

SAPIENZA Università di Roma

Domanda di finanziamento acquisizione di medie e grandi attrezzature scientifiche
Anno 2007 - prot. C26G07BM2E

1. Dati Generali

1.1 Responsabile della ricerca

FOA'
(cognome)

Roberto
(nome)

Prof. Ordinario
(qualifica)

08/12/1948
(data di nascita)

NESSUNA AFFERENZA
(facoltà)

(dip/istit)

(indirizzo)

06/85795753
(telefono)

06/85795792
(fax)

rfoa@bce.uniroma1.it
(e-mail)

1.3 Titolo della ricerca

Studio di mutazioni di sequenza di geni coinvolti nelle neoplasie ematologiche come marcatori di malattia ed indicatori di prognosi e di terapie mirate.

2. Informazione sull'attività di ricerca

2.1 Parole chiave

1. BCR/ABL
2. P53
3. LEUCEMIA ACUTA LINFOIDE
4. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA
5. LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA
6. NPM
7. CHIMERISMO
8. TRAPIANTO ALLOGENICO
9. ANTI-TIROSIN CHINASI
10. TARGET FARMACOLOGICI

2.2 Ambito della ricerca

Dipartimento

2.3 Altri richiedenti appartenenti al personale dell'Università

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento
1.	ALIMENA	Giuliana	PO	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
2.	GUARINI	Anna	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
3.	MARTELLI	Maurizio	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
4.	MAURO	Francesca Romana	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
5.	MELONI	Giovanna	PA	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
6.	PULSONI	Alessandro	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
7.	TAFURI	Agostino	PA	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA
8.	TESTI	Anna Maria	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA

Personale EP

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento	note
1.	CHIARETTI	SABINA	Altro			
2.	DEL GIUDICE	ILARIA	Altro			
3.	TAVOLARO	SIMONA	Dottorando			
4.	GHIA	EMANUELA	Dottorando			
5.	MESSINA	MONICA	Dottorando			
6.	DELLA STARZA	IRENE	Tecnico			
7.	SANTANGELO	SIMONA	Tecnico			
8.	VITALE	ANTONELLA	Altro			
9.	ELIA	LOREDANA	Altro			
10.	DIVERIO	DANIELA	Altro			
11.	MARINELLI	MARILISA	Dottorando			
12.	IORI	ANNAPAOLA	Altro			
13.	TORELLI	GIONANNI F.	Altro			

2.4 Sintesi del progetto di ricerca

Nello studio delle neoplasie ematologiche sta emergendo un grande interesse per il ruolo svolto da mutazioni di sequenza di geni coinvolti nelle patologie. Molte informazioni biologiche sono disponibili in differenti patologie e rappresentano delle conoscenze che devono oggi essere utilizzate per garantire un sempre migliore approccio nella cura dei pazienti. L'impatto di mutazioni di sequenze geniche nello sviluppo di neoplasie ematologiche richiede una validazione su un numero consistente di pazienti. In questo modo, è possibile dimostrare il valore prognostico della mutazione, oltre a permettere di identificare la malattia anche in quote cellulari molto piccole perché marca specificatamente la cellula neoplastica; può, inoltre, essere indicativa dell'efficacia di un farmaco. Queste conoscenze rappresentano un obiettivo di grande valore sia scientifico/speculativo che clinico. Nell'ambito di studi clinici che il gruppo cooperatore nazionale GIMEMA (Gruppo Italiano per lo studio delle Malattie EMatologiche dell'Adulto), coordinato dal nostro centro, sta conducendo per validare protocolli terapeutici in pazienti affetti da leucemie acute e croniche, sarà possibile studiare l'impatto delle mutazioni di sequenza. Infatti, questi protocolli prevedono al momento della diagnosi la raccolta di materiale biologico, la sua centralizzazione presso la nostra istituzione e la sua estesa caratterizzazione. Il progetto si propone di valutare la sequenza di alcuni geni in patologie definite. Più in particolare:

1. Studio della sequenza del gene p53 nella leucemia linfatica cronica (LLC).

La LLC è un malattia con un decorso clinico molto eterogeneo. Vi sono infatti pazienti con una malattia stabile che non richiedono trattamento per molto tempo, in alcuni casi per tutta la vita, ed altri pazienti invece che presentano una malattia progressiva, in alcuni casi totalmente resistente alla terapia con conseguente repentino esito infausto. E' stato recentemente attivato un protocollo GIMEMA per il trattamento di pazienti con malattia progressiva stratificati per categorie di rischio. Tra i fattori biologici che definiscono l'alto rischio un ruolo molto importante è rappresentato dal gene p53, che viene valutato sia con metodiche di citogenetica molecolare (FISH) che come sequenza. Il gene p53 e la sua proteina sono stati studiati approfonditamente sia a livello strutturale che funzionale; la proteina p53 rappresenta uno dei più importanti fattori di trascrizione sia positivo che negativo di un notevole numero di geni. La maggior parte delle mutazioni puntiformi del gene p53 associate alla forme tumorali avvengono nella porzione di legame al DNA. A seconda del punto di mutazione, la sequenza produce una proteina che può precipitare e non svolgere la sua funzione o di riparo del danno o di induzione di apoptosi nel caso che la cellula abbia subito un danno non riparabile. Nella LLC, le mutazioni di p53, così pure la delezione del gene, rendono la malattia particolarmente aggressiva e resistente a molti farmaci, quali ad esempio la fludarabina, e devono indirizzare il paziente a protocolli terapeutici mirati che contemplano l'uso di alcuni anticorpi monoclonali o, nel caso sia possibile per età e disponibilità di un donatore, anche il trapianto allogenico di cellule staminali.

2. Studio della sequenza del gene NPM1 nella leucemia acuta mieloide (LAM).

La LAM è una patologia clinicamente e molecularmente eterogenea. Lesioni citogenetiche e/o molecolari - quali la t(15;17), la t(8;21) l'inv (16) - sono state evidenziate in circa il 40% dei casi e sono state correlate a differente prognosi. Queste alterazioni hanno consentito la caratterizzazione molecolare della leucemia permettendo di seguire la malattia durante il decorso clinico anche quando è presente in quote non evidenziabili al microscopio (percentuale di cellule leucemiche inferiore all'1%). Lo studio della malattia minima residua (MMR) consente di stratificare i pazienti per il rischio di ricaduta e suggerisce l'applicazione di terapie più eradicanti. Recentemente, è stata evidenziata nel 60% dei casi di LAM dell'adulto senza alterazioni citogenetiche e molecolari note la mutazione (nell'esone 12) del gene nucleofosmina (NPM), che si traduce in una proteina multifunzionale di trasporto nucleo/citoplasma. Questa mutazione, che sembra predittiva di una buona risposta alla terapia di induzione e di buona prognosi (nei casi Flt3-), permette inoltre di valutare la MMR. Nei pazienti affetti da LAM ed afferenti ai protocolli terapeutici GIMEMA sarà possibile verificare la presenza di mutazione del gene NPM, la frequenza nella popolazione di pazienti affetti da LAM, l'impatto prognostico e la validità per lo studio della MMR.

