevate con *BamHI*, e in parte alla presenza di aberrazioni cromosomiche (iperploidia o traslocazioni), quando soltanto 3 o più bande di intensità comparabile sono state riscontrate, o alla presenza di subcloni con geni TCR/IgH differentemente riarrangiati, quando l'intensità tra coppie di bande riarrangiate è risultata differente. La presenza di subcloni è stata, generalmente, riscontrata in 15-30% di *precursor* LLA B per i continui riarrangiamenti dei geni V e per i fenomeni di mutazione somatica propria degli immunocitomi e linfomi derivati da cellule dei centri germinali. L'oligoclonalità è stata definita quando l'analisi ha rilevato la presenza di numerose bande riarrangiate di differente intensità. Il 100% di detenzione è stato riscontrato nei campioni LLA (10/10) e SLP (7/7), mentre l'86% per i campioni con LLC (6/7) con la sonda Jh6. Con la sonda $TCR\beta$, invece, solo il 90% di detenzione è stato ottenuto per i campioni con SLP (10/11), il 61% NHL (4/6) e il 100% dei campioni LGL (2/2) ha mostrato i geni TCR clonalmente riarrangiati e, pertanto, la sonda è risultata meno

sensibile di quella Jh6 perché i 3 campioni LLA testati (6684 – 4657 – 4764) sono risultati non clonali (appendice 11). Con tale metodica non sono mai stati ottenuti risultati falsi-positivi e i risultati negativi sono stati adottati al fatto che emergenti *pattern* clonali possono essere oscurati dalla configurazione germinale delle cellule TCR/IgH predominanti nel campione, come proposto da Bottaro M *et al.* (1994) per i geni TCR dai campioni di cute. I campioni così testati hanno costituito un paniere per valutare i metodi PCR descritti nei paragrafi 2.6 di materiali e metodi e il metodo *heteroduplex*.

3.3 Allestimento reazioni PCR

3.3.1 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle catene gamma e delta del recettore delle cellule T (TCR $\delta\gamma$).

In questa fase sono stati costruiti 12 *primer*, 6 *primer* segmento-specifici per il locus δ e 6 per quello γ . Quest'ultimi sono stati così costruiti:

- 2 *primer reverse* a doppia specificità perché capaci di riconoscere il segmento J γ 1.1 (detto anche JP1) e J γ 2.1 (JP2) o i segmenti J γ 1.3 (detto anche J1) e J γ 2.3 (J2);
- 4 *primer* senso capaci di riconoscere i segmenti funzionali della famiglia V γ 1 e i segmenti V γ 9 (costituente la famiglia V γ II), V γ 10 (costituente la famiglia V γ III) e V γ 11 (costituente la famiglia V γ IV).

Non sono stati costruiti *primer* per gli pseudogeni ψ V γ 1, ψ V γ 5 e ψ V γ 6, perché sono raramente usati nella formazione dei riarrangiamenti, pur mantenendo intatti i promotori e le sequenze segnali di ricombinazione (RSS). Tutti i campioni sono stati testati almeno 2 volte tramite ripetizioni indipendenti delle determinazioni PCR dello stesso campione e tramite applicazione delle tecniche di separazione ad alta risoluzione, come il Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) e/o il sequenziamento, per evitare l'*over*-interpretazione dei prodotti PCR dominanti rispetto alla diagnosi di leucemia: tali prodotti PCR, infatti, sotto condizioni reattive (non clonali) variano in grandezza, mentre quelli leucemici e clonali sono esattamente riproducibili (Dippel E. *et al.*, 2001). Tutte le combinazioni di *primer* hanno fornito PCR robuste, amplificando 205/246 campioni e convalidando l'uso degli stessi per l'identificazione alla diagnosi, per l'analisi di sequenza delle regioni giunzionali e per la detenzione della malattia minima residua (MRD) nei campioni *follow-up*. Con la metodica PCR accoppiata al DHPLC la clonalità TCR δ è stata osservata in 136/246 campioni analizzati e quella TCR γ in 205/246 campioni testati, sebbene non sia stato possibile discriminare tra monoclonali e biclonali, definizione possibile solo con la metodica SB che analizza porzioni estese di genoma. Non hanno mostrato amplificazione per TCR δ 110 campioni, i quali potrebbero presentare la configurazione di tali geni per ogni allele negli altri 2 stadi potenziali: germinale e delecto (Szczepanski T *et al.*, 1999). È stato possibile diagnosticare la clonalità sia in MB che in PB, sebbene accompagnati dalla co-amplificazione dei riarrangiamenti di DNA

da cellule normali. I campioni 3721-3725 da PB e MB, rispettivamente, dello stesso paziente con SLP alla diagnosi, hanno mostrato gli stessi riarrangiamenti $V\gamma 11-J\gamma 1.1/1.2$ e $V\gamma 9-J\gamma 1.3/2.3$; così come i campioni 11444-11445 da PB e MB di un paziente con LNH alla diagnosi, positivi per i riarrangiamenti $V\gamma 9-J\gamma 1.1/2.1$, $V\gamma 9-J\gamma 1.3/2.3$ e $V\gamma 1-J\gamma 1.3/2.3$ (appendice 12). I campioni 5960 (SLP), 6684, 4657 e 4764 (LLA) risultati negativi all'analisi SB, hanno prodotto amplificazione con i *primer* per i *loci* γ che δ . Questa maggiore sensibilità rispetto al SB è stata evinta anche dal fatto che l'88% di detenzione della clonalità TCR δ è stato ottenuto nei PNL, l'81% nelle LLA, il 61% nelle SLP e LMC, il 56% nei MIP, il 51% nei LNH, 47% in HES e il 26% nelle LLC. Per la clonalità TCR γ , invece, l'88% è stato ottenuto in MIP, LNH, SLP e LLA. Quest'ultimo dato ha anche evidenziato come non ci siano state differenze significative tra i tipi di LNH, la loro localizzazione, o la proporzione di cellule tumorali e che il fallimento a rilevare popolazioni T clonali negli altri casi non è stata causata da problemi di sensibilità della tecnica, ma da vera assenza dei riarrangiamenti appropriati, dovuti a configurazione germinale, riarrangiamenti incompleti o deleti nel *locus* o *trans*-riarrangiamenti tra segmenti $V\gamma$ e $J\delta$ (Assef C *et al.*, 2000). I pazienti con LLC e PNL hanno amplificato il TCR γ con una sensibilità del 70-75%, mentre i campioni con LMC del 61% e quelli con HES del 93%. Tale relativamente alta frequenza di positività riscontrata in quest'ultimo gruppo di pazienti può essere spiegata dal fatto che, come constatato da van Dongen JJM e ILM Wolvers-Tettero (1991), molte leucemie delle cellule T CD3 $^-$ presentano i geni delle catene $\gamma\delta$ del TCR riarrangiati e ciò giustifica anche la positività riscontrata nei 4 campioni da pazienti affetti da HES-LV e mostranti all'analisi citofluorimetrica immunofenotipo aberrante CD3 $^+CD4^+$, CD3 $^+CD8^+$ e CD3 $^+CD4^+CD8^+$, come riscontrato nei campioni CD3 $^+CD4^+CD5^+$ di Sandberg Y *et al.* (2005) sia in PB che in BM. Van Dongen JJM e ILM Wolvers-Tettero, (1991), inoltre, hanno prodotto quadri di monoclonalità IgH e TCR anche al SB in linfoproliferazioni clinicamente benigne, come le gammopatie monoclonali, papulosi linfomatoide, linfocitosi CD8/T γ , immunodeficienze primarie e secondarie e infezioni dal virus Epstein-Barr. I campioni 10934, 11352 (neutropenia), 3520, 4585, 9052, 11591 (LGL), 10652, 5656 (LLC), 10633, 5164, 10753, 5315, 11046, 3050, 3879, 3561, 3358, 3369, 4757, 4696 (SLP), 11449 (LLA T), 3608, 3255, 3126 (LLA B), 10863, 10759, 11541, 12714, 12704 (HES), PNL3, PNL4, pool e PNL5 sono stati identificati come oligoclonali alla diagnosi, in base alle indicazioni di Pongers-Willems MJ *et al.*, (1999), mentre solamente 36 campioni sono risultati negativi per la clonalità (appendice 12).

Amplificazioni monoclonali sono state osservate anche in 50 casi di malattia linfoproliferativa B, incluse la linea cellulare Reh ed il campione CPA 2, dimostrando che i primer non sono linea-linfocitaria specifici, come riferito da Trainor KJ *et al.* (1999). Ciò può essere spiegato adducendo le ipotesi di Brumpt C *et al.* (2000) e Szczepanski T *et al.* (1999), secondo i quali le LLA sono cellule arrestate a stadi di maturazione precoci

(CD34⁺/CD19⁺/CD10⁻) in cui sono ancora "ricombinasi-competenti", con i *loci* genici Ig/TCR in una configurazione cromatinica accessibile concomitantemente per la ricombinasi e indipendentemente controllata per i *loci* $\delta\gamma$, associando sempre i riarrangiamenti IgH con quelli TCR δ . In tal modo i riarrangiamenti dei geni IgH *cross-lineage* nelle LLA T potrebbero riflettere la trasformazione di timociti derivati da una cellula precursore CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺ con i geni IgH riarrangiati, come supportato dal modello murino dove i riarrangiamenti IgH sono presenti solo in uno stadio intermedio dello sviluppo del timocita. Altre ipotesi formulate da Szczepanski T *et al.* (1999) sono quelle per le quali i riarrangiamenti IgH nelle cellule *precursor* T potrebbero essere un evento aberrante inducente l'apoptosi (a meno che non vengano immortalizzate da eventi tumorali), dovuti probabilmente ad eventi postoncogeni risultanti dall'attività *ongoing* della ricombinasi sui *loci* accessibili. Quest'ultima ipotesi spiegherebbe anche perché i riarrangiamenti IgH sono stati quasi totalmente assenti nei timociti dei PNL. La maggior parte dei campioni testati ha mostrato i riarrangiamenti V δ 2-D δ 3 (78/246) e V δ 1-J δ 1 (78/246), così come i segmenti D δ 2-D δ 3 (49/246) e D δ 2-J δ 1 (73/246) e V δ 3-J δ 1 (64/246). In particolare, il segmento V δ 2-D δ 3 è stato trovato in 22/34 campioni di LLA, in 10/48 LLC, in 12/39 LHN e in 6/8 PNL; il segmento V δ 1-J δ 1 in 19/44 pazienti con SLP e 15/34 con LLA; V δ 3-J δ 1 in 10/48 pazienti con LLC, come mostrato in appendice 12.

Per il *locus* γ , la maggior parte dei campioni ha mostrato i riarrangiamenti V9-J1.3/2.3 (127/246), V9-J1.1/2.1 (116/246), V10-J1.3/2.3 (109/246), che sono stati ritrovati in 6-7/8 dei PNL testati, come mostrato da Szczepanski T *et al.* (1999), (appendice 12). Ciò è spiegabile considerando che la maggior parte dei linfociti T del sangue TCR $\gamma\delta$ ⁺ usano il segmento V γ 9 e J γ 1.2 in combinazione con V δ 2 e J δ 1 e, pertanto, i segmenti genici TCR $\gamma\delta$ non sono usati in maniera casuale, ma preferendo i segmenti V al 3' più vicini al *locus* J (Brumpt C *et al.*, 2000). I linfociti TCR $\alpha\beta$ ⁺ di sangue normale, infatti, più di quelli da leucemie, utilizzano uno degli 8 geni funzionali V γ I in combinazione con i segmenti genici J γ 2.3 o J γ 1.3 rendendo ancora più complicata l'interpretazione dei risultati (van Dongen JJM and ILM Wolvers-Tettero, 1991). Un uso preferenziale dei segmenti genici del *locus* γ è anche spiegabile considerando che in molte cellule TCR $\alpha\beta$ ⁺ entrambi gli alleli possono essere meleti e ciò, abbinato alla relativamente bassa frequenza di cellule TCR $\gamma\delta$ ⁺, fa sì che il *background* dei geni TCR δ riarrangiati sia basso (van Dongen JJM and ILM Wolvers-Tettero, 1991). Da qui deriva il basso numero di riarrangiamenti policlonali e il basso limite della tecnica a rilevare le bande policlonali, capacità che dipende dalla frequenza dei riarrangiamenti genici nei linfociti normali e dalla frazione di linfociti normali (van Dongen JJM and ILM Wolvers-Tettero, 1991).

Le analisi SB e PCR hanno mostrato che i *pattern* alla diagnosi e ai *follow-up* e alle ricadute dei campioni sono identici e che i *target* PCR investigati sono stabili nel corso della malattia. I campioni 10633-11449 (LNH-LLA),

3050-3879 (SLP), 3520-3814 (LGL-SLP), 3608-3647 (LLA), 11904-11968 (MGUS), 10471-10523 (LLC-SLP), 11963-12020 (HES), 12128-12197 (HES), 11890-12026 (HES), 2543-3771 (LLC), 4585-9052-10112 (LGL), 10386-10648-12320 (HES), 5279-11433 (LLC), hanno mostrato *pattern* alla diagnosi e ai *follow-up* tra loro confrontabili come mostrato in appendice 13, mantenendo la positività per i riarrangiamenti V δ 1-J δ 1 (7/18), per D δ 2-J δ 1 e V δ 3-J δ 1 (5/18), per V γ 9-J γ 1.1/2.1 e V γ 9-J γ 1.3/2.3 (10/18) e per V γ 10-J γ 1.3/2.3 (8/18). Questi risultati sono congrui con quelli riportati da Szczepanski T *et al.*, (2002), per il quale i riarrangiamenti TCR γ sono stabili nel 75% di campioni LLA e TCR δ incompleti nel 63% (V δ 3-J δ 1, D δ 2-D δ 3 e V δ 2-D δ 3) e, quindi, tali riarrangiamenti potrebbero avere un valore prognostico, come sostenuto da Diaz MA *et al.*, (1997) e Green E *et al* (1998).

3.3.2 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici della catena pesante delle immunoglobuline (IgH)

In questa fase sono stati costruiti 13 primer, 5 per il *locus* V e 6 per il *locus* D allo scopo di rilevare tutti i riarrangiamenti completi VJ ed incompleti DJ. Tra i primi, due *primer*, Vh1/7 e Vh4/6, sono stati costruiti in modo avere doppia specificità per il segmento Vh1 e Vh7 e Vh4 e Vh6, rispettivamente. Tutti i *primer* senso sono stati costruiti in modo da essere famiglia-specifici e hanno mostrato omologia con tutti i segmenti genici funzionanti della rispettiva famiglia V, mentre il *primer* antisense è stato costruito sulla regione conservata *consensus* di tutti e 6 i segmenti Jh. Tutte le combinazioni di *primer*, riportate in paragrafo 2.4.2, hanno fornito PCR robuste, amplificando 204/246 campioni e validando l'uso degli stessi per l'identificazione alla diagnosi, per l'analisi di sequenza delle regioni giunzionali e per la detenzione delle malattia minima residua (MRD) nei campioni *follow-up*, rilevando cloni nel 100% di casi di HCL, PV, LGL, LPC e MIP; nel 96% di LLC, nel 89%-90% di LNH e SLP, nell'87% di LLA e PNL, nel 57%-50% di casi con HES e con HES-LV, nel 69%-67% di LMC, consentendo la diagnosi del 95% dei processi linfoproliferativi B. I campioni 5379, 3678 (LNH) e 5515 (SLP), infatti, che sono stati trovati negativi al SB per la clonalità, sono risultati positivi come mostrato in appendice 14.

La clonalità per Vh è stata osservata, dopo analisi DHPLC, in 163/246 campioni analizzati e quella per Dh in 204/246 campioni testati sebbene non sia stato possibile discriminare tra prodotti monoclonali e biclonali, che è una capacità propria della metodica SB, la quale analizza porzione estese di genoma.

Questo sistema di singole PCR, però, ha mostrato che i riarrangiamenti possono essere diagnosticati sia in MB che in PB, sebbene accompagnati dalla co-amplificazione dei riarrangiamenti di DNA da cellule normali. I campioni 3721-3725 da PB e MB, rispettivamente, di uno stesso paziente con SLP alla diagnosi, hanno mostrato gli stessi riarrangiamenti Vh5-Jh, Dh1-Jh e Dh2-Jh; così come i campioni 11444-11445 da PB e MB di un

paziente con LNH alla diagnosi, sono risultati positivi per i riarrangiamenti Vh4/6-Jh e Dh2-Jh (appendice 14).

I campioni 12217 (pancitopenia), 10614 (SMD), 10285, 10269 (LLC), 10776, 4696, 11173 (SLP), pool, risultanti positivi per l'amplificazione di quasi tutti i segmenti VD, sono stati identificati oligoclonali alla diagnosi secondo quanto indicato da Szczepanski T. *et al.* (1999), mentre solamente 37 campioni sono risultati negativi per la clonalità. Se si considerano negativi i campioni che hanno mostrato soltanto il riarrangiamento Dh7-Jh, il quale può essere amplificato anche in configurazione germinale (non riarrangiata), perché posto immediatamente a monte del *locus* J sul cromosoma 14 (appendice 1), il numero di campioni negativi è stato 67/246 campioni.

Sono state ottenute amplificazioni monoclonali in 31 casi di malattia linfoproliferativa T, incluse le linee cellulari Jurkat e Karpas e il campione CPA 1, dimostrando che i *primer* non sono linea-linfocitaria specifici, a differenza di quanto riportato da Trainor KJ *et al.*, (19991).

La maggior parte dei campioni testati ha mostrato i riarrangiamenti Vh3-Jh (106/246), Vh5-Jh (93/246), Dh1-Jh (96/246) e Dh7-Jh (154/246), a differenza dei campioni testati da Szczepanski T *et al.* (1999), che hanno mostrato un uso preferenziale del segmento Dh6 e un uso preferenziale dei segmenti Dh più a valle e più vicini al *locus* J. Tale uso preferenziale di alcuni segmenti, riscontrato anche da Davi F *et al.* (1996), sembra contraddire, almeno apparentemente, l'assunto secondo il quale i segmenti V hanno in teoria uguale probabilità di essere selezionati per i riarrangiamenti. Il maggior numero di riarrangiamenti Vh3-Jh riscontrato in quasi tutte le malattie linfoproliferative B è sicuramente imputabile al fatto che la famiglia Vh3 è la più grande contenendo 64 dei 123 segmenti Vh, ma anche a preferenzialità d'uso. Tale segmento Vh3 è stato riscontrato più frequentemente nella LLC (36/48) e nelle SLP (28/44), dove esiste una proporzionalità diretta tra il tasso di uso del suddetto segmento e la sua relativa vicinanza al *locus* J, come evidenziato da Mortuza FY *et al.*, (2001), il quale ha riscontrato anche un uso predominante del segmento Vh6 e Vh5 nelle LLA B. Quest'ultimo dato è stato registrato anche nel presente studio dove il segmento Vh5 è stato rilevato, invece, in 17/34 campioni con LLA, in 27/48 con LLC e in 6/8 PNL. In questi ultimi sono stati riscontrati con uguale frequenza i segmenti Dh1 e Dh7 (6/8), il quale è stato amplificato anche in 26/34 pazienti LLA e 36/48 pazienti con LLC. I campioni con MIP hanno tutti amplificato per i segmenti Vh5 e Vh4, come nello studio di Li A. *et al.*, (2004), e Dh1 come i 27/48 campioni con LLC. In ultimo, il segmento Dh4 è stato, invece, sottorappresentato anche nelle LLA, come confermato da Li A *et al.*, (2004). Tali risultati supportano l'ipotesi di Li A *et al.*, (2004) per la quale l'ordine cromosomico può in parte regolare il riarrangiamento delle sequenze Vh e quella di Mortuza FY *et al.*, 2001, per la quale l'uso inaspettato di singoli geni Vh potrebbe essere il risultato del processo leucemogenico guidante un pattern non naturale piuttosto che riflettere la realtà degli eventi normali, suggerendo che la trasformazione delle cellule in LLA avviene negli stadi precoci dello sviluppo delle cellule B. Analoghe

ipotesi possono essere formulate per spiegare l'uso preferenziale dei segmenti Dh e Jh, che secondo Li A *et al.*, (2004), potrebbe dipendere dalla presenza di specifiche sequenze RSS o dall'attività di proteine chinasi DNA-dipendenti che interagendo con la Terminildeossittransferasi (TdT) regolano l'espressione dei segmenti allo *step* della legazione.

Le analisi SB e PCR (appendice 13) hanno mostrato che i *pattern* alla diagnosi e ai *follow-up* e ricadute dei campioni: 3050-3879 (SLP), 3520-3814 (LGL-SLP), 3608-3647 (LLA), 11904-11968 (MGUS), 10471-10523 (LLC-SLP), 12128-12197 (HES), 2543-3771 (LLC), 4585-9052-10112 (LGL), 2198-4648-10680-11603 (LNH), 11532-11190 (LPC), 10475-11538 (LLA), 5279-11433 (LLC), sono tra loro confrontabili e che i *target* PCR investigati sono stabili. Di questi campioni, infatti, 7/18 hanno mantenuto la positività per i riarrangiamenti Vh5-Jh, 8/18 per Dh1-Jh, 4/18 per Vh3-Jh e Vh4/6-Jh e 5/18 per Dh2-Jh. Questi risultati sono congrui con quelli riportati da Szczepanski T *et al.* (2002), per il quale i riarrangiamenti IgH sono stabili nel 64% di campioni LLA e, quindi, aventi un probabile valore prognostico, come sostenuto anche da Diaz MA *et al.*, (1997) e Green E *et al.* (1998). Sebbene non siano stati così raramente rilevati nelle LLA-T, come sostenuto dallo stesso Szczepanski T *et al.* (1999), i riarrangiamenti IgH sono stati per lo più incompleti.

Tra i campioni PNL analizzati, PNL2 e PNL5 sono risultati positivi per la clonalità. Ciò è compatibile con quanto riportato da Deane M. e JD Norton, (1991), i quali ottennero risultati pseudo-monoclonali da campioni di pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto, dove un limitato numero di riarrangiamenti coinvolgenti differenti famiglie Vh può rappresentare una popolazione oligoclonale B, che può cambiare nel tempo. Il metodo, quindi, efficacemente scannerizza l'intero repertorio di riarrangiamenti genici IgH ed è capace di rilevare rari cloni o popolazioni di cellule linfoidi B oligoclonali, anche attraverso il decorso della malattia (Deane M. and JD Norton, 1991), rilevando con alta sensibilità (circa 10^{-4}) riarrangiamenti clonali IgH coesistenti in un contesto di popolazioni B normali.

3.3.3 Amplificazione PCR del gene costitutivamente espresso Rask2e

Il DNA di tutti i campioni testati in questo lavoro è stato sottoposto a reazione PCR per la rilevazione del gene costitutivamente espresso Rask2e. I 246 campioni hanno prodotto il frammento atteso di 250bp (dati non mostrati), indicando che la negatività ottenuta nelle diverse metodiche PCR è da ascrivere all'effettiva mancanza di riarrangiamenti clonali nel campione e non alla cattiva qualità e quantità del DNA in reazione.

3.3.4 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle catene gamma del recettore delle cellule T (TCR γ) mediante strategia *multiplex*-PCR.

L'analisi *heteroduplex* (HD) è stata ristretta al *locus* γ eseguendo 2 reazioni

per ciascun campione, come indicato nel paragrafo 2.4.4 dei materiali e metodi. Il riarrangiamento clonale ha dato origine all'analisi HD all'*homoduplex* ed è stato visualizzato come una singola banda intensa, sottile e ben definita di 170-230bp, riflettendo il diverso numero di nucleotidi rimossi ed inseriti alle giunzioni VDJ, mentre quello derivante da una popolazione policlonale eterogenea di linfociti T ha dato origine all'*heteroduplex* visualizzato su gel come una serie di bande comprese fra 170bp e 230bp in un'unica banda larga e diffusa. I prodotti *homoduplex* sono stati costituiti in tutti i casi da una o 2 bande migranti velocemente e sono stati spesso prodotti anche 2 bande meno intense e migranti lentamente, ottenute dall'amplificazione di geni simili su entrambi gli alleli (dati non mostrati). In alcuni campioni i 2 *homoduplex* hanno mostrato soltanto una piccola differenza nella mobilità sul gel o sono co-migrati, come riportato da Bottaro M *et al.*, (1994), riflettendo, almeno in teoria, la presenza di due cloni diversi. Sia per la *mix* I che per la *mix* II sono state riscontrate bande addizionali alle monoclonali *homoduplex* con peso molecolare maggiore di 500bp, che non hanno complicato l'interpretazione dei risultati e potrebbero essere dovute alla formazione di *heteroduplex* fra due regioni giunzionali VDJ (riarrangiamenti biallelici), o all'amplificazione delle regioni giunzionali VDJ dai segmenti J γ 1.1/2.1 e J γ 1.3/2.3 vicini, dove i *primer reverse* possono anche essere appaiati, come proposto da Garcia-Sanz R *et al.* (1999). L'amplificazione clonale è stata stabilita, dopo analisi al DHPLC e/o HD, per 130/246 campioni: in particolare, 100/246 campioni sono risultati positivi per i riarrangiamenti della *mix* I, 70 per quelli della *mix* II, 40 di questi sono risultati positivi anche per entrambe le *mix* e solo 56 campioni sono risultati positivi per la *mix* I e negativi per la *mix* II (appendice 12). Questa minore efficienza di amplificazione dei *primer* della *mix* II è imputabile al fatto che i *primer* che la compongono sono omologhi ai segmenti V usati raramente, infatti, i *primer* della *mix* I sono omologhi ai segmenti V2-V3-V4-V8-V9 che sono usati in quasi tutti i riarrangiamenti TCR γ in cellule normali di PB e nelle LLA T e in molte LLA B (Trainor KJ *et al.*, 1991). La *mix* II ha, però, prodotto amplificazione in molti dei campioni da pazienti con HES e LMC, suggerendo per queste patologie un probabile uso non random dei segmenti in gioco nei riarrangiamenti. I riarrangiamenti monoclonali del gene TCR γ non sono specifici di questa determinata linea, essendo presenti nel 75% dei casi con LLA B e meno comuni nei casi di NLH B, ma sono assenti nei casi di LLC B e mielomi. Le miscele dei *primer* così preparati, pertanto, sono state in grado di rilevare cloni nel 100% di HCL, pancitopenia, neutropenia, LGL e LPC, 67% di MIP, 60-62% di LNH, SLP e LLA, 50% di casi con HES-LV, 38-40% di LLC e LMC e HES, 13% di casi nei PNL, consentendo la diagnosi del 90-95% dei processi linfoproliferativi T. L'analisi SB e HD (appendice 13) hanno mostrato completa concordanza in 17/18 casi, perché il campione 4757 (SLP), risultato monoclonale all'analisi SB non ha prodotto amplificazione con questa metodica, ma è risultato clonale per i riarrangiamenti dei geni delle

IgH sia con la metodica singole PCR sia *semi-nested* PCR (paragrafi 2.4.2 e 2.4.5). Secondo Trainor KJ *et al.* (1991), una tale situazione riflette o una sensibilità subottimale della PCR rispetto al SB o un mancato *priming* della PCR, dovuto all'uso nel riarrangiamento di regioni V inusuali, o a difetti di mutazione TCR γ deleteri nella regione di omologia con i *primer*, che avvengono frequentemente (fino al 100%) in cellule T mature e del timo e risultano in trascritti non funzionali (Dippel E *et al.*, 1999), o in inversione dei geni (Trainor KJ *et al.*, 1990).

3.3.5 Amplificazione PCR dei riarrangiamenti genici delle catene pesante delle Immunoglobuline (IgH) mediante strategia *semi-nested* PCR.

Per velocizzare la procedura, è stata messa a punto una strategia di *semi-nested* PCR amplificante la porzione *framework* (FR2) della regione V delle IgH dei geni riarrangiati e considerando positivi, dopo confronto dei risultati dell'analisi al DHPLC e HD, 130/246 campioni. Questi hanno mostrato, all'HD una singola banda intensa, sottile e ben definita di 240-260bp e rappresentante l'*homoduplex* originato dal riarrangiamento clonale. Sono stati considerati positivi anche i campioni che, costituiti da una miscela di cellule B tumorali (clonali) e di cellule B reattive, hanno prodotto la banda ben definita sintomo della clonalità su un insieme di bande multiple. I campioni, invece, che hanno prodotto all'HD una serie di bande comprese fra 240-260bp in un'unica banda larga e diffusa sono stati considerati policlonali e quindi negativi, perché costituiti da una popolazione eterogenea di linfociti B. La diversa grandezza delle bande è stata direttamente proporzionale al diverso numero di nucleotidi rimossi ed inseriti alle giunzioni VDJ. Con tale metodica non sono state prodotte amplificazioni per i campioni affetti da PV, pancitopenia, neutropenia, HES, come mostrato in appendice 14, ed è stato possibile confermare la diagnosi nel 75-90% dei processi linfoproliferativi B, incluse le LLA B, le LLC B, i LNH B e i mielomi, con una sensibilità di 10^{-3} in un *background* di cellule B normali caratterizzate da pochi diversi riarrangiamenti (Deane M. and JD Norton, 1991).

Tale sensibilità potrebbe essere la conseguenza di un significativo *mismatch* dei *primer* all'estremità 3' dei frammenti Vh, come ipotizzato da Aubin J *et al.* (1995) per spiegare la mancata amplificazione dei segmenti Vh6 e Vh5. Tale sensibilità, inoltre, è paragonabile a quella ottenuta con l'analisi SB, che ha mostrato completa concordanza con l'analisi HD in 42/48 casi. I campioni 5656, 5865 (LLC), 5637 (LNH), 3766 (SLP), 3309, 2959 (LLA B), infatti, risultati monoclonali al SB non hanno prodotto amplificazione con questa metodica, come trovato anche da Trainor KJ *et al.*, (1991). Di questi, i campioni 3309 e 2959 sono risultati positivi sia all'analisi singole PCR TCR $\gamma\delta$ che *multiplex* PCR, riflettendo o una sensibilità subottimale della PCR rispetto al SB o un mancato *priming* della PCR, dovuto all'uso nel riarrangiamento di regioni V inusuali, che impediscono l'appaiamento dei

primer stessi al *target*, o a traslocazione, come la t(14;18), che causano un'ampia separazione dei siti di legame dei *primer* (Trainor KJ *et al.*, 19991). Una simile spiegazione può essere addotta per spiegare la negatività riscontrata nei campioni 5656 (LLC), 11378 (LNH), 4877 (SLP), 12323 (HES), che sono risultati positivi solamente per il riarrangiamento Vh5 in singole PCR (appendice 14). Come osservato da Aubin J *et al.* (1995), il *primer consensus* FR2A fallisce a rilevare i riarrangiamenti coinvolgenti i segmenti Vh6 e il meno esteso Vh5, segmenti presenti in molti repertori genici di leucemie B mature e immature. I campioni 5379 (LNH) e 5515 (SLP) sono stati trovati clonali contrariamente ai risultati del SB, mentre il 3678 (LNH) ne ha confermato la negatività. La più bassa sensibilità di detenzione dei riarrangiamenti nei LNH può essere stata causata dal più alto tasso di mutazione somatica in questi disordini, come ipotizzato da Aubin J *et al.*, (1995). Nessuno dei 61 controlli negativi, tra i campioni di pazienti affetti da HES e LMC, ha prodotto risultati monoclonali con tale tecnica, mentre all'analisi PCR su gel d'agarosio 27 hanno mostrato un *pattern* clonale e uno di questi ha mostrato un risultato falso-positivo in *semi-nested* PCR. Poiché tali risultati sono visualizzati come un segnale amplificato discreto derivante da una popolazione monoclonale che è immerso in un segnale diffuso di fondo derivante da una popolazione policlonale presente insieme a quella monoclonale, la sensibilità della tecnica è dipesa dai numeri relativi di linfociti mono- e policlonali presenti nel campione in analisi (Pongers-Willemse MJ *et al.*, 1999) e, quindi, è stata limitata dalla specificità con cui i prodotti PCR clonali possono essere discriminati dai prodotti PCR delle cellule B normali (Deane M. and JD Norton, 1991), cioè dal numero di *homoduplex* clonali formati. Maggiore, infatti, è stato il numero di cellule policlonali nel campione e minore è stato il numero di *homoduplex* derivanti da cellule monoclonali e, pertanto, la sensibilità della tecnica è dipesa dalla capacità di rilevare gli *homo- versus* (vs) gli *heteroduplex*.

3.4 Analisi *Heteroduplex* (HD)

Per distinguere i prodotti ottenuti da popolazioni monoclonali e policlonali con le *multiplex* PCR e *semi-nested* PCR è stata condotta l'analisi degli *heteroduplex* (HD), che discrimina gli *homo-* e gli *heteroduplex* su gel di sequenza. In tal modo sono stati evitati risultati falsi-positivi generati dall'amplificazione *background* di riarrangiamenti simili in linfociti B e T reattivi. Gli *homoduplex*, come detto precedentemente, sono derivati dai geni TCR/IgH riarrangiati in maniera clonale, mentre gli *heteroduplex* da quelli di cellule policlonali. Questi sono stati formati attraverso la denaturazione/rinaturazione dei prodotti delle *multiplex* e *semi-nested* PCR a temperature di rinaturazione diverse. La rinaturazione eseguita a temperature di 30-40°C per 1h ha permesso una visualizzazione più chiara dei 2 *homo-* ed *heteroduplex* sul gel, mentre quella a T amb (circa 22°C) ha generato dei *duplex* non completi rendendo visibili anche i prodotti ssDNA, i quali hanno migrato più lentamente sul gel e sono stati evidentissimi con

rinaturazione a 10-4°C. A tale temperatura, però, è stata registrata una diminuzione dell'intensità delle bande *duplex* (dati non mostrati), che potrebbe essere dovuta al più lento processo di rinaturazione dei filamenti, come ipotizzato da Langerak AW *et al.*, (1997). In tutti i casi, interessanti, i frammenti ssDNA hanno mostrato differenti *pattern* di migrazione a differenti temperature di rinaturazione (dati non mostrati), suggerendo che la conformazione dei prodotti di ssDNA è temperatura-dipendente.

La rinaturazione è stata eseguita anche a differenti intervalli di tempo da 15min a 60min per gli amplificati dei campioni precedentemente testati per SB ed aventi diagnosi clinica di LLA e LLC. Come evidenziato da Langerak AW *et al.* (1997), il periodo di tempo impiegato per la rinaturazione non ha avuto alcun effetto sulla formazione del *duplex*. Confrontando l'intensità delle bande prodotte, i massimi livelli di formazione di *duplex* sono stati ottenuti con periodi di tempo di rinaturazione di 30-45min e solo una leggera diminuzione nella loro formazione è stata osservata rinaturando per 15min; mostrando, così, di dipendere ampiamente dalla temperatura di rinaturazione piuttosto che dalla durata del processo. Sebbene la formazione di *duplex* sia risultata migliore alla temperatura di 40°C, la clonalità è stata meglio visualizzata quando la rinaturazione è avvenuta a 4°C, soprattutto nei casi di campioni con carica clonale piccola. Ciò può derivare dal fatto che il movimento delle molecole, come sostenuto da Langerak AW *et al.* (1997), a temperature di 30-40°C produce la formazione non casuale dei *duplex* non clonali per il preferenziale appaiamento del ssDNA "matching". Di conseguenza, a tali temperature sono presenti molti homoduplex non clonali con grandezza e distribuzione Gaussiana come testimoniato dalle bande deboli e larghe prodotte dai PNL1, PNL4, dal pool e dalla placenta (dati non mostrati). Tali bande false-positive sono state maggiormente prodotte con frammenti PCR più grandi di 600bp, dove il contributo della regione giunzionale all'intera grandezza del frammento è alto.