3. Studio della sequenza del trascritto molecolare BCR/ABL nella leucemia acuta linfoide (LAL) Ph1+.

La traslocazione t(9;22)(q34;q11) risulta essere l'anomalia genetica responsabile di circa il 95% dei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC) e di circa il 20-40% dei pazienti affetti da LAL. Tale traslocazione genera un gene di fusione BCR/ABL che codifica una proteina con una elevata attività protein-chinasi che

induce la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, ed inibisce i processi di apoptosi. L'Imatinib mesilato (Glivec, STI571, CGP57148) è un farmaco anti-tirosin-chinasico con specifica attività inibente il gene ABL, del suo derivativo BCR-ABL e di altre tirosin-chinasi. Ha dato risultati estremamente lusinghieri nella cura della LMC e negli ultimi anni il suo utilizzo è stato esteso alle LAL. Un certo numero di pazienti è risultato però refrattario, soprattutto tra le LAL. Il più frequente meccanismo identificato di resistenza all'Imatinib risulta essere l'insorgenza di mutazioni puntiformi su ABL che possono modificare l'affinità di legame del farmaco. Le mutazioni identificate sono molte, la maggior parte di esse si concentra all'interno del dominio chinasi di BCR-ABL. In particolare, si è visto che le mutazioni che rientrano nel P-loop (codoni 248-255) e la mutazione T315I sono quelle più frequentemente identificate ed associate alla resistenza al farmaco. Diventa ovviamente fondamentale ai fini prognostici e terapeutici andare ad identificare precocemente tali mutazioni. Il sequenziamento seguito all'analisi con D-HPLC risulta essere un sistema sensibile, rapido e meno dispendioso in grado di detectare mutazioni puntiformi quali inserzioni, delezioni e tandem repeat.

4. Studio del chimerismo nei pazienti trapiantati da donatore allogenico di cellule staminali o di cordone ombelicale.

Il trapianto allogenico di cellule staminali trova applicazione in diverse emopatie tra cui leucemie e linfomi. Uno dei parametri più utili per seguire l'attecchimento nel decorso post-trapianto è il rapporto tra cellule del paziente e del donatore che viene definito come percentuale di "chimerismo". Recentemente, l'identificazione di loci altamente polimorfici, con ripetizioni in tandem da 15-50 volte di nucleotidi, dispersi nel genoma umano sono in grado di caratterizzare gli individui; in particolare, i VNTR (variable number of tandem repeats) e gli STR (short tandem repeats) hanno assunto un ruolo chiave nel monitoraggio del chimerismo nei pazienti allotrapiantati. In alcuni casi, le normali metodiche di biologia molecolare per identificare VNTR e STR possono fallire a causa della promiscuità tra cellule del paziente e cellule trapiantate. Diventa quindi necessaria l'analisi di questi frammenti genici tramite metodiche che utilizzano la strumentazione D-HPLC. Tramite questo sistema che permette di analizzare l'area dei diversi picchi di migrazione dei campioni in studio, è infatti possibile identificare le diversità tra i vari individui, legate alla sostituzione, inserzione o delezione anche di un solo nucleotide e si può seguire nel corso del tempo l'attecchimento in maniera molto più sensibile e precisa.

2.5 Linee di ricerca e descrizione dell'utilizzazione dello strumento da parte dei singoli partecipanti

Lo studio delle mutazioni dei diversi geni da identificare con lo strumento D-HPLC sarà effettuato in progetti differenti dai diversi partecipanti alla richiesta di finanziamento. La linea di ricerca è simile e mira a correlare la caratterizzazione di mutazioni di sequenza genica con la prognosi e la risposta alla terapia, e a permettere la quantificazione della presenza di MMR in pazienti affetti da leucemie acute e croniche che sono sottoposti a protocolli terapeutici GIMEMA.

1. Studio della mutazione del gene p53 in pazienti affetti da LLC.

I pazienti inseriti nel protocollo terapeutico GIMEMA sono pazienti con malattia progressiva che necessitano di trattamento; lo studio delle caratteristiche biologiche indirizza i pazienti a terapie di maggiore o minore intensità definendoli a "basso" o "alto" rischio. Le caratteristiche biologiche esaminate che definiscono il basso rischio consistono nella valutazione di:

- a) morfologia delle cellule leucemiche che viene definita tipica (oltre il 90% di cellule piccole con alto N/C, con cromatina addensata, senza nucleoli, assenza di basofilia, numerose ombre di Gumprecht);
- b) immunofenotipo delle cellule leucemiche (CD5/CD20+, CD23+, FMC7-, CD79b-, Ig di superficie a debole intensità) che non devono esprimere in superficie l'antigene CD38;
- c) mutazioni della sequenza del gene variabile della catena pesante delle Ig che devono essere superiori al 2%;
- d) assenza della proteina ZAP-70 nel citoplasma della cellula leucemica;
- e) assenza di alterazioni citogenetiche a cattiva prognosi;
- f) assenza della proteina p53 nel citoplasma della cellula leucemica studiata con tecniche di immunocitochimica;
- g) assenza di mutazioni di sequenza del gene p53.

Le caratteristiche biologiche che definiscono l'alto rischio consistono nella valutazione di:

- a) morfologia delle cellule leucemiche che viene definita atipica (oltre il 10% di cellule grandi, con cromatina dispersa e nucleoli evidenti, citoplasma basofilo, assenza di ombre di Gumprecht);
- b) immunofenotipo delle cellule leucemiche (CD5/CD20+, CD23+, FMC7+/-, CD79b+/-, Ig di superficie a forte intensità) e in particolare la presenza dell'antigene CD38 in più del 20% di cellule leucemiche;
- c) mutazioni della sequenza del gene variabile della catena pesante delle Ig che devono essere inferiori al 2%;
- d) presenza della proteina ZAP-70 nel citoplasma in oltre il 10% di cellule leucemiche;
- e) presenza di alterazioni citogenetiche, in particolare la delezione del cromosoma 11 e la delezione del cromosoma 17;
- f) presenza della proteina p53 nel citoplasma della cellula leucemica studiata con tecniche di immunocitochimica;
- g) presenza di mutazioni di sequenza del gene p53.

La definizione di alto rischio si pone quando almeno tre delle caratteristiche sopraelencate vengono evidenziate. Fà eccezione la delezione del cromosoma 17 presente almeno nel 20% delle cellule leucemiche e la mutazione del gene p53. E', infatti, un dato consolidato che i pazienti con queste caratteristiche hanno una prognosi infausta con una comprovata resistenza ai farmaci chemioterapici.

Lo studio delle mutazioni del gene p53 nella LLC ha evidenziato mutazioni puntiformi soprattutto nella sequenza di dominio di legame con il DNA. Queste mutazioni possono dare luogo ad una proteina totalmente o parzialmente inattiva che precipita o non nella cellula e può essere evidenziabile con colorazioni immunocitochimiche. Il gene formato da 11 esoni verrà studiato interamente, anche se le mutazioni più frequenti sono segnalate negli esoni 4-8. L'analisi verrà effettuata su popolazioni purificate CD19+. Dopo estrazione e purificazione del DNA, saranno eseguite nelle condizioni standardizzate le amplificazioni delle regioni da esaminare con metodica PCR; i prodotti saranno corsi sulla colonna di cromatografia. I prodotti che mostrano alterazione di migrazione verranno sequenziati. Sarà possibile, utilizzando software idonei, poter tentare un modello tridimensionale della proteina e prevedere la sua attività. L'alterazione del gene p53 è atteso nel 7% di LLC, ma nel 20% delle LLC progressive.

Il progetto interessa i seguenti partecipanti: Roberto Foà (responsabile del progetto), Anna Guarini (responsabile della diagnosi), Francesca Romana Mauro (responsabile clinica), Ilaria Del Giudice (responsabile clinica), Emanuela Ghia/Simona Santangelo/ Marilisa Marinelli (studi di biologia molecolare, sequenziamento dei geni).

2. Studio della mutazione del gene NPM nelle LAM.

NPM è una proteina con funzioni di trasporto; ha normalmente una localizzazione nucleolare, regola il pathway onco-soppressore ARF-p53. Le traslocazioni che coinvolgono il gene NPM causano dislocazioni citoplasmatiche della proteina e sono evidenziabili con tecniche di immunocitochimica, come è stato recentemente dimostrato in un alto numero di pazienti affetti da LAM. Questo fenomeno è stato correlato con aspetti biologici e clinici della malattia. In particolare, è stato evidenziato che la presenza di NPM nel citoplasma delle cellule leucemiche è associato a casi che non mostrano alterazioni molecolari e/o citogenetiche. La presenza citoplasmatica della proteina si è rivelata strettamente associata a mutazioni della sequenza genetica. Le mutazioni sono localizzate nell'esone 12. L'80% di mutazioni consistono nella sequenza nucleotidica TCTG che dà luogo ad una differente sequenza della proteina (286-DLCLAVEEVSLRK proteina mutata rispetto a 286-DLWQWRKSL proteina normale), ma ne sono state segnalate in letteratura molte altre. I pazienti affetti da LAM afferenti ai protocolli terapeutici GIMEMA (differenziati per età) vengono caratterizzati al momento della diagnosi con studi di morfologia, citochimica, citogenetica, ciclo cellulare, resistenza ai farmaci e biologia molecolare. L'individuazione di trascritti leucemici è presente in circa il 40% dei casi e permette l'identificazione della presenza di cellule leucemiche anche con un numero di cellule molto basso, con una sensibilità pari a 1 cellula/milione, utilizzando tecniche di PCR quantitativa. Lo studio delle mutazioni del gene NPM verrà eseguito su tutti i casi le cui cellule non mostrano positività per trascritti noti. L'individuazione di mutazioni del gene sarà seguito dal sequenziamento. La conoscenza della sequenza permette di disegnare primers specifici. Sarà quindi possibile seguire l'andamento clinico dei pazienti durante il trattamento utilizzando la tecnica di PCR quantitativa per verificare la presenza di cellule patologiche residue (MMR).

Il progetto interessa i seguenti partecipanti: Roberto Foà (responsabile del progetto), Anna Guarini (responsabile della diagnosi), Daniela Diverio (biologia molecolare e sequenziamento), Giovanna Meloni (responsabile clinica), Emanuela Ghia/Simona Santangelo/ Marilisa Marinelli (studi di biologia molecolare, sequenziamento dei geni).

3. Studio delle mutazioni del trascritto BCR/ABL.

La scoperta del BCR-ABL come requisito fondamentale per la patogenesi delle LMC o delle LAL e l'evidenza che l'attività tirosin-chinasica di ABL è fondamentale per la trasformazione neoplastica di BCR-ABL, ha concentrato l'attenzione dei nuovi approcci terapeutici proprio su ABL portando alla identificazione di farmaci specifici quali l'Imatinib mesilato (Glivec, STI571, CGP57148), un potente inibitore di ABL, del suo derivativo BCR-ABL e di altre tirosin-chinasi. L'importante risposta ematologica e citogenetica al trattamento con Imatinib ne ha consentito l'uso come trattamento di prima linea nei pazienti alla diagnosi. Un gruppo minoritario di pazienti risulta però refrattario al trattamento; altri invece perdono la risposta citogenetica e molecolare in corso di trattamenti prolungati e possono poi perdere la remissione ematologica. Si sono fatte diverse ipotesi: il sequestro del farmaco da parte di una proteina sierica, la a-1 glicoproteina acida, oppure l'effluo dell'Imatinib al di fuori della cellula mediante pompe multidrug resistance (MRP), ma a tutt'oggi il più frequente meccanismo identificato di resistenza all'Imatinib risulta essere l'insorgenza di mutazioni puntiformi su ABL che possono modificare l'affinità di legame del farmaco, oppure agire in altri siti e modificare

la conformazione del dominio chinasi necessaria per legare l'Imatinib. Le mutazioni identificate sono molte, la maggior parte di esse si concentra all'interno del dominio chinasi di BCR-ABL (codoni 200-500) dove si distinguono 3 regioni: P-loop, dominio catalitico e di attivazione. In particolare, si è visto che le mutazioni che rientrano nel P-loop (codoni 248-255) e la mutazione T315I sono quelle più frequentemente identificate che si ritrovano maggiormente in fasi avanzate di malattia determinando una più rapida insorgenza di resistenza. Sono, inoltre, associate ad una prognosi peggiore e, al contrario delle altre, non rispondono ad alcun aumento di dose dell'Imatinib. Diventa ovviamente fondamentale ai fini prognostici e terapeutici andare ad identificare tali mutazioni precocemente. Le metodiche attualmente utilizzate sono diverse; inizialmente, il sequenziamento diretto è stato il sistema più largamente utilizzato a tale scopo, ma è risultato molto dispendioso, complicato e non propriamente sensibile (limite di detectabilità 20%); l'ASO-PCR e l'RFLP sembrano essere sistemi alternativi, più sensibili ma non adatti ad uno screening su larga scala per tutte le mutazioni attualmente evidenziate. Il sequenziamento seguito all'analisi con D-HPLC risulta essere un sistema sensibile, rapido e meno dispendioso in grado di detectare mutazioni puntiformi quali inserzioni, delezioni e tandem repeat.

Al momento della diagnosi di LAL, l'individuazione della presenza del trascritto BCR/ABL deve essere seguita dallo studio della sequenza per evidenziare l'indicazione al trattamento con Imatinib o ad altra terapia.

Il progetto interessa i seguenti partecipanti: Roberto Foà (responsabile del progetto), Anna Guarini (responsabile della diagnosi), Giovanna Meloni (responsabile clinica adulti), Anna Testi (responsabile clinica pazienti pediatrici), Sabina Chiaretti (responsabile studi genomici), Simona Tavolaro/Monica Messina (caratterizzazione molecolare), Antonella Vitale (coordinamento dati clinico/biologici), Loredana Elia/Emanuela Ghia/Irene Della Starza/Simona Santangelo/Marilisa Marinelli (studi di biologia molecolare, sequenziamento dei geni).