La temperatura ottimale di rinaturazione, quindi, è stata quella di 4°C, perché la minore formazione dei *duplex* è stata compensata dalla rinaturazione ON, senza formazione di bande false positive nella placenta e nei PNL. Per i pazienti con LLA e LLC testati per SB e, quindi, la rinaturazione a 4°C per 5min ha prodotto bande clonali maggiormente distinguibili dal *background* policlonale e, pertanto, tale temperatura è stata utilizzata per le analisi dei campioni, risultando sufficientemente sensibile per monitorare i pazienti con LLC nel corso della malattia.

3.5 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC).

Per discriminare tra prodotti clonali e policlonali gli amplificati ottenuti sono stati analizzati al Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ed i risultati ottenuti sono stati illustrati nel paragrafo 3.3 dei risultati.

3.5.1 Induzione formazione *duplex*

Sono state eseguite prove di denaturazione/rinaturazione dei prodotti PCR con i *primer* V γ 1-J γ 1.3/2.3 dei campioni precedentemente testati per SB, prima delle loro corse al DHPLC. Tali prove hanno mostrato che il riscaldamento del prodotto PCR non migliora il tasso di detenzione, né la risoluzione dei picchi risultanti. Tale passaggio, di conseguenza, è stato omesso per la discriminazione dei prodotti clonali ottenuti con le metodologie descritte nei paragrafi 2.4 per evitare l'aumento del rumore di fondo.

3.5.2 Determinazione delle condizioni di corsa DHPLC in gradiente lineare TEAA.

La sensibilità e la realizzabilità del metodo sono stati saggiati per il riarrangiamento più comune V γ 1-J γ 1.3/2.3, usando le linee cellulari Jurkat e Reh e i campioni 3126 (LLA B), con stato biclonale attestato per SB, e pool, con stato oligoclonale attestato per *multiplex*-PCR.

Le condizioni di corsa sono state stabilite attraverso l'analisi della temperatura di quasi denaturazione (*melting curve*) dei punti di fusione (*melting point*) con il software *Wavemaker* (Transgenomic) e il calcolo dell'Algoritmo di *Stenford*, come indicato in materiali e metodi. Un tipico profilo di eluizione è stato costituito da un picco molto ampio all'inizio della corsa, costituito dalle proteine e dagli acidi nucleici nel campione iniettato che migrano nella colonna DHPLC senza legarsi, e da picchi successivi con aree di aumentata intensità del segnale nei primi minuti di corsa, che possono rappresentare alcuni complessi denaturati e non usati come indicatori di un *heteroduplex*. I tempi di ritenzione sono stati diversi da corsa a corsa e qualche volta anche nella stessa corsa. Ciò è probabilmente dovuto alle sottili variazioni delle condizioni nella colonna e/o nella concentrazione di acetonitrile nel tampone di corsa, senza intaccare l'interpretazione dei risultati. In presenza di una costante temperatura di parziale denaturazione e di gradiente chimico denaturante, l'*heteroduplex*, che ha una più bassa temperatura di *melting*, ha eluito prima dell'*homoduplex* (Bardwell PD *et al.*, 2002).

I risultati DHPLC sono stati così interpretati: 1 o 2 picchi prominenti hanno indicato la monoclonalità (monoallelica e/o biallelica), 3 o 5 picchi prominenti hanno indicato l'oligoclonalità e più di 5 picchi hanno indicato la policlonalità, secondo le indicazioni di Dippel E *et al.* (1999). La *pseudo*-monoclonalità è stata discriminata per confronto della grandezza dei frammenti da amplificazioni ripetute separatamente dello stesso campione e mostranti profili di eluizione diversi, che non hanno riprodotto la monoclonalità.

3.5.2.1 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite "temperature mapping".

Poiché differenti regioni giunzionali possono portare a differente stabilità di temperature della configurazione elicoidale, influenzando i *pattern* di ritenzione di 1-2°C sotto i punti di *melting*, per stabilire con precisione la temperatura della colonna DHPLC alla quale correre i campioni è stata eseguita una *Temperature Mapping*.

I profili di eluizione delle linee Jurkat, Reh, pool e 3126 sono stati studiati, pertanto, alla temperatura di 50°C, quando tutto il prodotto PCR è in conformazione dsDNA, e a diverse temperature della colonna, tra 52°C e 70°C e percentuale di tampone B del 40% a inizio corsa e del 72% a fine corsa, con un incremento del 2%/min dello stesso (appendice 15). Tale *temperature mapping* ha chiarificato come il comportamento di *melting* dei prodotti sia stato influenzato dalla composizione in coppie di basi delle sequenze date. Le regioni ricche in AT nella prima parte dei prodotti, infatti, sono state eluite ad una temperatura di 56°C, mentre la gran parte delle regioni giunzionali che sono risultate ricche in contenuto GC, portante ad una più alta stabilità della temperatura, sono state risolte ad una temperatura di 58-59°C. Quando sottoposti alla *temperature mapping* la grandezza della regione giunzionale influenza la sensibilità della metodica, perché quella con limitato o con nessun nucleotide inserito ha generato rumore di fondo nell'analisi DHPLC.

Il pool policlonale, infatti, è stato eluito in un singolo picco con corse a temperature da 50°C a 56°C, producendo una curva ad andamento Gaussiano solo a 57°C e tra 10 e 12min (appendice 15). Ciò è in accordo con la letteratura (Huber CG, 1998 e zur Stadt U *et al.*, 2001), che descrive una *performance* di discriminazione sulla lunghezza di 1-3% alle condizioni di non denaturazione: un prodotto, ad esempio, di 530bp con una variazione di lunghezza (distribuzione gaussiana) di circa 20 nucleotidi non può essere discriminato se non a temperature di "quasi denaturazione". Con temperature più alte, questo picco è stato dissolto ed una curva più ampia è stata eluita più precocemente dalla colonna. I prodotti clonali delle linee Jurkat (LLA T) e Reh (LLA B), invece, hanno mostrato distinti picchi (clonali) alle temperature fino a 60°C per poi denaturarsi totalmente in singoli filamenti ed eluire in una curva ampia (appendice 15).

Il campione biconale 3126, ancora, è stato eluito in 3 picchi distinti, 2 con uguale altezza ed area, alle temperature fino a 58°C: da 59°C ha mostrato la degradazione dell'amplificato con relativa riduzione dell'altezza del picco eluito a circa 10min (appendice 15). La migliore risoluzione è stata ottenuta con corse a 57°C. La temperatura ottimale per la discriminazione dei prodotti d'amplificazione con la coppia di primer V γ 1-J γ 1.3/2.3, pertanto, capace di discriminare tra i diversi tipi di clonalità, è stata stabilita essere di 58°C.

3.5.2.2. Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite *Wavemaker* - Transgenomic.

Il software *Wavemaker* dello strumento DHPLC ha permesso di definire il *melting point*, la temperatura alla quale il 50% del prodotto PCR ha una struttura ad elica, e la percentuale della frazione di elica vs la temperatura a partire dalla sequenza di 532bp prodotta per unione dei 2 segmenti germinali V γ 1 e J γ 1.3 riarrangiati senza nessuna diversità e pubblicata da zur Stadt U *et al.* (2001). Per tale sequenza il software ha evidenziato la presenza di due domini di *melting* alle rispettive temperature di 56°C e 59°C, dimostrando anche che i prodotti con la suddetta sequenza restano in configurazione dsDNA fino alla temperatura di 55°C, mentre a 65°C tutti i prodotti sono completamente a ssDNA. Alla luce di tutto ciò, software ha predetto due temperature ottimali per l'eluizione dei prodotti PCR con i primer V γ 1-J γ 1.3/2.3 a 56°C e 58°C, come ottenuto come la *temperature mapping*. Con questo programma sono state predette le temperatura di "quasi denaturazione", per le restanti 15 *mix* PCR del TCR e le 12 *mix* PCR per i geni IgH, analizzando: 265 riarrangiamenti IgH completi (VDJ) ed incompleti (DJ) ottenuti unendo le sequenze germinali delle 7 famiglie V, delle 7 famiglie D e dei 6 segmenti J, 45 riarrangiamenti TCR γ ottenuti unendo le sequenze germinali delle 4 famiglie V e dei 4 segmenti J1/2 e JP1/2 e 16 riarrangiamenti TCR δ completi (VDJ, VDD e VDDJ) ed incompleti (DJ, DD e DDJ), tutti ottenuti unendo le sequenze germinali della *Genebank* del sito *ImMunoGeneTics* (IMGT, <http://imgt.cines.fr>) riarrangiati in maniera casuale senza delezioni o aggiunte nucleotidiche come mostrati in appendice 9. Le analisi prodotte hanno fornito il *range* di temperature ottimali presentato in appendice 16.

3.5.2.3 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite Algoritmo di *Stanford*.

Tale temperatura di 58°C per l'eluizione ottimale dei prodotti di 532bp prodotta per unione dei 2 segmenti germinali V γ 1 e J γ 1.3 riarrangiati senza nessuna diversità e pubblicata da zur Stadt U *et al.* (2001) è stata confermata anche dal *melting point* del sito dell'Università di *Stanford* (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>), che ne ha calcolato l'omonimo algoritmo e proponendo anche un *range* di temperatura di 57-59°C e di gradiente di tampone di TEAA ai quali analizzare i campioni (appendice 16). Con questo programma *online* sono state calcolate le temperatura di "quasi denaturazione" per le restanti 15 *mix* PCR del TCR e le 12 *mix* PCR per i geni IgH, analizzando: 265 riarrangiamenti IgH completi (VDJ) ed incompleti (DJ) ottenuti unendo le sequenze germinali delle 7 famiglie V, delle 7 famiglie D e dei 6 segmenti J, 45 riarrangiamenti TCR γ ottenuti unendo le sequenze germinali delle 4 famiglie V e dei 4 segmenti J1/2 e JP1/2 e 16 riarrangiamenti TCR δ completi (VDJ, VDD e VDDJ) ed incompleti (DJ, DD e DDJ), tutti ottenuti unendo le sequenze germinali della *Genebank* del sito *ImMunoGeneTics* (IMGT, <http://imgt.cines.fr>) riarrangiati in maniera casuale

senza delezioni o aggiunte nucleotidiche come mostrati in appendice 9. Le analisi prodotte hanno fornito il *range* di temperature ottimali presentato in appendice 16.

3.5.2.4 Confronto dei risultati delle corse prodotte dai metodi *mutation detection* ed *universal liner*.

Allo scopo di ridurre il tempo di corsa e, di conseguenza, la quantità di tampone consumato, il gradiente di TEAA è stato tarato sull'area discriminante i prodotti PCR con i *primer* V γ 1-J γ 1.3/2.3 applicando il programma "*mutation detection*", il quale ha variato il gradiente in modo da migliorare la risoluzione tra i 3min e gli 8min della precedente corsa in gradiente lineare di tampone, iniziando la corsa a 50.7% di tampone B e finendola a 59.7% dello stesso con un incremento del 2%/min. L'analisi con questo gradiente più corto ha mostrato profili di eluizioni ottimali per i campioni Jurkat e Reh, amplificati con la coppia di primer V γ 1-J γ 1.3/2.3, con temperature minori, pari a 56.3°C, mentre ha mostrato una negativizzazione dei campioni pool, come atteso, e 3126 (appendice 17). Questo risultato ha sì confermato l'assunto che con rapide variazioni di gradiente la colonna cromatografia raggiunge le condizioni ideali per la separazione più velocemente, circa 2°C in meno e corsa più breve, di quanto avvenga in gradiente lineare, ma confrontandone i profili di eluizione con quelli prodotti dagli stessi campioni corsi a 54.3-55.3-56.3-57.3°C in condizioni di gradiente lineare di TEAA (40% tampone B ad inizio corsa e 72% a fine corsa con incremento del 2%/min), è stato possibile constatare che la rapida variazione di gradiente produce un effetto di "slargamento" del picco di eluizione anche sulle linee cellulari Jurkat e Reh (appendice 17), con possibile induzione dell'operatore ad erronea interpretazione dei risultati dell'analisi. Le condizioni migliori, pertanto, per poter analizzare campioni con clonalità non nota sono state stabilite le corse lunghe circa 20min in gradiente lineare di TEAA a 58°C per i prodotti PCR con i *primer* V γ 1-J γ 1.3/2.3. Nessun artefatto genomico o picco *heteroduplex*, in ogni caso, è stato osservato nel corso di queste analisi. Per testare l'effetto delle variazioni di sequenza da sole e in combinazione con le differenze di lunghezza e per saggiare il rischio di risultati falsi-negativi con popolazioni minori, miscele con uguali volumi (V/V) dei prodotti monoclonali (Jurkat+Reh), di quelli monoclonali con i biclonali (Reh+3126, Jurkat+3126), di quelli monoclonali con i policlonali (Jurkt+pool, Reh+pool) e di quelli policlonali con i biclonali (pool+3126) derivanti dall'amplificazione della *mix* 13 PCR TCR $\gamma\delta$ (paragrafo 2.4.1 dei materiali e metodi) sono stati analizzati attraverso iniezioni seriali dopo denaturazione e rinaturazione per l'induzione degli *heteroduplex*, ottenendo livelli di sensibilità confrontabili con quelli prodotti dai campioni con popolazioni monoclonali. Quest'analisi, in particolare, ha prodotto per la miscela Reh+Jurkat due picchi separati di eluizione. Poiché i due amplificati non differivano nella lunghezza del frammento in analisi (523bp), ma nella regione giunzionale, i profili di

eluizione dell'analisi DHPLC sono stati altamente sequenza-specifici ed hanno mostrato un distinto tempo di ritenzione (appendice 18). La separazione in base alla lunghezza ha giocato, quindi, solo un ruolo marginale alle condizioni di parziale denaturazione, a differenza delle analisi su gel (zur Stadt U *et al.*, 2001). A conferma di quanto appena sostenuto, l'analisi della miscela V/V degli amplificati pool+3126, Jurkat+pool, Jurkat+3126 ha mostrato picchi di eluizione separati e distinti per ogni campione in gioco, mostrando che la metodica è stata capace di discriminare anche il rumore di fondo dall'amplificazione dei riarrangiamenti policlonali in cui è immerso il riarrangiamento monoclonale nel campione in studio. In tal modo, è stato determinato il potere discriminante del metodo e constatare come le variazioni nelle sequenze giunzionali abbiano avuto effetti drammatici sul potere di separazione dei frammenti e sui differenti tempi di eluizione: da più di 6min a 18min, osservando la separazione solo con frammenti elicali differenti. I *target* PCR dei 2 pazienti e delle linee cellulari Jurkat e Reh sono stati usati, pertanto, per stabilire la riproducibilità della metodica per la detenzione della MRD. In tutti i casi è stato possibile risolvere i riarrangiamenti genici amplificati con sensibilità comparabile, dipendente almeno parzialmente dalla frequenza dei riarrangiamenti genici nelle cellule non tumorali, dove rari sono stati i riarrangiamenti dei geni δ e frequenti quelli dei geni γ . Ciò ha caratterizzato particolarmente i segmenti della famiglia V γ -J γ 1.3 o V γ -J γ 2.3, che avvengono frequentemente in LL Λ , come evidenziato da Pongers-Willems MJ *et al.* (1999).

3.5.2.5 Determinazione delle condizioni DHPLC in gradiente lineare TEAA tramite "temperature mapping" per le mix PCR TCR ed IgH.

Per poter analizzare ogni campione alle condizioni ottimali di gradiente di TEAA, è stata eseguita la *Temperature Mapping* per le restanti 15 *mix* del sistema PCR per i riarrangiamenti genici del TCR e per le 12 *mix* PCR per i geni IgH (paragrafo 2.4), i prodotti monoclonali di Jurkat e Reh, policlonali del pool e biconali di 3126 e dei campioni 5315, 3050, 3391, 3369, 5637, 3561, 5164, 3647, 4696, 5538, 3333, 3814, 5960, 5858, 5181, 3879, 5493, 3255, 3555 per il TCR e 5084, 4696, 3608, 5538, 3669, 5181, 4757, 5379, 5279, 5164 per le IgH alle seguenti temperature:

per TCR $\gamma\delta$ 50-52-54-55-56-57-58-60-62°C

e per IgH 50-54-56-58-59-60-62-64-66°C.

iniziando le corse in presenza del 40% tampone B e finendole a 72% dello stesso con incremento del 2%/min.

Le temperature ottimali determinate per ciascuna delle *mix* in analisi sono oscillate tra 54°C e 60°C per TCR e 56°C e 62°C per IgH come schematizzato in appendice 10. Questi valori sono stati confermati sia dalle predizioni della temperatura del forno della colonna del *Wavemaker* (Transgenomic) che dal calcolo dell'algoritmo di *Stanford*, i quali hanno fornito un *range* di temperature ottimali mostrato in appendice 16. Il

confronto di tali temperature con quelle prodotte sperimentalmente ha evidenziato che quest'ultime sono state leggermente inferiori o comprese nel *range* di quelle predette dal software *Wavemaker* rispetto alle temperature calcolate dall'algoritmo di *Stanford*. Ciò si spiega tenendo presente che il *melting point* di *Stanford* calcola questa temperatura in maniera del tutto empirica, considerando il sistema ideale e non reale. Per ogni *mix* PCR, dunque, la temperatura predetta è dipesa non solo dal campione e dal tipo di campione ma soprattutto dalla diversità della sequenza in analisi. La *Temperature Mapping*, ancora, non è riuscita a determinare una temperatura ottimale per risolvere i picchi dall'amplificazione con la coppia di *primer* Dh7-Jh i riarrangiamenti effettivi da quelli prodotti in configurazione germinale. Questo perché, vista l'estrema vicinanza del segmento Dh7-27 al *locus* Jh, la quantità di amplificato omogeneo è tale da essere eluita nello stesso momento e formare un unico picco di eluizione, come mostrato per il pool in appendice 19.

3.5.2.6 Discriminazione tramite DHPLC in gradiente lineare TEAA dei prodotti derivanti dall'amplificazione multiplex-PCR e semi-nested PCR.

Per i campioni amplificati secondo *multiplex-PCR* e/o *semi-nested PCR*, dove si ha la visualizzazione di un segnale di amplificazione discreto prodotto dalla popolazione monoclonale e sovrastante un *background* di segnale di amplificazione diffuso derivante dalla popolazione policlonale (in cui il clone leucemico è immerso), i prodotti amplificati sono stati corsi in gradiente lineare di TEAA alla temperatura di 50°C (40% tampone B ad inizio corsa e 72% a fine corsa con incremento del 2%/min), risultata essere ottimale per la discriminazione del picco prodotto da amplificazione del segmento riarrangiato da quelli costituiti dai dimeri dei *primer* in miscela *multiplex* e/o da amplificazione di regioni non specifiche. I campioni che hanno mostrato un profilo di eluizione simile a quello delle linee cellulari controllo Jurkat, Reh, Karpas, CPA 1 e CPA 2 sono stati considerati positivi, mentre quelli con profili di eluizione simili ai campioni pool, placenta, EOL1, CNA sono stati considerati negativi (appendice 20). Profili complessi sono stati visualizzati con la separazione dei prodotti amplificati con la *mix* II della *multiplex PCR*, come i campioni 3520 e 3126 (appendice 20). La presenza di più picchi, generalmente doppi, evidenziati dai campioni con clonalità IgH e soprattutto da quelli con LNH di Burkitt, potrebbero essere spiegati ipotizzando che i *primer* non abbiano un'omologia 100% col *target*, per cui originano 2 gruppi di frammenti quelli omologhi al 100% coi *primer* e quelli omologhi al 100% col *target*, con conseguente differenza nel tempo di eluizione. Altra spiegazione potrebbe essere la presenza di mutazioni puntiformi nei segmenti V, che sono state visualizzate con corse DHPLC a più alte temperature e corrispondenti più basse concentrazioni di acetonitrile al 75% dei punti elica, dove la maggiore sensibilità del DHPLC di rilevare le

mutazioni produce profili di eluizione con più di un picco *heteroduplex*, come visualizzato per la *mix* 12 del pool (Bardwell PD *et al.*, 2002).

3.6 Purificazione del DNA amplificato

Per poter sequenziare i prodotti mono- e biconali riscontrati nei campioni in studio, è stato necessario purificare le bande di DNA, riamplicarlo e ripurificarlo così da arricchirlo in concentrazione e raggiungere la quantità di 20ng/100bp richiesta per il sequenziamento. Per evitare la lungaggine di una metodica preveda la doppia purificazione di un prodotto PCR da sequenziare e che non sempre ha prodotto i risultati cercati, è stato proposto di separare e raccogliere le frazioni con i segmenti di interesse al DHPLC. Le reazioni di sequenziamento allestite con tali frazioni, purtroppo, non hanno sortito i risultati sperati, perché le tracce di TEAA che inevitabilmente sono state presenti nell'eluato purificato hanno intaccano l'efficienza della procedura di sequenziamento diretto destabilizzando la polimerasi.

3.7 Sequenziamento

Allo scopo di valutare se le sequenze ottenute fossero state corrispondenti ai segmenti genici effettivamente riarrangiati o, viceversa, ad amplificati in configurazione germinale, è stato utilizzato il software *online ImMunoGeneTics* (<http://imgt.cines.fr>), seguendo le indicazioni di Li A *et al.*, 2004 per la determinazione dei segmenti D, quali della presenza di una minima omologia di almeno 6 *match* per riga o 7 *match* interrotti da 1 *mismatch*. Per determinare le relazioni tra singoli subcloni i diversi riarrangiamenti Jh/TCR per uno stesso paziente sono stati sequenziati e le sequenze allineate alle regioni VDJ del *Database del National Center of Biotechnology Information* (NCBI, Altschul SF *et al.*, 1997). Scopo del sequenziamento è stato anche quello di avere sequenze sulle quali disegnare i *primer* clone-specifici per la detenzione della MRD in un approccio ASO-RQ PCR.

3.7.1 Analisi sequenze

Molti prodotti clonali PCR sono stati confermati con il sequenziamento diretto. L'allineamento delle sequenze con quelle in *datbank* ha evidenziato una bassa omologia delle regioni CDR3 riflettente l'estesa diversità dovuta all'aggiunta dei nucleotidi della regione N tra i segmenti VD e DJ. Tali sequenze sono state idealmente ottimali per l'identificazione di sequenze clone-specifiche per la costruzione dei primer ASO da utilizzare in approcci di PCR quantitativa (RQ-PCR) per il monitoraggio della MRD, come proposto da Assaf A *et al.* (2000). L'analisi delle sequenze ha dimostrato che i riarrangiamenti possono potenzialmente produrre le proteine IgH, evidenziando un'associazione con l'uso privilegiato dei segmenti Vh e Vh3 in modo particolare. A tale proposito, la linea cellulare Reh e il campione 11899 (SLP) hanno riarrangiato i segmenti Vh3 e Jh6 (appendice 21). L'analisi di sequenza dell'amplificato della placenta ottenuto con i *primer*

Dh7-Jh e mostrante profili monoclonali al DHPLC non ha indicato né riarrangiamento genico né sequenze codificanti, perché i segmenti Dh7 e Jh1 sono stati intervallati da sequenze germinali e, pertanto, il profilo DHPLC è stato *pseudo-monoclonale* (dati non mostrati). Questo risultato DHPLC può essere imputabile alla limitata sensibilità clinica (Dippel E *et al.*, 1999) e al fatto che il segmento Dh7-27 è costituito solo da 11 nucleotidi (Szczepanski T *et al.*, 1999) e può essere facilmente amplificato in configurazione germinale. L'allineamento della sequenza nucleotidica nel *database* NCBI ha mostrato omologia al 100% con il segmento Dh7-27 e Jh1. Similmente è stata mostrata amplificazione germinale dei segmenti Dh7-27-Jh1 per il campione con MGUS 11904 (dati non mostrati).

I segmenti Dh hanno mostrato una lunghezza oscillante tra 14 e 28 nucleotidi e sono risultati essere in *frame* (appendice 21). Come riscontrato da Takahashi N *et al.* (1984), anche nella sequenza di Reh ottenuta con i *primer* Vh3-Jh è stata presente un codone d'inizio trascrizione AUG che ha generato una regione CDR3 lunga 18 nucleotidi con *frame* negativo, mentre per il campione 11899 la lunghezza della regione CDR3 è stata di 21 nucleotidi con *frame* positivo. L'allineamento delle sequenze amminoacidiche con quelle presenti nel *Database* NCBI ha mostrato una similarità dell'85% circa con le sequenze delle regioni Vh, particolare, per il campione 11899 è stata evidenziata un'omologia del 82% con IgH ϵ , del 78% con la proteina IgH μ e del 75% con IgH α . L'allineamento nel sito IMGT, invece ha mostrato la presenza del riarrangiamento Vh3-48/N1(gg)/Dh3-3/Jh6 con 2 basi mutate nel segmento D rispetto al controllo (appendice 21).

Per la linea Reh, invece, è stata riscontrata un'omologia del 97% con la regione V-III *precursor* IgH e dell'88% con la proteina IgH μ . L'allineamento nel sito IMGT, invece, ha mostrato la presenza del riarrangiamento Vh3-15/N1(gg)/Dh3-10/Jh6 con 2 basi mutate nel segmento Jh rispetto al controllo (appendice 21).

Analoghi risultati sono stati ottenuti con il sequenziamento dei riarrangiamenti del TCR, dove i segmenti maggiormente usati sono stati V γ 11 e V γ 8, J γ 1.1 e J γ 1.3.

L'allineamento della sequenza amminoacidica della linea cellulare Jurkat ottenuta con i *primer* V γ I-J γ 1.3/2.3 con quelle presenti nella *Genebank* di IMGT ha mostrato la presenza di 5 codoni di *stop* della traduzione in corrispondenza degli aminoacidi 136 (TAA), 137 (TAG), 143 (TGA), 146 (TGA) e 162 (TGA), i quali garantiscono la traduzione del riarrangiamento V γ 8/N(aaatt)/J γ 2.3 con *frame* positivo e regione CDR3 lunga 10 nucleotidi (appendice 22). La presenza dei codoni di *stop* è da attribuire all'amplificazione germinale del *locus* J γ 2. Il *blast* con il *Database* NCBI ha evidenziato un'omologia di sequenza amminoacidica del 93% con la proteina TCR della linea cellulare PEER (V γ 8-J γ 1/2) e dell'87% con la proteina *Ti* isoforma 2 simile al TCR. L'allineamento in IMGT della sequenza ottenuta con i *primer* V γ 11-J γ 1.3/2.3 di Jurkat ha identificato il

riarrangiamento $V\gamma 11/N(tcagatcctcacagggcgggtt)/J\gamma 1.3$, con *frame* negativo e regione CDR3 lunga 13 nucleotidi (appendice 22). L'analisi ha mostrato la presenza nella sequenza di 8 codoni di *stop* della trascrizione: posizione 114 (TAA), 128 (TAA), 145 (TAA), 150 (TAG), 157 (TAG), 159 (TAG), 163 (TAA), 185 (TAA). La presenza di tali codoni di *stop* è da attribuire all'amplificazione germinale del *locus* $J\gamma 2$ e $V\alpha$, al *frame-shift* causato da inserzioni/delezioni nucleotidiche o a mutazioni puntiformi (dati non mostrati). Il *blast* con il Database NCBI ha evidenziato un'omologia di sequenza amminoacidica del 93% con la proteina TCR della linea cellulare PEER e dell'82% con la proteina Ti isoforma 2 simile al TCR. L'allineamento nel sito IMGT delle sequenze dei campioni 12045 e 12020 (HES-LV) ottenute con la coppia di *primer* $V\gamma 1-J\gamma 1.3/2.3$ ha identificato i riarrangiamenti $V\gamma 2/P(cc)/J\gamma 2.3$ e $V\gamma 2/P(c)/J\gamma 2.3$ con *frame* positivo e regione CDR3 lunga 10 nucleotidi (appendice 22) e quello con NCBI ha mostrato omologia del 97% con il segmento genico $J\gamma 1.3$ e $J\gamma 2.3$ e 93% con in segmento $V\gamma 2$. Interessantemente, l'analisi in IMGT della sequenza prodotta dall'amplificazione del campione 12020 con la coppia di *primer* $V\gamma 1-J\gamma 1.1/2.1$ non ha individuato nessun riarrangiamento (dati non mostrati), ma ha rilevato omologia con i segmenti germinali $J\gamma 1.1/2.1$. Il *blast* di NCBI ha, invece, presentato per la stessa sequenza un'omologia di 94% per i segmenti $V\gamma 8$ e 100% per $J\gamma 1.1/2.1$. Analogo risultato è stato ottenuto per le sequenze del campione con HES 11347 prodotte con le coppie di *primer* $V\gamma 1-J\gamma 1.1/2.1$ e $V\gamma 1-J\gamma 1.3/2.3$, che hanno mostrato 98% di similarità ai segmenti $V\gamma 2$ e 99% a $J\gamma 2.3$ di NCBI, per le sequenze ottenute con le coppie di *primer* $V\gamma 9-J\gamma 1.3/2.3$ e $V\gamma 10-J\gamma 1.3/2.3$, che hanno mostrato, rispettivamente, il 100% di similarità con i segmenti $V\gamma 9-J\gamma 2.3$ e $V\gamma 10-J\gamma 2.3$ di NCBI. Per quanto riguarda i segmenti δ , l'analisi in NCBI e in IMGT delle sequenze ottenute dall'amplificazione del campione con HES 12045 con le coppie di *primer* $D\delta 2-D\delta 3$ e $D\delta 3-J\delta 1$ ha evidenziato il 97% e il 100%, rispettivamente, di similarità per tali riarrangiamenti, confermandone la positività. Per tutte le sequenze dei segmenti $V\gamma$ e $V\delta$ prodotte sono state evidenziate ampie delezioni che hanno portato alla codifica di pochi residui amminoacidici. La relativamente bassa omologia riscontrata quando sono stati allineate le sequenze dei riarrangiamenti e non dei singoli segmenti è da imputare alla diversità delle regioni fiancheggianti le estremità 5' e 3' dei segmenti coinvolti nel riarrangiamento. Per questo motivo l'allineamento con il *software on line* IMGT è risultato più informativo, efficiente e sensibile rispetto al *blast* di NCBI, che riesce ad allineare le sequenze in analisi solo localmente con quelle in esso depositate.

3.8 Determinazione di un *cutoff* per la discriminazione dei campioni risultati positivi all'analisi singole PCR per i geni del TCR $\gamma\delta$ e IgH.

Allo scopo di ridurre il numero di positività di linfociti T monoclonali e oligoclonali presenti nei campioni in analisi e che hanno influenzato l'esito

della PCR, inducendo l'operatore in erronea interpretazione di biconalità nel caso di campioni clonali e di *pseudo-clonalità* nel caso di campioni policlonali, come le malattie autoimmuni e le infezioni virali, è stata valutata l'area dei picchi di tutti i profili di eluizione dei 246 campioni analizzati al DHPLC, utilizzando la funzione di calcolo dell'integrale del programma *Wavemaker analysis* (Transgenomic).

I valori ottenuti (dati non mostrati) sono stati analizzati con il programma *GraphPad Prism vers. 4.0a 2003* che li ha dispersi in uno *scattergram* in base alla diagnosi clinica e alla coppia di *primer* con cui sono stati prodotti. Il confronto degli *scattergram* ottenuti per i campioni con diagnosi di LLA, SLP, LLC, LNH, LMC, HES, MIP e PLN non ha permesso l'individuazione di una soglia numerica, al di sotto della quale i campioni potevano dirsi negativi e viceversa (dati non mostrati). Questo perché i valori delle aree dei picchi sono stati distribuiti nella zona dello *scattergram* compresa tra 10^2 - 10^7 , sia per i campioni attesi positivi sia per i campioni usati come controllo negativo. Ciò è spiegabile ipotizzando che l'efficienza dell'amplificazione dei riarrangiamenti *pseudo-clonali* è dipesa esclusivamente dalla capacità della polimerasi di amplificare le regioni di DNA comprese tra i *primer* appaiati, perché, indipendentemente dalla quantità del dato riarrangiamento nel campione, il processo PCR è condotto per 2ⁿ volte, determinando risultati paragonabili in termini di quantità di prodotto finale della reazione PCR.

3.9 Calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica.

La sensibilità e la specificità diagnostica sono state calcolate su 194/246 campioni testati con diagnosi clinica confermata di LLA, LLC, SLP, HCL, SMD, PV, Mieloma e MGUS, LGL, LNH, LPC, HES, HES-LV, LMC, PNL. Tali parametri sono stati considerati per le metodologie SB, *multiplex-PCR*, *semi-nested-PCR* e singole PCR per i *loci* $\gamma\delta$ del TCR e per i *loci* V e D delle IgH. I valori ottenuti sono stati riportati in appendice 23. Considerando insieme i valori di sensibilità e specificità, l'approccio *semi-nested* è risultato migliore rispetto a quello singola PCR, ottenendo solo un leggero abbassamento della sensibilità rispetto al SB. La più bassa sensibilità registrata con la *mix II* della strategia *multiplex-PCR* è dovuta al fatto che i *primer* in essa presenti sono specifici per segmenti V rari ed è ben compensata dall'alta specificità (79% circa) registrata. A conferma di quanto detto nei precedenti paragrafi, la PCR singola per il *locus* TCR γ ha mostrato una specificità estremamente bassa (18%) imputabile alla maggiore produzione di risultati falsi-positivi, a loro volta causati dalla presenza particolarmente frequente di tali riarrangiamenti nei campioni di MB normale, come riscontrato anche da Cavé H *et al.* (1994). La metodologia singola PCR per i riarrangiamenti TCR e IgH è risultata, pertanto, applicabile solo per il controllo della MRD, perché prendendo in considerazione più di due *target* PCR previene i risultati falsi-negativi

durante i *follow-up* dovuti alla formazione di nuovi riarrangiamenti e alla creazione di riarrangiamenti secondari che portano alla perdita della regione giunzionale inizialmente identificata alla diagnosi, cosa frequente nei geni IgH che sono spesso clonali alla diagnosi.