4. Studio del chimerismo nei pazienti allotrapiantati.

Il trapianto di cellule staminali ha assunto negli ultimi anni un ruolo di primo piano sia per patologie non-neoplastiche (talassemia, immunodeficienze congenite, anemia aplastica) che per neoplasie ematologiche, quali leucemie e linfomi. Uno dei parametri più utili per seguire l'attecchimento nel decorso post-trapianto è il rapporto tra cellule del paziente e del donatore che viene definito come percentuale di "chimerismo" dalla figura della mitologia greca per metà uomo e metà animale. L'analisi seriale del chimerismo è divenuta una procedura routinaria a cui vengono attribuiti considerevoli significati clinici da parte di diversi gruppi di ricercatori, che vedono nella comparsa di un'incremento della percentuale di cellule del ricevente un rischio di possibile recidiva. L'identificazione di loci altamente polimorfici dispersi nel genoma umano è in grado di caratterizzare gli individui; in questo senso, i VNTR e gli STR hanno assunto un ruolo chiave nel monitoraggio del chimerismo sui pazienti trapiantati. L'utilizzo di metodiche sempre più sofisticate di trapianto di cellule staminali prevede l'uso del sangue di cordone ombelicale quale sorgente di cellule staminali in quei casi in cui non sia disponibile un donatore. Tuttavia, soprattutto negli adulti, il numero totale di cellule cordonali infuse può essere molto critico per la buona riuscita del trapianto e può aumentare il rischio di infezioni e di mortalità correlata. Più recentemente, proprio per superare l'ostacolo della scarsità di dose cellulare infusa si sta seguendo la strada del trapianto da doppio cordone HLA parzialmente compatibile (sono consentiti al massimo 2 loci di diversità); molti gruppi riferiscono l'uso di tale procedura trapiantologia come un sistema utile per superare la barriera legata alla dose cellulare. In questi casi specifici, in cui le normali metodiche di biologia molecolare VNTR e STR a causa della promiscuità tra cellule del paziente e cellule delle due unità cordonali trapiantate possono fallire, risulta essere utile l'analisi tramite D-HPLC dei frammenti genici. Infatti, tramite questo sistema ed analizzando l'area dei diversi picchi di migrazione dei campioni in studio è possibile identificare le diversità tra i vari individui, legate alla sostituzione, inserzione o delezione anche di un solo nucleotide e si può seguire nel corso del tempo l'attecchimento in maniera molto più sensibile e precisa.

Il progetto interessa i seguenti partecipanti. Roberto Foà (responsabile del progetto), Anna Paola Iori (responsabile clinico), Giovanni F Torelli/Alessandro Pulsoni/Maurizio Martelli (clinici), Loredana Elia/Emanuela Ghia/Irene Della Starza/ (studi di biologia molecolare, sequenziamento dei geni).

3. Elenco dei lavori scientifici negli ultimi 3 anni

A) Pubblicazioni su riviste scientifiche

1. VANNUCCHI AM, ANTONIOLI E, GUGLIEMELLI P, RAMBALDI A, BAROSI G, MARCHIOLI R, MARFISI RM, FINAZZI G, GUERINI V, FABRIS F, RANDI ML, DE STEFANO V, CABERLON S, TAFURI A., RUGGERI M, SPECCHIA G, LISO V, ROSSI E, POGLIANI E, GUGLIOTTA L, BOSI A, BARBUI T. (2007). Clinical profile of homozygous JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *BLOOD*. ISSN: 0006-4971.
2. ZEUNER A, PEDINI F, SIGNORE M, RUSCIO G, MESSINA C, TAFURI A., GIRELLI G, PESCHLE C, DE MARIA R. (2006). Increased death receptor resistance and FLIP short expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *BLOOD*. vol. 107, pp. 3495-3502 ISSN: 0006-4971.
3. LO COCO F, CIMINO G, BRECCIA M, NOGUERA NJ, DIVERIO D, FINOLEZZI E, POGLIANI EM, DI BONA E, MICOLEZZI C, KROPP M, VENDITTI A, TAFURI A., MANDELLI F. (2004). Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *BLOOD*. vol. 104, pp. 1995-1999 ISSN: 0006-4971.
4. GREGORJ C, RICCIARDI MR, PETRUCCI MT, SCERPA MC, DE CAVE F, FAZI P, VIGNETTI M, VITALE A, MANCINI M, CIMINO G, PALMIERI S, DI RAIMONDO F, SPECCHIA G, FABBIANO F, CANTORE N, MOSNA F, CAMERA A, LUPPI M, ANNINO L, MIRAGLIA E, FIORITONI G, RONCO F, MELONI G, MANDELLI F, ANDREEFF M, MILELLA M, FOA R, TAFURI A. (2007). ERK1/2 phosphorylation is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *BLOOD*. ISSN: 0006-4971.
5. MILELLA M, KONOPLEVA M, PRECUPANU CM, TABE Y, RICCIARDI MR, GREGORJ C, COLLINS SJ, CARTER BZ, D'ANGELO C, PETRUCCI MT, FOA R, COGNETTI F, TAFURI A., ANDREEFF M. (2007). MEK blockade converts AML differentiating response to retinoids into extensive apoptosis. *BLOOD*. ISSN: 0006-4971.
6. PL ZINZANI, P. QUAGLINO, N. PIMPINELLI, E. BERTI, G. BALIVA, S. RUPOLI, MARTELLI M., M. ALAIBAC, G. BORRONI, S. CHIMENTI, R. ALTERINI, L. ALINARI, M.T FIERRO, N. CAPPELLO, A. PILERI, D. SOLIGO, M. PAULLI, S. PILERI, M. SANTUCCI AND M. G. BERNENGO. (2006). Prognostic factors in Primary Cutaneous B- Cell Lymphoma: The Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. vol. 24, pp. 1376-1382 ISSN: 0732-183X.
7. A. GALLAMINI, C. STELITANO, R. CALVI, M. BELLEI, D. MATTEI, U. VITOLO, F. MORABITO, MARTELLI M., E. BRUSAMOLINO, E. IANNITTO, F. ZAJA, S. CORTELLAZZO, L. RIGACCI, L. DEVIZZI, G. TODESCHINI, G. SANTINI, M. BRUGIATELLI, AND M. FEDERICO. (2004). Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic multicentric clinical study. *BLOOD*. vol. 103, pp. 2474-2479 ISSN: 0006-4971.
8. ZINZANI PL, PULSONI A, PERROTTI A, SOVERINI S, ZAJA F, DE RENZO A, STORTI S, LAUTA VM, GUARDIGNI L, GENTILINI P, TUCCI A, MOLINARI AL, GOBBI M, FALINI B, FATTORI PP, CICCONE F, ALINARI L, MARTELLI M., PILERI S, TURA S, BACCARANI M. (2004). Fludarabine Plus Mitoxantrone With and Without Rituximab Versus CHOP With and Without Rituximab As Front-Line Treatment for Patients With Follicular Lymphoma. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. vol. 22, pp. 2654-2661 ISSN: 0732-183X.
9. ELIA L, GOTTARDI E, FLORIDDIA G, GRILLO R, CIAMBELLI F, LUCIANI M, CHIUSOLO P, INVERNIZZI R, MELONI G., FOA R, SAGLIO G, CIMINO G. (2004). Retrospective comparison of qualitative and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction in diagnosing and monitoring the ALL1-AF4 fusion transcript in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *LEUKEMIA*. vol. 18, pp. 1824-1830 ISSN: 0887-6924.
10. PASQUALUCCI L, LISO A, MARTELLI MP, BOLLI N, PACINI R, TABARRINI A, CARINI M, BIGERNA B, PUCCIARINI A, MANNUCCI R, NICOLETTI I, TIACCI E, MELONI G., SPECCHIA G, CANTORE N, DI RAIMONDO F, PILERI S, MECUCCI C, MANDELLI F, MARTELLI MF, FALINI B. (2006). Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *BLOOD*. vol. 108, pp. 4146-4155 ISSN: 0006-4971.
11. GARDERET L, LABOPIN M, GORIN NC, POLGE E, BARUCHEL A, MELONI G., ORTEGA J, VOSSER J, BUNJES D, LEVERGER G, BLAISE D, FERRANT A, BRUNE M, DORE E, GADNER H, ZINTL F, YANIV I, DINI G, FRASSONI F, ACUTE LEUKEMIA WORKING PARTY AND PEDIATRIC WORKING PARTY OF THE EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION. (2005). Hematopoietic stem cell transplantation for de novo acute megakaryocytic leukemia in first complete remission: a retrospective study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *BLOOD*. vol. 105, pp. 405-409 ISSN: 0006-4971.
12. ORSINI E, PASQUALE A, MAGGIO R, CALABRESE E, MAURO F.R., GIAMMARTINI E, GUARINI A, FOA R. (2004). Phenotypic and functional characterization of monocyte-derived dendritic cells in chronic lymphocytic leukaemia patients: influence of neoplastic CD19 cells in vivo and in vitro. *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*. vol. 125, pp. 720-728 ISSN: 0007-1048.
13. SELICK G.S, WEBB E.L, ALLINSON R, MATUTES E, DYER M.J.S, JNSSON V, LANGERAK A.W, MAURO F.R., FULLER S, WILEY J, LYTTELTON M, CALLEA V, YUILLE M, CATOVSKY D, HOULSTON R.S. (2006). A high-density SNP genome-wide linkage scan for chronic lymphocytic leukemia-susceptibility loci. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS*. vol. 77, pp. 420-429 ISSN: 0002-9297.

14. CALIN GA, TRAPASSO F, SHIMIZU M, DUMITRU CD, YENDAMURI S, GODWIN AK, FERRACIN M, BERNARDI G, CHATTERJEE D, BALDASSARRE G, RATTAN S, ALDER H, MABUCHI H, SHIRASHIT, HANSEN LL, HERLEA V, MAURO F.R., DIGHIERO G, MOVSAS B, RASSENTI L, KIPPS T, BAFFA R, FUSCO A, MORI M, RUSSO G, LIU GG, NEUBERG D, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. (2005). A germline stop mutation in ARLTS1, a new member of the ADP-ribosylation factor family, is associated with familial cancers and reduced in vivo apoptosis. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. vol. 352, pp. 1667-1676 ISSN: 0028-4793.
15. FALINI B, MARTELLI M.P, BOLLI N, BONASSO R, GHIA E, PALLOTTA M.T, DIVERIO D, NICOLETTI I, PACINI R, TABARRINI A, GALLETTI G.V, MANNUCCI R, ROTI G, ROSATI R, SPECCHIA G, LISO A, TIACCI E, ALCALAY M, LUZI L, VOLORIO S, BERNARD L, GUARINI A., AMADORI S, MANDELLI F, PANE F, LO-COCO F, SAGLIO G, PELICCI P.G, MARTELLI M.F, MECUCCI C. (2006). Immunohistochemistry predicts nucleoplasm (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *BLOOD*. vol. 108, pp. 1999-2005 ISSN: 0006-4971.
16. BOMBEN R, DAL BO M, CAPELLO D, BENEDETTI D, MARCONI D, ZUCCHETTO A, FORCONI F, MAFFEI R, GHIA EM, LAURENTI L, BULIAN P, DEL PRINCIPE MI, PALERMO G, THORSELIUS M, DEGAN M, CAMPANINI R, GUARINI A., DEL POETA G, ROSENQUIST R, EFREMOV DG, MARASCA R, FOA R, GAIDANO G, GATTEI V. (2007). Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *BLOOD*. ISSN: 0006-4971.
17. VITALE A, GUARINI A., ARIOLA C, MELONI G, PERBELLINI O, PIZZUTI M, DE GREGORIS C, METTIVIER V, PASTORINI A, PIZZOLO G, VIGNETTI M, MANDELLI F, FO R. (2007). Absence of prognostic impact of CD13 and/or CD33 antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the GIMEMA ALL 0496 trial. *HAEMATOLOGICA*. vol. 92, pp. 342-348 ISSN: 0390-6078.
18. GENTILE M, MAURO FR, GUARINI A., FOA R. (2005). New developments in the diagnosis, prognosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *CURRENT OPINION IN ONCOLOGY*. vol. 17, pp. 597-604 ISSN: 1040-8746.
19. KRAMPERA M, PERBELLINI O, VINCENZI C, ZAMPIERI F, PASINI A, SCUPOLI M.T, GUARINI A., DE PROPRIIS M.S, COUSTAN-SMITH E, CAMPANA D, FOA R, PIZZOLO G. (2006). Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *HAEMATOLOGICA*. vol. 91, pp. 1109-1112 ISSN: 0390-6078.
20. VITALE A, GUARINI A., CHIARETTI S, FOA R. (2006). The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. *CURRENT OPINION IN ONCOLOGY*. vol. 18, pp. 652-659 ISSN: 1040-8746.
21. GENTILE M, MAURO FR, CALABRESE E, DE PROPRIIS MS, GIAMMARTINI E, MANCINI F, MILANI ML, GUARINI A., FOA R. (2005). The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*. vol. 130, pp. 549-557 ISSN: 0007-1048.
22. CAPELLO D, GUARINI A., BERRA E, MAURO FR, ROSSI D, GHIA E, CERRI M, LOGAN J, FOA R, GAIDANO G. (2004). Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable B-cell chronic lymphocytic leukemia. *LEUKEMIA*. vol. 18, pp. 1941-1947 ISSN: 0887-6924.
23. TESTI AM., AL-HADAD SA, AL-JADIRY MF, MOLETTI ML, MANDELLI F AND FOA R. (2006). Impact of international collaboration on the prognosis of childhood acute promyelocytic leukemia in Iraq. *HAEMATOLOGICA*. vol. 91, pp. 509-512 ISSN: 0390-6078.
24. GIONA F, MOLETTI ML, DEL GIUDICE I, TESTI AM., DIVERIO D, DE CUIA MR, MANDELLI F, FOA R. (2005). Long-term follow-up of Philadelphia chromosome-positive (Ph) Chronic Myeloid Leukemia (CML) in children and adolescents managed at a single institution over 20-year period. *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*. vol. 130, pp. 970-972 ISSN: 0007-1048.
25. TESTI AM., BIONDI A, LO COCO F, MOLETTI ML, GIONA F, VIGNETTI M, MENNA G, LOCATELLI F, PESSION A, BARISONE E, DE ROSSI G, DIVERIO D, MICALIZZI C, ARICO M, BASSO G, FOA R, MANDELLI F. (2005). GIMEMA-AIEOP AIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *BLOOD*. vol. 106, pp. 447-43 ISSN: 0006-4971.
26. ZINZANI PL, PULSONI A., PERROTTI A, SOVERINI S, ZAJA F, DE RENZO A, STORTI S, LAUTA VM, GUARDIGNI L, GENTILINI P, TUCCIA A, MOLINARI AL, GOBBI M, FALINI B, FATTORI PP, CICCONE F, ALINARI L, MARTELLI M, PILERI S, TURA S, BACCARANI M. (2004). Fludarabine Plus Mitoxantrone With and Without Rituximab Versus CHOP With and Without Rituximab As Front-Line Treatment for Patients With Follicular Lymphoma. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. ISSN: 0732-183X.
27. CAVALIERI E, ANSELMO AP, GIANFELICI V, FRATTARELLI N, PESCARMONA E, FOA R, PULSONI A. (2005). Is bone marrow trephine biopsy always mandatory in staging Hodgkin's disease?. *HAEMATOLOGICA*. vol. 90(1), pp. 134-136 ISSN: 0390-6078.
28. BASSO K, LISO A, TIACCI E, BENEDETTI R, PULSONI A., FOA R, DI RAIMONDO F, AMBROSETTI A, CALIFANO A, KLEIN U, DALLA FAVERA R, FALINI B. (2004). Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*. vol. 199(1), pp. 59-68 ISSN: 0022-1007.
29. FALINI B, TIACCI E, LISO A, BASSO K, SABATTINI E, PACINI R, FOA R, PULSONI A., DALLA FAVERA R, PILERI S. (2004). Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *LANCET*. vol. 363(9424), pp. 1869-1870 ISSN: 0140-6736.
30. PULSONI A., STARZA ID, FRATTARELLI N, GHIA E, CARLOTTI E, CAVALIERI E, MATTURRO A, TEMPERA S, RAMBALDI A, FOA R. (2007). Stage I/II follicular lymphoma: spread of bcl-2/IgH+ cells in blood and bone marrow from primary site of disease and possibility of clearance after involved field radiotherapy. *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*. vol. 3, pp. 216-220 ISSN: 0007-1048.
31. FULCI V; CHIARETTI S; GOLDONI M; AZZALIN G; CARUCCI N; TAVOLARO S; CASTELLANO L; MAGRELLI A; CITARELLA F; MESSINA M; MAGGIO R; PERAGINE N; SANTANGELO S; MAURO FR; LANDGRAF P; TUSCHL T; WEIR DB; CHIEN M; RUSSO JJ; JU J; SHERIDAN R; SANDER C; ZAVOLAN M; GUARINI A; FOA R.; MACINO G (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *BLOOD* ISSN: 0006-4971
32. VIGNETTI M; FAZI P; CIMINO G; MARTINELLI G; DI RAIMONDO F; FERRARA F; MELONI G; AMBROSETTI A; QUARTA G; PAGANO L; REGE-CAMBRIN G; ELIA L; BERTIERI R; ANNINO L; FOA R.; BACCARANI M; MANDELLI F (2007). Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. *BLOOD* vol. 109 pp. 3676-3678 ISSN: 0006-4971
33. CHIARETTI S; GUARINI A; DE PROPRIIS MS; TAVOLARO S; INTOPPA S; VITALE A; IACOBELLI S; ELIA L; ARIOLA C; RITZ J; FOA R. (2006). ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 re-arrangement and the pre-B stage of differentiation, and prognostic implications. *BLOOD* vol. 107 pp. 197-204 ISSN: 0006-4971
34. CHIARETTI S; GUARINI A; DE PROPRIIS MS; TAVOLARO S; INTOPPA S; VITALE A; IACOBELLI S; ELIA L; ARIOLA C; RITZ J; FOA R. (2006). ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *BLOOD* vol. 107 pp. 197-204 ISSN: 0006-4971
35. QUARANTA MT; SPINELLO I; TESTA U; MARIANI G; DIVERIO D; FOA R.; PESCHLE C; LABBAYE C (2006). PLZF-mediated control on VLA-4 expression in normal and leukemic myeloid cells. *ONCOGENE* vol. 25 pp. 399-408 ISSN: 0950-9232
36. VITALE A; GUARINI A; ARIOLA C; MANCINI M; MECUCCI C; CUNEO A; PANE F; SAGLIO G; CIMINO G; TAFURI A; MELONI G; FABBIANO F; RECCHIA A; KROPP MG; KRAMPERA M; CASCIVILLA N; FERRARA F; ROMANO A; MAZZA P; FOZZA C; PAOLONI F; VIGNETTI M; FOA R. (2006). Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol. *BLOOD* vol. 107 pp. 473-479 ISSN: 0006-4971
37. MANCINI M; SCAPPATICCI D; CIMINO G; NANNI M; DERME V; ELIA L; TAFURI A; VIGNETTI M; VITALE A; CUNEO A; CASTOLDI G; SAGLIO G; PANE F; MECUCCI C; CAMERA A; SPECCHIA G; TEDESCHI A; DI RAIMONDO F; FIORITONI G; MIRTO S; MARMONT F; FERRARA F; CASCIVILLA N; TODESCHINI G; NOBILE F; KROPP MG; LEONI P; TABILIO A; LUPPI M; ANNINO L; MANDELLI F; FOA R. (2005). A comprehensive genetic classification of adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *BLOOD* ISSN: 0006-4971
38. BUCANEVE G; MICOZZI A; MENICHETTI F; MARTINO P; DIONISI MS; MARTINELLI G; ALLIONE B; D'ANTONIO D; BUELLI M; NOSARI AM; CILLONI D; ZUFFA E; CANTAFFA R; SPECCHIA G; AMADORI S; FABBIANO F; DELLIERS GL; LAURIA F; FOA R.; DEL FAVERO A; GRUPPO ITALIANO MALATTIE EMATOLOGICHE DELL'ADULTO GIMEMA INFECTION PROGRAM (2005). Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* vol. 353 pp. 977-987 ISSN: 0028-4793
39. CHIARETTI S; LI X; GENTLEMAN R; VITALE A; WANG KS; MANDELLI F; FOA R.; RITZ J. (2005). Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation.