4 Conclusioni

L'identificazione dei riarrangiamenti genici costituisce un aspetto fondamentale della diagnosi di malattie linfoproliferative, quali le Leucemie Linfatiche Croniche (LLC), i linfomi (LNH) e le malattie immunoproliferative (MIP), perché permette di determinare la gravità della malattia e di monitorarla nel tempo, anche in maniera quantitativa. Ciò è stato generalmente fatto con l'analisi *Southern Blot* (SB) che è realizzabile, ma *time consuming, labor intensive*, richiedente una quantità relativamente grande di materiale patologico ed avente una sensibilità del 5-10%. Questa è stata la ragione per la quale in questa tesi sono state ampiamente valutate le tecniche PCR, sebbene da sole non riescano a discriminare bene i prodotti monoclonali dai policlonali (Garcia-Sanz R *et al.* 1999). Di conseguenza, le tecniche di Analisi *Heteroduplex* (HD) e *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC) degli amplificati da singole PCR per i geni TCR/IgH, da *multiplex-PCR* per i geni del TCR γ e *semi-nested PCR* per i geni delle IgH sono state investigate, mostrando, risultati altamente correlati con quelli prodotti dall'analisi SB, sebbene più discriminanti e sicuri per la caratterizzazione di popolazioni clonali minori. A tal fine, sono stati caratterizzati 246 campioni, tra Leucemia Linfatica Acuta (LLA), Sindrome Linfoproliferativa (SLP), LLC, LNH, Leucemia Mieloide Cronica (LMC), ipereosinofilia (HES) e ipereosinofilia variante linfocitaria (HES-LV), alcuni dei quali sono risultati positivi con una sola delle metodiche testate. Ciò è stato causato in parte dai limiti di sensibilità propri di ciascuna tecnica e in parte dalla diversa sensibilità della PCR mostrata per la detenzione di una popolazione monoclonale mista ad una policlonale, sensibilità risultata a volte inferiore rispetto al SB. Sia la *multiplex-PCR* che la *semi-nested-PCR*, infatti, hanno fallito a rilevare i riarrangiamenti in un piccolo numero di pazienti, mostrando una più bassa sensibilità di detenzione della popolazione clonale rispetto al SB, che è da imputare al numero relativo di linfociti B e T monoclonale e policlonali presenti e, quindi, al tessuto in studio. Ciò potrebbe essere spiegato, almeno per le leucemie immature, dai seguenti diversi meccanismi:

- sensibilità subottimale dei *primer*,
- mancato *priming* della PCR, dovuto o all'uso nel riarrangiamento di regioni V inusuali, o ad eventuali inversioni avvenute durante i riarrangiamenti genici o a traslocazione, come la t(14;18) nel *locus* IgH, che causano un'ampia separazione dei siti di legame dei *primer*, come notato nei linfomi follicolari da Trainor KJ *et al.* (1991),
- eccessiva attività esonucleotidica CDR3 portante alla rimozione di nucleotidi omologhi all'estremità 3' dei *primer* FR2A o Jh della *semi-nested PCR*,
- presenza di molti riarrangiamenti ognuno al di sotto del limite di detenzione della tecnica ed originanti risultati falsi-negativi,

- mancato riconoscimento dei segmenti V coinvolti da parte dei *primer* per la presenza di mutazioni somatiche in un pre-esistente riarrangiamento genico, che caratterizzano spesso l'evoluzione del clone leucemico tra diagnosi e ricaduta sia nelle leucemie di cellule B mature, come i LNH follicolari, che nelle cellule B *precursor* e tipiche dei mielomi, generando sia potenziale oligoclonalità, come nei campioni con LLA (Davi F. *et al.*, 1996), sia instabilità genomica (Green E *et al.*, 1998), sia diminuita omologia dei *primer* stessi.

Ulteriori analisi, dunque, dovranno essere condotte al fine di ottimizzare la specificità dei sistemi PCR e la sensibilità delle *multiplex* e *semi-nested* PCR migliorando i *primer* FR2A, che riconoscono regioni IgH meno affette da mutazioni somatiche rispetto alle altre, e disegnando *primer consensus* per la rilevazione dei subcloni minori (Green E *et al.*, 1998) e dei riarrangiamenti incompleti e/o completi (Scrideli CA *et al.*, 2003) del TCR β , che dà usualmente trascritti funzionali dei riarrangiamenti evitando risultati falsi-negativi. Questi potrebbero essere evitati utilizzando nella diagnosi *routinaria* i riarrangiamenti V δ -J α , che:

- sono rari nei tessuti linfoidei normali e, di conseguenza, con basso *background* di policlonalità, a differenza di quelli V δ 2-D δ 3 e TCR γ virtualmente interessanti entrambi gli alleli in tutti i linfociti CD3⁺ (55% pre LLA B e 90% LLA T);
- sono stabili anche nelle ricadute, non essendo soggetti all'instabilità propria dei riarrangiamenti TCR e che rappresenta una potenziale importante complicanza nella detenzione della MDR (Davi F. *et al.*, 1996);
- hanno estese regioni giunzionali N, ad opera del meccanismo "open and shut", le quali costituiscono marcatori genetici unici per le cellule (Davi F *et al.*, 1996).

Questo meccanismo, che consiste nell'addizione e delezione di nucleotidi addizionali dopo riapertura e chiusura del riarrangiamento, fa sì che i riarrangiamenti V δ -J α derivino dalla continua ricombinazione dei geni VDJ con estesa delezione degli esoni C δ , come dimostrato da Szczepanski T *et al.* (2004). Questi, analizzando campioni con LLA B *precursor* in bambini e adulti, ha riscontrato che V δ 2 è un "hot spot" per la ricombinazione VDJ, poiché i riarrangiamenti V δ 2-D δ 3 e V δ 2-J δ 1 possono essere sottoposti a continua attività ricombinasica portante alla preferenziale ricombinazione dei segmenti, vicini al *locus* δ , V δ 2-J α 58, V δ 2-J α 61, V δ 2-J α 29, V δ 2-J α 54, V δ 2-J α 48 nel timo, nei linfonodi e nei campioni tonsillari con livelli di circa 10⁻⁵-10⁻⁴. Ciò può essere originato, secondo lo stesso Szczepanski T *et al.* (2002), dal richiamo di specifici fattori di trascrizione, costitutivamente attivi durante la proliferazione cellulare, che modificano l'accessibilità delle regioni cromosomiche delle RSS *consensus* migliorandone l'appaiamento ai *primer* V *consensus* (Szczepanski T *et al.*, 2004) e dalla mancata inibizione della ricombinasi VDJ nei blasti leucemici. Questa causa la totale chiusura delle regioni V δ 1 e J δ creando una diversa accessibilità leucemia-associata dei

segmenti nel *locus* TCR δ nella linea B, permettendo, così, una migliore comprensione dei meccanismi che regolano la trascrizione di tali geni all'interno del *lineage* e generando una limitata diversità combinatoriale e giunzionale (van Wering ER *et al.*, 2001) per il ridotto numero di segmenti genici TCR δ/α coinvolti nei riarrangiamenti. Quest'ultima, pur non garantendo efficienti amplificazioni e non rilevando tutti i cloni leucemici del campione testato (Davi F. *et al.*, 1996), mantiene un importante significato pratico migliorando la detenzione della MRD, che dipende, almeno parzialmente, dalla frequenza relativa dei riarrangiamenti nelle cellule normali, tramite l'uso delle regioni N dei riarrangiamenti dei segmenti leucemia-specifici J α 9 e J α 29. Analisi di sequenza dovranno, al tal fine, essere condotte per disegnare su queste regioni N *primer* ASO paziente-specifici da utilizzare in un sistema di *Real Time* PCR quantitativa con sensibilità di almeno 10^{-4} (Szczepanski T *et al.*, 2004). Lavorando secondo tali direttive, ulteriori analisi dovranno essere eseguite per validare i campioni policlonali e PNL come controlli negativi delle metodiche perché il loro uso può essere mandatario per lo sviluppo di *set* di *primer* specifici, soprattutto per TCR γ . La competizione dei *primer*, infatti, per una stessa popolazione oligoclonale di infiltrati infiammatori costituita da pochi linfociti B/T nel campione, ha fatto sì che ogni clone sia stato amplificato esponenzialmente dando su gel *heteroduplex* una sola banda (Aubi J *et al.*, 1995), come nei casi dei campioni PNL di questa tesi, nei 3/9 PNL utilizzati come controlli negativi da van Krieken JHJM *et al.* (2003) e come nel 10% delle lesioni reattive riportate in letteratura (Dippel E *et al.*, 1999), quali: le infezioni da virus *Epstein-Barr* senza LNH/leucemie, le iperplasie atipiche come la malattia di *Castleman*, le tiroiditi di *Hashimoto*, le malattie celiaca, le malattie del tratto intestinale del digiuno senza alterazioni istologiche, i linfomi di cellule T associati ad enteropatie. Questa *pseudo-monoclonalità* è stata riprodotta anche con le tecniche *post-PCR* (van Krieken JHJM *et al.*, 2003) in un *background* policlonale, come nel caso dell'amplificazione con i *primer* Dh7-Jh nella placenta e nel campione 11904 (MGUS) che sono risultati monoclonali al DHPLC. L'incapacità del DHPLC di discriminare tra amplificazioni monoclonali e *pseudo-monoclonali* non è imputabile, quindi, ad un limite dello strumento, ma alla limitata sensibilità clinica come dimostrato dai risultati prodotti da Dippel E *et al.*, (1999), con l'analisi *GeneScan* (GS) degli amplificati PCR per il TCR γ di pazienti con LNH cutaneo, e da Sandberg Y *et al.* (2003 e 2005). Questi, infatti, non è riuscito a discriminare all'analisi HD e GS 4/8 pazienti con micosi fungine stadio I e IV, 3/3 con sindrome di *Sezary*, 1/3 con papulosi linfomatoide (lyp), 2/2 con artite reumatoide, 1 con dermatite, 1 con immunocitoma clonale e in campioni di PB da anziani da pazienti con malattie autoimmuni e con infezioni virali, in genere. Anche Bottaro M *et al.* (1994) ha riscontrato la presenza di bande HD per i segmenti V γ 2 e V γ 4 dei campioni non leucemici adducendone l'origine alla comigrazione di riarrangiamenti V non casuali, a causa della debole intensità. Alla luce di tutto ciò i risultati falsi-positivi

riscontrati dopo analisi DHPLC e sequenziamento, dipendendo anche dal numero di cellule analizzate, non solo implicano che sufficienti linfociti devono essere necessariamente presenti nel campione in analisi per poter ottenere risultati policlonali (van Krieken JHJM *et al.*, 2003), ma anche che la loro origine è legata ad errori della PCR durante l'amplificazione. Come sostenuto da Gonzalez M *et al.* (1999), l'alto tasso di detenzione di clonalità della metodica singole PCR, seppur desiderabile per il monitoraggio della MRD, può dipendere da 2 fattori: ridotta stringenza delle condizioni PCR ed uso di *primer* famiglia-specifici degenerati, che se da un lato aumentano l'efficienza dei *primer*, dall'altro ne inficiano l'efficienza e la specificità dell'ibridazione, influenzando i risultati della PCR (Cavé H *et al.*, 1994). Nell'attesa di meglio chiarire la valenza della *pseudo*-clonalità, la monoclonalità deve essere definita come l'occorrenza di 1 o 3 picchi dominanti (mono-/biallelici) che sono riproducibilmente rilevati con l'analisi DHPLC e la sua presenza non deve implicare necessariamente la malignità. Oltre all'uso di campioni di PB e tessuti extramidollari, informativi tanto quanto quelli di MB (Coustan-Smith *et al.*, 2002 e Sandberg Y *et al.*, 2005), è raccomandabile l'uso di più *target* (IgH, IgL, TCR β , TCR α) e più *mix* di *primer* PCR per paziente allo scopo di minimizzare gli effetti dovuti ad altre alterazioni geniche presenti nel clone leucemico e massimizzare il numero di casi clonali rilevati (Brumpton C *et al.*, 2000). Ancora, per individuare forme leucemiche più aggressive, soprattutto delle LLA B, con evidente utilità clinica, è raccomandabile utilizzare un approccio algoritmico che combini l'immunopatologia con l'analisi dei riarrangiamenti genici adattando quello proposto da Nihal M *et al.* (2000) per l'analisi delle lesioni della pelle: se l'analisi immunopatologica dimostra molte cellule B o cellule del plasma, allora la PCR IgH produrrà un *pattern* falso-positivo dovuto ai ridotti riarrangiamenti genici per la presenza di cellule B disperse. Un lavoro, questo, teso a facilitare anche la diagnosi dei pazienti nei quali le prove cliniche, istologiche ed immunologiche sono consistenti ma non interamente tipiche di una linfoproliferazione maligna, come per i pazienti con leucemie SS e LGL T (Sandberg Y *et al.*, 2005). Uguale cautela va posta nella definizione dell'oligoclonalità come presenza di picchi multipli in un *background* policlonale, perché i prodotti PCR da PNL con piccolo *background* di cellule linfoidi non clonali sono stati definiti oligoclonali solo dopo aver mostrato in esperimenti ripetuti separatamente le differenze di grandezza generate dalla diversa lunghezza delle regioni CDR3 sequenziate, come riportato anche da Assef A *et al.* (2000). Alla luce di tutto ciò, i risultati molecolari di (oligo)clonalità da SB e PCR devono essere sempre interpretati con grande attenzione e completa conoscenza della patologia e dell'immunofenotipo del campione, come suggerito da van Krieken JHJM *et al.* (2003) e Sandberg Y *et al.* (2005), per correlarli con i dati clinici, istopatologici e fenotipici dei singoli pazienti. Di contro, tutti i campioni con diagnosi di malattia linfoproliferativa provata da analisi immunofenotipiche, morfologiche e citofluorimetriche che risultano negativi alla diagnosi con le strategie *multiplex- e/o semi-nested* PCR devono essere

processati con la strategia singole PCR, il cui alto potere analitico è stato apprezzato nei casi positivi in PCR per la clonalità del *locus* γ , ma negativi in SB per quella al *locus* β , mostrando bande di grandezza simile e non distinguibili con le convenzionali condizioni elettroforetiche da quelle germinali. A differenza del SB, la metodica singole PCR non identifica solo il tipo di riarrangiamento (completo, incompleto), ma dà anche informazioni circa le regioni giunzionali (zur Stadt U *et al.*, 2003) identificando la famiglia dei riarrangiamenti in gioco (van Krieken JHJM *et al.*, 2003). Questa informazione è importante alla luce del contesto pato-fisiologico particolare per:

- stimare l'abbondanza relativa di differenti cloni B nella popolazione totale, per la maggiore e più sicura sensibilità della tecnica, pur restando essenzialmente un metodo qualitativo/non quantitativa (Deane M. and JD Norton, 1991);
- correlarne l'andamento della malattia identificando pazienti con cattiva prognosi, particolarmente tra quelli classificati con gli indicatori prognostici per il rischio *standard* (Green E *et al.*, 1998),
- monitorare la malattia minima residua (MDR) in LLA, LNH e LLC.

Come evidenziato da Li A *et al.* (2004), le LLC con geni IgH non mutati somaticamente usano per lo più il riarrangiamento Vh1-69/Dh/Jh6, mentre le LLC con mutazioni somatiche dei geni Vh usano il segmento Vh3-21 ed hanno significativamente più corta sopravvivenza rispetto agli altri pazienti con mutazione somatica. Similmente, Felix CA *et al.* (1987) ha trovato che i geni TCR γ quando sono riarrangiati nelle LLA B durante l'infanzia hanno un valore prognostico negativo. Il tipo di riarrangiamento, dunque, può essere associato anche a differenze nella maturazione dei blasti, come ipotizzato da Cavé H *et al.* (1994) e da Biondi A *et al.* (1992), il quale ha trovato solo 1 marcatore γ e 8 δ in 21 LLA B infantili, suggerendo che i riarrangiamenti variano con l'età della diagnosi, e restano comunque stabili durante il corso della malattia, come confermato dalle analisi comparate SB e PCR/DHPLC ripetute separatamente. In tal modo, i vari geni TCR/IgH caratteristici alla diagnosi hanno valore prognostico, eccezion fatta dei segmenti genici V δ 2-J δ 1. Lo sforzo di questa tesi, in conclusione, è stato quello di stabilire una metodica PCR semplificata che superasse la maggiore difficoltà della detenzione della clonalità discriminando i riarrangiamenti TCR/IgH policlonali e monoclonali in LLA, LLC, SLP, HES-LV nuovamente diagnosticati. Per ottenere ciò è stata esaminata la specificità e la sensibilità dei sistemi *multiplex-PCR* e *semi-nested PCR* abbinati al DHPLC in campioni LLA con riarrangiamenti noti e non noti e nei PNL, eseguendo una *temperature mapping* per determinare la temperatura DHPLC (simile a quella predetta con il *Wavemaker* e ai valori ideali calcolati con l'algoritmo di *Stanford*) che separasse in maniera ottimale i *target* clonali. La separazione, poi, delle miscele V/V di prodotti clonali (Reh+Jurkat con *primer* V γ 1-J γ 1.3/2.3) con uguale lunghezza (523bp) e composizione delle sequenze giunzionali nota ha dimostrato che la separazione dipende ampiamente

dalla conformazione *heteroduplex* dei prodotti analizzati e dalla temperatura applicata alla colonna e che i profili di eluizione sono sequenza-specifici avendo un distinto tempo di ritenzione (6-18min); di conseguenza, la separazione in base alla lunghezza gioca solo un ruolo marginale alle condizioni di "quasi denaturazione" (zur Stadt U *et al.*, 2001). Ciò costituisce uno dei maggiori vantaggi del DHPLC rispetto all'HD e al GS, permettendo la specifica e riproducibile separazione degli alleli con identica lunghezza e del rumore di fondo dovuto all'amplificazione di riarrangiamenti policlonali non patologici nei quali è immerso il clone in studio e che inficia l'identificazione dei *target* per la MRD. In tale chiave i sistemi *multiplex*- e *semi-nested* PCR seguiti dall'analisi DHPLC, avendo rilevato circa il 90% cloni nelle malattie leucemiche B e T, sono candidati ad essere tecniche di prima linea, sostituendo con successo il SB, per la diagnosi di malattie linfoproliferative con diagnosi incerta, fornendo quali vantaggi sostanziali i parametri considerati per la valutazione dei diversi metodi testati e cioè:

- valutazione della clonalità delle cellule T e B in ogni tipo malattia, stadio e campione inclusi i tessuti paraffinati sui quali l'analisi SB non può essere eseguita perché il DNA è spesso degradato (Sandberg Y *et al.*, 2005);
- alta riproducibilità e facile interpretazione dei risultati rispetto all'analisi SB ed HD, con alto numero di risultati concordi alla diagnosi clinica senza l'incertezza dell'analisi HD derivante dalla necessità di definire il metodo per ogni laboratorio (zur Stadt U *et al.*, 2001);
- sicurezza per l'operatore essendo un metodo non radiattivo con procedure semplici e relativamente rapido (risultati in 48-72h); automatizzazione ed economicità (circa 1 euro per campione);
- nessuna necessità di maneggiamenti dei campioni *pre*- e/o *post*-analitici (come preparazione di gel e colorazione), che spesso non garantiscono la stessa specificità per i segmenti V come in singola analisi;
- nessuna richiesta d'uso di sonde fluorescenti per la tipizzazione molecolare del clone dominante, permettendo il sequenziamento diretto dei picchi *homo*- ed *heteroduplex*, senza ricorrere al clonaggio degli amplificati clonali; basso tasso di falsi-negativi, richiesto soprattutto in situazioni con problemi di diagnosi;
- sensibilità di detenzione di popolazioni clonali di circa 5% per evitare interpretazioni false-positive, come per i cloni leucemici da piccole popolazioni reattive.

La versatilità della metodica, inoltre, la rendono applicabile sia alla rilevazione di popolazioni linfoidi B policlonali e clonali in un ampio spettro di situazioni cliniche che allo studio delle ipermutazioni somatiche permettendo di sequenziare solo i campioni che presentano profilo di eluizione alterati. Ciò è fondamentale se applicata ai pazienti affetti da LLC e discriminati per la prognosi favorevole e/o sfavorevole in base alla presenza e/o assenza delle mutazioni somatiche, rispettivamente. In tal modo si ottiene una frequenza di detenzione delle mutazioni che è uguale a quella del sequenziamento diretto, ma con minor lavoro, *bypassando* le impurità delle

amplificazioni *background* policlonali o da riarrangiamenti biallelici dei campioni leucemici (zur Stadt U *et al.*, 2003), come dimostrato dalla necessità di procedere attraverso lunghi e tediosi passaggi di purificazione del prodotto da sequenziare, perché ovviati recuperando le frazioni eluite dalla colonna e permettendo l'uso di entrambe le varianti all'eliche per la valutazione della MRD durante la terapia (zur Stadt U *et al.*, 2003). Sulla base dei criteri utilizzati per valutare i diversi metodi analizzati, il SB resta una tecnica da riservare ai casi nei quali l'amplificazione PCR fallisce a rilevare i cloni IgH/TCR, mentre l'approccio a singole PCR è ottimo per la detenzione della clonalità TCR nei casi di HES-LV, dove la presenza dei cloni aberranti è sempre molto bassa e l'uso di questa metodologia sensibile può permettere di *bypassare* l'isolamento dei linfociti T aberranti e procedere direttamente alla loro valutazione. Un confronto dei dati ottenuti e del tasso di detenzione delle cellule maligne con quelli pubblicati da altri autori è stato difficile per molte ragioni:

- scelta dei *primer* utilizzati, raramente sono stati gli stessi tra i diversi autori e nei diversi studi di uno stesso autore (Davi F. *et al.*, 1996);
- tipo di malattia, la maggior parte dei dati pubblicati partono da un contesto clinico ben determinato e sono focalizzati su uno specifico tipo di malattia, inducendo *bias* nei risultati;
- tipo di campione in analisi; metodo utilizzato, l'approccio *semi-nested* PCR è stato usato solo in alcune patologie; mentre l'HD è stata eseguita da alcuni autori su gel di poliacrilammide o è stata ampiamente sostituita dall'analisi GS; *pitfall* incontrati durante i *test*, quali la non rappresentatività dei tessuti congelati, la *pseudo-clonalità* e l'incapacità dei *primer* ad amplificare i cloni secondo *lineage*, essendo state osservate amplificazioni monoclonali con i *primer* IgH in casi di malattia linfoproliferativa T, e viceversa.

Poiché tale *pitfall* è stato una costante in questa tesi e poiché van Krieken JHJM *et al.* (2003) ha riscontrato riarrangiamenti incompleti TCR in 1/15 LNH B e IgH in 1/11 campioni con LNH T, grande attenzione va posta nel definire il *lineage* attraverso l'analisi clonale dei riarrangiamenti dei geni dei recettori antigenici. Ultimo, ma non per questo meno importante, la tecnica DHPLC *post-PCR* usata per discriminare i prodotti clonali è stata utilizzata solo da altri 2 autori: zur Stadt U *et al.* (2001), per il recupero dei prodotti clonali TCR $\gamma\delta$ da usare come stampo per le RQ-PCR, e Bardwell PD *et al.* (2002) per la discriminazione di riarrangiamenti IgH con segmenti V mutati. I frutti di questa ricerca si offrono, quindi, come base di partenza per ottenere una metodica ancora più rapida testando i prodotti della *multiplex-* e *semi-nested* PCR con l'applicazione "*multiple fragment*" del DHPLC, che iniziando la corsa con il 49% del tampone B e terminandola a 59.1% dello stesso, con un incremento di 2.5min/100bp del tampone, eluisce in maniera sensibile e riproducibile i riarrangiamenti TCR monoclonali dalla lunghezza attesa di 170-230bp e IgH di 240-260bp dopo 4-5min di corsa, lasciando inalterata l'ottima risoluzione ottenuta con le corse lunghe di 20min e la capacità di recupero delle frazioni da sequenziare.

Bibliografia

- **Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raffi, K. Roberts and J.D. Watson, (1997).** *"Biologia molecolare della cellula"*. Zanichelli Ed. Cap. 23: 1387-1459.
- **Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman, (1997).** *"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"*. *Nucleic Acid Research*. 25: 3389-3402.
- **Assaf C., M. Hummel, e. Dippel, S. Goerdts, H.H. Muller and I. Anagnostopoulos, (2000).** *"High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing"*. *Blood*. 96: 640-646.
- **Aubin J., F. Davi, F. Nguyen-Salomon, D. Leboeuf, C. Debert, M. Taher, F. Valensi, D. Canioni, N. Brousse, B. Varet and E.A. Macintyre. (1995).** *"Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies"*. *Leukemia*. 9: 471-479.
- **Bardwell P.D., A. Martin and M.D. Schriff, (2002).** *"Mutation detection of immunoglobulin V-regions by DHPLC"*. *J.I.M.* 266: 165-173.
- **Bernasconi P., (2003).** *"Onco-Ematologia molecolare"*. EDIMES Ed. Cap 1: 11-38; cap. 2: 51-61; cap. 5: 117-122; cap. 6: 123-134.
- **Bimboim H.C. and J. Doly, (1979).** *"A rapid alkaline extracrion procedure for screening recombinant plasmid DNA"*. *Nucleic Acid Researc.* 7: 1513-1523.
- **Biondi A., V. Rossi, P.F. Di Celle, A. Carbone, S. Benvestito, A. Brusca, G. Giudici, C. Giachino, G. Basso, R. Foa and N. Mignone, (1992).** *"Inique genotypic features of infant acute lymphoblastic leukemia at presentation and at relapse"*. *Br. J. Haematol.* 80: 472.
- **Bottaro M., E. Berti, A. Biondi, N. Migone and L. Crosti, (1994).** *"Heteroduplex Analysis of T-cell receptor γ gene rearrangements for diagnosis and monitoring of Cutaneous T-cell lymphomas"*. *Blood*. 83: 3271-3278.
- **Brisco M.J., P.J. Sykes, E. Hughes, et al. (1997).** *"Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B lineage acute Lymphoblastic leukaemia"*. *Br. J. Haematol.* 99: 314-319).
- **Brumpt C., E. Delabasse, K. Beldjord, F. Davi, J.M. Cayuela, C. Millien, P. Villaresa, P. Quartier, A. Buzyn, F. Valensi and E. Macintyre, (2000).** *"The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype"*. *Blood*. 96: 2254-2261.
- **Cavé H., C. Guidal, P. Rohrllich, M.H. Delfau, A. Broyart, B. Lescoeur, C. Rahiny, O. Fenneteau, N. Monplaisir, L. d'Auriol, J. Elion, E. Vilmer and B. Grandchamp, (1994).** *"Prospective Monitoring and Quantitation of Residual Blast in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Polymerase Chain Reaction Study of d and g T-Cell Receptor Genes"*. *Blood*. 83: 1892-1902.
- **Cools J., H. Quentmeier, B.J. Huntly, P. Marynen, J.D. Griffin, H.G. Drexler and D.G. Gilliland, (2004).** *"The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia"*. *Blood*. 103: 2802-2805.

- **Coustan-Smith E., J. Sancho, M.L. Hancock, B.I. Razzouk, R.C. Ribeiro, G.K. Rivera, J.E. Rubritz, J.T. Sandlund, C.H. Pui and D. Campana.** (2002). "Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia". *Blood*. 100: 2399-2402.
- **Davi F., C. Gocke, S. Smith and J. Sklar,** (1996). "Lymphocytic progenitor cell origin and clonal evolution of human B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia". *Blood*. 88: 609-621.
- **Deane M. and J.D. Norton,** (1991). "Immunoglobulin gene fingerprinting: an approach to analysis of B lymphoid clonality in lymphoproliferative disorders". *British J. Haematology*. 77: 274-281.
- **Diaz M.A., F. Garcia-Sanchez, J.L. Vicario, M. Ramirez, A. Balas and L. Madero,** (1997). "Clinical relevance of T-cell receptor delta gene rearrangements in childhood B-precursor cell acute lymphoblastic leukemia". *Br. J. Haematol.* 99: 308-313.
- **Dippel E., C. Assaf, M. Hummel, H.J. Schrag, H. Stein, S. Goerdts and C.E. Orfanos,** (1999). "Clonal T-cell receptor γ -chain gene rearrangement by PCR based GeneScan Analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation". *J. Pathol.* 188: 146-154.
- **Dippel E., D. Klemke, M. Hummel, H. Stein and S. Goerdts,** (2001). "T-cell clonality of undetermined significance". *Blood*. 98: 247-248.
- **Drexler H.G. and R.A. MacLeod,** (2004). "Malignant hematopoietic cell line: in vitro models for the study of anaplastic large-cell lymphoma". *Leukemia*. 18: 1569-1571.
- **Felix C.A., G.H. realan, S.J. Korsmeyer, G.F. Hollis, P.A. Dinndorf, J.J. Wright and I.R. Kirsch,** (1987). "Immunoglobulin and T-cell receptor gene configuration in acute lymphoblastic leukemia of infancy". *Blood*. 70: 536.
- **Fisher P., E. Nacheva, D.Y. Mason, P.D. Sherrington, C. Hoyle, F.G. Hayhoe and A. Karpas.** (1988). "A *ki-1* (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene". *Blood*. 72: 234-240.
- **Garcia-Sanz R., R. Lopez-Perez, A.W. Langerak, D. Gonzalez, M.C. Chillon, A. Balanzategui, M.V. Mateos, I. Alaejos, M. Gonzalez, J.J.M. van Dongen and J.F. San Miguel,** (1999). "Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma". *Haematologica*. 84: 328-335.
- **Gonzalez M., D. Gonzalez, R. Lopez-Perez, R. Garcia-Sanz, M.C. Chillon, A. Balanzategui, M.V. Mateos, I. Alaejos, A.W. Langerak, A. Orfao, J.J.M. van Dongen, J.F. San Miguel,** (1999). "Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B cell non Hodgkin's Lymphoma. A comparison between different strategies". *Haematol.* 84: 779-784.
- **Green E., C.M. Mc Conville, J.E. Powell, J.R. Mann, P.J. Darbyshire, A. Malcom, R. Taulor and T. Stankovic.,** (1998). "Clonal diversity of Ig and T-cell-receptor gene rearrangements identifies a subset of childhood B-precursor acute Lymphoblastic leukemia with increased risk of relapse". *Blood*. 92: 952-958.

- Huber C.G., (1998). "Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA". *J. Chromatogr.* 806: 3-30.
- Kimura M., (1980). "A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Langerak A.W., T. Szczepanski, M. van der Burg, I.L.M. Wlvers-Tettero and J.J.M. van Dongen, (1997). "Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations". *Leukemia.* 11: 2192-2199.
- Lefranc M.P., V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Bodmer, W. Muller, R. Bontrop, M. Lemaitre, A. Malik, V. Barbié and D. Chaume, (1999). "IMGT, the international ImMunoGeneTics database". *Nucl. Ac. Res.* 27: 209-212.
- Levy R. et al., (1987). "Somatic mutation in human B cell tumors". *Immunol. Rev.* 96: 43-58.
- Lewin B., (2000). "Il gene VI". Zanichelli Ed. Cap. 33: 850-879.
- Li A., M. Rue, j. Zhou, H. Wang, M.A. Goldwasser, D. Neuberg, V. Dalton, D. Zuckerman, C. Lyons, L.B. Silverman, S.E. Sallan and J.G. Gribben, (2004). "Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis". *Blood.* 103: 4602-4609.
- Mason D.Y., C. Bastard, R. Rimokh, N. Dastugue, J.L. Huret, U. Kristoffersson, J.P. Magaud, C. Nezelof, H. Tilly, J.P. Vannier et al. (1990). "CD30-positive large cell lymphoma (ki-1 lymphoma) are associated with a chromosomal translocation involving 5q35". *Br. J. Haematol.* 74: 161-168.
- Matsuo Y. and H.G. Drexler, (1998). "Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines". *Leuk. Res.* 22: 567-579.
- Mayumi M., (1992). "EoL-1, a human eosinophilic cell line". *Leuk Lymphoma.* 7: 243-250.
- Mortuza F.Y., I.M. Moreira, M. Papaioannou, P. Gameiro, L.A. Coyle, C.S. Gricks, P. Almot, H.G. Prentice, A. Madrigal, A.V. Hoffbrand and L. Foroni, (2001). "Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute Lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of Jh-proximal variable segments". *Blood.* 97: 2716-2726.
- Mullis K.B. and F.A. Faloona, (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalized chain reaction". *Method Enzymol.* 155: 335-350.
- Nihal M., D. Mikkola and G.S. Wood, (2000). "Detection of clonally restricted Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements in Normal and Lesion Skin. Analysis of the B cell component of the Skin-Associated Lymphoid Tissue and implications for the molecular diagnosis of cutaneous B cell lymphomas". *J. Mol. Diagnostics.* 2: 5-10.
- Ohta T., (1980). "Evolution and Variation of Multigene Families". Springer, Berlin.
- Pongers-Willemse M.J., T. Seru, F. Stolz, E. d'Aniello, P. Gameiro, P. Pisa, M. Gonzalez, C.R. Bartram, E.R. Panzer-Grumayer, A. Biondi, J.F. San Miguel and J.J.M. van Dongen, (1999). "Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as

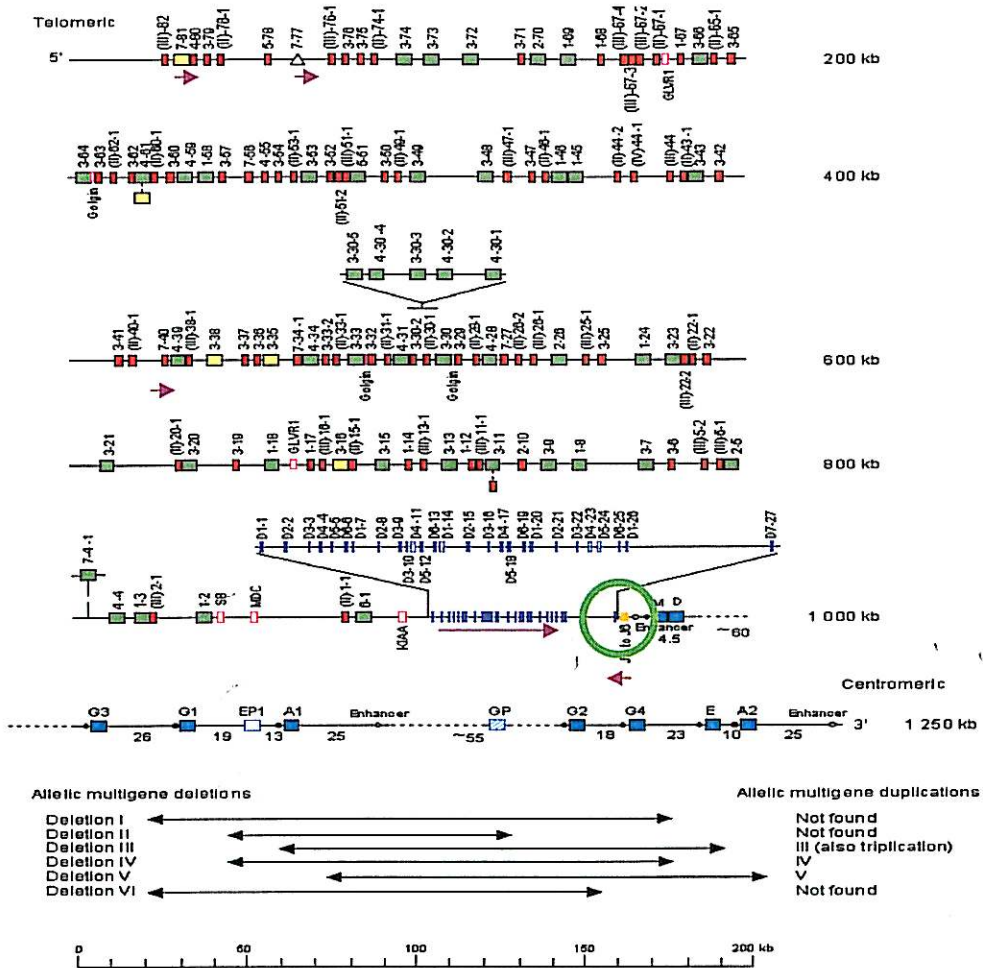
target PCR – Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia". *Leukemia*. 13: 110-118.