40. G.F. TORELLI; A. GUARINI; A. PORZIA; S. CHIARETTI; C. TATARELLI; D. DIVERIO; R. MAGGIO; A. VITALE; J. RITZ; FOA' R. (2005). *Flt-3 inhibition in t(4;11) adult acute lymphoid leukemia.*
BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY vol. in press ISSN: 0007-1048
41. PANE F; CIMINO G; IZZO B; CAMERA A; VITALE A; QUINTARELLI C; PICARDI M; SPECCHIA G; MANCINI M; CUNEO A; MECUCCI C; MARTINELLI G; SAGLIO G; ROTOLI B; MANDELLI F; SALVATORE F; FOA' R. (2005). *Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia.*
LEUKEMIA ISSN: 0887-6924
42. RAMBALDI A; CARLOTTI E; OLDANI E; DELLA STARZA I; BACCARANI M; CORTELAZZO S; LAURIA F; ARCAINI L; MORRA E; PULSONI A; RIGACCI L; RUPOLO M; ZAJA F; ZINZANI PL; BARBUI T; FOA' R. (2005). *Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH positive cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in Follicular non Hodgkin's Lymphoma.*
BLOOD ISSN: 0006-4971
43. VITALE A; GUARINI A; ARIOLA C; MANCINI M; MECUCCI C; CUNEO A; PANE F; SAGLIO G; CIMINO G; TAFURI A; MELONI G; FABBIANO F; RECCHIA A; KROPP MG; KRAMPERA M; CASCAVILLA N; FERRARA F; ROMANO A; MAZZA P; FOZZA C; PAOLONI F; VIGNETTI M; FOA' R. (2005). *Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol.*
BLOOD vol. 22 ISSN: 0006-4971
44. CHIARETTI S.; XIOACHUN L.; GENTLEMAN R.; VITALE A.; VIGNETTI M.; MANDELLI F.; RITZ J.; FOA' R. (2004). *Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival.*
BLOOD vol. 103 pp. 2771-2778 ISSN: 0006-4971
I003099 (MA)
45. MESSMER BT; ALBESIANO E; EFREMOV DG; GHIOTTO F; ALLEN SL; KOLITZ J; FOA' R.; DAMLE RN; FAIS F; MESSMER D; RAI KR; FERRARINI M; CHIORAZZI N. (2004). *Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia.*
JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 16 pp. 519-525 ISSN: 0022-1007