- **Quentmeier H., J. Reinhardt, M. Zaborski and H.G. Drexler**, (2003). "MLL partial tandem duplications in acute leukemia cell lines". *Leukemia*. 17: 980-981.
- **Rosenfeld C., A. Goutner, C. Choquet, A.M. Vanuat, B. Kayibanda, J.L. Pico and M.F. Greaves**, (1977). "Phenotypic characterization of a unique non-T, non-B acute Lymphoblastic leukemia cell line". *Nature*. 267: 841-843.
- **Roufosse F., M. Goldman and E. Cogan**, (2006). "Hypereosinophilic syndrome: lymphoproliferative and myeloproliferative variants". *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 27: 159-170.
- **Saitou N. and M. Nei**, (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic tree". *Mol. Biol. Evol.* 4: 1073-1095.
- **Saito H., A. Bourinbaiar, M. Ginsburg, K. Minato, E. Ceresi, K. Yamada, D. Machover, J. Breard and G. Mathe**, (1985) "Establishment and characterization of a new huma eosinophilic leukemia cell line". *Blood*. 66: 1233-1240.
- **Sambrook IE, F. Fritsch and T. Maniatis**, (1989). "Molecular cloning: a laborator manual eds".
- **Sandberg Y., F. Heule, K. Lam, P.J. Lugtenburg, I.L.M. Wolvers-Tettero and J.J.M. van Dongen**, (2003). "Molecular immunoglobulin/T-cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with the Biomed-2 standardized polymerase chain reaction protocol". *Haematologica*. 88: 659-670.
- **Sandberg Y., E.J. van Gastel-Mol, B. Verhaaf, K.H. Lam, J.J.M. van Dongen and A.W. Langerak**, (2005). "BIOMED-2 Multiplex Immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot Analysis in routine clonalitu diagnostics". *J.M.D.* 7: 495-503.
- **Sanger F.**, (1988). "Sequences, sequences and sequences". *Ann. Rev. Biochem.* 57: 1-28.
- **Schneider U., H.U. Schwenk and G. Bornkamm**, (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute Lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma". *Int. J. Cancer*. 19: 621-626.
- **Scrideli C.A., R.G. de Paula Queiroz, J.E. Bernardes, E.T. Valera and L.G. Tone**, (2003). "PCR detection of clonal IgH and TCR gene rearrangements at the end of induction as a Non Remission criterion in children with ALL: comparison with standard morphologic analysis and risk group classification". *Med. Pediatr. Oncol.* 41: 10-16.
- **Szczepanski T., M.J. Pongers-Willemse, A.W. Langerak, W.A. Hearts, A.J.M. Wijkhuijs, E.R. van Wering and J.J.M. van Dongen**, (1999). " Ig Heavy Chain Gene Rearrangements in T-Cell Acute Lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and Dh7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-Cell Receptor $\alpha\beta$ lineage". *Blood*. 93: 4079-4085.
- **Szczepanski T., M.J. Pongers-Willemse, B. Brinkhof, E.R. van Wering, M. van der Burg and J.J.M. van Dongen**, (2002). " Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor B ALL provides improved strategies for selction of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease". *Blood*. 99: 2315-2323.

- Szczepanski T., V.H.J. van der Velden, P.G. Hoogeveen, M. de Bie, D.C.H. Jacobs, E.R. van Wering and J.J.M. van Dongen., (2004). "*V δ 2-J α rearrangements are frequent in precursor B-acute Lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells*". *Blood*. 103: 3798-3804.
- Takahashi N., Noma T. and Honjo T., (1984). "*Rearranged immunoglobulin heavy chain variable region (Vh) pseudogene that deletes the second complementarity-determining region*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 5194-5198.
- Trainor K.J., M.J. Brisco, C.J. Story and A.A. Morley, (1990). "*Monoclonality in B-Lymphoproliferative disorders detected at the DNA level*". *Blood*. 75: 2220-2222.
- Trainor K.J., M.J. Brisco, J.H. Wan, S. Neoh, S. Grist and A.A. Morley, (1991). "*Gene rearrangement in B- and T-Lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction*". *Blood*. 78: 192-196.
- van Dongen J.J.M. and I.J.M. Wolvers-Tettero, (1991). "*Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects*". *Clinica Chimica Acta*. 198: 1-92.
- van Dongen J.J.M., A.W. Langerak, M. Bruggemann, P.A.S. Evans, M. Hummel, F.L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. Garcia-Sanz, J.H.J.M. van Krieken, J. Does, D. Gonzalez, C. Bastard, H.E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J.L. Smith, G.J. Morgan, M. Kneba and E.A. Manintyre, (2003). "*Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*". *Leukemia*. 17: 2257-2317.
- van Krieken J.H.J.M., A.W. Langerak, J.F. San Miguel, A. Parreira, J.L. Smith, G.M. Morgan, M. Kneba, E.A. Macintyre and J.J.M. van Dongen, (2003). "*Clonality Analysis for Antigen Receptor Genes: Preliminary Results From the Biomed-2 Concerted Action PL96-3936*". *Human Pathology*. 34: 359-361.
- van Wering E.R., B.E.M. van der Linden-Schrever, V.H.J. van der Valden, T. Szczepanski and J.J.M. van Dongen., (2001) "*T-lymphocytes in bone marrow samples of children with acute Lymphoblastic leukemia during and after chemotherapy might hamper PCR-based minimal residual disease studies*". *Leukemia*. 15: 1301-1315.
- Wiestner A., (2006). "*More Zap for Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)*". *Blood*. 105: 2036.
- Willems P., O. Verthagen, C. Segeren, P. Veenhuizen, J. Guikema, E. Wiemer, L. Grootuis, T. Buitenweg-de Jong, H. Kok, A. Bloem, N. Bos, E. Vellenga, E. Mensink, P. Sonneveld, H.L.E. van der Schoot and R. Raymaker, (2000). "*Consensus strategy to quantitate malignant cells in myeloma patients is validated in a multicenter study*". *Blood*. 96: 63-70.
- Xiao W. and P.J. Oefner, (2001). "*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A review*". *Humana Mutation*. 17: 439-474.
- zur Stadt U., J. Rischewski, R. Schneppenheim and H. Kabisch, (2001). "*Denaturing HPLC for Identification of clonal T-Cell Receptor gene Rearrangements in Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia*". *Clinical Chemistry*. 47: 2003-20011.

- zur Stadt U., C. Eckert, J. Rischewski, K. Michael, S. Golta, M. Muller, R. Schneppenheim and H. Kabisch, (2003). "*Identification and characterisation of clonal incomplete T-cell-receptor V δ 2-D δ 3/D δ 2-D δ 3 rearrangements by denaturing high-performance liquid chromatography and subsequent fragment collection: implications for minimal residual disease monitoring in childhood acute Lymphoblastic leukemia*". J. Chromatogr. 792: 287-298.

Appendice 1: Locus 14q32.33 IgH dell'Homo sapiens.



V-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)
- Pseudogene
- △ Not sequenced, not found in Matsuda et al., Exp. Med., 188, 2151-2162 (1998)

D-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)

J-GENE

- Functional

C-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)
- Pseudogene

GENES NOT RELATED

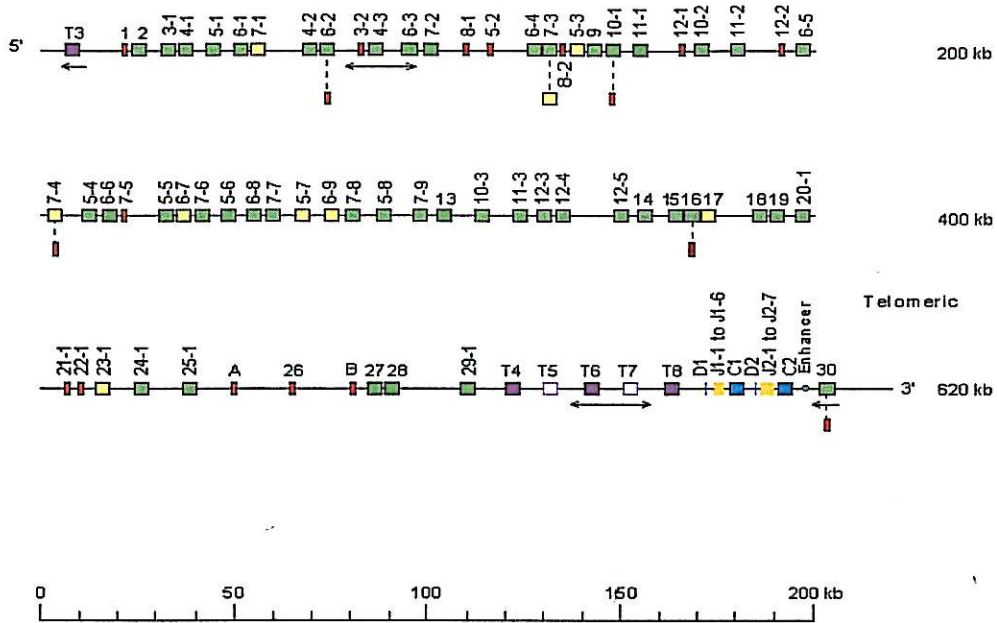
- Pseudogene.

Le frecce viola indicano esempi di primer famiglia-specifici senso e l'unico primer consensus antisenso.

Nel circolo verde è evidenziata la vicinanza del segmento Dh7-27 al locus Jh.

Appendice 2: Locus 7q34 TCR β dell'*Homo sapiens*.

Centromeric



V-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)
- Pseudogene

D-GENE

- Functional

J-GENE

- Functional

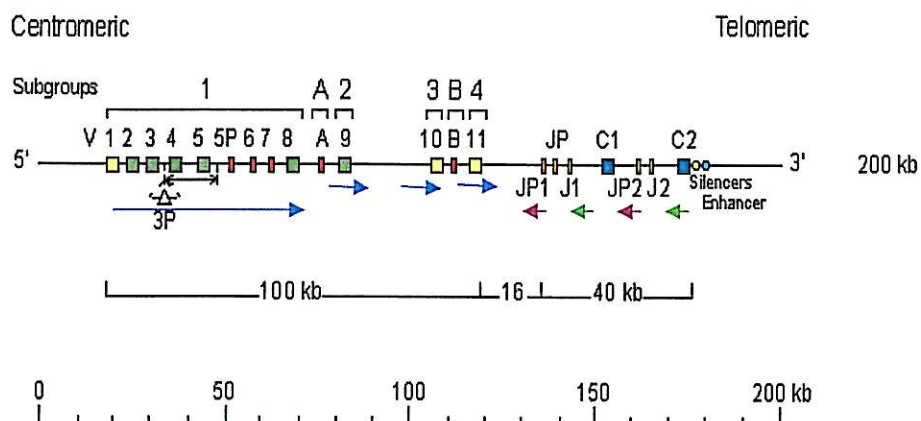
C-GENE

- Functional

GENES NOT RELATED (Trypsinogen genes)

- Functional
- Pseudogene

Appendice 3: Locus 7p14 TCR γ dell'*Homo sapiens*.



V-GENE

- Functional
- ORE (Open Reading Frame)
- Pseudogene
- △ Not sequenced

J-GENE

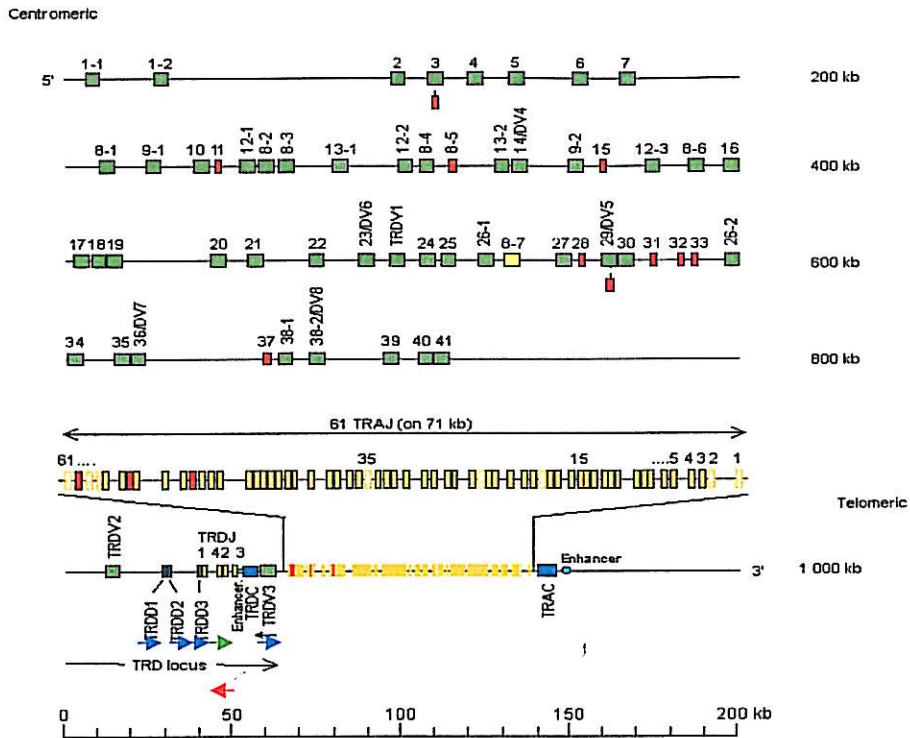
- Functional

C-GENE

- Functional

Le frecce azzurre indicano la posizione dei primer senso segmento-specifici e famiglia V γ -specifici, mentre quelle viole e verdi la posizione dei primer antisenso a doppia specificità.

Appendice 4: Locus 14q11.2 TCR α/δ dell'Homo sapiens.



V-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)
- Pseudogene

D-GENE

- Functional

J-GENE

- Functional
- ORF (Open Reading Frame)
- Pseudogene

C-GENE

- Functional

Le frecce azzurre indicano la posizione dei primer senso segmenti V-specifici, mentre quelle verdi e rosse indicano, rispettivamente, le posizioni del primer senso segmento D2-specifico e dei primer antisense segmento D3-specifico e segmento J consensus.

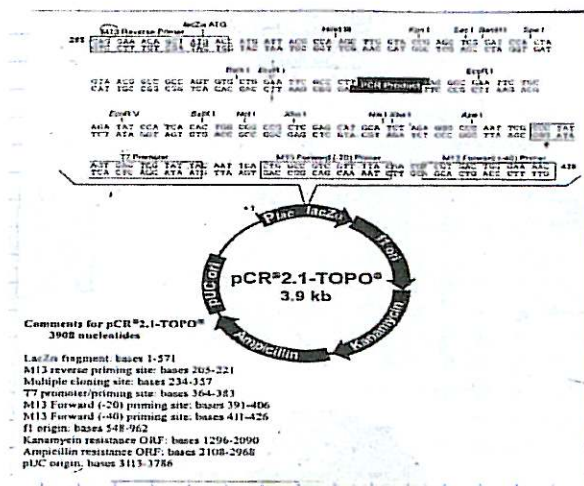
Appendice 5: Tabella con i dati clinici di alcuni dei campioni testati.

Campioni	Malattia	Stadio	Tipo	Data Prelievo	Note
11899	LLC-B	Dx	MB	12/12/2005	
10652	LLC T	F.U.	MB	27/04/2005	
5538	LLC B	F.U.	MB	30/10/2001	
10471	LLC T	Dx	PB	22/03/2005	
2543	LLC B	Dx	MB	07/01/1998	
3771	LLC B	Recidiva	MB	29/11/1999	
5493	Linfoma + dermatomiosite	Dx	MB	16/10/2001	
2198	LNH	Dx	MB	30/06/1997	Splenomegalia epatomegalia linfomegalia
4648	Linfoma mantellare	F.U.	MB	09/11/2000	
10633	LNH-T Med	Dx	MB	21/04/2005	
5637	LNH Leucemizzato Burkitt	Dx	MB	04/12/2001	
11454	LNH-T cutaneo	Dx	MB	10/10/2005	
11378	LNH mobilitazione	preallo TMO	Aferesi stem cell		
10763	Linfoma Burkitt	Dx	MB	11/05/2005	
11904	MGUS + Linfoadenomegalia	Dx	MB	13/12/2005	
10614	SMD+MGUS	Dx	MB	19/04/2005	
3879	SLP-T	F.U.	PB	25/01/2000	
3814	SLP-T + Nutropenia	F.U.	PB	21/12/1999	
5084	MLP-B	Dx	MB	16/05/2001	
3369	SLP	Dx	MB	23/04/1999	
4696	Linfocitosi DNDD	Dx	PB	28/11/2000	
5960	Linfocitosi + SMP		MB	26/02/2002	
3555	LLA B		MB		CD19+ CD13+ CD33+ CD10+ DR+
11449	LLA T	Remissione	MB	07/10/2005	
6684	LLA T	Dx	MB	10/10/2002	
4645	LLA	Dx	MB	09/11/2000	CD19+ CD10+ CD13+
3669	LLA B	Recidiva	MB	06/10/1999	
3808	LLA B	Remissione Parziale	PB	07/09/1999	
3647	LLA B	Recidiva	PB	22/09/1999	
3010	LLA	Recidiva	MB	24/09/1998	CD19+ CD20+
3309	LLA B	Dx	MB	10/03/1999	CD19+ CD10+ DR+ CD13+
4657	LLA-T pre-TMO	Remissione	MB	15/11/2000	
3255	LLA B	Dx	MB	08/02/1999	
3126	LLA B	Dx	PB	24/11/1998	
3557	LLA B	Dx	PB + MB	05/08/1999	CD19+ CD20+ CD34+
13112	Leucosi + Ipereosinofilia	Dx	MB	12/06/2006	
12020	Ipereosinofilia + linfocitosi	F.U. I controllo	PB	10/01/2006	
13117	Ipereosinofilia + Linfocitosi	Dx	PB		CD3-CD4+ 2,4%
12045	Ipereosinofilia + linfocitosi	Dx	PB	11/01/2006	
11963	Ipereosinofilia	Dx	MB	28/12/2005	
10863	Ipereosinofilia	Dx	MB	31/05/2005	

Continuo appendice 5

Campioni	Malattia	Stadio	Tipo	Data Prelievo	Note
10759	Iper eosinofilia	Dx	MB	11/05/2005	
12128	Iper eosinofilia	Dx	PB	25/12/2006	
11532	Leucemia plasmacellulare	F.U.	MB	07/10/2005	
3520	Neutropenia + LGL	F.U.	PB	12/07/1999	CD3+ CD8+
9062	LGL	Dx	PB	14/05/2004	CD3+
10934	Neutropenia	Dx	PB	14/06/2005	
12326	LMC	Dx	MB	21/02/2006	
Controlli positivi					
Campioni	Malattia	Stadio	Tipo	Data Prelievo	Note
Jurkat	LLA T				
Reh	LLA B				
CPA 1	Linfoma T				
CPA 2	Linfoma B				
Karpas 299	Linfoma T				
Controlli negativi					
Campioni	Malattia	Stadio	Tipo	Data Prelievo	Note
EOL 1	Iper eosinofilia				
CNA	Pz non leucemico				
PNL 1					
PNL 2					
PNL 3					
PNL 4					
PNL 6					
Placenta					
Pool	Mix 10 campioni da PNL				

Appendice 6: Rappresentazione schematica del vettore plasmidico usato per il clonaggio delle sonde Jh6/TCR β C.



SOC Medium

I componenti di tale substrato sono:

Triptone per Batteri (Difco, Detroit, MI)	2% (w/v)
Estratto di Lievito per Batteri (Difco)	0.5% (w/v)
NaCl	10 mmol/l
KCl	2.5 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
MgSO ₄	10 mmol/l
Glucosio	20 mmol/l

Tale substrato è stato autoclavato a 120°C per 20min e dispensato in piastre Petri per poi essere usato durante la fase di trasformazione delle cellule di *E. coli* con il plasmide ricombinante, contenente l'insero di interesse.

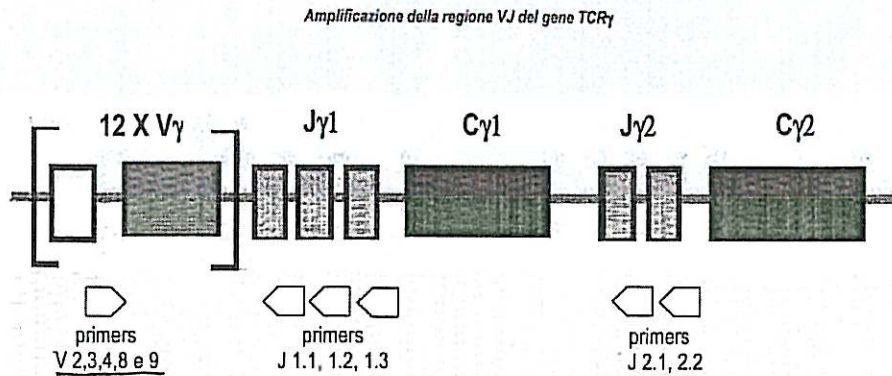
Luria-Bertani Medium

I componenti di tale substrato sono:

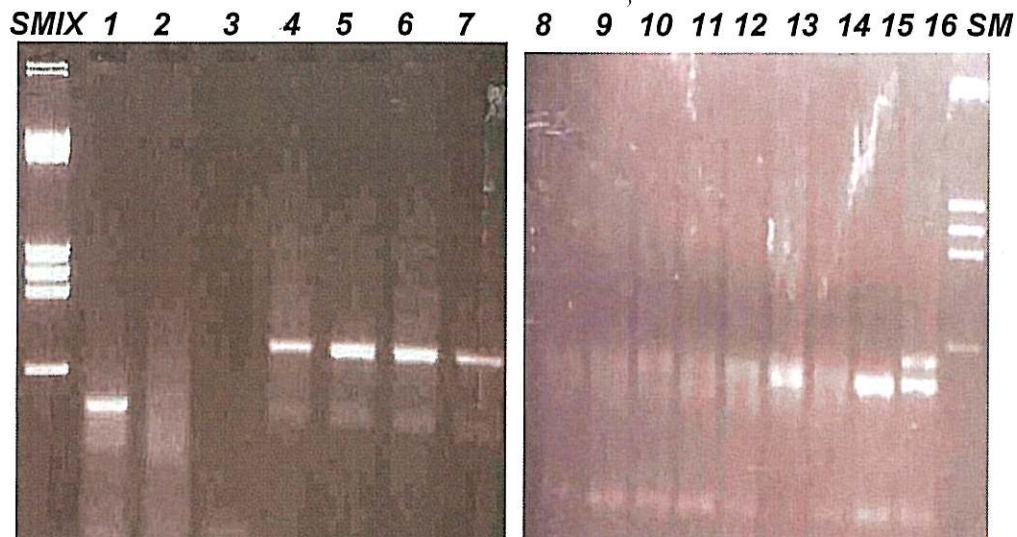
Bacto-Triptone (Difco, Detroit, MI)	1% (w/v)
Bacto-Yeast extract (Difco)	0.5% (w/v)
NaCl	0.5% (w/v)
Bacto-Agar (Difco)	1.6% (w/v)
NaOH	pH 7.0

Tale substrato è stato autoclavato a 120°C per 20min e usato durante la preparazione delle cellule competenti per la trasformazione e la crescita delle cellule trasformate.

Appendice 7: Schema della localizzazione dei primer Multiplex PCR.

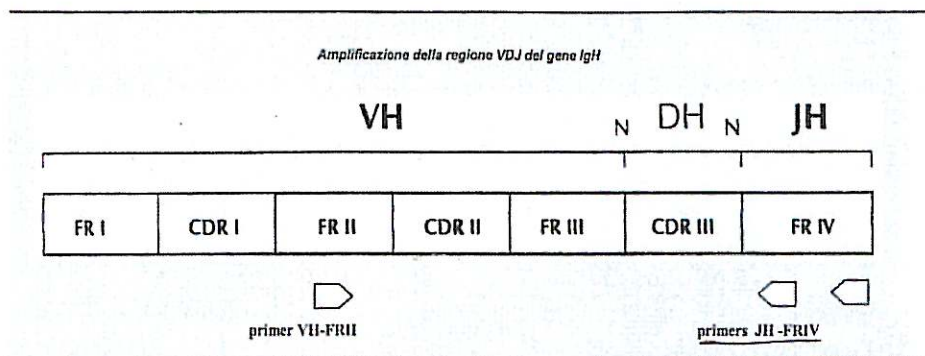


Profili di amplificazione dei riarrangiamenti TCR γ per Multiplex PCR.

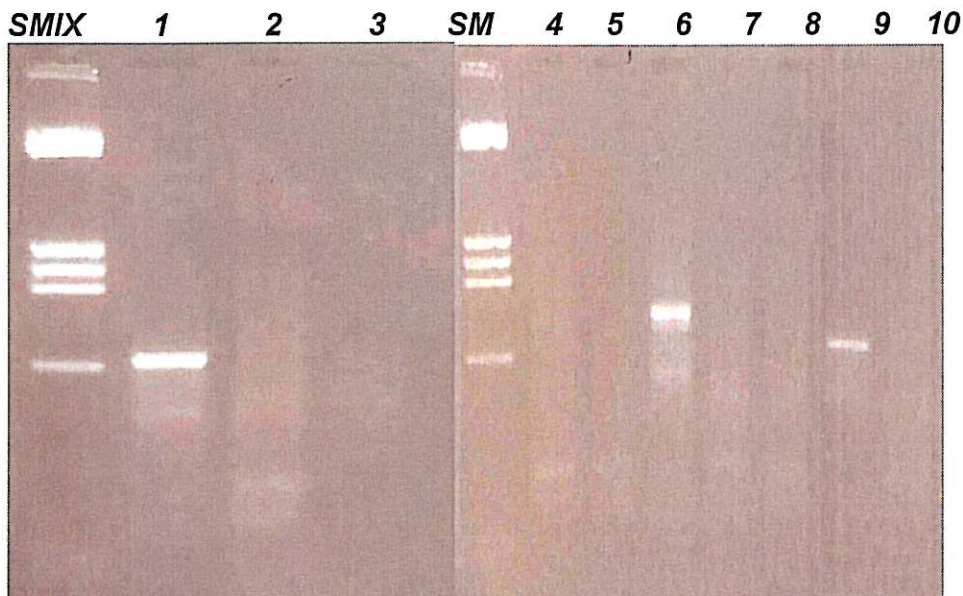


I primer producono un amplificato atteso di 170-230bp visualizzato come banda netta su gel d'agarosio al 3%. Questo è il caso dei campioni 1 (3126 LLA B), 4 (Jurkat LLA T), 5 (Reh LLA B), 6 (Karpas LNH T), 7 (CPA1 LNH T). I campioni policlonali, come il 2 (Pool), mostrano una banda larga e diffusa, mentre i campioni negativi, come il 3 (placenta) non manifestano amplificazione con la mix I. I campioni 15 (Jurkat), 16 (CPA 1), 13 (3126) sono monoclonali per la mix II, mentre 8 (placenta), 9 (pool), 10 (Karpas), 11 (11347 HES) e 12 (11181 mieloma) sono policlonali.

Appendice 8: Schema localizzazione dei primer Semi-nested PCR.



Profili di amplificazione dei riarrangiamenti IgH per Semi-nested PCR.



I primer producono un amplificato atteso di 240-260bp visualizzato come banda netta su gel d'agarosio al 3%. Questo è il caso dei campioni 1 (3126 LLA B), 6 (CPA 2 LNH B), 9 (Reh LLA B), mentre i campioni 6 (Karpas LNH T), 3 (CPA1 LNH T), 4 (Pool), 5 (placenta), 7 (11347 HES), 8 (12217 Pancitopenia) mostrano una banda larga e diffusa tipica del profilo policlonale.

Appendice 9: Esempi di segmenti scelti tra le sequenze in database IMGT per il calcolo dell'algoritmo di Stenford e per la predizione della temperatura di quasi denaturazione con il software Wavemaker Transgenomic riarrangiati senza delezioni o aggiunte nucleotidiche.

IgH	TCR γ	TCR δ
Vh2-26 - Dh1-7 - Jh6	Vg1-J1	Vd1-Dd3
Vh3-21 - Dh1-7 - Jh6	Vg1-J2	Vd1-Jd1
Vh3-9 - Dh1-7 - Jh6	Vg1-Jp1	Vd1-Dd2-Dd3
Vh4-59 - Dh1-7 - Jh6	Vg1-Jp2	Vd1-Dd2-Jd1
Vh4-4 - Dh1-7 - Jh6	Vg10-J1	Vd2-Dd3
Vh5-51 - Dh1-7 - Jh6	Vg10-J2	Vd2-Jd1
Vh1-69 - Dh1-14 - Jh6	Vg10-Jp1	Vd2-Dd2-Dd3
Vh2-5 - Dh1-14 - Jh6	Vg10-Jp2	Vd2-Dd2-Jd1
Vh2-26 - Dh1-14 - Jh6	Vg5-Jp2	Vd3-Dd3
Vh3-21 - Dh1-14 - Jh6	VgP5-J1	Vd3-Jd1
Vh3-9 - Dh1-14 - Jh6	VgP5-Jp1	Vd3-Dd2-Dd3
Vh4-59 - Dh1-14 - Jh6	VgP5-Jp2	Vd3-Dd2-Jd1
Vh4-4 - Dh1-14 - Jh6	Vg11-J1	Dd2-Dd3
Vh5-51 - Dh1-14 - Jh6	Vg11-J2	Dd2-Jd1
Vh5-51 - Dh2-8 - Jh3	Vg2-Jp1	Dd2-Dd3-Jd1
Vh6-1 - Dh2-8 - Jh3	Vg2-Jp2	
Vh7-81 - Dh2-8 - Jh3		
Vh1-2 - Dh2-8 - Jh4		
Vh1-69 - Dh2-8 - Jh4		
Vh2-5 - Dh2-8 - Jh4		
Vh2-26 - Dh2-8 - Jh4		
Vh3-21 - Dh2-8 - Jh4		
Vh3-9 - Dh2-8 - Jh4		
Vh7-81 - Dh2-15 - Jh1		
Vh1-2 - Dh2-15 - Jh2		
Vh1-69 - Dh2-15 - Jh2		
Vh2-5 - Dh2-15 - Jh2		
Vh2-26 - Dh2-15 - Jh2		
Vh3-21 - Dh2-15 - Jh2		

Appendice 10: Temperature di quasi denaturazione DHPLC in gradiente lineare di TEAA per la discriminazione dei riarrangiamenti mono-, oligo- e policlonali.

Mix TcR	T da
1	54
2	56
3	60
4	57
5	54
6	58
7	58
8	54
9	57
10	56
11	56
12	57
13	58
14	54
15	56
16	56

Mix IaH	T da
1	56
2	58
3	60
4	60
5	59
6	59
7	58
8	59
9	60
10	60
11	59
12	62

Le suddette temperature di quasi denaturazione sono state stabilite dopo confronto dei dati prodotti dalla Temperature mapping, dal calcolo dell'algoritmo di Stanford e dalla predizione con il software Wavemaker Transgenomic, eseguite per ciascuna mix come indicato in materiali e metodi.

Appendice 11: Tabella risultati analisi Southern Blot (SB) di alcuni dei 70 campioni testati.

Campioni			Sonda JH				
Codice	Malattia	Stadio	BglIII	HindIII	EcoRI	Quadro allelico	
3358	SLP	Dx	g+3,7+4,6+7,5	g+4,8+6,4	g+18,2+13,5	R1/R2 - R3/G4	Biclonale
3369	SLP	Dx	g+4,8+3,7	g+9,7+6,5	g+10	R1/R2 - R1/G	Biclonale
3255	LLA B	Dx	g+2,6+9,2+4+2,9+5,3	g+6,6+6,1	8,4	R1/R2 - R3/R4	Biclonale
3126	LLA B	Dx	G+5,3	g+7,9+6,6+5,3	g+3,9+9,2+7,3	R1/R2 - R3/G4	Biclonale
3557	LLA B	Dx	n.v.	6,8+8,3+9,2	16+9,5+9,3	R1/R2 - R3/G4	Biclonale
5084	SLP - B	Dx	g+5	g+6	g+6,6	R1/D2	Monoclonale
3010	LLA	Recidiva	2,2	3,6		R1/D2	Monoclonale
3309	LLA B	Dx	G+3,4	9,7	15	R1/D2	Monoclonale
3050	SLP		g+10+12	g+9,4	g+21+18	D1/R2 - R1/G2	Monoclonale
3879	SLP - T	F.U.	G+12	g	g+20	D1/R2 - G1/G2	Monoclonale
3814	SLP T + Neutropenia	F.U.	G+9,8	g	G	G1/G2 - D1/R2	Monoclonale
3608	LLA B	Rem. Parz.	g+4,6+23	g+8,2+6,8	g+16+8,8	R1/R2	Monoclonale
3647	LLA B	Recidiva	g+4,8+2,3	g+8,4+6,9	g+16+8,5	R1/R2	Monoclonale
3771	LLC B	Recidiva	g+2,4+4	g+4+3,3	g+17+16	R1/R2	Monoclonale
Placenta			3,9	9,5	16,5	G1/G2	Negativo
			Sonda β-TCR				
			HindIII	EcoRI	BamHI	Quadro allelico	
4696	Linfocitosi DNDD	Dx	G	g+11,5+4,8	g+18	R1/G2 - R1/G2	Monoclonale
3082	SLP T	Dx	25	g+10	25	D1/R2 - R1/G2	Monoclonale
5960	Linfocitosi SMP		G	g	g	G1/G2	Negativo
3520	Neutropenia + LGL	F.U.	G+9,1	g+8	n.v.	G1/G2 - D1/R2	Monoclonale
4585	LGL	Dx	G+7,9	g+6,8	g+16+12	D1/R2 - R1/G2	Monoclonale
6684	LLA T	Dx	G	g	g	G1/G2	Negativo
4657	LLA T	Remissione	G	g	g	G1/G2	Negativo
4764	LLA	Dx	G	g	g	G1/G2	Negativo
Placenta			3,5+7,5 (5,8)	10,5+3,8 (7,4)	23	G1/G2	Negativo

Appendice 12: Tabella risultati analisi PCR TCR $\gamma\delta$ e multiplex PCR di alcuni dei 246 campioni.

Campioni		TCR delta										TCR gamma							Multiplex		4q1 2
Codice	Malattia	Stadio	V1- D3	V2- D3	V3- D3	D2- D3	V1- J1	V2- J1	V3- J1	D2- J1	V1- J1.1 /2.1	V9- J1.1/2 .1	V10- J1.1/2 .1	V11- J1.1/2 .1	V1- J1.3/ 2.3	V9- J1.3/2 .3	V10- J1.3/2 .3	V11- J1.3/2 .3	Mix I	Mix II	
3721	SLP	Dx												X				X	neg	x	
11454	LNHT cutaneo	Dx											X						X	neg	
11455	LNHT cutaneo	Dx																	X	neg	
5960	Linfocitosi SMP																		neg	neg	
10633	LNHT Med	Dx		X									X					X	X	neg	
10753	LNH Burkitt	Dx		X									X					X	X	neg	
5315	LNH	Dx		X									X					X	neg	X	
6684	LLA T	Dx				X							X						neg	neg	
4764	LLA	Dx		X															neg	neg	
3647	LLA B	Residua		X									X					X	X	neg	
3608	LLA B	Remissione Parziale		X														X	X	neg	
3255	LLA B	Dx										X						X	neg	neg	
3126	LLA B	Dx		X								X		X				X	neg	neg	
12020	HES-LV	F.U.										X							neg	neg	neg
12045	HES-LV	Dx									X								neg	neg	neg
13112	HES-LV	Dx																	neg	neg	neg
13117	HES-LV	Dx												X					X	neg	neg
12128	HES	Dx		X														X	neg	neg	neg
12197	HES	Dx																	neg	neg	neg
12026	HES	F.U.																	neg	neg	neg
10863	HES	Dx																X	X	neg	neg
2543	LLCB	Dx																X	X	neg	neg
10471	LLCT	Dx																X	X	neg	neg
10934	Neutropenia	Dx		X									X					X	X	neg	neg

Continuo appendice 12.

Codice	Malaria	Studio	V1-D3	V2-D3	V3-D3	D2-D3	V1-J1	V2-J1	V3-J1	D2-J1	V1-J1/21	Vp-J1/21	V10-J1/21	V11-J1/21	V1-J1/23	Vp-J1/23	V10-J1/23	V11-J1/23	Mix I	Mix II	
																					Controlli positive
Controlli positive																					
Controlli negative																					
4585	LGL	Dx	x				x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	
10112	LGL	F.U.												x					x	x	
5656	LLC	Dx		x				x	x			x							neg	neg	
3725	SLP	Dx												x					neg	neg	
3050	SLP		x			x	x		x			x		x					neg	x	
3879	SLP.T	F.U.	x	x		x	x	x	x			x		x					neg	x	
Controlli positive																					
CPA 1	LNHT		x			x		x											x	x	
CPA2	LNHB							x											x	neg	
Karpas	LNHT		x			x	x												x	neg	
Jurkat	LLA.T			x		x													x	x	
Reh	LLA.B		x			x													x	neg	
Controlli negative																					
EOL1	HES																		neg	neg	
PNL 1			x		x	x													neg	neg	
PNL 2			x		x			x											neg	neg	
PNL 3			x		x	x		x											neg	neg	
PNL 4			x		x	x	x	x											neg	neg	
PNL 5			x		x	x	x	x											neg	neg	
Placenta							x												neg	neg	
Pool		Dx	x	x	x	x	x	x	x										x	neg	
CNA																			neg	neg	

Appendice 13: Confronto dei risultati prodotti con SB, PCR TCR $\gamma\delta$, PCR IgH, Multiplex PCR TCR γ e Semi-nested PCR IgH di alcuni dei 246 campioni testati.

Codice	Campione		TCR δ	TCR γ	Multiplex		4q12	IgH V	IgH D	Semi-Nested	SB	
	Malattia	Stadio			Mix I	Mix II					TCR b	Jh
10633	LNH T Med	Dx	X	x	x	neg		neg	neg	neg		
11449	LLA T	Remissione	X	x	neg	neg		neg	neg	Neg		
3050	SLP		X	x	neg	x		x	x	X	Monoclonale	
3879	SLP T	F.U.	X	x	neg	x		x	x	Neg	Monoclonale	
3520	Neutropenia LGL	F.U.	X	x	x	x		x	x	X	Monoclonale	
3814	SLP T Neutropenia	F.U.	X	x	x	x		x	x	X	Monoclonale	
3608	LLA B	Remissione Parziale	X	x	x	neg		x	x	X		Monoclonale
3647	LLA B	Recidiva	X	x	x	neg		x	x	X		Monoclonale
11904	MGUS Linfadenomegalia	Dx	X	x	neg	x		x	x	X		
11968	MGUS Linfadenomegalia	F.U.	X	x	x	x		x	x	X		
10471	LLC T	Dx	Neg	x	x	neg		neg	x	neg		
10523	SLP	Dx	X	x	x	neg		neg	x	neg		
11963	HES	Dx	X	x	neg	neg	neg	neg	x	neg		
12020	HES-LV	F.U.	Neg	x	neg	neg	neg	neg	neg	neg		
12128	HES	Dx	X	x	neg	neg	x	neg	x	neg		
12197	HES	Dx	Neg	x	neg	neg	x	neg	x	neg		
11890	HES	Dx	X	x	neg	neg	neg	neg	x	neg		
12026	HES	F.U.	X	x	neg	neg	neg	neg	neg	neg		
2543	LLC B	Dx	Neg	x	neg	neg		x	x	x		Monoclonale
3771	LLC B	Recidiva	Neg	x	neg	neg		x	x	x		Monoclonale
4585	LGL	Dx	X	x	x	x		x	x	neg	Monoclonale	
9052	LGL	Dx	X	x	x	x		x	x	x		
10112	LGL	F.U.	Neg	x	x	x		neg	x	neg		
10386	HES	F.U.	X	x	neg	neg	neg	neg	neg	neg		
10648	HES	F.U.	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		
12320	HES	F.U.	X	x	neg	neg	neg	neg	x	neg		
5279	LLC B		X	x	neg	neg		x	x	x		Monoclonale
11433	LLC B	F.U.	Neg	x	x	x		neg	x	x		
4767	SLP	Dx	X	x	neg	neg		x	x	x	Monoclonale	
2198	LNH	Dx	Neg	x	neg	x	x	x	x	x		
4648	LNH mantellare	F.U.	Neg	neg	neg	neg		x	x	x		
10680	LNH mantellare	Recidiva	X	x	neg	neg		x	x	x		
11603	LNH mantellare	Recidiva	Neg	x	x	neg		x	x	x		
11190	LPC	F.U.	Neg	x	x	x		x	x	neg		
11532	LPC	F.U.	Neg	x	x	neg		x	x	x		
10475	LLA	Dx	Neg	x	x	x		x	x	neg		

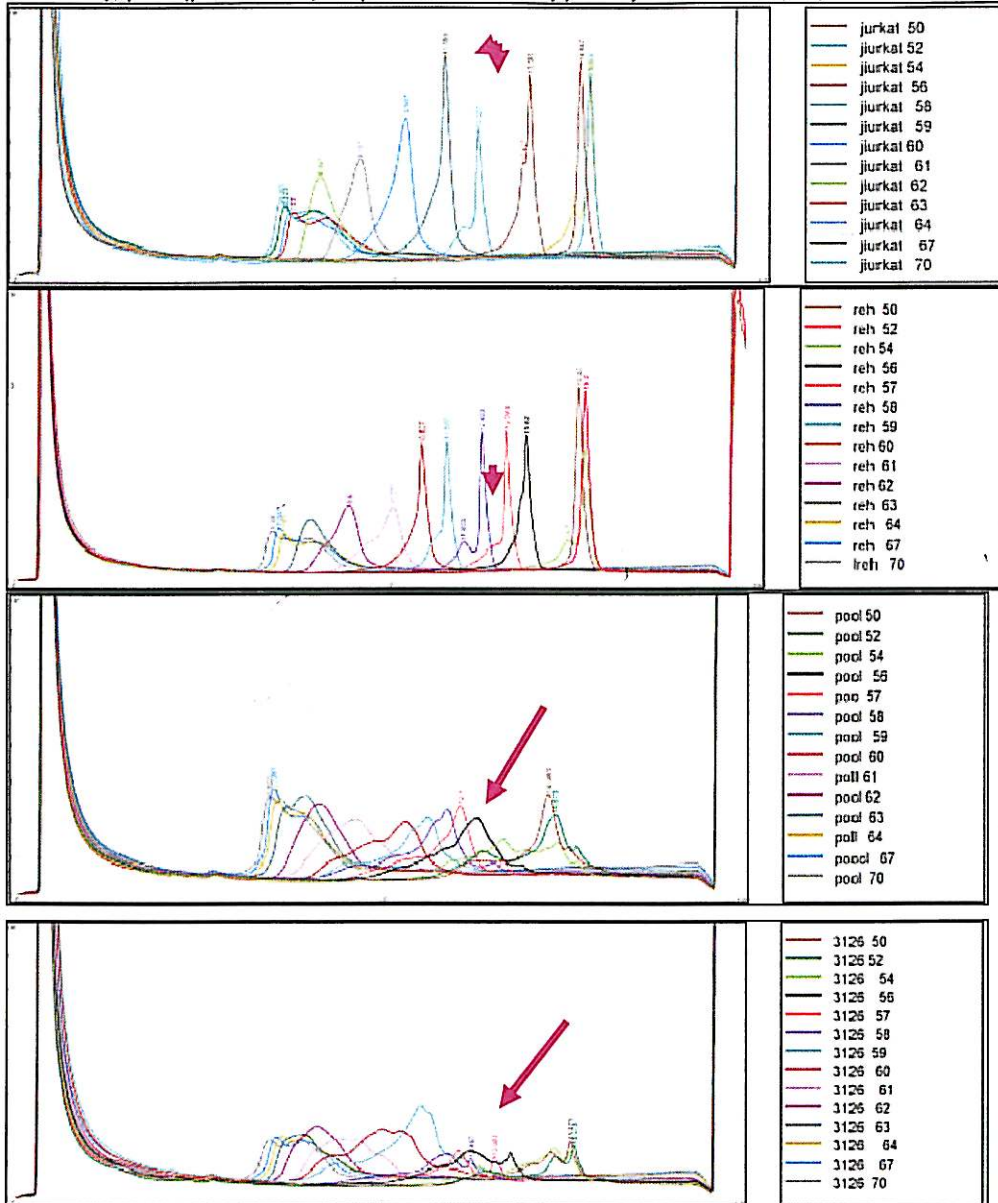
Continuo appendice 13.

11538	ALL	Recidiva	Neg	x	x	neg		x	x	x		
12046	HES-LV	Dx	X	x	neg	neg	neg	neg	x	neg		
13112	HES-LV	Dx	Neg	x	neg	x	x	neg	x	neg		
13117	HES-LV	Dx	Neg	x	x	neg		neg	neg	neg		
Controlli positive			TCR δ	TCR γ	Multiplex		4q12	IgH V	IgH D	Multiplex	SB	
Codice	Malattia	Stadio			Mix I	Mix II					TCR b	Jh
CPA 1	LNH T		X	x	x	x		neg	neg	neg		
CPA 2	LNH B		X	x	x	neg		x	x			
Karpas	LNH T		X	x	x	neg		x	x	neg		
Jurkat	LLA T		X	x	x	x		x	x	x		
Reh	LLA B		X	x	x	neg		x	x	x		
CPA 2	LNH B		X	x	x	neg		x	x	x		
Controlli negative			TCR δ	TCR γ	Multiplex		4q12	IgH V	IgH D	Semi-nested	SB	
Codice	Malattia	Stadio			Mix I	Mix II					TCR b	Jh
EOL1	HES		Neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		
PNL 1			X	x	neg	neg		x	x	neg		
PNL 2			X	neg	neg	neg		x	x	x		
PNL 3			X	x	neg	neg		x	x	neg		
PNL 4			X	x	neg	neg		x	x	neg		
PNL 5			X	x	neg	neg		x	x	x		
Placenta			X	x	neg	neg		x	x	neg	neg	Neg
Pool	mix 10 PNL	Dx	X	x	x	neg		x	x	neg		
CNA			Neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		

Appendice 14: Tabella risultati PCR IgH e semi-nested PCR di alcuni dei 246 campioni testati.

Campioni	Malattia	Stadio	V17-J	V2-J	V3-J	V4(6-J)	V5-J	D1-J	D2-J	D3-J	D4-J	D5-J	D6-J	D7-J	Semi-nested
5637	LNH Burkitt	Dx								x					neg
5379	LNH	Dx			x					x					x
3678	LNH	Dx			x									x	neg
11454	LNH T cutaneo	Dx				x			x						x
11455	LNH T cutaneo	Dx				x			x			x			x
2198	LNH	Dx					x					x			x
4648	LNH	F.U.	x											x	x
10680	LNH	Recidiva					x	X						x	x
11603	LNH	Recidiva			x		x	X					x		x
11378	LNH mobilizzazione	pre TMO					x								neg
12217	Panictopenia	F.U.			x		x	X	x	x		x	x	x	neg
10614	SMD MGUS	Dx				x	x	X	x		x	x	x	x	x
10285	LLC	Dx		x	x					x	x	x	x		x
10269	LLC	Progressione			x			X			x	x			x
10471	LLC T	Dx										x			neg
2543	LLC	Dx			x		x	X	x			x	x	x	x
3771	LLC B	Recidiva					x	X	x			x	x	x	x
5279	LLC B	Dx			x		x	X	x			x	x	x	x
11433	LLC B	Dx				x				x			x	x	x
5656	LLC	Dx					x								neg
3766	Leucosi	Dx			x		x		x					x	neg
4877	SLP T	Dx						X							neg
10523	SLP	Dx										x			neg
5515	SLP	Dx			x				x				x		x
3721	SLP	Remissione	x				x	X	x					x	x
3725	SLP	Dx			x		x	X	x						x
10776	SLP	Dx		x	x		x	X	x			x	x		neg
3050	SLP				x						x	x			x
3879	SLP T	F.U.		x	x			X						x	neg
3814	SLP Neutropenia	F.U.	x		x		x	X	x					x	x
3520	Neutropenia LGL	F.U.		x			x	X	x			x			x
9052	LGL	Dx			x			X	x					x	x
4585	LGL	Dx			x			X	x					x	neg
10112	LGL	F.U.						X						x	neg
3608	LLA B	Remissione Parziale			x		x	X						x	x

Appendice 15: Risultati Temperature Mapping DHPLC in gradiente lineare di TEAA dei campioni Jurkat (LLA T monoclonale), Reh (LLA B monoclonale), 3126 (LLA B biclonale), pool (policlonale) amplificati con la coppia di primer TCR V γ -J γ 1.3/2.3.

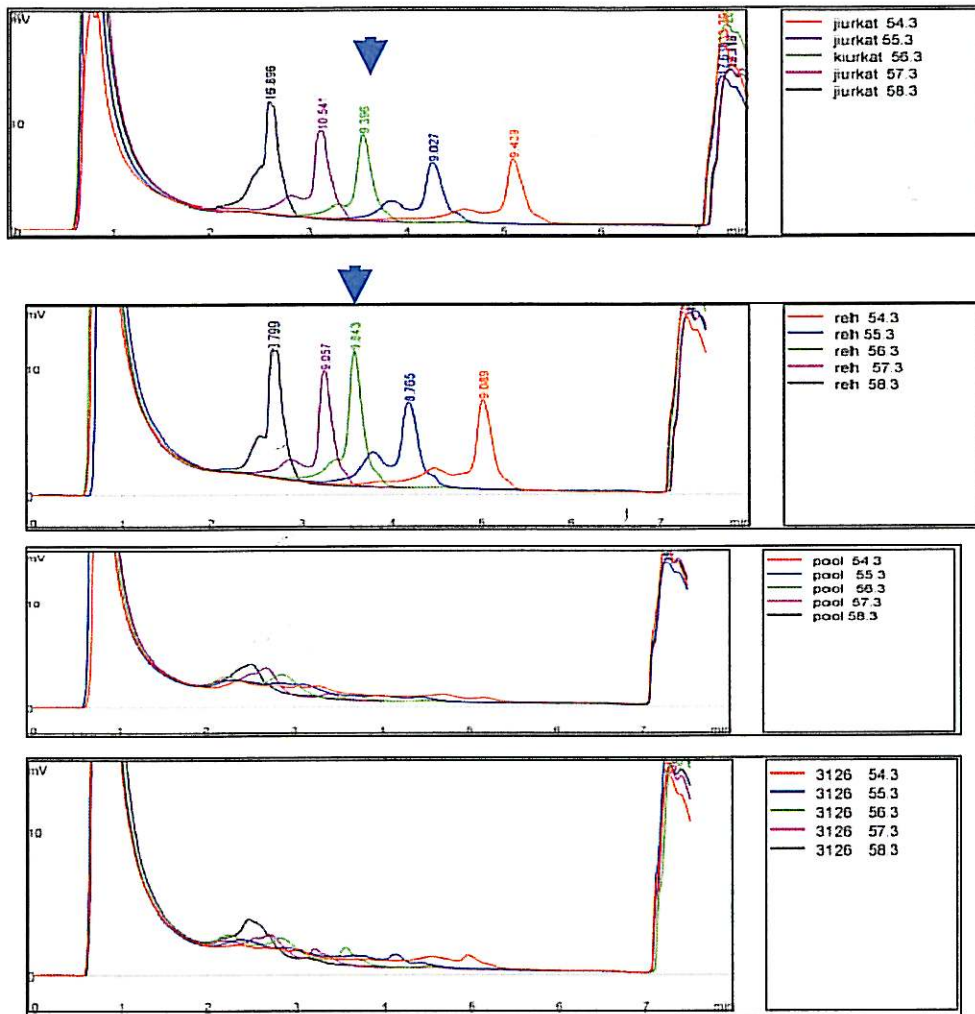


Appendice 16: Confronto dei valori ottenuti tramite Temperature mapping, calcolo dell'algoritmo di Stanford e predizione della temperatura di quasi denaturazione con il software Wavemaker Transgenomic.

Mix TCR	T°C	Algoritmo di Stanford	Sotware Transgenomic
1	50-54	60	58.02.00
2	56-58	60	58.04.00
3	58-60	61	58.03.00
4	58	60 e 56	55.09.00
5	50-54	60-58-55-53	56-55
6	57-58	60-58-55-54	57-55
7	55-58	60-55-56	56-55
8	54	60-55-56	54
9	57	60-59-57-52	58-57
10	56-57	57 a 59	58-57
11	56	57 a 59	58-59
12	57	59-57-52	57
13	58	57-59	58
14	54	60-59-56.9	56
15	56	59	57
16	56-58	58-53	56

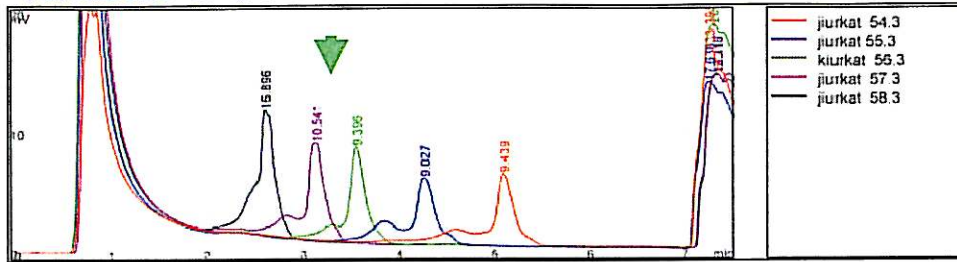
Mix IgH	T°C	Algoritmo di Stanford	Sotware Transgenomic
1	59	62-61	62.1 a 60.4
2	58	62-61	62.4 a 60.5
3	60	62-61	61.5 a 59.6
4	60	62-61	61.3 a 60
5	59	62-61	68.1 a 60.1
6	56	63-62	65 a 63
7	58	61	62 a 60
8	59	61	61 a 60
9	60	62	63 a 61
10	60	62	63 a 61
11	59	61	62 a 61
12	62	63	63 a 62

Appendice 17: Risultati Temperature Mapping DHPLC in variazione di gradiente di TEAA dei campioni Jurkat (monoclonale), Reh (monoclonale), 3126 (biclone), pool (policlone) amplificati con la coppia di primer TCR V γ -J γ 1.3/2.3.

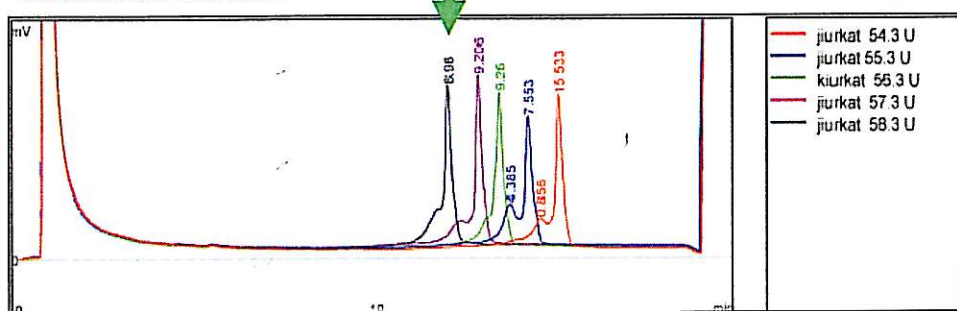


Continuo appendice 17.

Variazione di gradiente

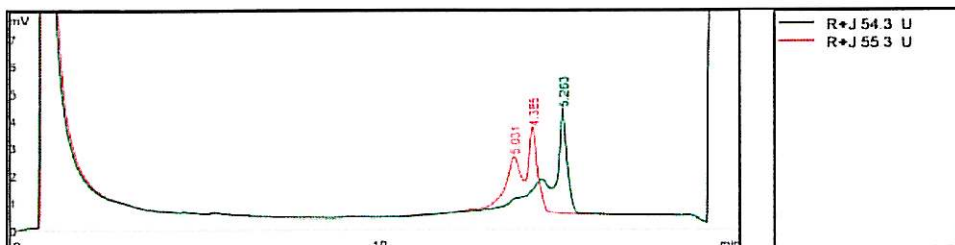


Gradiente lineare

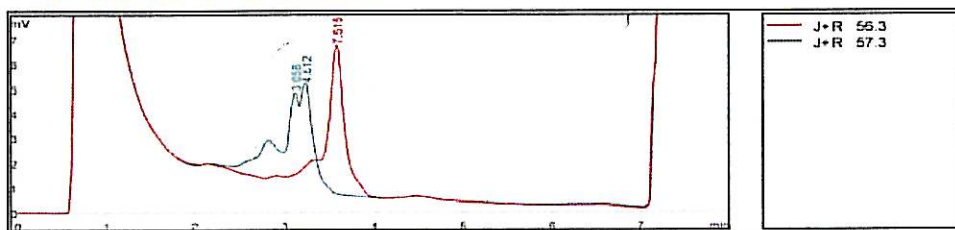


Appendice 18: Determinazione del potere discriminante del DHPLC e risultati dell'effetto delle variazioni di sequenza analizzando miscele V/V dei prodotti di amplificazione con i primer V γ -J γ 1.3/2.3 monoclonali (Reh+Jurkat), mono- e biconali (Reh+3126, Jurkat+3126), mono- e policlonali (Reh+pool, Jurkat+pool), bi- e policlonali (3126+pool) analizzati in gradiente lineare e in variazione di gradiente di TEAA.

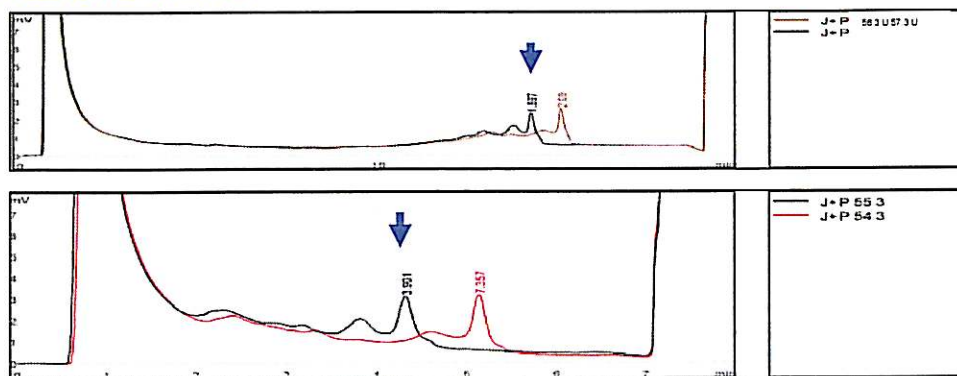
Gradiente lineare



Variazione di Gradiente

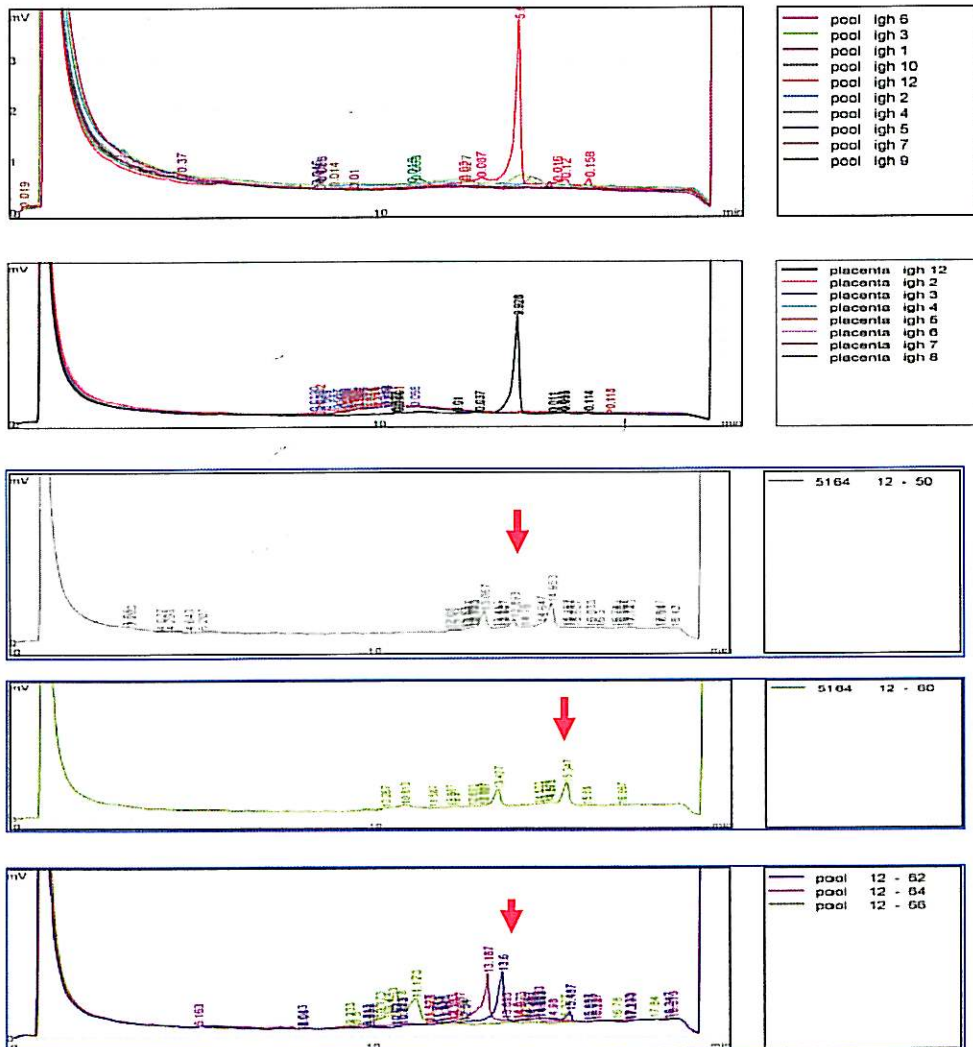


Gradiente lineare

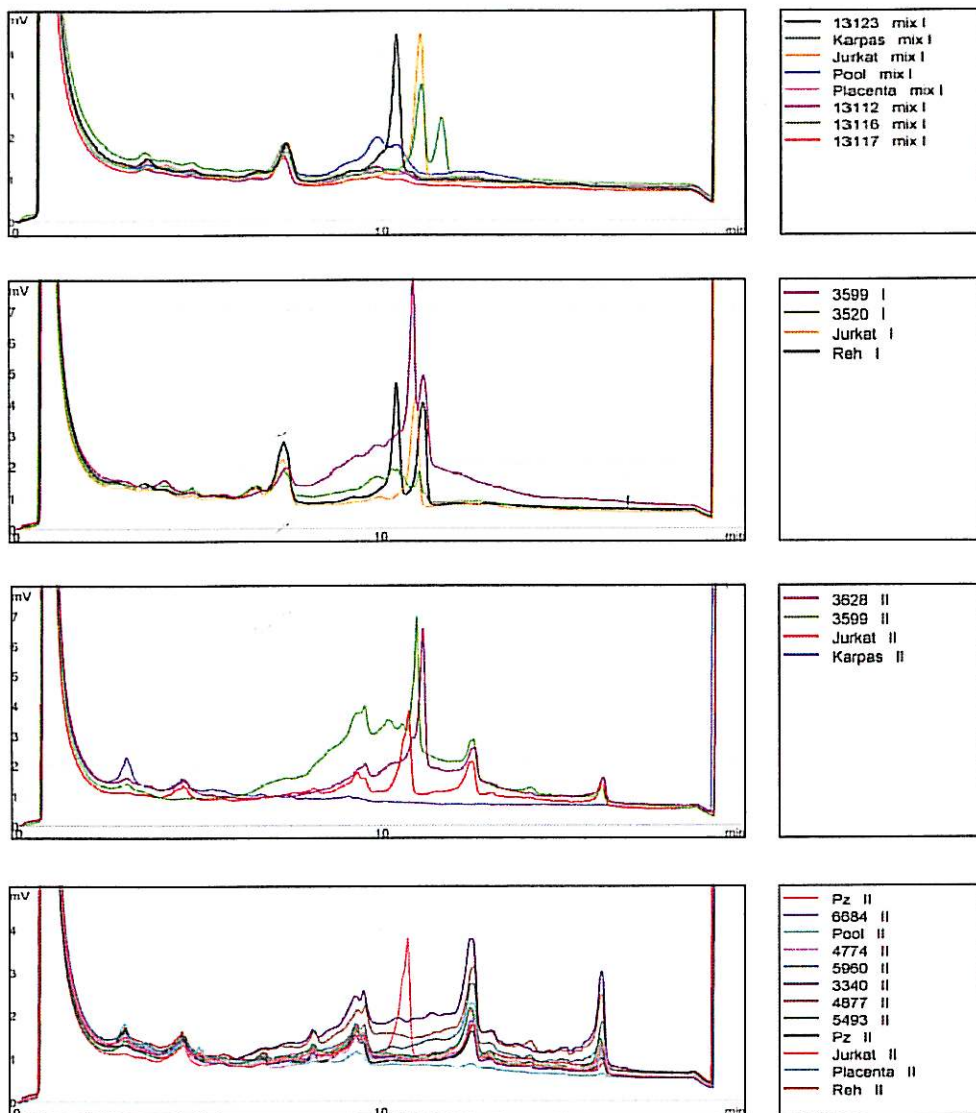


Variazione di Gradiente

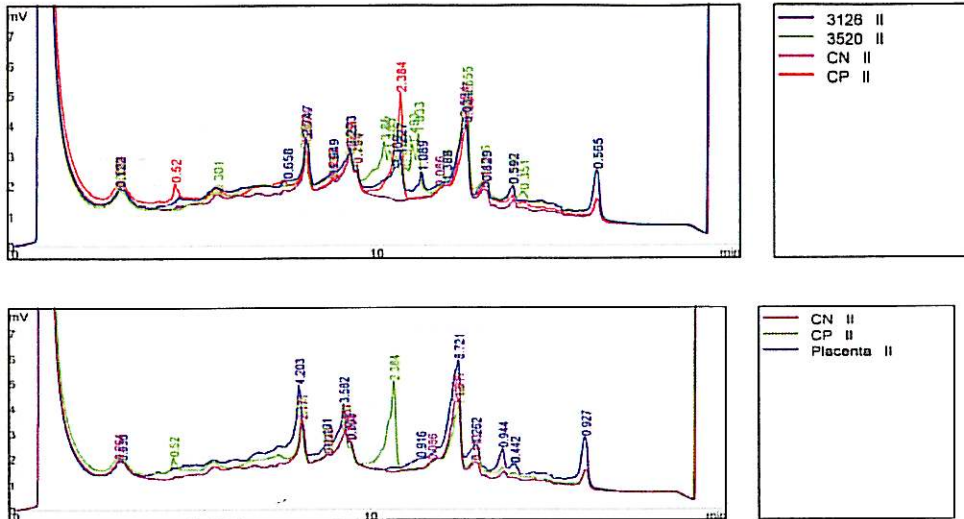
Appendice 19: Risultato di amplificazioni pseudoclonali dei campioni placenta e pool (segmenti genici IgH in configurazione germinale) e del campione 5164 (LNH) monoclonale (con profilo di eluizione heteroduplex) amplificati con la coppia di primer IgH Dh7-Jh consensus.



Appendice 20: Rilevazione al DHPLC dei prodotti mono-, oligo- e policlonali di alcuni dei 246 campioni amplificati in Multiplex PCR e Semi-nested PCR analizzati in condizioni lineari di gradiente TEAA.



Continuo appendice 20.



I campioni che presentano geni del TCR γ clonalmente riarrangiati sono:
per la mix I: Jurkat, 13123, Karpas, 3599, Reh, 3250;
per la mix II: 3628, 3599, 3520, 3126, CP Amplimedical, Jurkat.

Appendice 21: Risultati analisi dell'allineamento delle sequenze dei riarrangiamento amplificati per PCR IgH con quelle presenti nel database ImMunoGeneTics (<http://imgt.cones.fr>).

Analisi giunzionale sequenza IgH Vh3-Jh consensus di Reh.

```
Input V name    V-REGION N1      D-REGION          J-REGION          J name
Reh IGHV3-15*02 tgtaccacag. gg.atggttcggggagtta.ttatactactactacggtatggacgtctgg IGHJ6*02
Input          D name Vmut Dmut Jmut Ngc
reh  IGH3-10*01 0     0     2     2/2
```

Traduzione della giunzione

```
CDR3-IMGT 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 frame length
C T T G M V R G # Y Y G M D V W
reh  tgt acc aca ggg atg gtt cgg gga a.. tac tac tac ggt atg gac gtc tgg - 18
```

Analisi giunzionale sequenza IgH Vh3-Jh consensus del campione 11899 (LLC B).

```
Input V name    V-REGION N1      D-REGION          J-REGION          J name
11899 IGHV3-48*03 tgtgcgaga gg .ttacgatttttggagtggttattatggc .tactactactactacggtatggacgtctgg IGHJ6*02 IGH3-3*01
Input Vmut Dmut Jmut Ngc
11899 0     2     0     2/2
```

Traduzione della giunzione

```
CDR3-IMGT 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 frame length
C A R G Y D F W Y Y Y G M D V W
11899 tgt gcg aga ggt tac gat ttt tgg tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg + 21
```

Appendice 22: Risultati analisi dell'allineamento delle sequenze dei riarrangiamento amplificati per PCR TCR $\gamma\delta$ quelle presenti nel database ImMunoGeneTics (<http://imgt.cones.fr>).