B) Pubblicazioni su libri

C) Pubblicazioni su atti di convegni e congressi

D) Altro (pubblicazioni non previste nei punti precedenti)

4. Richiesta di finanziamento del progetto

4.1 Richiesta di finanziamento

Spese per acquisto attrezzature scientifiche(IVA compresa) Â Â Â	€ 84.000
--	----------

4.2 Finanziamenti degli anni precedenti

Anno	2002Â Â Â Â Â	2003Â Â Â Â Â	2004	2005Â Â Â Â Â
Finanziato	NO	NO	NO	SI

5. Attrezzature richieste

5.1 Descrizione dettagliata delle attrezzature richieste (secondo i preventivi allegati)

La richiesta è per uno strumento dedicato allo studio delle mutazioni di sequenze di acidi nucleici che utilizza la tecnologia D-HPLC (denaturing high performance liquid chromatography). E' costituito da diversi moduli:

- Modulo di interfaccia per il collegamento ai differenti moduli del sistema; permette la gestione delle metodiche coordinando l'attività dei singoli componenti del cromatografo.
- Modulo idraulico con sistema di pompaggio, generazione del gradiente (binario) con miscelamento ad alta pressione, completo di sistema di degasaggio in depressione ed in linea a 4 vie per eliminare le microbolle dai tamponi/eluenti, pompe ad alta pressione, sistema di lavaggio automatico.
- Modulo di gestione del campione: cambiacampioni/iniettore automatico con 1 supporto per micropiastre a 96 pozzetti; il modulo è termostato per mantenere alla temperatura desiderata i campioni, in attesa del momento dell'analisi. La bassa temperatura consente di evitare l'evaporazione del campione. Le temperature sono programmabili a seconda del protocollo da utilizzare. L'attività quotidiana è interamente programmabile. E' presente un iniettore automatico con movimento tridimensionale programmabile secondo le esigenze operative.
- Rivelatore ultravioletto (lunghezza d'onda 254nm con lampada a vapori di mercurio ad alta efficienza) con microcella a flusso.

- Sistema di termostatazione ad alta precisione e riproducibilità per D-HPLC, la cui tecnologia si fonda sulla differenziazione tra molecole di DNA normale e mutato che a temperatura prossima alla denaturazione si comportano in modo differente, permettendone la rivelazione. Settabilità della temperature: 0.1°C.

Raffreddamento/Riscaldamento ad effetto Peltier.

- Programma di gestione del sistema e dei dati:

Navigator è un software specifico per D-HPLC: consente di organizzare e gestire le sperimentazioni e la diagnostica in D-HPLC. Lo strumento comprende il personal computer con tastiera, mouse, video LCD 15" e masterizzatore.

Navigator consente di preconizzare, sulla base della sola sequenza del DNA da analizzare, il comportamento del campione in esame: ne prevede ed indica la posizione del cromatogramma alla temperatura di 50°C (condizioni non-denaturanti), ed alla temperatura di quasi-denaturazione (indicata dal software), ne calcola il comportamento di denaturazione termica e chimica in ambiente D-HPLC e provvede alla generazione del programma di analisi proposto (tabella gradiente).

Fornisce le curve di elicità/non elicità della sequenza alle differenti temperature, per ottimizzare le condizioni operative in modo rapido ed economico in quanto le simulazioni non utilizzano né campione né reagenti e vengono calcolate istantaneamente.

Calcola la temperatura alla quale effettuare la ricerca delle mutazioni sull'intero frammento, analizzandone anche i singoli domini. Il programma permette di generare report personalizzabili e gestiti come "progetti" per semplificare la ricerca dei risultati relativi a una determinata serie di analisi.

L'interfaccia con l'utente è concepita in modo che il dialogo sia impostato seguendo i criteri della ricerca biologica/genetica piuttosto che il linguaggio cromatografico: ciò permette una più rapida familiarizzazione con il software e l'apparecchiatura.

Il software navigator garantisce anche:

. un sistema di riconoscimento dei profili cromatografici, personalizzabile per l'operatore che mostra la presenza o assenza di una mutazione

. lo sviluppo automatizzato dei metodi con previsione automatica delle condizioni analitiche

. l'interconnettività dei dati potendo il sistema essere collegato in rete e quindi avere la possibilità di accedere ai dati di laboratorio permettendo la verifica della provenienza dei dati da sorgenti multiple

. un sistema di controllo remoto quindi una flessibilità operativa permettendo di programmare ed effettuare analisi da qualsiasi punto di rete

. la assoluta integrità dei dati per l'uso di un database evoluto che consente di accedere alle informazioni ma non di modificarle.

Per ciascuna sequenza viene immediatamente calcolata la lunghezza in bp, la percentuale di GC, e la T_m, temperatura di fusione, curva di melting e relativi domini quindi viene proposto il gradiente ottimale per la separazione cromatografica.