Analisi giunzionale sequenza TCR V γ I-J γ 1.3/2.3 di Jurkat.

```
Input V name V-REGION N J-REGION J name Ngc
JURKAT TRGV8*01 tgtgccacctgg.aaatt.ttattataagaaactcttt TRGJ2*01 0/5
```

Traduzione della giunzione

```
105 107 109 114 116 118
CDR3-IMGT 104 106 108 113 115 117 frame length
C A T W K F Y Y K K L F
JURKAT tgt gcc acc tgg aaa ttt tat tat aag aaa ctc ttt + 10
130
Y R K N T T F P R * * R E G R K * L
JURKAT 13 TAT CGG AAG AAT ACA ACA TTT CCA AGG TAA TAG AGG GAA GGC AGG AAA TGA TTA
M13434 TRGV8*01
N * N N V I M F R K R R N W M G I *
JURKAT 13 AAC TGA AAT AAT GTA ATA ATG TTT AGA AAA AGG AGG AAT TGG ATG GGG ATT TGA
```

Analisi giunzionale sequenza TCR V γ 11-J γ 1.3/2.3 di Jurkat.

```
Input V name V-REGION N J-REGION J name Ngc
Jurkar TRGV11*01 tgtgacctg.tcagatcctcacagggcggtt.taagaaactcttt TRGJ1*01 13/22
```

Traduzione della giunzione

```
105 107 109 111 113 115 117
CDR3-IMGT 104 106 108 110 112 114 116 118 frame length
C A C Q I L T G R V # K K L F
#1 Jurkar tgt gcc tgt cag atc ctc aca ggg cgg gtt ..t aag aaa ctc ttt - 13
130
R * V S E E Y N I S K V I E G K Q E
Jurkar 16 AGG TAA GTA TCG GAA GAA TAC AAC ATT TCC AAG GTA ATA GAG GGA AAG CAG GAA
Y11227 TRGV11*01
I I K L E * C N N V * K K E E L D G
Jurkar 16 ATT ATT AAA CTG GAA TAA TGT AAT AAT GTT TAG AAA AAA GAG GAA TTG GAT GGG
D L M * K T * E R L * N K R S Y * K
Jurkar 16 GAT TTG ATG TAG AAA ACT TAG GAG AGA CTT TAA AAC AAA CGC TCA TAC TAA AAG
```

Analisi giunzionale sequenza TCR V γ I-J γ 1.3/2.3 del campione 12020 (HES-LV).

```
Input V name V-REGION P J-REGION J name Ngc
12020 TRGV2*01 tgtgccacctgggacggg c .attataagaaactcttt TRGJ2*01 0/0
```

Traduzione della giunzione

```
105 107 109 114 116 118
CDR3-IMGT104 106 108 113 115 117 frame length
C A T W D G H Y K K L F
12020 tgt gcc acc tgg gac ggg cat tat aag aaa ctc ttt + 10
```

Appendice 23 : Sensibilità diagnostica e specificità diagnostica delle metodiche PCR TCRgd, PCR IgH, Multiplex PCR, Semi-nested PCR e Southern Blot.

IgH			
	Vh	Dh	Semi nested
VN	63	30	80
VP	88	91	83
FP	37	70	20
FN	6	3	11
Totale campioni considerati	194	194	194
Specificità	63%	30%	80%
Sensibilità	93,62%	96,81%	88,30%

	TCR		Multiplex	
	delta	gamma	Mix I	Mix II
VN	75	26	107	124
VP	37	49	30	22
FP	80	117	42	33
FN	2	2	15	15
Totale campioni considerati	194	194	194	194
Specificità	48,39%	18,18%	71,81%	78,98%
Sensibilità	94,87%	96,08%	66,67%	59,46%

Southern Blot		
	TCRb	Jh6
VN	13	48
VP	1	1
FP	0	0
FN	4	3
Totale campioni considerati	18	52
Specificità	100,00%	100,00%
Sensibilità	76,47%	94,12%

Elenco delle pubblicazioni allegare

- Moschetti G., A.L. Peluso, A. Protopapa, M. Anastasio, O. Pepe, R. Defez. 2005. "Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*". Syst. Appl. Microbiol. 28: 619-631.
- Moschetti G. and Peluso A.L. "Diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strains nodulating wild and crop legumes in Central – Southern Italy". Annali di Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Portici; Edizione Quinta vol. I: pag 1-13.

Elenco delle pubblicaazioni in abstract

- Poster – Franzese T., Peluso A.L., Mauriello G., Casaburi A. and Moschetti G. "Evaluation of proteolytic, lipolytic and decarboxilase activity of extremely halophilic bacteria occurring in ripening of salt anchovies". Proceedings of the 19th International ICFMH Symposium FoodMicro 2004 "New tools improving Microbial Food Safety and Quality – Biotèchnology and Molecular Biology Approaches", Portoroz – Slovenia 12-16th September 2004: pag. 194.

New Tools for Improving Microbial Food Safety and Quality

Technology and Molecular
Biology Approaches

Book of Abstracts

Dedicated to
Professor David AA Mossel

16th September 2004 • Portorož • Slovenia

EVALUATION OF PROTEOLYTIC, LIPOLYTIC AND DECARBOXYLASE ACTIVITY OF EXTREMELY HALOPHILIC BACTERIA OCCURRING IN RIPENING OF SALT ANCHOVIES

Tullia FRANZESE, Anna Lucia PELUSO, Gianluigi MAURIELLO,
Annalisa CASABURI, Giancarlo MOSCHETTI

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Sezione di Microbiologia, Palazzo Mascabruno,
Via Università 100, 80055, Portici, Italy
E-mail: moschett@unina.it

In order to define the role of extremely halophilic bacteria occurring at the ripening stage of salted anchovies, 21 strains of these bacteria were tested for their proteolytic, lipolytic and decarboxylase activity. The strains used were isolated from a variety of extreme environments including salt anchovies, salt cod and salt marsh. They were presumptively identified as *Halobacterium salinarum*, *Haloarcula* sp., *Haloferax vulcani*, *Haloterrigena thermotollerans*, and halophilic Naxos II (not yet identified in literature) by using partial sequencing of 16S rDNA. Proteolytic activity on sarcoplasmic and myofibrillar proteins extracted from fresh fish, lipolytic activity on cod liver oil (similar in composition to fatty acids of anchovies) and decarboxylase activity were evaluated. Only *Halobacterium salinarum* strain CER6a (from a salt marsh in Cervia, Italy), *Halobacterium salinarum* strain 9R (from Icelandic dried salt cod), *Haloarcula* sp. M4R1 (from a salt marsh in Otranto, Italy),

and Naxos II R5 (from a salt marsh in Cagliari, Italy) showed proteolytic activity on sarcoplasmic proteins. By contrast, no strain seemed to degrade myofibrillar proteins as well as exhibit lipolytic activity on fish oil. Analysis of decarboxylase activity showed that only strain CER6a decarboxylated tyrosine and lysine, precursors of biogenic amines, which could increase the toxic effect of histamine. However, further studies are needed to understand the role of these bacteria in the ripening of salt fish. In particular, we are going to carry out experiments on the manufacture of salt anchovies by adding halophilic bacteria with and without proteolytic and decarboxylase activities to determine whether they play a technological role during the production of this food.

Keywords: halophilic bacteria, salt anchovies, proteolytic, lipolytic and decarboxylase activity

Diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strains nodulating wild and crop legumes in central-southern Italy

G. MOSCHETTI, A. PELUSO

SUMMARY

A polyphasic approach including phenotypic and genotypic techniques was used to study the diversity of 27 bacterial isolates from wild and crop legumes belonging to genera *Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* and *Galega* from different agroecological areas in central-southern Italy. Analysis of symbiotic properties revealed that wild isolates have a wide spectrum of nodulation with respect to the reference strains tested in this study. All rhizobial isolates (except for the isolate CG4 from *Galega officinalis*) were presumptively identified as *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* both by the symbiotic properties and the specific PCR amplification of the *nodC* gene. Particularly, we found that the *nodC* gene could be used as a diagnostic molecular marker for strains belonging to *R. leguminosarum* bv. *viciae*. RFLP-PCR 16S rDNA analyses confirmed these results, with the exception of 2 strains that showed RFLP genotypes different from that of the reference strains of *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Partial sequencing of 16S rDNA revealed that these two strains are 87.6 % similar to 16S of all strains of *Rhizobium* presented in GeneBank.

KEY WORDS: *Rhizobium*, *NodC* gene, wild legumes, 16S rDNA

PAROLE CHIAVE: *Rhizobium*, *NodC* gene, leguminose selvatiche, 16S rDNA

INTRODUCTION

Bacteria belonging to the genera *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* (Young & Haukka, 1996; De Lajudie *et al.*, 1998a; De Lajudie *et al.*, 1998b) are best known for their ability to establish symbiotic relationships with leguminous plants of agricultural and environmental importance, a process that results in biological nitrogen fixation (BNF) (Hirsch, 1992). The nitrogen-fixing leguminous plants are key components of the natural succession in Mediterranean ecosystems (Zahran, 1997), because these plant species, upon establishing rhizobial symbioses, increase soil fertility and quality enhancing soil N content, organic matter, hydrostable soil aggregates, N transfer from N₂-fixing to non-fixing species (Elkan & Bunn, 1992; Requena *et al.*, 2001).

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Sezione di Microbiologia Agraria, Alimentare ed Ambientale e di Igiene, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy

Corresponding author: G. Moschetti; e-mail: moschett@unina.it

In the last decade wild legumes received the attention of the ecologists because of their tolerance to drastic environmental conditions such as salinity, severe drought and elevated temperatures. In addition, their associated rhizobia are more efficient in nitrogen fixation activity with other hosts than their compatible hosts (Wange, 1989; Zhang *et al.*, 1991; Zahran, 2001). Moreover, symbiotic rhizobia of naturally growing legumes are more tolerant to above mentioned stresses than rhizobia from cultivated legumes, and successfully establish effective symbioses under these conditions (Zahran, 1997). This characteristic is very important for the Mediterranean region since, according to Zahran (Zahran *et al.*, 1999), nearly 40% of the world's land surface can be categorized as having potential salinity problems and most of these areas are confined to the tropics and to Mediterranean regions.

Rhizobium species and biovars are also differentiated by the kind of plants that they nodulate (Burton, 1999). In fact rhizobial species and genotypes differ in their complement of nodulation genes and in allelic forms of shared *nod* genes. These differences lead to predictable variability of the structure of Nod Factor that could be used to characterize rhizobial isolates. Zèzè *et al.*, (2001) used the *nodD* gene as a distinctive genetic marker to characterize the population of rhizobia isolated from a pasture soil, Tan *et al.*, (1999) performed a RFLP analysis of a fragment containing *nodDAB* genes to differentiate rhizobia from wild legumes in China, Laguerre *et al.*, (2001) used the *nodC* gene, a common *nod* gene essential for nodulation in all rhizobial species, to characterize a collection of 83 rhizobial strains which represented 23 recognized species distributed in the genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*.

It is well known that crop plants belonging to the genera *Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* and *Lens* are effectively nodulated by strains of *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Vincent, 1982). However, studies either on the relationships between wild vetch and their associated rhizobia or on intraspecific diversity of the symbiotic strains have not received much attention (Young *et al.*, 1987; Strain *et al.*, 1994; Palmer & Young, 2000). Our studies have focused on the assessment of rhizobial diversity and characterization of native rhizobial isolates from wild vetch from Italian soils for their potential use in sustainable agriculture. In fact, one interesting application of rhizobia from wild legumes is their use as inoculum for crop legumes. Similar works investigated the rhizobia populations associated with wild plant in Morocco (Zerhari *et al.*, 2000); Senegal and Gambia (Diouf *et al.*, 2000). The aim of this study was to isolate and characterize the rhizobial populations naturally associated with wild legumes originating from different agroecological areas in central-southern Italy by a polyphasic approach including the evaluation of phenotypic properties as well as genotypic characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Plants and microorganisms

The root nodules were excised from wild legumes (host plants are shown in Table 1) in several areas of central-southern Italy. Rhizobia were isolated from fresh nodules by the «Hotel isolation method» (Vincent, 1970). Single colonies were picked up and checked for purity by repeated streaking on YMA medium (Vincent, 1970) supplemented with Congo red to indicate possible contaminants (Graham *et al.*, 1991). All isolates were incubated at 28°C and maintained at -20°C in YM broth with 25% (v/v) glycerol until analysis. The isolates and the reference strains used in this study are listed in Table 1.

TABLE 1 - Isolates and reference strains used in this study

Isolates/Strains	Species	Geographic origin	Host plant and source	Reference/source
CG1-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco (Naples)	<i>Vicia faba</i> plant 1, nodule 1	This study
CG1-2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Vicia faba</i> plant 1, nodule 2	This study
CG3-1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Vicia faba</i> plant 2	This study
T1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Vicia faba</i> plant 1	This study
T4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Vicia faba</i> plant 2	This study
T2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Pisum sativum</i>	This study
T3p	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Torre del Greco	<i>Vicia villosa</i> var. <i>pseudocracca</i>	This study
CG4	<i>Rhizobium</i> spp.	Torre del Greco	<i>Galega officinalis</i>	This study
GRAN1A	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Roselle (Grosseto)	<i>Lathyrus annuus</i> nodule 1	This study
GRAN1B	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Roselle	<i>Lathyrus annuus</i> nodule 2	This study
LE3m	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Frigole (Lecce)	<i>Vicia sativa</i> nodule 1	This study
LE3nm	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Frigole	<i>Vicia sativa</i> nodule 2	This study
POHY1A	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici (Naples)	<i>Vicia hybrida</i> plant 1 nodule 1	This study
POHY1B	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia hybrida</i> plant 1 nodule 2	This study
POHY2A	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 1	This study
POHY2B1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 2	This study
POHY2B2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 2	This study
POLACLY1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Lathyrus clymenum</i>	This study
POV12	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia villosa</i> plant 1	This study
POV13	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia villosa</i> plant 2	This study
POSA1A	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia sativa</i> nodule1	This study
POSA1B	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia sativa</i> nodule2	This study
RIP2	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia sativa</i> plant 1	This study
RIP3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Portici	<i>Vicia sativa</i> plant 2	This study
SAAN1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Lanciano (Chieti)	<i>Vicia sativa</i> plant 1	This study
SAOC2A	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Lanciano	<i>Vicia sativa</i> plant 2	This study
SAOC2B	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Montecorice (Salerno)	<i>Lathyrus annuus</i>	This study
Reference strains:		Montecorice	<i>Lathyrus ochrus</i> nodule 1	This study
LPR1105	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Italy	<i>Lathyrus ochrus</i> nodule 2	This study
VF39	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Germany	<i>Vicia faba</i>	Hooykaas et al. [19]
3Hog18	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Thailand	<i>Pisum sativum</i>	Priester [34]
WSM1455	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	Collure collection of Chning May University
WSM11014	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	Howieson et al. [20]
H132	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	France	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Carter et al. [5]
T143	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	France	<i>Trifolium pratense</i>	Laguerre et al. [24]
2011	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Unknown	<i>Medicago sativa</i>	Laguerre et al. [24]
CE3	<i>Rhizobium etli</i>	Mexico	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cossenu and Batut [10]
MSMC28	<i>Rhizobium</i> spp.	Morocco	<i>Acacia</i> sp.	Segovia et al. [40]
21	<i>Mesorhizobium loti</i>	Unknown	<i>Lotus japonicus</i>	Khbaya et al. [22]
USDA 110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	United States	<i>Glycine max</i>	Radutoiu et al. [36]

Plant nodulation tests

All the 27 isolates and some reference strains were tested for their ability to nodulate the following plants: *Cicer arietinum*, *Lathyrus aphaca*, *Lotus japonicus*, *Lupinus albus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trifolium repens* and *Vicia hirsuta*. Inoculation and seeds treatment were performed by using the method of Vincent (1970) with some modifications. Briefly, seeds were surface sterilized by soaking in 3% H₂O₂, rinsing with sterile water and newly soaking for 2h at 4°C in sterile water (except for *T. repens*). Plants were then kept for 24h in sterile water in a dark chamber at room temperature. To enhance the germination of *L. japonicus* and *L. aphaca* seeds, showing a more resistant tegument, after sterilization they were scarified with 75% sulfuric acid for 30 and 60 min, respectively. Seeds were then placed on sterile filter paper saturated with 40 ml of sterile water and inoculated with 1 ml of bacterial suspension containing approximately 10⁵ cfu ml⁻¹. The plants were cultured in a growth chamber under constant temperature of 21°C and 12h day⁻¹ photoperiod for 40 days and watered with nitrogen free nutrient solution (Priefer *et al.*, 2001). In all plants the pink colour of the nodules and the dark green color of leaves indicated a healthy phenotype, which suggests normal nitrogen fixation.

DNA extraction and PCR conditions

Total DNA was extracted using Instagene Matrix (BioRad). 5 µl of DNA, approximately 50 ng, was used as template for the polymerase chain reaction assays in a mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 250 µM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 0.2 µM of each primer and 2.5 units of *Taq* polymerase (Invitrogen). The amplifications were carried out in an PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc) and the presence of specific PCR products was controlled by agarose (1.5% w/v) gel electrophoresis.

NodC gene analysis

For specific amplification of the *nodC* gene, two oligonucleotides, chosen inside the *nodC* sequence from *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain USDA 2478 (Genebank acc. n. D28960), were used. The selected sequences were 5'-GCTGCCTATGCAGACGATG-3' (*nodCf*, position 32-50) and 5'-GGTTACTGGCTTTCATTTGGC-3' (*nodCr*, position 231-251). Template DNA was denatured for 5 min at 94°C; then the PCR was carried out for 30 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 3 min at 72°C for cycle). Finally a 7 min extension period at 72°C was performed. The presence of a 220 bp PCR products was controlled by agarose (2% w/v) gel electrophoresis.

RFLP analysis of amplified 16S rRNA genes

Primers described by Weisburg *et al.*, (1991), which correspond to *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 8-27 and 1524-1540, respectively, were used for PCR amplification of 16S rRNA genes (approximately 1.5 kb). The PCR mixture was prepared as described in Blaiotta *et al.*, (2002); whereas PCR conditions consisted of initial denaturing step at 95°C for 3 min, 30 cycles (94°C for 1 min, 54°C for 45 s and 72° for 2 min) and additional final chain elongation step at 72°C for 7 min. The presence of PCR

products was verified by agarose (2% w/v) gel electrophoresis, at 100V for 1h. Restriction endonucleases *Cfo*I, *Hinf*I, *Msp*I and *Nde*II (Invitrogen), as recommended by Laguerre et al., (1994), were used separately to digest 30 µl of PCR products. Restricted DNA was analyzed by electrophoresis in 2% agarose at 120V for 4h.

16S rDNA partial sequencing

The amplified 16S rDNA region of POVI2 and SAOC2B strains was purified by using QIAquick PCR purification kit (Qiagen S.p.A., Milano) and sequenced by using the primer rD1 described by Weisburg et al., (1991). The DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method by the DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA) according to the manufacturer's instructions and were repeat twice. The sequences were analysed by MacDNasis Pro v3.0.7 (Hitachi Software Engineering Europe S.A., Olivet Cedex) and research for DNA similarity was performed with the GeneBank and EMBL database (Altschul et al., 1997). The GeneBank accession of type strains are *R. leguminosarum* IAM12609 (acc. n. D14513), *R. galegae* ATCC43677 (acc. n. D11343), *M. huakuii* IFO15243 (acc. n. D13431), *S. fredii* ATCC35423 (acc. n. D14516.), *S. meliloti* IAM12611 (acc. n. D14509), *R. tropici* IFO15247 (acc. n. D11344), *R. daejeonense* L61T/KCTC12121 (acc. n. AY341343), *M. loti* ATCC33669 (acc. n. D14514), *R. huautlense* SO2 (acc. n. AF025852).

RESULTS

Phenotypic characteristics

27 rhizobial isolates investigated in this study (Table 1) were purified from root nodules of 8 species of wild legumes (*Vicia hybrida*, *V. villosa*, *V. villosa* var. *pseudoracca*, *V. sativa*, *Lathyrus ochrus*, *L. clymenum*, *L. annus* and finally *Galega officinalis*) and from 2 species of crop legumes (*Vicia faba*, *Pisum sativum*). collected from 4 different geographical and ecological areas of central-southern of Italy (Abruzzo, Tuscany, Campania and Apulia). All the isolates derived from nodules that showed a pink colouring and medium size (0.3-1 cm of diameters) with exception of the strains POHY2B1 and POHY2B2 which were isolated from a big nodule (globular in shape with a diameter of 2.3 cm, see Figure 1) excised from a *Vicia hybrida* plant.

All isolates were fast growers and formed single, regular and mucous colonies with diameters of 2-5 mm within 3-6 d on YMA, as reported in the Bergey's Manual (Jordan, 1984). Moreover, the isolates CG1-1, CG1-2, GRAN1A, GRAN1B, POHY1A, POHY1B, POHY2B1, POHY2B2, POLACLY1, SAOC2B, T1, T2 and the reference strain LPR1105 moderately absorbed Congo red, like fried egg.

Symbiotic properties

Visual observations of nodule formation on the specific host plant and of plants size and foliage colour compared to uninoculated controls after 40 d of growth were used to classify our isolates as *Rhizobium* and to investigate their symbiotic potential with 8 different leguminous host plants tested. In this assay all isolates showed variability in nodulation. As reported in Table 2, the 27 rhizobial isolates provided 11 dif-



Fig. 1 – Big nodule excised from *Vicia hybrida* plant from which POHY2B1 and POHY2B2 strains were isolated.

ferent main nodulation patterns of which only the pattern A was the same of the two reference strains belonging to *R. leguminosarum* bv. *viciae* (LPR1105 and VF39). 7 isolates (CG1-2, RIPA2, SAAN1, SAOC2A, T1, T3p and T4) exhibited a wide host range, nodulating from 5 to 7 plants.

On the basis of their nodulation pattern, all the isolates, with the exception of the strain CG4, were presumptively recognised as *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Graham, 1969). Particularly, all our isolates collected from vetch nodulated *L. aphaca* and almost all nodulated *P. sativum* (with exception of GRAN1B and T2) and *V. hirsuta* (with the exception of GRAN1B, POVI3 and SAOC2B). The isolate T3p was able to nodulate all plants tested, save for *C. arietinum*, and it was the only one to nodulate *L. albifrons*, even though with a number of ineffective nodules for plant. Moreover, 16 strains isolated from several host plants were able to nodulate *P. vulgaris* ecotype «Zolferino», even though 6 strains (CG1-2, CG1-3, POVI2, RIPA2, SAAN1, LE3m) formed ineffective nodules. A wide host range was found for reference strains 3Hog18, WSM1014 and WSM1455; moreover, we found that the 3Hog18 strain was the only one able to nodulate all the plants used in this study.

NodC gene analysis

The *nodC* gene was amplified to be used as a specific marker for *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Based on *nodC* sequence derived from *R. l.* bv. *viciae* USDA 2478 (GeneBank acc. n. D28960), two oligonucleotides, named *nodCf* and *nodCr*, were designed for specific amplification of *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains. Blast analysis (Altschul *et al.*, 1997) of primer sequences revealed no omology to any known sequences included in current databases with the exception of *nodC* sequence from *R. leguminosarum* bv. *viciae*. After amplification using these primers, a 220 bp product was obtained only from

TABLE 2 – Nodulation patterns (NPs) and number of nodules obtained after 40-days of growth on hydroponic conditions

Strain	Ps ^a	Lap	Vh	Lua	Pv	Ca	Tr	Lj	N Ps ^c
CG1-1	15.6±3.6 ^b	10.7±2.2	15.9±5.3	0.0	4.3±1.1	0.0	0.1±0.3	0.0	B
CG1-2	13.6±1.5	2.5±1.9	7.1±2.5	0.0	14.0±2.6	0.0	0.2±0.4	0.3±0.5	B ₁
CG3-1	10.6±1.1	8.7±2.3	5.7±2.9	0.0	18.7±1.5	0.0	0.3±0.5	0.0	B
GRAN1A	14.8±1.3	1.3±0.5	3.6±2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
GRAN1B	0.0	1.2±2.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9±1.1	0.7±1.1	L
LE3m	17.4±4.5	16.3±3.08	14.0±4.6	0.0	2.0±1.0	0.0	0.3±0.7	0.0	B
LE3nm	2.8±0.8	15.5±3.3	26.4±7.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2±0.6	A ₂
POHY1A	11.0±1.0	10.3±2.3	31.0±20.6	0.0	0.0	0.33±0.6	0.2±0.4	0.0±0.4	A ₃
POHY1B	8.4±2.3	5.8±1.5	29.3±41.5	0.0	0.0	0.33±0.6	0.9±0.6	0.0	A ₃
POHY2A	17.6±3.1	4.8±1.9	14.1±14.0	0.0	0.0	0.33±0.6	0.0	0.0	A ₄
POHY2B1	12.8±1.3	2.7±1.4	7.9±12.8	0.0	0.0	0.0	0.2±0.4	0.0	A ₁
POHY2B2	16.4±1.3	1.5±0.5	6.4±5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POLACLY1	20.8±2.3	14.5±3.02	23.1±5.1	0.0	0.0	1.0±1.3	0.1±0.3	0.0	C
POSA1A	11.4±1.5	10.2±3.1	16.3±4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POSA1B	11.6±4.7	12.0±8.5	17.1±7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POVI2	14.4±1.1	6.0±1.4	17.1±4.0	0.0	14.3±2.3	0.0	0.0	0.2±0.4	B ₂
POVI3	12.0±1.6	7.5±2.4	0.0	0.0	39.3±4.7	0.0	0.1±0.3	0.0	D
RIPA2	18.8±1.9	4.5±1.9	13.1±2.1	0.0	10.0±1.0	0.0	0.1±0.3	0.2±0.4	B ₁
RIPA3	3.6±1.1	4.67±1.9	23.9±3.8	0.0	17.0±3.6	0.0	0.3±0.5	0.0	B
SAAN1	13.2±2.3	6.0±2.1	0.4±0.8	0.0	43.3±9.6	0.0	0.3±0.5	0.3±0.5	D ₁
SAOC2A	20.6±33.8	13.2±13.8	6.4±5.2	0.0	10.0±4.0	0.0	2.2±1.4	0.0	E
SAOC2B	13.8±3.1	9.0±1.8	0.0	0.0	0.67±0.6	0.0	0.0	0.0	F
T1	26.0±42.6	7.0±3.3	9.3±15.0	0.0	67.0±11.5	0.0	2.3±4.3	0.2±0.4	E ₁
T2	0.0	2.7±2.6	1.4±1.6	0.0	6.3±2.5	0.0	0.7±1.1	0.0	G
T3p	28.2±4.6	4.3±4.5	2.7±2.5	0.8±0.8	65.7±9.0	0.0	0.1±1.1	0.6±0.7	B ₃
T4	16.6±3.4	2.5±2.4	1.0±1.2	0.0	38.3±9.5	0.0	2.6±4.9	0.3±0.5	E ₁
CG4	0.0	0.8±0.7	0.0	0.0	0.7±0.6	0.0	0.2±0.4	0.1±0.3	H
LPR1105	7.6±3.0	6.0±1.4	4.1±5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
VF39	21.4±3.1	6.5±1.9	22.3±4.3	0.0	0.0	0.0	0.5±0.8	0.0	A ₁
3Hog18	10.2±7.5	10.8±11.2	14.14±21.0	2.2±0.8	8.33±5.9	0.67±0.6	4.0±7.1	1.8±0.9	I
WSM1455	14.6±7.4	14.5±12.8	12.0±11.9	0.0	33.3±17.2	0.0	1.7±1.4	1.2±1.1	J
WSM1014	6.0±2.9	10±8.0	15.71±25.9	0.0	24.7±9.0	1.33±0.6	1.5±0.9	0.4±0.7	K

a Ps: *Pisum sativum*; Lap: *Lathyrus aphaca*; Vh: *Vicia hirsuta*; Lua: *Lupinus albus*; Pv: *Phaseolus vulgaris*; Ca: *Cicer arietinum*; Tr: *Trifolium repens*; Lj: *Lotus japonicus*.

b Average with standard deviation (± SD) of number of nodules per plant (20 plants).

c The main NPs (A to L) were obtained considering only the average of number of nodules per plant ≥ 1.0, while the subgroups (i.e. A₁) considering average ≤ 0.9.

isolates excised from *Vicia*, *Lathyrus* and *Pisum* plants. Reference strains LPR1105 and VF39 provided the same PCR product, while the isolate CG4 from *G. officinalis* and different biovarieties and species of Rhizobia did not provide any PCR product.

16S-RFLP analysis

The 16S rDNA of all 27 isolates and of reference strains was amplified, resulting in a characteristic single band of 1532 bp (data not shown). This size corresponded to the expected size of the 16S rRNA genes among bacteria (Weisburg *et al.*, 1991). Restriction analysis was performed by using 4 endonucleases as reported under materials and methods. The results were in agreement with those obtained by MacDNasis Pro v3.0.7 virtual digestions of fragment 16S rDNA gene of *Rhizobium leguminosarum*

IAM12609 (GeneBank acc. n. D14513). Particularly, the analysis revealed one to seven restriction patterns for each enzyme used (Table 3). DNA fragments shorter than 90 bp, produced by some endonucleases, were not properly resolved by electrophoresis and were therefore not used for the patterns comparison. For this reason, the size of PCR products estimated by summing the molecular weights of the restricted fragments was smaller than the size estimated for undigested amplified products and ranged from 1200 to 1400 bp. Four different 16S rDNA genotypes (I to IV), representing 4 different combinations of patterns, were finally retrieved in the 27 root nodule isolates analyzed by RFLP. The genotype group I included the majority of the isolates (24 out of 27) and exhibited the same genotype of *R. leguminosarum* bv. *viciae* reference strains. Surprisingly, strains POVI2 and SAOC2B showed different genotype (II and III, respectively) because POVI2 differed for its *HinfI* and *NdeII* restriction patterns, while SAOC2B exhibited three restriction patterns (*HinfI*, *NdeII* and *MspI*) different from those of the other strains examined. The strain CG4 (from *G. officinalis*) exhibited the genotype IV, while *R. etli* CE3, *M. loti* 21, *Rhizobium* spp. MSMC28, *S. meliloti* 2011 and *B. japonicum* USDA 110 showed different genotypes (V to IX, respectively). On the basis of RFLP analysis, partial 16S rDNA gene sequence of POVI2 and SAOC2B was determined.

16S rDNA partial sequencing

The sequencing, performed by using di primer rD1 (*E. coli* position 1540-1542), generated a 837 bp nucleotide sequence of the 16S rDNA 3'-end for two our isolates, corresponding to ca. 53% of the whole 16S rDNA. POVI2 strain exhibited a similarity level of 89.4% with SAOC2B. In addition, the Blast analysis showed that POVI2 has a similarity level of 97% with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* acc. n. RLU89829 and with unidentified strains (*Rhizobium* sp. DZ6-4 acc. n. AY210712, *Rhizobium* sp. Am4-4 acc. n. AY210707.1 and *Rhizobium* sp. Ad2 acc. n. AY210704.1). Instead,

TABLE 3 - 16S rDNA genotypes and restriction patterns obtained after digestion with *CfoI*, *HinfI*, *NdeII* and *MspI* of PCR-amplified 16S rDNA genes. Letters represent RFLP-16S restriction patterns revealed for each restriction endonuclease while the roman numbers represent the genotypes derived from the combination of restriction patterns obtained with the four endonucleases used

Strain	<i>CfoI</i>	<i>HinfI</i>	<i>NdeII</i>	<i>MspI</i>	RFLP-16S genotype
CG1-1, CG1-2, CG3-1, GRAN1A, GRAN1B, LE3m, LE3nm, T1, T2, POHY1A, POHY1B, POHY2A, POHY2B1, POHY2B2, RIPA2, T3p, POLACLY1, T4, POSA1A POSA1B, POVI3, RIPA3, SAAN1, SAOC2A, POVI2	A	A	A	A	I
SAOC2B	A	B	B	A	II
CG4	A	B	C	B	III
LPR1105, VF39.3Hog18, WSM1455, WSM1014, H132, T143	A	A	D	C	IV
<i>Rhizobium etli</i> CE3	A	A	A	A	I
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	A	C	E	A	V
<i>Rhizobium</i> sp. MSMC28	A	D	F	D	VI
<i>Mesorhizobium loti</i> 21	A	C	G	E	VII
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	B	E	G	F	VIII
	A	F	A	G	IX

SAOC2B has a similarity level of 94% with all the strain above mentioned. Our sequences were aligned and compared with 16S rDNA sequences of all type strains of *Rhizobium* reported in GeneBank. As shown in the dendrogram depicted in Figure 2, both strains showed at 87.6 % of similarity with all type strains.

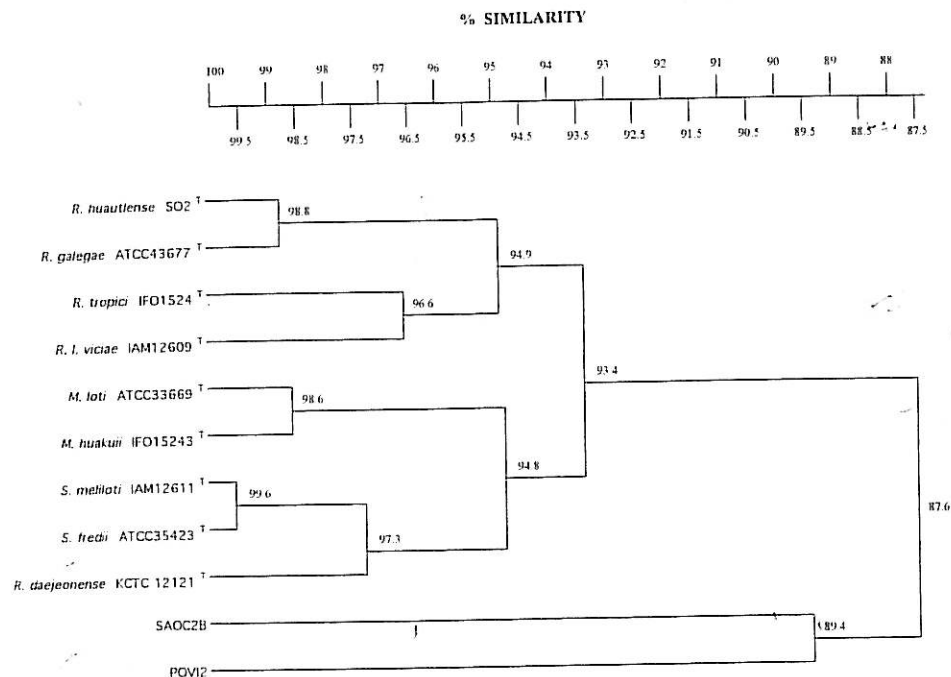


Fig. 2 – Dendrogram showing the degree of similarity (%) of 16SrDNA of all the Type Strains of Rhizobia reported in GeneBank compared to 16S rDNA of POV12 and SAOC2B strains.

DISCUSSION

As generally described for members of *R. leguminosarum* bv. *viciae*, crop plant belonging *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens* and *Pisum* are effectively nodulated by this strains (Vincent, 1982). Since the *Fabaceae* family comprises more than 13.000 species of plants and fewer than 100 of them are currently used in agriculture (Burton, 1979), no much information is available about wild legumes and their associated rhizobia. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize the rhizobial populations naturally associated with wild legumes originated from several areas in the Mediterranean climate of the central-southern Italy. It should be mentioned that Australian climate is self-defined as Mediterranean climate and most of the Rhizobia used to inoculate legume derive from Syria, Sardinia, Sicily and Spain (Howieson *et al.*, 2000).

All the isolates originated from vetch plants were presumptively identified as *R. leguminosarum* bv. *viciae* either by the symbiotic properties and by RFLP-PCR 16S rDNA analysis. In fact, almost all isolates were able to effectively nodulate specific plant for the bv. *viciae* as *L. aphaca*, *P. sativum* and *V. hirsuta*. Only two strains (GRAN1B

and T2) did not nodulate pea's roots. Ten of our isolates effectively nodulated common beans; confirming, in agreement to results reported by Corich et al. (2001), that some strains belonging to *R. leguminosarum* bv. *viciae* have a broad host range. A flexible nodulation pattern was found with our strains, which were able to nodulate, even though forming ineffective nodules, *L. albifrons*, *C. arietinum*, *T. repens* and *L. japonicus*. Some strains formed more than 150 nodules for plants on *L. aphaca* and *V. hirsuta*. Possibly, the plant either did not control the progress of the rhizobial infection or the isolates did not autoregulate their growth and N₂-fixing activity (Stougaard et al., 1990). Therefore, the nodulation on wild legumes shows a high level of variability in term of quality, localization and time of appearance as also found by Zahran (Zahran, 1997).

Laguerre et al. (1993a, 1993b) reported that 16S-RFLP analysis is a useful approach in *Rhizobium* taxonomy since the results obtained are in agreement with those from sequence analysis of the 16S rDNA gene and DNA-DNA hybridization. By using this strategy 24 out of 27 isolates were confirmed to be *R. leguminosarum*. Only POVI2 and SAOC2B showed a different 16S-RFLP genotype. Therefore, we carried out a partial sequencing of the 16S rDNA. The alignment sequences analysis of two isolate showed 87.6% of similarity to 16S rDNA of type strain of *R. leguminosarum*, even though POVI2 and SAOC2B exhibited a similarity level of 97% and 94%, respectively, with *R. leguminosarum* bv. *viciae* acc. n. RLU89829. Further studies are in progress to clarify the taxonomic position of the above mentioned uncertain strains.

NodC primers designed in this study were able to identify all the reference and our strains belonging to *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Therefore this approach could be considered a useful method to distinguish the strains of biovar *viciae* from other *Rhizobium* biovars and species. Since DNAs could be amplified directly from cells or from nodules (Harrison et al., 1992), this method should be particularly helpful in studies requiring rapid examination of numerous isolates, together with other approach such as analysis of the 16S-23S rDNA spacer region fragment used by de Oliveira et al. (1999).

CONCLUSIONS

In this study we found that the root-nodule bacteria of wild legume, especially those isolated in areas with growth limiting conditions, are promising. In fact the majority of these bacteria showed a wide host range, a character that confers to these legumes ecological advantages. The cross-inoculant experiment with different species or varieties is necessary to provide information about the genetic diversity of the rhizobia well-adapted to marginal edapho-climatic conditions and to their compatible partners. Therefore, for the cultivation of legumes in arid areas under environmentally friendly and economically attractive conditions (i.e. without applying huge amounts of chemical nitrogen fertiliser), it is important to identify and to select natural strains particularly resistant to the environmental stress peculiar of the Mediterranean regions for use them as inoculants of crop legumes.

In this work, we attempt to show that molecular characterization using *nodC* gene PCR is a quick, reliable and convenient method to differentiate *R. leguminosarum* bv. *viciae*. The PCR-RFLP method appears to be a rapid tool for the differentiation and estimation of genetic relationships between *Rhizobium* 16S rRNA genes at the species level. Wild rhizobia can be a source for genetic information to improve symbiotic characters of other rhizobia. The significance of rhizobia of wild legumes is not restricted

to their symbiotic nitrogen fixation activity or to other activities in the soil, but some strains of rhizobia may be used for other biotechnological applications, such as the production of polysaccharides, enzymes and antibiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MI-PAF, Rome) The authors would like to thank Prof. Benjavan Rerkasem (Chiang Mai University, Thailand) for providing the strain 3Hog18 and Dr Roberto Defez for scientific and technical collaboration.

REFERENCES

- ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHAFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER & D.J. LIPMAN, 1997 - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- BLAIOTTA, G., O. PEPE, G. MAURIELLO, F. VILLANI, R. ANDOLFI & G. MOSCHETTI, 2002 - 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garviae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *Sist. Appl. Microbiol.* 25:520-527.
- BURTON, J.C. 1979 - *Rhizobium* Species: Microbial Technology, 2nd edn, Vol. I, Academic Press London.
- CARTER, J.M., J.S. TIEMAN & A.H. GIBSON, 1995 - Competitiveness and persistence of strains of rhizobia for faba bean in acid and alkaline soils. *Soil Biol. Biochem.* 27:617-623.
- CORICH, V., A. GIACOMINI, M. CARLOT, R. SIMON, H.-V. TICHY, A. SQUARTINI & M.P. NUTI, 2001 - Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Can. J. Microbiol.* 47:580-584.
- COSSEAU, C. & J. BATUT, 2004 - Genomics of the ccoNOQP-encoded cbb(3) oxidase complex in bacteria. *Arch. Microbiol.* 181: 89-96.
- DE LAJUDIE, P., E. LAURENT-FULELE, A. WILLEMS, U. TORCK, R. COOPMAN, M.D. COLLINS, K. KERSTERS, B. DREYFUS & M. GILLIS, 1998a - *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1277-1290.
- DE LAJUDIE, P., A. WILLEMS, G. NICK, F. MOREIRA, F. MOLOUBA, B. HOSTE, U. TORCK, M. NEYRA, M.D. COLLINS, K. LINDSTROM, B. DREYFUS & M. GILLIS, 1998b - Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:369-382.
- DE OLIVEIRA, V.M., H.L.C. COUTINHO, B.W.S. SOBRAL, C.T. GUIMARÃES, J.D. VAN ELSAS & G.P. MANFIO, 1999 - Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Let. Appl. Microbiol.* 28:137-141.
- DIOUF, A., P. DE LAJUDIE, M. NEYRA, K. KERSTERS, M. GILLIS, E. MARTINEZ-ROMERO & M. GUEYE, 2000 - Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 50:159-170.
- ELKAN, G.H. & C.R. BUNN, 1992 - The rhizobia. In: A. BALOWS, H.G. TRUPER, M. DWORKIN, W. HARDER, K.H. SCHLEIFER, (eds) *The Prokaryotes*. Springer New York 2nd edn, pp. 2197-2213.
- GRAHAM, P.H., M.J. SADOWSKY, H.H. KEYSER, Y.M. BARNET, R.S. BRADLEY, J.E. COOPER, D.J.

- DELEY, B.D.W. JARVIS, E.B. ROSLYCKY, B.W. STRIJDOM & J.P.W. YOUNG, 1991 - Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:582-587.
- GRAHAM, P.H. 1969 - Selective medium for growth of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 17:769.
- HARRISON, S.P., L.R. MYTTON, L. SKOT, M. DYE & A. CRESSWELL, 1992 - Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Can. J. Microbiol.* 38:1009-1015.
- HIRSH, A.M. 1992 - Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
- HOYKAAS, P.J.J., P.M. CLAPWIJK, M.P. NUTI, R. SCHILPEROORT & A. ROERSCH, 1977 - Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium* ex-planta. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- HOWIESON, J.G., G.W. O'HARA & S.J. CARR, 2000 - Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crop Res.* 6:107-122.
- JORDAN, D.C. 1984 - Family III. *Rhizobiaceae* In: N.R. KRIEG, J.G. HOLT, (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology* The William and Wilkins Co. Baltimore, pp. 234-244.
- KHBAYA, B., M. NEYRA, P. NORMAND, K. ZERHARI & A. FILALI-MALTOUF, 1998 - Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4912-4917.
- LAGUERRE, G., M.P. FERNANDEZ, V. EDEL, P. NORMAND & N. AMARGER, 1993a - Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:761-767.
- LAGUERRE, G., E. GENIAUX, S.I. MAZURIER, R. RODRIGUEZ-CASARTELLI & N. AMARGER, 1993b - Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* 39:412-419.
- LAGUERRE, G., M.R. ALLARD, F. REVOY & N. AMARGER, 1994 - Rapid identification of *Rhizobium* by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
- LAGUERRE, G., S.M. NOUR, V. MACHERET, J. SANJUAN, P. DROUIN & N. AMARGER, 2001 - Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol.* 147:981-993.
- LOUCH, H.A. & K.J. MILLER, 2001 - Synthesis of a low-molecular weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1008-1010.
- PALMER, K.M. & J.P.W. YOUNG, 2000 - Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2445-2450.
- PRIEFER, U.B. 1989 - Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* 171:6161-6168.
- PRIEFER, U.B., J. AUAG, B. BOESTEN, I. BOUHMOUCH, R. DEFEZ, A. FILALI-MALTOUF, M. MIKLIS, H. MOAWAD, B. MOUHSNE, J. PREL, A. SCHLUTER & B. SENATORE, 2001 - Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J. Biotechnol.* 91:223-236.
- RADUTOIU, S., L.H. MADSEN, E.B. MADSEN, H.H. FELLE, Y. UMEHARAI, M. GRONLUND, S. SATO, Y. NAKAMURA, S. TABATA, N. SANDAL & J. STOUGAARD, 2003 - Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425:585-592.
- REQUENA, N., E. PEREZ-SOLIS, C. AZCON-AQUILAR, P. JEFFRIES & J.M. BAREA, 2001 - Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:495-498.
- SEGOVIA, L., J.P.W. YOUNG & E. MARTINEZ-ROMERO, 1993 - Re-classification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.

- STOUGAARD, J., J.E. JØRGENSEN, T. CHRISTENSEN, A. KÜHLE & K.A. MARCKER, 1990 - Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and N23 gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* 220:353-360.
- STRAIN, S.R., K. LEUNG, T.S. WHITTAM, F.J. DE BRUIJN, P.J. BOTTOMLEY, 1994 - Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and *viciae* populations found in two Oregon soils under different plant communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2772-2778.
- TAN, Z.Y., E.T. WANG, G.X. PENG, M.E. ZHU, E. MARTÍNEZ-ROMERO & W.X. CHEN, 1999 - Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1457-1469.
- VINCENT, J.M. 1970 - A manual for the Practical Study of Root. Nodule Bacteria. IBP handbook 15. Blackwell Oxford.
- VINCENT, J.M. 1982 - Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, London.
- WANGE, S.S. 1989 - Response of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to inoculation with *Rhizobium* strains isolated from arboreal legumes. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:135-141.
- WEISBURG, W.G., S.M. BARNS, D.A. PELLETIER & D.J. LANE, 1991 - 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- YOUNG, J.P.W. & K. HAUKKA, 1996 - Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133:87-94.
- YOUNG, J.P.W., L. DEMETRIOU & R.G. APTE, 1987 - *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in pea crop. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:397-402.
- ZAHARAN, H.H., M.S. AHMAD, M. ABDEL-FATTAH & A.Y. ZAKI, 1999 - Phenotypic characteristics, cross nodulation and nitrogen fixation of root-nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. In: Proceedings of the International Symposium on Biological Nitrogen Fixation and Crop Production, Cairo, 11-13 May 1999:77-90.
- ZAHARAN, H.H. 1997 - Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 25:211-223.
- ZAHARAN, H.H. 2001 - Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* 91:143-153.
- ZERHARI, K., J. AURAG, B. KHBAYA, D. KHARCHAF & A. FILALI-MALTOUF, 2000 - Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:351-357.
- ZÈZÈ, A., L.A. MUTCH & P.W. YOUNG, 2001 - Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.* 3:363-370.
- ZHANG, X.P., M. KARSISTO, R. HARPER & K. LINDSTRÖM, 1991 - Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:104-113.



Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*

Giancarlo Moschetti^{a,*}, AnnaLucia Peluso^a, Andrea Protopapa^a, Marilena Anastasio^a, Olimpia Pepe^a, Roberto Defez^b

^aDipartimento di Scienza degli Alimenti, Sezione di Microbiologia Agraria, Alimentare ed Ambientale e di Igiene, Università degli Studi di Napoli "Federico II", I 80055 Portici, Italy

^bIstituto di Genetica e Biofisica, A. Buzzati Traverso, via Marconi 12, I 80125 Napoli, Italy

Received 15 December 2004

Abstract

Twenty-seven new *Rhizobium* isolates were obtained from root nodules of wild and crop legumes belonging to the genera *Vicia*, *Lathyrus* and *Pisum* from different agroecological areas in central and southern Italy. A polyphasic approach including phenotypic and genotypic techniques was used to study their diversity and their relationships with other biovars and species of rhizobia. Analysis of symbiotic properties and stress tolerance tests revealed that wild isolates showed a wide spectrum of nodulation and a marked variation in stress tolerance compared with reference strains tested in this study. All rhizobial isolates (except for the isolate CG4 from *Galega officinalis*) were presumptively identified as *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* both by their symbiotic properties and the specific amplification of the *nodC* gene. In particular, we found that the *nodC* gene could be used as a diagnostic molecular marker for strains belonging to the bv. *viciae*. RFLP-PCR 16S rDNA analysis confirms these results, with the exception of two strains that showed different RFLP-genotypes from those of the reference strains of *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Analysis of intraspecies relationship among strains by using the RAPD-PCR technique showed a high level of genetic polymorphism, grouping our isolates and reference strains into six different major clusters with a similarity level of 20%. Data from seven parameters of phenotypic and genotypic analyses were evaluated by using principal component analysis which indicated the differences among strains and allowed them to be divided into seven different groups. © 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum*; *NodC* gene; Stress tolerance; Wild legumes; Strains diversity; Mediterranean area; Symbiotic characteristics

Introduction

Bacteria belonging to the genera *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* [51] are generally called rhizobia. They are best known for their ability to establish symbiotic relationships with leguminous plants

*Corresponding author. Tel.: +39 081 2539404;
fax: +39 081 2539407.

E-mail address: moschett@unina.it (G. Moschetti).

of agricultural and environmental importance, a process that results in biological nitrogen fixation (BNF) [17]. Nitrogen-fixing leguminous plants are key components of the natural succession in Mediterranean ecosystems [50], since such plant species, upon establishing rhizobial symbioses, increase soil fertility and quality by enhancing soil N content, organic matter and hydrostable soil aggregates [13,37].

In the last decade, wild legumes and their symbionts have attracted the attention of ecologists due to their tolerance to extreme environmental conditions such as salinity, severe drought and elevated temperatures. In addition, symbiotic rhizobia of naturally growing legumes successfully establish effective symbioses under these conditions [50]. This characteristic is very important for Mediterranean regions since, according to Zahran [49], about 40% of the world's land surface can be categorized as having potential salinity problems and most of these areas are just confined to the tropics and to Mediterranean regions.

The symbiotic interaction between rhizobia and legumes is initiated by an exchange of complex molecular signals that confer host-specificity. Legume roots and seeds exude a number of organic compounds (e.g. flavonoids), which differ between species. Rhizobia respond to these by one or more of the constitutive *nodD* genes encoding for a soluble cytoplasmatic protein activating the other *nod* genes when they interact with the appropriate plant signal compounds. This leads to the biosynthetic enzymes of lipo-chitin oligosaccharides (Nod Factors) encoded by *nodABC* genes. Rhizobial species and genotypes differ in their complement of *nod* genes and in allelic forms of shared *nod* genes. These differences lead to predictable variability in the structure of Nod Factor that could be used to characterize rhizobial isolates. Zèze et al. [53] used the *nodD* gene as a distinctive genetic marker to characterize the population of rhizobia isolated from a pasture soil. Tan et al. [42] performed RFLP analysis of a fragment containing *nodDAB* genes to differentiate rhizobia from wild legumes in China. Laguerre et al. [25] used the *nodC* gene, a common *nod* gene essential for nodulation in all rhizobial species, to characterize a collection of 83 rhizobial strains which represented 23 recognized species distributed in the genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*.

It is well known that crop plants belonging to the genera *Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* and *Lens* are effectively nodulated by strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* [46]. However, neither study on the relationships between wild vetch and their associated rhizobia nor on intraspecific diversity of the symbiotic strains has received much attention [31,40,48]. Our studies have mainly focused on the assessment of rhizobial diversity and characterization of native rhizobial isolates from wild vetch from Italian soils compared

to those from Australia and Thailand for their potential use in sustainable agriculture. One interesting application of rhizobia from wild legumes is their use as inoculum for crop legumes. Similar works investigated the rhizobia populations associated with wild plants in Morocco [52], Mexico [43], China [42], southern Andes in Argentina [1], and Senegal and Gambia [12].

The aim of this study was to isolate and characterize the rhizobial populations naturally associated with wild legumes originating from different agroecological areas by a polyphasic approach including the evaluation of phenotypic properties as well as genotypic characteristics.

Materials and methods

Plants and microorganisms

The root nodules were excised from wild legumes (host plants are shown in Table 1) in several areas of central-southern Italy. Rhizobia were isolated from fresh nodules by the "Hotel isolation method" [45]. Single colonies were picked and checked for purity by repeated streaking on YMA medium [45] supplemented with Congo red to indicate possible contaminants [14]. All isolates were incubated at 28 °C and maintained at -20 °C in YM broth with 25% (v/v) glycerol until analysis. The isolates and the reference strains used in this study are listed in Table 1.

NaCl, pH and temperature tolerance

Tolerance of isolates was tested on YMA plates containing 0.1 (control) 1%, 2%, 3%, 4% and 5% (w/v) NaCl and in plates in which the pH was adjusted to 4, 5, 6, 6.8 (control) 8 and 9 by adding HCl (1 M) or NaOH (1 M), respectively, incubating at 28 °C for 14 d. Finally, the temperature tolerance of isolates was tested at 10, 15, 28 (control) 37 and 44 °C on YMA plates for 14 d. All tests were carried out in triplicate.

Plant nodulation tests

All the 27 isolates and some reference strains were tested for their ability to nodulate the following plants. *Cicer arietinum*, *Lathyrus aphaca*, *Lotus japonicum*, *Lupinus albus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trifolium repens* and *Vicia hirsuta*. Inoculation and seed treatment were performed by using the method of Vincent [45] with some modifications due to the hardness of seed tegument. Particularly, seeds of *L. japonicum* and *L. aphaca* were scarified with 75% sulphuric acid for 30 and 60 min, respectively. The plants were cultured in a growth chamber under a constant temperature of 21 °C and 12 h d⁻¹ photoperiod

Table 1. Isolates and reference strains used in this study

Isolates/strains	Species	Geographic origin	Host plant and source	Reference/source
CG1-1	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 1	<i>Vicia faba</i> plant 1, nodule 1	This study
CG1-2	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 1	<i>Vicia faba</i> plant 1, nodule 2	This study
CG3-1	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 1	<i>Vicia faba</i> plant 2	This study
T1	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 2	<i>Vicia faba</i> plant 1	This study
T4	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 2	<i>Vicia faba</i> plant 2	This study
T2	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 2	<i>Pisum sativum</i>	This study
T3p	<i>R. l. bv. viciae</i>	Torre del Greco (NA) site 2	<i>Vicia villosa</i> var. <i>pseudocracca</i>	This study
CG4	<i>Rhizobium</i> spp.	Torre del Greco (NA) site 1	<i>Galega officinalis</i>	This study
GRANIA	<i>R. l. bv. viciae</i>	Roselle (GR)	<i>Lathyrus annuus</i> nodule 1	This study
GRANIB	<i>R. l. bv. viciae</i>	Roselle (GR)	<i>Lathyrus annuus</i> nodule 2	This study
LE3m	<i>R. l. bv. viciae</i>	Frigole (LE)	<i>Vicia sativa</i> nodule 1	This study
LE3nm	<i>R. l. bv. viciae</i>	Frigole (LE)	<i>Vicia sativa</i> nodule 2	This study
POHY1A	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia hybrida</i> plant 1 nodule 1	This study
POHY1B	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia hybrida</i> plant 1 nodule 2	This study
POHY2A	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 1	This study
POHY2B1	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 2	This study
POHY2B2	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia hybrida</i> plant 2 nodule 2	This study
POLACLY1	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Lathyrus clymenum</i>	This study
POVI2	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia villosa</i> plant 1	This study
POVI3	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia villosa</i> plant 2	This study
POSA1A	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia sativa</i> nodule 1	This study
POSA1B	<i>R. l. bv. viciae</i>	Portici (NA)	<i>Vicia sativa</i> nodule 2	This study
RIPA2	<i>R. l. bv. viciae</i>	Lanciano (CH)	<i>Vicia sativa</i> plant 1	This study
RIPA3	<i>R. l. bv. viciae</i>	Lanciano (CH)	<i>Vicia sativa</i> plant 2	This study
SAANI	<i>R. l. bv. viciae</i>	Montecorice (SA)	<i>Lathyrus annuus</i>	This study
SAOC2A	<i>R. l. bv. viciae</i>	Montecorice (SA)	<i>Lathyrus ochrus</i> nodule 1	This study
SAOC2B	<i>R. l. bv. viciae</i>	Montecorice (SA)	<i>Lathyrus ochrus</i> nodule 2	This study
<i>Reference strains</i>				
LPR1105	<i>R. l. bv. viciae</i>	Italy	<i>Vicia faba</i>	Hooykaas et al. [18]
VF39	<i>R. l. bv. viciae</i>	Germany	<i>Pisum sativum</i>	Priefer [33]
3Hog18	<i>R. l. bv. viciae</i>	Thailand	<i>Pisum sativum</i>	Culture collection of Chaing May University
WSM1455	<i>R. l. bv. viciae</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	Howieson et al. [19]
WSM1014	<i>R. l. bv. viciae</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	Carter et al. [5]
H132	<i>R. l. bv. phaseoli</i>	France	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Laguerre et al. [24]
T143	<i>R. l. bv. trifolii</i>	France	<i>Trifolium pratense</i>	Laguerre et al. [24]
2011	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Unknown	<i>Medicago sativa</i>	Cosseau and Batut [9]
CE3	<i>Rhizobium etli</i>	Mexico	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al. [39]
MSMC28	<i>Rhizobium</i> spp.	Morocco	<i>Acacia</i>	Khbaya et al. [21]
21	<i>Mesorhizobium loti</i>	Unknown	<i>Lotus japonicum</i>	Radutoiu et al. [35]
USDA 110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	United States	<i>Glycine max</i>	Louch and Miller [26]

for 40 d and watered with nitrogen-free nutrient solution [34]. The effectiveness of the nodules for nitrogen fixation was estimated from the pink of the nodules and the dark green of the leaves compared to control plants (without inoculation).

PCR assays

Total DNA was extracted using Instagene Matrix (BioRad). DNA (5 µl), approximately 50 ng, was used as template for the polymerase chain reaction assays. The

amplifications were carried out in a PTC-100 thermocycler (M J Research Inc.).

Amplification of *nodC* gene analysis

For specific amplification of the *nodC* gene, we used two oligonucleotides, chosen inside the *nodC* sequence from *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*R. l.* bv. *viciae*) strain USDA 2478 (GeneBank accession number d28960). Selected sequences were 5'-GCTGCCTATGCAGAC-GATG-3' (*nodCf*, position 32–50) and 5'-GGTTACTG-GCTTTCATTTGGC-3' (*nodCr*, position 231–251). Template DNA was denatured for 5 min at 94 °C; then the PCR was carried out for 30 cycles (1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 3 min at 72 °C for each cycle). Finally, a 7 min extension period at 72 °C was performed. PCR products were verified by electrophoresis in 2% agarose at 120 V for 4 h.

RFLP analysis of amplified 16S rRNA genes

Primers described by Weisburg et al. [47], which correspond to *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 8–27 and 1524–1540, respectively, were used for PCR amplification of 16S rRNA genes (approximately 1.5 kb). PCR mixture was prepared as described in Blaiotta et al. [3]. PCR conditions consisted of initial denaturing step at 95 °C for 3 min, 30 cycles (94 °C for 1 min, 54 °C for 45 s and 72 °C for 2 min) and an additional final chain elongation step at 72 °C for 7 min. The presence of PCR products was ascertained by agarose (1% w/v) gel electrophoresis, at 100 V for 1 h. Restriction endonucleases *CfoI*, *HinfI*, *MspI* and *NdeII* (Invitrogen), as recommended by Laguerre et al. [22], were used separately to digest 30 µl of PCR products. Restricted DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose at 120 V for 4 h.

16S rDNA partial sequencing

The amplified 16S rDNA region of POVI2 and SAOC2B strains was purified by using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen S.p.A., Milan) and sequenced by using the primer rD1 described by Weisburg et al. [47]. The DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method using the DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA) according to the manufacturer's instructions and were repeated twice. The sequences were analysed by MacDNAsis Pro v3.0.7 (Hitachi Software Engineering Europe S.A., Olivet Cedex) and research for DNA similarity was performed with the GeneBank and EMBL database [2].

RAPD-PCR

Amplification reactions and PCR conditions were those reported by Moschetti et al. [28] using two 10-mer primers: CCI 5'-AGC AGC GTG G-3' [6] and PRIMM239 5'-CTG AAG CGG A-3', with 70% and 80% G–C content, respectively. Similarities between individual lanes was determined according to Moschetti et al. [28] and the reproducibility of patterns obtained with the primers was evaluated by amplifying the 10 randomly chosen isolates three times.

Statistical analysis

To characterize the 27 isolates and reference strains, principal component analysis (PCA) was carried out on the basis of the following parameters: pH, NaCl and temperature tolerance, host plant, nodulation patterns and RFLP-genotypes. Statistical treatment of data was performed using Systat software for Macintosh version 5.2.1 [41].

Results

Phenotypic characteristics

Twenty-seven rhizobial isolates investigated in this study (Table 1) were purified from root nodules of eight species of wild legumes (*Vicia hybrida*, *V. villosa*, *V. villosa* var. *pseudocracca*, *V. sativa*, *Lathyrus ochrus*, *L. clymenum*, *L. annus* and *Galega officinalis*) and from two species of crop legumes (*Vicia faba*, *P. sativum*) collected from four different geographical and ecological areas of central-southern Italy (Abruzzo, Tuscany, Campania and Apulia).

All isolates were fast growers which formed single, circular and mucous colonies with diameters of 2–5 mm within 3–6 d on YMA, as reported in Bergey's Manual [20]. Table 2 summarizes the results of NaCl, pH and temperature resistance assays performed on all isolates and reference strains belonging to *R. l.* bv. *viciae* used in this study. Most strains were able to grow only at 0.1% NaCl while five isolates (POHY2B2, RIPA2, RIPA3, SAANI and CG4) grew well at concentration between 1% and 2%. In addition, the strain 3Hog18, originating from Thailand, showed resistance at a NaCl concentration of 5%. The majority of the isolates tolerated a pH range between 4 and 9, except for six isolates (LE3m, POLACLY1, POVI2, RIPA2, RIPA3 and CG4) which were sensitive to pH 4. The strains 3Hog18 and WSM1455 grew at pH values between six and nine while strain WSM1014 failed to grow only at pH 9. Only four isolates (POHY2B2, RIPA3, SAANI and T4) and strains WSM1455 and WSM1014 were able to grow at

Table 2. Phenotypic characteristics of isolates and reference strains used in this study

Strain	Max [NaCl] (%)	pH range	Temperature range (°C)
CG1-1	0.1	4–9	15 ^a –28
CG1-2	0.1	4 ^a –9	10–37 ^a
CG3-1	0.1	4–9	15 ^a –37
GRAN1A	0.1	4 ^a –9	10 ^a –37 ^a
GRAN1B	0.1	4 ^a –9	10–37
LE3m	0.1	5 ^a –9	28
LE3nm	0.1	4 ^a –9	28
POHY1A	0.1	4–9	15 ^a –28
POHY1B	0.1	4–9	15 ^a –28
POHY2A	0.1	4 ^a –9	15–28
POHY2B1	0.1	4–9	28
POHY2B2	2 ^a	4–9	10 ^a –44 ^a
POLACLY1	0.1	5–9	28
POSA1A	0.1	4–9	28
POSA1B	0.1	4–9	15 ^a –28
POVI2	0.1	5–9	15 ^a –28
POVI3	0.1	4–9 ^a	10 ^a –37 ^a
RIPA2	2	5–9	15–44
RIPA3	1	5–9	10 ^a –44 ^a
SAANI	2	4–9	10–44 ^a
SAOC2A	0.1	4–9	15 ^a –28
SAOC2B	0.1	4 ^a –9 ^a	15 ^a –37
T1	0.1	4–9	15–28
T2	0.1	4–9	10–37
T3p	0.1	4–9	15 ^a –37 ^a
T4	0.1	4–9	10 ^a –44
CG4	2 ^a	5–9	15 ^a –37
LPR1105	0.1	4–9	10 ^a –37 ^a
VF39	0.1	4–9	15 ^a –28
3Hog 18	5	6–9	10–28
WSM1455	0.1	6–9	10 ^a –44 ^a
WSM1014	0.1	4–8	10–44

^aDelayed growth and small colonies.

temperatures between 10 and 44 °C; the majority of the strains grew in the range 15–37 °C while five isolates (LE3m, LE3nm, POHY2B1, POLACLY1 and POSA1A) grew only at 28 °C.

Symbiotic properties

Visual observations of nodule formation on the specific host plant and of plant size and foliage colour compared to uninoculated controls after 40 d of growth were used to classify our isolates as *Rhizobium* and to evaluate their symbiotic potential with eight different leguminous host plants tested. In this assay, all isolates showed variability in nodulation. As reported in Table 3, the 27 rhizobial isolates provided 11 different main nodulation patterns of which only pattern A was the same as that of the two reference strains belonging to the

bv. *viciae* (LPR1105 and VF39). Seven isolates (CG1-2, RIPA2, SAANI, SAOC2A, T1, T3p and T4) exhibited a wide host range, nodulating from 5 to 7 plants.

On the basis of their nodulation pattern, all the isolates, with the exception of the strain CG4, were presumptively recognized as *R. leg.* bv. *viciae* [15]. In particular, all our isolates collected from vetch nodulated *L. aphaca* and almost all nodulated *P. sativum* (with exception of GRAN1B and T2) and *V. hirsuta* (with exception of GRAN1B, POVI3 and SAOC2B). The isolate T3p was able to nodulate all plants tested, save *C. arretinum*, and it was the only one to nodulate *L. albifrons*, albeit with a low number of ineffective nodules per plant. Moreover, 16 strains isolated from several host plants were able to nodulate *P. vulgaris* ecotype “Zolferino”, even though six strains (CG1-2, CG1-3, POVI2, RIPA2, SAANI and LE3m) formed ineffective nodules. A wide host range was found for reference strains 3Hog18, WSM1014 and WSM1455; moreover, we found that the 3Hog18 strain was the only one able to nodulate all the plants used in this study.

NodC gene analysis

The *nodC* gene was amplified to be used as a specific marker for *R. l.* bv. *viciae*. Based on the *nodC* sequence derived from *R. l.* bv. *viciae* USDA 2478 (GeneBank accession number D28960), two oligonucleotides, named NodCF and NodCR, were designed for specific amplification of *R. l.* bv. *viciae* strains. Blast analysis [2] of primer sequences revealed no homology to any known sequences included in current databases with the exception of the *nodC* sequence from *R. leg.* bv. *viciae*. After amplification using these primers, a 220 bp product was obtained only from isolates excised from *Vicia*, *Lathyrus* and *Pisum* plants. Representative results are shown in Fig. 1. Reference strains LPR1105 and VF39 provided the same PCR product, while the isolate CG4 from *G. officinalis* and other biovarieties and species of rhizobia did not provide any PCR product.

16S–RFLP analysis

The 16S rDNA of all 27 isolates and of reference strains was amplified, resulting in a characteristic single band of 1532 bp (data not shown). Restriction analysis was performed by using four endonucleases as reported in Materials and methods. The results were in agreement with those obtained by MacDNAsis Pro v3.0.7 virtual digestions of fragment 16S rDNA gene of *R. leguminosarum* IAM12609 (GeneBank accession number D14513). The analysis revealed one to seven restriction patterns for each enzyme used (Table 4). Four different 16S rDNA genotypes (I–IV), representing four different combinations of patterns, were finally retrieved in the 27

Table 3. Nodulation patterns (NPs) and number of nodules obtained after 40 d of growth on hydroponic conditions

Strain	Ps ^a	Lap	Vh	Lua	Pv	Ca	Tr	Lj	NPs ^b
CG1-1	15.6±3.6 ^c	10.7±2.2	15.9±5.3	0.0	4.3±1.1	0.0	0.1±0.3	0.0	B
CG1-2	13.6±1.5	2.5±1.9	7.1±2.5	0.0	14.0±2.6	0.0	0.2±0.4	0.3±0.5	B ₁
CG3-1	10.6±1.1	8.7±2.3	5.7±2.9	0.0	18.7±1.5	0.0	0.3±0.5	0.0	B
GRAN1A	14.8±1.3	1.3±0.5	3.6±2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
GRAN1B	0.0	1.2±2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9±1.1	0.7±1.1	L
LE3m	17.4±4.5	16.3±3.1	14.0±4.6	0.0	2.0±1.0	0.0	0.3±0.7	0.0	B
LE3nm	2.8±0.8	15.5±3.3	26.4±7.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2±0.6	A ₂
POHY1A	11.0±1.0	10.3±2.3	31.0±10.6	0.0	0.0	0.3±0.6	0.2±0.4	0.0	A ₃
POHY1B	8.4±2.3	5.8±1.5	29.3±11.5	0.0	0.0	0.3±0.6	0.9±0.6	0.0	A ₃
POHY2A	17.6±3.1	4.8±1.9	14.1±4.0	0.0	0.0	0.3±0.6	0.0	0.0	A ₄
POHY2B1	12.8±1.3	2.7±1.4	7.9±2.8	0.0	0.0	0.0	0.2±0.4	0.0	A ₁
POHY2B2	16.4±1.3	1.5±0.5	6.4±5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POLACLY1	20.8±2.3	14.5±3.02	23.1±5.1	0.0	0.0	1.0±1.3	0.1±0.3	0.0	C
POSA1A	11.4±1.5	10.2±3.1	16.3±4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POSA1B	11.6±4.7	12.0±8.5	17.1±7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
POVI2	14.4±1.1	6.0±1.4	17.1±4.0	0.0	14.3±2.3	0.0	0.0	0.2±0.4	B ₂
POVI3	12.0±1.6	7.5±2.4	0.0	0.0	39.3±4.7	0.0	0.1±0.3	0.0	D
RIPA2	18.8±1.9	4.5±1.9	13.1±2.1	0.0	10.0±1.0	0.0	0.1±0.3	0.2±0.4	B ₁
RIPA3	3.6±1.1	4.67±1.9	23.9±3.8	0.0	17.0±3.6	0.0	0.3±0.5	0.0	B
SAAN1	13.2±2.3	6.0±2.1	0.4±0.8	0.0	43.3±9.6	0.0	0.3±0.5	0.3±0.5	D ₁
SAOC2A	20.6±13.8	13.2±3.8	6.4±5.2	0.0	10.0±4.0	0.0	2.2±1.4	0.0	E
SAOC2B	13.8±3.1	9.0±1.8	0.0	0.0	0.67±0.6	0.0	0.0	0.0	F
T1	26.0±12.6	7.0±3.3	9.3±15.0	0.0	67.0±11.5	0.0	2.3±4.3	0.2±0.4	E ₁
T2	0.0	2.7±0.6	1.4±1.6	0.0	6.3±2.5	0.0	0.7±1.1	0.0	G
T3p	28.2±4.6	4.3±0.5	2.7±2.5	0.8±0.8	65.7±9.0	0.0	0.7±1.1	0.6±0.7	B ₃
T4	16.6±3.4	2.5±0.4	1.0±1.2	0.0	38.3±9.5	0.0	2.6±0.9	0.3±0.5	E ₁
CG4	0.0	0.8±0.7	0.0	0.0	0.7±0.6	0.0	0.2±0.4	0.1±0.3	H
LPR1105	7.6±3.0	6.0±1.4	4.1±5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	A
VF39	21.4±3.1	6.5±1.9	22.3±4.3	0.0	0.0	0.0	0.5±0.8	0.0	A ₁
3Hog18	10.2±7.5	10.8±1.2	14.14±21.0	2.2±0.8	8.33±5.9	0.67±0.6	4.0±1.1	1.8±0.9	I
WSM1455	14.6±7.4	14.5±2.8	12.0±11.9	0.0	33.3±17.2	0.0	1.7±1.4	1.2±1.1	J
WSM1014	6.0±2.9	10±8.0	15.71±25.9	0.0	24.7±9.0	1.33±0.6	1.5±0.9	0.4±0.7	K

^aPs: *Pisum sativum*; Lap: *Lathyrus aphaca*; Vh: *Vicia hirsuta*; Lua: *Lupinus albus*; Pv: *Phaseolus vulgaris*; Ca: *Cicer arietinum*; Tr: *Trifolium repens*; Lj: *Lotus japonicum*.