Il computer è: Personal Computer Pentium IV le cui caratteristiche sono: CPU 2 GHz; HDD 80 GB, FDD 1,44 MB, Masterizzatore interno 48x, 24x, 48x, Chassis posizionabile a desk top o tower, stampante ink-jet a colori, terminale Video LCD da 17".

La strumentazione D-HPLC MD 4000 plus TM (Ditta Transgenomic) ha un attestato di unicità. Infatti, è l'unica a poter utilizzare la colonna brevettata che è garantita per 6000 corse per ogni singola colonna. Presenta quindi una elevata produttività analitica. Questo requisito è necessario per la realizzazione del progetto; infatti, i tempi devono essere celeri per l'identificazione delle mutazioni. Inoltre, tra le sue caratteristiche di unicità ha protocolli analitici e diagnostici standardizzati in circuiti internazionali e l'azienda produttrice è proprietaria esclusiva del sito che indica le condizioni ottimali per l'implicazione e protocollo di studio dei geni di interesse.

5.2 Regolamento di utilizzo dell'attrezzatura

Lo strumento sarà posizionato in una area idonea e personalizzata.

Lo strumento sarà settato per la ricerca delle sequenze e delle mutazioni di esse, utilizzando i software che lo compongono. Per ogni gene, quindi, le condizioni di temperatura di reazione e di corsa sulla colonna cromatografica saranno attentamente standardizzate.

Il principio della colonna HPLC si basa sulla differente velocità di migrazione, in un mezzo simile ad un gel per gli eteroduplex ed omoduplex. Questi duplex si formano quando un frammento amplificato di DNA mutato ed uno non mutato vengono denaturati termicamente e lasciati ricombinare. Una qualsiasi variazione tra la molecola originale (wild type) e quella mutata porta alla formazione di un eteroduplex (combinazione di due catene di DNA a singola catena non perfettamente corrispondenti, caratterizzata dalla presenza di una "bolla" dove c'è la mutazione). L'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente dall'omoduplex non mutato; l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) dell'omoduplex e da ciò si può caratterizzare la presenza di una mutazione in un campione sotto forma di picchi ulteriori rispetto al "wild". Di conseguenza, si può procedere con l'identificazione di tale mutazione attraverso la sequenza specifica, soltanto sui campioni risultati mutati al D-HPLC.

Dal campione di sangue midollare e/o periferico verranno separate e, quando necessario, purificate le cellule neoplastiche.

L'estrazione del DNA verrà eseguita sul pellet di cellule patologiche mediante un kit (Promega) che prevede la purificazione da proteine e RNA e susseguente precipitazione dell'acido nucleico. Dopo dosaggio in spettrofotometria, si procederà alla amplificazione della sequenza con differenti primers specifici per ogni regione. I prodotti di amplificazione dopo corsa su gel per verificarne la presenza, verranno fatti correre alle condizioni idonee sulla colonna cromatografica. Saranno sequenziate le regioni che evidenziano mutazione.

L'uso sarà attentamente programmato con priorità per gli studi che richiedono un risultato veloce per le ricadute che esso comporta. E' evidente che la conoscenza della sequenza, e quindi delle mutazioni di essa, per esempio del trascritto BCR/ABL necessita di una immediata esecuzione perchè il paziente che mostra mutazioni associate alla resistenza al farmaco Imatinib devono essere indirizzati ad altra terapia. Infatti, l'uso improprio del farmaco provoca danno al paziente sia in termini di tossicità sia aumentando la popolazione leucemica non responsiva; inoltre, si produce uno spreco economico non irrilevante senza alcun beneficio per il paziente. Nell'ambito dei protocolli GIMEMA, i pazienti affetti da LAL BCR/ABL+ sono circa il 2% della popolazione pediatrica, il 25% della popolazione adulta ed il 40% della popolazione anziana (sopra i 60 anni di età). I protocolli reclutano circa 200 pazienti affetti da LAL ogni anno provenienti dal territorio nazionale. Le cellule leucemiche alla diagnosi sono centralizzate presso un laboratorio dedicato (presso il nostro centro) e vengono caratterizzate. In 24 ore, sono a disposizione i risultati dell'immunofenotipo che è caratteristico nelle LAL BCR/ABL+ (CD10/ CD19/CD34/TdT+, CD38+ eterogeneo, CD66c+) e, soprattutto, della biologia molecolare eseguita con metodica di PCR qualitativa che mostra il trascritto e lo caratterizza nelle due forme p190, la più frequente, e p210. A questo punto, si procederà allo studio della sequenza e delle sue eventuali mutazioni. E' assai importante escludere la presenza delle mutazioni 315 e 317 che rendono la malattia resistente al farmaco specifico Imatinib.

Nell'utilizzazione dello strumento, una priorità importante è costituita dallo studio del gene p53. I pazienti con LLC che richiedono un trattamento sono inseriti in un protocollo di studio GIMEMA che stima un reclutamento di circa 80 pazienti ogni anno. La definizione di alto/basso rischio comporta una scelta terapeutica differente. Entro un mese dal momento della indicazione alla terapia il trattamento deve essere cominciato. Il peso della delezione del cromosoma 17, così pure della mutazione di p53, ha valore come parametro singolo.

Nei pazienti affetti da LAM, la mutazione del gene NPM ha valore prognostico ma soprattutto riesce a caratterizzare la cellula leucemica. In considerazione del fatto che nei pazienti con LAM circa il 60% della leucemie senza alterazioni molecolari presenta la mutazione di questo gene, lo studio di esso non ha certo un valore marginale. Al momento della diagnosi le cellule leucemiche vengono caratterizzate molecolarmente; quelle in cui non si osservano i trascritti t(15;17), t(8;21), inv 16 verranno sequenziate per il gene NPM sia nei pazienti anziani, che negli adulti che nei bambini con una previsione di circa 100 pazienti/anno. L'individuazione della sequenza permetterà il disegno di primers specifici che consentiranno l'analisi e la quantificazione con metodiche di PCR quantitativa della MMR.

Nei pazienti affetti da differenti patologie ematologiche quali leucemie acute, leucemie croniche e linfomi, di età adulta e pediatrica che sono stati sottoposti ad un trapianto di cellule staminali allogeniche o di cordone ombelicale, sarà monitorato l'attecchimento delle cellule del donatore. Gli studi di biologia molecolare volti ad identificare le sequenze VNTR e STR saranno eseguiti su sangue midollare. nei casi in cui non sia possibile ottenere e quantificare risposte attendibili per la promiscuità dovuta alla possibile contemporanea presenza di cellule del ricevente e del donatore, si procederà alla valutazione con metodica D-HPLC. In particolare, sarà molto interessante l'analisi dei casi dove vengono utilizzate più unità cordonali. Questo studio ha per il momento un valore solo speculativo quindi l'utilizzazione dell'attrezzatura sarà correlata alla sua disponibilità.

6. Parere del Dipartimento del responsabile

Data delibera: 19/04/2007 *Parere:* POSITIVO

Firma

Data 10/05/2007 00:10