^bStrains were grouped in relation to their ability to nodulate eight different legumes. Capital letters (A–L) indicate striking different nodulation patterns (NPs) of the strains analysed. Minor differences (i.e. A_n or B_n) indicate that a single strain was able to nodulate mostly the same kind of plants, but with a single difference in the ability to nodulate a plant. Such single difference has to be on average below to 1 nodule per plant.

^cAverage with standard deviation (±S.D.) of number of nodules per plant (20 plants).

root-nodule isolates analysed by RFLP. Representative results of 16S–RFLP analysis of strains belonging to *R. l. bv. viciae* are shown in Fig. 2. The genotype group I included the majority of the isolates (24 out of 27) and exhibited the same genotype of *R. l. bv. viciae* reference strains. Surprisingly, strains POVI2 and SAOC2B showed different genotypes (II and III, respectively) as POVI2 differed in its *HinfI* and *NdeII* restriction patterns, while SAOC2B exhibited three restriction patterns (*HinfI*, *NdeII* and *MspI*) differing from those of the other strains examined. The strain CG4 (from *G. officinalis*) exhibited genotype IV, while *Rhizobium etli* CE3, *Mesorhizobium loti* 21, *Rhizobium* spp. MSMC28, *Sinorhizobium meliloti* 2011 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 showed different genotypes (V–IX,

respectively). On the basis of RFLP analysis, partial 16S rDNA gene sequences of POVI2 and SAOC2B were determined.

16S rDNA partial sequencing

The sequencing, performed by using primer rD1 generated an 837bp nucleotide sequence of the 16S rDNA 3'-end, corresponding to ca. 53% of the whole 16S rDNA. Strain POVI2 exhibited a similarity level of 89.4% with SAOC2B. In addition, Blast analysis showed that POVI2 has a similarity level of 97% with *Rhizobium l. bv. viciae* accession number RLU89829 and with unidentified strains (*Rhizobium* sp. DZ6-4 accession

number AY210712, *Rhizobium* sp. Am4-4 accession number AY210707.1 and *Rhizobium* sp. Ad2 accession number AY210704.1). Instead, SAOC2B has a similarity level of 94% with all the strains mentioned above. Our sequences were aligned and compared with 16S rDNA sequences of all type strains of *Rhizobium* reported in GeneBank. As shown in the dendrogram depicted in Fig. 3, both strains showed 87.6% of similarity with all type strains.

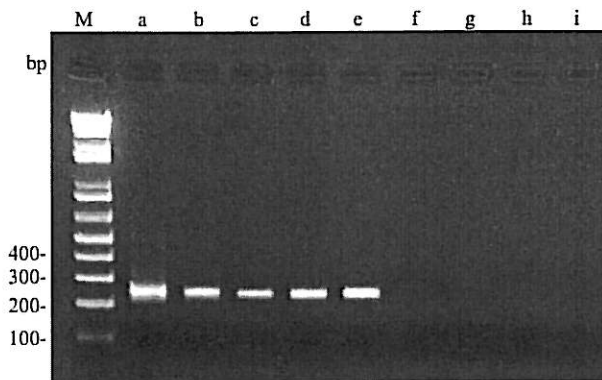


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of *nodC* PCR-products from some rhizobial isolates and reference strains. Lane a, CG1-1; lane b, GRAN1A; lane c, POHY1A; lane d, *R. l. bv. viciae* LPR1105; lane e, *R. l. bv. viciae* VF39; lane f, CG4; lane g, *R. l. bv. phaseoli* H132; lane h, *R. l. bv. trifolii* T143; lane i, *Mesorhizobium loti* 21. M, 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL) used as molecular weight marker.

RAPD-PCR

The degree of similarity among *R. l. bv. viciae* strains was investigated by RAPD-PCR by using PRIMM239 and CC1 primers. The primer PRIMM239 produced 28 RAPD-profiles among the 31 strains investigated (data not shown). In fact, isolates GRAN1A and GRAN1B showed the same RAPD pattern as did isolates POHY1A–POHY1B, POSA1A–POSA1B and POVI2–POVI3. These results were partially confirmed using primer CC1 that provided 29 different RAPD-profiles since POVI2–POVI3 and POHY1A–POHY1B exhibited different CC1 patterns, while POHY2B1 and POHY2B2 (differing with PRIMM239 primer) provided the same profile (data not shown). The amplification patterns obtained with primer CC1 showed a higher degree of polymorphism than those obtained with primer PRIMM239. Therefore, in order to obtain a result representing intraspecies relationships between all our isolates and the reference strains belonging to the *bv. viciae*, we combined data from RAPD-PCR patterns obtained with the two primers in a single dendrogram (Fig. 4). Six different main clusters were defined at a similarity level of 20%. Cluster 1 (S 27%) grouped three isolates that originated from different geographical areas: Apulia, Campania and Abruzzo. Cluster 2 (S 25%) contained eight isolates, originating from different areas (six from Campania and two from Tuscany) close to the reference strain *R. l. bv. viciae* VF39, whereas, cluster 3 (S 30%) comprised only rhizobia isolated from root nodules of *Vicia* plants and collected from Portici (Campania). Cluster 4 (S 22%) grouped rhizobia

Table 4. 16S rDNA genotypes and restriction patterns obtained after digestion with *CfoI*, *HinfI*, *NdeII* and *MspI* of PCR-amplified 16S rDNA genes

Isolates/strains	<i>CfoI</i>	<i>HinfI</i>	<i>NdeII</i>	<i>MspI</i>	RFLP–16S genotype
CG1-1, CG1-2, CG3-1, GRAN1A, GRAN1B, LE3m, LE3nm, T1, T2, POHY1A, POHY1B, POHY2A, POHY2B1, POHY2B2, RIPA2, T3p, POLACLY1, T4, POSA1A, POSA1B, POVI3, RIPA3, SAAN1, SAOC2A, POVI2	A	A	A	A	I
SAOC2B	A	B	B	A	II
CG4	A	B	C	B	III
LPR1105, VF39, 3Hog18, WSM1455, WSM1014, H132, T143	A	A	D	C	IV
<i>Rhizobium etli</i> CE3	A	A	A	A	I
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	A	C	E	A	V
<i>Rhizobium</i> sp. MSMC28	A	D	F	D	VI
<i>Mesorhizobium loti</i> 21	A	C	G	E	VII
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	B	E	G	F	VIII
	A	F	A	G	IX

Note: Letters represent RFLP–16S restriction patterns revealed for each restriction endonuclease while the roman numbers represent the genotypes derived from the combination of restriction patterns obtained with the four endonucleases used.

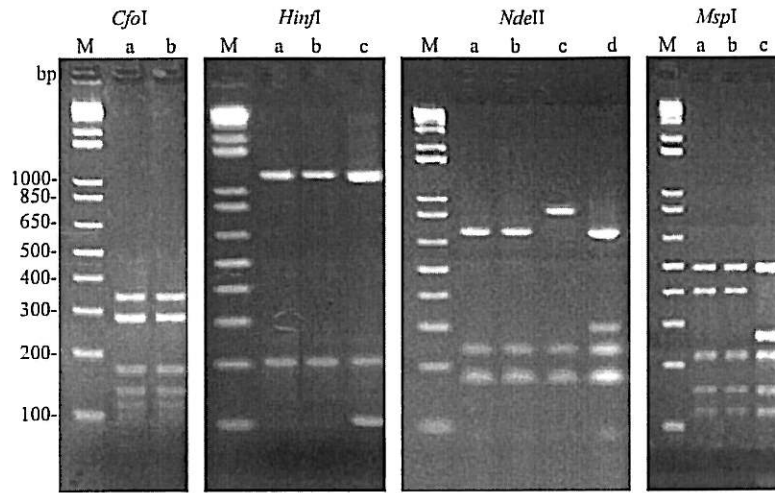


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of 16S-RFLP products from some *R. l. bv. viciae* isolates. Panel *CfoI*: lane a, LPR1105; lane b, CG1-1; Panel *HinfI*: lane a, LPR1105; lane b, CG1-1; lane c, POV12; Panel *NdeII*: lane a, LPR1105; lane b, CG1-1; lane c, POV12; lane d, SAOC2B; Panel *MspI*: lane a, LPR1105; lane b, CG1-1; lane c, SAOC2B. M, 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL) used as molecular weight marker.

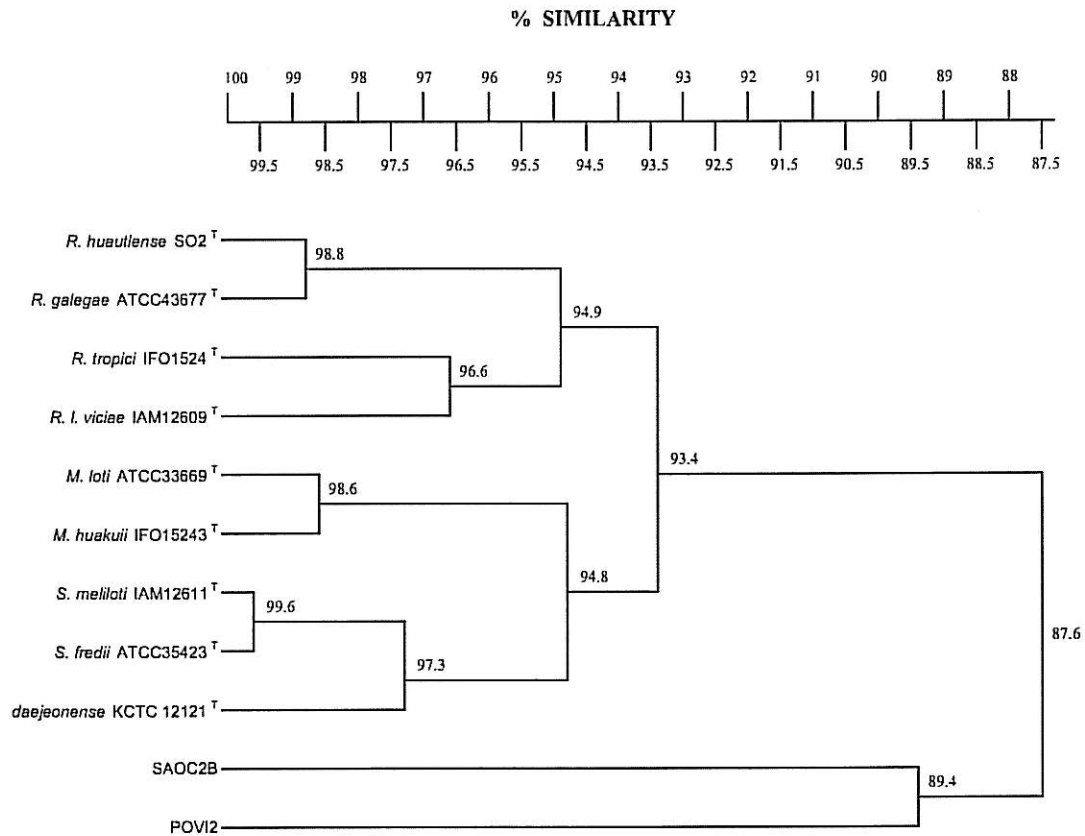


Fig. 3. Dendrogram showing the degree of similarity (%) of 16S rDNA partial sequences (837 bp) of all the type strains of rhizobia reported in GeneBank compared to that of POV12 and SAOC2B strains.

derived from *Vicia* plants but originating from different sites. The reference strain 3Hog18 from Thailand, and WSM1014 and WSM1455 from Australia clustered

together with the isolates LE3m (cluster 5, S 35%). Finally, group 6 (S 20%) contained CG1-1 isolates and the reference strain LPR1105 collected both from *V.*

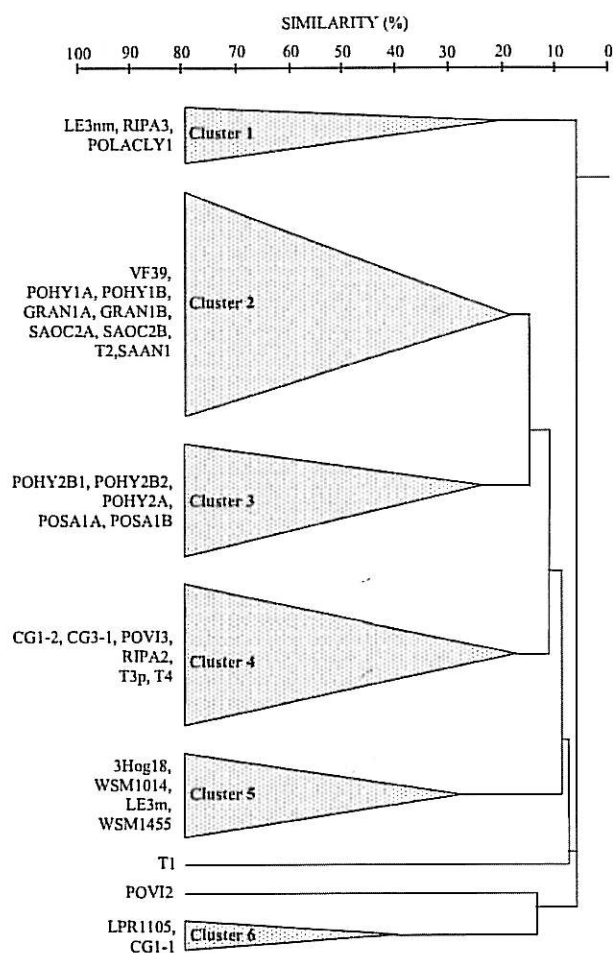


Fig. 4. A simplified dendrogram showing the degree of similarity (%) of RAPD fingerprints of all strains investigated using primers CCl and PRIMM239. For each primer a similarity matrix was created, and finally joined to a matrix, in which the respected values from each primer contributed to a mean. The resulting matrix was used in the average linkage method by the Cluster procedure of Systat 5.2.1 [41].

fab. Only the isolates POV12 and T1 were not grouped in any cluster as they showed a similarity level lower than 20%.

Principal component analysis

To characterize the 27 isolates and reference strains belonging to bv. *viciae*, PCA was carried out on the correlation matrix of the following parameters: pH, NaCl and temperature tolerance, host plant, nodulation pattern and RFLP-genotypes. These variables were condensed into two principal components (Fig. 5) that together were extracted and accounted for 67.8% of the variance. The RFLP-genotype, host plant, NaCl and temperature tolerance correlated with axis 1, whereas

the nodulation patterns and pH tolerance correlated with axis 2. However, the NaCl and temperature variables were strongly correlated, whereas NaCl was not correlated with pH variables. The nodulation patterns and host plants were correlated, as were RFLP-genotypes and host plants. The pH variable was not correlated with the RFLP-genotypes. The first component perhaps may be interpreted as temperature tolerance while the second may be interpreted as pH tolerance from factor loadings.

As illustrated in Fig. 5, the scattergram on the two principal components was effective in showing the difference between isolates and reference strains used and in separating those in the plane. Particularly, six different groups were defined in the PCA plane. Group A, including isolates POHY2B2, RIPA2 and RIPA3, was characterized by mid-values of temperature tolerance and high values of NaCl tolerance. Group B included isolates POSA1A, LE3nm, LE3m and POHY2B1. Group C comprised the strain LPR1105, seven isolates from Campania and two from Tuscany. This group, placed at the left part of the PCA plane, was inversely proportional to nodulation patterns, host plants and RFLP-genotype variables. Strain VF39 and isolates SAOC2A and POV13 formed group D, which was inversely proportional to NaCl and temperature variables. Group E included isolates T2 and T3p and was characterized by host plants and nodulation patterns variables. Group F gathered POLACLY1 and T4 strains that showed mid-pH values, positioning it near the origin of the scattergram. Strains WSM1455 and WSM1014 formed group G that was characterized by nodulation patterns variable and was placed in extreme right of the PCA plane. Only isolates SAANI, T1, POV12, SAOC2B, CG4, and strain 3Hog18 were not included in any group. In particular, 3Hog18 was placed in the top-right part of plane as it showed the highest tolerated temperatures and NaCl concentrations, while POV12 and SAOC2B were characterized by RFLP-genotypes variable.

Discussion

As generally described for members of *R. l.* bv. *viciae*, crop plants belonging *Vicia*, *Lathyrus*, *Lens* and *Pisum* are effectively nodulated by this biovar [46]. Since the *Leguminosae* family comprises more than 13,000 species of plants and fewer than 100 of them are currently used in agriculture [4], little information is available on wild legumes and their associated rhizobia. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize the rhizobial populations naturally associated with wild legumes originating from several Mediterranean-type areas in central-southern Italy. It should be noted that

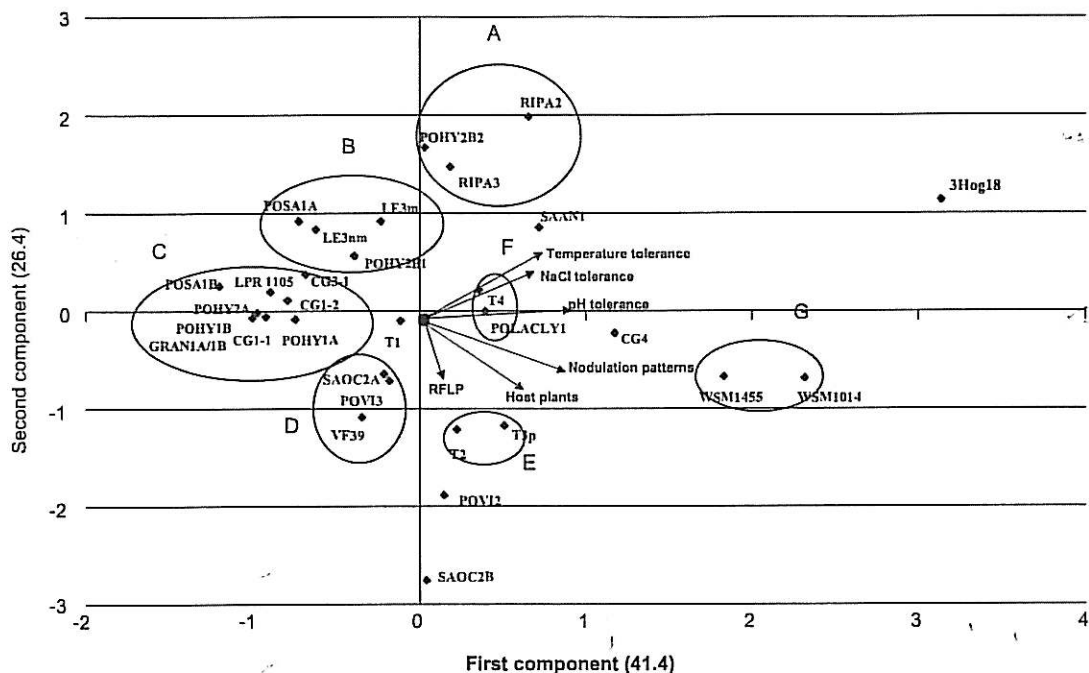


Fig. 5. Scattergram showing the distribution of the strains in the plane formed by the two principal axes of the principal component analysis (PCA). Scatters included in the circles were gathered in A–G groups.

the Australian climate is self-defined as Mediterranean and most of the rhizobia used to inoculate legume derive from Syria, Sardinia, Sicily and Spain [19].

All the isolates from vetch plants were presumptively identified as *R. l.* bv. *viciae* both by their symbiotic properties and by RFLP-PCR 16S rDNA analysis. Indeed, almost all isolates were able to effectively nodulate specific plants for the bv. *viciae* such as *L. aphaca*, *P. sativum* and *V. hirsuta*. Only two strains (GRAN1B and T2) failed to nodulate pea roots. Ten of our isolates effectively nodulated common beans confirming that some strains belonging to bv. *viciae* show a broad host range in agreement with results reported by Corich et al. [8]. In addition, common bean is a promiscuous host for nodulation, as reported by Martinez-Romero [27]. A flexible nodulation pattern was found with our strains, which were able to nodulate *L. albifrons*, *C. arietinum*, *T. repens* and *L. japonicum*, albeit forming ineffective nodules. Some strains formed more than 150 nodules for plants on *L. aphaca* and *V. hirsuta*. Therefore, the nodulation on wild legumes shows more variability in terms of nodule quality, localization and time of appearance as also found by Zahran [50].

Laguerre et al. [23,24] reported that 16S–RFLP analysis is a useful approach in *Rhizobium* taxonomy since the results obtained agree with those from sequence analysis of the 16S rDNA gene and DNA–DNA hybridization. By using this approach 24 out of 27 isolates were confirmed to *R. leguminosarum*. Only

POVI2 and SAOC2B showed a different 16S–RFLP-genotype. Therefore, we carried out a partial sequence of the 16S rDNA. Alignment sequence analysis of two isolates showed 87.6% of similarity to 16S rDNA of *R. leguminosarum*-type strain IAM12609, although POVI2 and SAOC2B exhibited a similarity level of 97% and 94%, respectively, with strain UDSA 2498 of *Rhizobium leg.* bv. *viciae* (accession number RLU89829). Further studies are in progress to clarify the taxonomic position of the above-mentioned uncertain strains.

NodC primers designed in this study were able to identify all the reference and our strains belonging to bv. *viciae*. Hence, this approach could be considered a useful method to distinguish the strains of bv. *viciae* from other *Rhizobium* biovars and species. Since DNAs could be amplified directly from cells or from nodules [16], this method should be particularly helpful in studies requiring rapid examination of numerous isolates, together with other approaches such as the 16S–23S rDNA spacer region fragment used by de Oliveira et al. [10].

Our study has demonstrated a high phenotypic and genotypic diversity among the rhizobia nodulating wild legumes. We found that four of our isolates were able to growth at a temperature of 44°C and up to 2% NaCl. Since the efficient *Rhizobium*-legume symbiosis in salt soils is obtained when both partners are resistant to stress [7,44] it is necessary to isolate salt-tolerant strains and, concurrently select vegetable genotypes resistant to salinity and compatible with our rhizobia. On the other

hand, many authors found that *R. leguminosarum* strains isolated from saline soils or from high temperature soils survive upon being exposed to such stresses, but lose their infectivity [36,38]. We also found among our isolates different capacities for growing at high temperatures, as reported in the literature cited above. We found also that more than 88% of the strains tested were able to grow at low (pH 4) and alkaline pH (pH 9). These results prove that the evolution of rhizobial strains can be influenced by environmental conditions such as biological barriers to gene exchange, geographical isolation, soil type and genotype of the host plant [11].

RAPD-PCR is a typing analysis used for the first time by Harrison et al. [16] to characterize *R. leguminosarum* strains. It was also used by Niemann et al. [29] to discriminate among isolates of a natural *S. meliloti* population. In our study, this approach indicated that there was a high intraspecies genetic diversity among strains belonging to the bv. *viciae*. However, there was no relationship between strain and specific host plant or between strains and their geographical origin. Indeed, strains isolated from the same site were classified in different clusters. However, in a sampling site the rhizobial community may be more heterogeneous and the rhizosphere of one plant can show the same rhizobial diversity as that of the whole sampling area, hosting several rhizobial strains [32]. Among the isolates, POSA1A and POSA1B showed a similarity level of 100%. A possible explanation for this similarity is that legumes nodules host only one rhizobial strain. By contrast, CG1-1 and CG1-2 isolated from the same nodule of *V. faba* plants grouped into two different clusters. The phenotypic and genotypic diversity of POHY2B1 and POHY2B2 strains collected from the same nodule agrees with the results of Corich et al. [8], who observed the coexistence of unrelated plasmid profiles from several isolates obtained from the same root nodule. This result also concurs with Young et al. [48], who found a different population of *R. l. bv. viciae* on each individual commercial pea plant.

Finally, we used multivariate statistical PC analysis that allowed us to evaluate simultaneously the six parameters considered by condensing them into two principal components with a minimal mathematical loss of information. These principal components may be used as axes on which the data can be plotted and visualized structurally [30]. PCA confirmed the correlation observed between temperature and NaCl variables. This analysis also confirmed that our strains tolerated more basic pH values, since they were positioned in a left part of the plane. In addition, the location of strains WSM1455, WSM1014 and 3HOG18 on the plane may be justified by their sampling site (Australia and Thailand, respectively). The confirmation that the six variables considered are more influenced by geographical origin than by taxonomic position, is provided by the

isolate CG4, which, even though isolated from *G. officinalis*, was placed close to strains originating from the same sampling areas.

Conclusions

In this study, we found that the root-nodule bacteria of wild legumes, especially those isolated in areas with growth-limiting conditions showed a wide host range, a character which confers ecological benefits on such legumes. Therefore, a catalogue of strains resistant to unfavourable conditions (salinity, severe drought, elevated temperatures and low pH) isolated in different area of the world might be helpful to face alteration in local conditions due to modification in the global climate (desertification or acid rain).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MIPAF, Rome) and from the European Union, INCO-DEV SONGLINES grant, project ICA4-CT-2001-10059. The authors would like to thank Prof. Benjavan Rerkasem (Chiang Mai University, Thailand) for providing the strain 3Hog18 and Maria Rosaria D'Alessio for technical collaboration.

References

- [1] O.M. Aguilar, M.V. Lópe, P.M. Riccillo, R.A. Gonzales, M. Pagano, D.H. Grasso, A. Pühler, G. Favelukes, Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the southern Andes in Argentina, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3520–3524.
- [2] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [3] G. Blaiotta, O. Pepe, G. Mauriello, F. Villani, R. Andolfi, G. Moschetti, 16S–23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garviae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis, *Syst. Appl. Microbiol.* 25 (2002) 520–527.
- [4] J.C. Burton, *Rhizobium* Species: Microbial Technology, second ed., vol. I, Academic Press, London, London, 1979.
- [5] J.M. Carter, J.S. Tieman, A.H. Gibson, Competitiveness and persistence of strains of rhizobia for faba bean in acid and alkaline soils, *Soil Biol. Biochem.* 27 (1995) 617–623.
- [6] P.S. Cocconcelli, D. Porro, S. Galandini, L. Senini, Development of RAPD protocol for typing of strains of

- lactic acid bacteria and enterococci, *Lett. Appl. Microbiol.* 21 (1995) 376–379.
- [7] M.P. Cordovilla, F. Libero, C. Lluch, Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in *Faba* bean (*Vicia faba* L.) under salt stress, *Plant Soil* 172 (1995) 289–297.
- [8] V. Corich, A. Giacomini, M. Carlot, R. Simon, H-V. Tichy, A. Squartini, M.P. Nuti, Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations, *Can. J. Microbiol.* 47 (2001) 580–584.
- [9] C. Cosseau, J. Batut, Genomics of the ccoNOQP-encoded cbb(3) oxidase complex in bacteria, *Arch. Microbiol.* 181 (2004) 89–96.
- [10] V.M. de Oliveira, H.L.C. Coutinho, B.W.S. Sobral, C.T. Guimarães, J.D. van Elsas, G.P. Manfio, Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S–23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), *Lett. Appl. Microbiol.* 28 (1999) 137–141.
- [11] D.H. Demezas, T.B. Reardon, S.R. Strain, J.M. Watson, A.H. Gibson, Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L., *Mol. Ecol.* 4 (1995) 209–220.
- [12] A. Diouf, P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kersters, M. Gillis, E. Martinez-Romero, M. Gueye, Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia), *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 50 (2000) 159–170.
- [13] G.H. Elkan, C.R. Bunn, The rhizobia, In: A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*, second ed, Springer, New York, 1992, pp. 2197–2213.
- [14] P.H. Graham, Selective medium for growth of *Rhizobium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 17 (1969) 769.
- [15] P.H. Graham, M.J. Sadowsky, H.H. Keyser, Y.M. Barnet, R.S. Bradley, J.E. Cooper, D.J. Deley, B.D.W. Jarvis, E.B. Roslycky, B.W. Strijdom, J.P.W. Young, Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 582–587.
- [16] S.P. Harrison, L.R. Mytton, L. Skot, M. Dye, A. Cresswell, Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers, *Can. J. Microbiol.* 38 (1992) 1009–1015.
- [17] A.M. Hirsh, Developmental biology of legume nodulation, *New Phytol.* 122 (1992) 211–237.
- [18] P.J.J. Hooykaas, P.M. Clapwijk, M.P. Nuti, R. Schilperoord, A. Roersch, Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium* explanta, *J. Gen. Microbiol.* 98 (1977) 477–484.
- [19] J.G. Howieson, G.W. O'Hara, S.J. Carr, Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective, *Field Crop Res.* 6 (2000) 107–122.
- [20] D.C. Jordan, Family III. Rhizobiaceae, In: N.R. Krieg, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The William and Wilkins Co., Baltimore, 1984, pp. 234–244.
- [21] B. Khbaya, M. Neyra, P. Normand, K. Zerhari, A. Filali-Maltouf, Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4912–4917.
- [22] G. Laguerre, M.R. Allard, F. Revoy, N. Amarger, Rapid identification of *Rhizobia* by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 56–63.
- [23] G. Laguerre, M.P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, N. Amarger, Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 761–767.
- [24] G. Laguerre, E. Geniaux, S.I. Mazurier, R. Rodriguez-Casartelli, N. Amarger, Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes, *Can. J. Microbiol.* 39 (1993) 412–419.
- [25] G. Laguerre, S.M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouinb, N. Amarger, Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts, *Microbiology* 147 (2001) 981–993.
- [26] H.A. Louch, K.J. Miller, Synthesis of a low-molecular weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1008–1010.
- [27] E. Martinez-Romero, Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives, *Plant Soil* 252 (2003) 11–23.
- [28] G. Moschetti, G. Blaiotta, M. Aponte, P. Catzeddu, F. Villani, P. Deiana, S. Coppola, Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains, *J. Appl. Microbiol.* 85 (1998) 25–36.
- [29] S. Niemann, A. Pühler, H.V. Tichy, R. Simon, W. Selbitschka, Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population, *J. Appl. Microbiol.* 82 (1997) 477–484.
- [30] Y. Oda, K. Ouchi, Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 1495–1499.
- [31] K.M. Palmer, J.P.W. Young, Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2445–2450.
- [32] J.R. Postgate, *The Fundamentals of Nitrogen Fixation*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- [33] U.B. Priefer, Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 6161–6168.
- [34] U.B. Priefer, J. Auag, B. Boesten, I. Bouhmouch, R. Defez, A. Filali-Maltouf, M. Miklis, H. Moawad, B. Mouhsne, J. Prel, A. Schluter, B. Senatore, Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance, *J. Biotechnol.* 91 (2001) 223–236.

- [35] S. Radutoiu, L.H. Madsen, E.B. Madsen, H.H. Felle, Y. Umeharai, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases, *Nature* 425 (2003) 585–592.
- [36] R. Raman, V. Prasad, Salinity tolerance of *Rhizobium* mutants, growth and relative efficiency of symbiotic nitrogen fixation, *Soil Biol. Biochem.* 15 (1983) 217–223.
- [37] N. Requena, E. Perez-Solis, C. Azcon-Aquilar, P. Jeffries, J.M. Barea, Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 495–498.
- [38] R.J. Roughley, R.A. Date, The effect of strain of *Rhizobium* and of temperature on nodulation and early growth of *Trifolium semipilosum*, *Exp. Agric.* 22 (1986) 123–131.
- [39] L. Segovia, J.P.W. Young, E. Martinez-Romero, Re-classification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 374–377.
- [40] S.R. Strain, K. Leung, T.S. Whittam, F.J. De Bruijn, P.J. Bottomley, Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and *viciae* populations found in two Oregon soils under different plant communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 2772–2778.
- [41] Systat 5.2.1: Statistics, Version 5.2 Edition, Systat Inc., Evanston, IL, 1992.
- [42] Z.Y. Tan, E.T. Wang, G.X. Peng, M.E. Zhu, E. Martinez-Romero, W.X. Chen, Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1457–1469.
- [43] I. Toledo, L. Lloret, E. Martinez-Romero, *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico, *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (2003) 54–64.
- [44] R.R. Velagaleti, S. Marsh, Influence of host cultivars and *Bradyrhizobium* strains on the growth and symbiotic performance of soybean under salt stress, *Plant Soil* 119 (1989) 133–138.
- [45] J.M. Vincent, A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook 15, Blackwell, Oxford, 1970.
- [46] J.M. Vincent, Nitrogen Fixation in Legumes, Academic Press, London, 1982.
- [47] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 697–703.
- [48] J.P.W. Young, L. Demetriou, R.G. Apte, *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in pea crop, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 397–402.
- [49] H.H. Zahran, Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments, *Biol. Fertil. Soils* 25 (1997) 211–223.
- [50] H.H. Zahran, Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology, *J. Biotechnol.* 91 (2001) 143–153.
- [51] F. Zakhia, P. de Lajudie, Taxonomy of rhizobia, *Agronomie* 21 (2001) 569–576.
- [52] K. Zerhari, J. Aurag, B. Khbaya, D. Kharchaf, A. Filiali-Maltouf, Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco, *Lett. Appl. Microbiol.* 30 (2000) 351–357.
- [53] A. Zèzè, L.A. Mutch, P.W. Young, Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil, *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 363–370.