

A. PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI PER LA CARATTERIZZAZIONE E PURIFICAZIONE DI CELLULE STAMINALI UMANE. B. STUDIO DELLA DIFFERENZIAZIONE MEGACARIOCITARIA E PIASTRINICA IN VITRO A PARTIRE DA CELLULE CD34⁺ PURIFICATE DAL SANGUE PERIFERICO DI DONATORI ADULTI SANI

Marco Vitale¹ e Giorgio Zauli²

¹ Sezione di Anatomia umana, Dipartimento di Scienze biomediche e biotecnologiche, Brescia; ² Sezione di Anatomia umana, Dipartimento di Embriologia e morfologia, Ferrara

In un primo gruppo di esperimenti, è stato prodotto e caratterizzato un nuovo anticorpo monoclonale della classe IgM (B203.13), il quale reagisce specificamente con una sottopopolazione (8-18%) di progenitori emopoietici CD34⁺ umani. Saggi di colture a lungo (LTC-IC) e breve (BFU-E, CFU-GM, CFU-meg) termine su cellule CD34⁺/B203.13⁺ non hanno mostrato significative differenze rispetto alla sottopopolazione CD34⁺/B203.13⁺. Viceversa, cellule CD34⁺/B203.13⁺ sono risultate particolarmente arricchite in progenitori megacariocitari (3). L'espressione dell'antigene B203.13 è progressivamente persa nel corso della maturazione megacariocitaria e piastrinica. Analogamente, l'espressione di B203.13 viene rapidamente persa in precursori della linea mieloide e T linfoidi, mentre persiste sugli elementi linfoidi B in via di maturazione. La selettività dell'anticorpo anti-B203.13 è stata sfruttata al fine di arricchire una sottopopolazione di progenitori emopoietici (CD34⁺/B203.13⁺) contenenti la maggior parte dei progenitori megacariocitari. Cellule CD34⁺/B203.13⁺ sono state indotte a maturare lungo la filiera megacariocitaro-piastrinica, aggiungendo in coltura liquida combinazioni ottimali di citochine ad ampio spettro (50 ng/ml di stem cell factor + 1 ng/ml di interleuchina 3) per tre giorni seguite da alte dosi di trombopoietina (100 ng/ml) per dieci-quindici giorni.

La ricostituzione piastrinica che fa seguito a chemioterapia mielosoppressiva e/o trapianto di cellule staminali in pazienti affetti da tumori solidi o da disordini neoplastici di origine emopoietica è spesso incompleta o ritardata, richiedendo un supporto trasfusionale, che invariabilmente implica rischi di natura infettiva ed immunologica oltre che alti costi finanziari. Sebbene la conoscenza dei meccanismi patogenetici di tali piastrinopenie sia ancora largamente incompleta e lacunosa, studi condotti sulla cinetica piastrinica hanno chiaramente mostrato che le piastrine autologhe hanno una ridotta sopravvivenza in pazienti che hanno subito trapianto di cellule staminali emopoietiche. Inoltre, analisi di biopsie midollari hanno consentito di dimostrare che i megacariociti non sono solo ridotti di numero, ma spesso sono anche distrofici. Ciò suggerisce che

l'incapacità delle cellule staminali emopoietiche a differenziare lungo la filiera megariocitaria possa contribuire alla patogenesi della trombocitopenia in tali pazienti.

Lo studio *in vitro* dei megacariociti e delle piastrine è stato a lungo reso difficoltoso dalla bassa frequenza di megacariociti in campioni midollari così come dalla mancanza di citochine specifiche in grado di indurre la maturazione lungo la filiera megacariocitario-piastrinica. La megacariocitopoiesi è caratterizzata da due fasi distinte: proliferazione e maturazione. Il compartimento proliferativo è rappresentato da progenitori megacariocitari (CFU-meg), mentre il compartimento maturativo comprende i piccoli megacarioblasti, che presentano la caratteristica unica di andare incontro ad un processo di endoreduplicazione con un incremento progressivo della ploidia nucleare da 2N a 64-128N. Il secondo evento fondamentale nel processo di maturazione megacariocitaria è rappresentato da modificazioni a carico del citoplasma: un marcato incremento in volume, lo sviluppo del sistema di demarcazione delle membrane, la formazione degli α -granuli intracellulari ed, in ultimo, la formazione ed il rilascio di piastrine funzionalmente attive.

Nel corso di alcune ricerche condotte nell'ambito del I° Progetto Sangue dell'ISS, sono state d'apprima ottimizzate le condizioni di coltura, mettendo a punto un terreno liquido serum-free specifico per lo sviluppo megacariocitario, che consente di ottenere una differenziazione uniforme delle cellule CD34⁺ in direzione megacariocitario-piastrinica in presenza di alte concentrazioni di trombopoietina (7, 8). In particolare, è stato studiato l'effetto della trombopoietina sull'attività funzionale dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ in precursori megacariocitari, ottenuti da popolazioni CD34⁺ umane. Si è dimostrato che TPO induce un incremento di adesione dei precursori megacariocitari sia al fibrinogeno che alla fibronectina, accompagnato ad un incremento dell'immunoreattività per l'anticorpo PAC1. Inoltre, appare evidente che PI 3-chinasi giochi un ruolo regolatorio essenziale nel cambiamento conformazionale di $\alpha_{IIb}\beta_3$, che media l'incrementata adesività al fibrinogeno (7).

L'allestimento della metodica di coltura in fase liquida serum-free ha consentito di valutare pienamente anche la fase finale del differenziamento megacariocitario, che conduce alla formazione di piastrine a partire da cellule CD34⁺ umane. Il picco del rilascio piastrinico è stato osservato ai giorni 18-21, quando una alta percentuale (>50%) dei megacariociti erano apoptotici (8). Un simile fenomeno è stato osservato quando megacariociti primari $\alpha_{IIb}\beta_3^+$, sono stati posti in coltura liquida serum-free. L'aggiunta di TPO, ma non di eritropoietina e IL-3 ha mostrato un certo grado di protezione dall'apoptosi. Va anche rilevato che la morfologia e la funzionalità delle piastrine rilasciate *in vitro* dai megacariociti differenziati a partire dalle cellule CD34⁺ è stata esaminata dopo aver concentrato le piastrine tramite gel filtrazione su colonne Sepharose 2B, utilizzando un tampone di eluizione specifico. Dopo una conta eseguita al microscopio a luce, la taglia piastrinica è stata analizzata per mezzo di un conta-cellule elettronico (Sysmex, Chicago, IL). Le taglia della piastrine differenziate *in vitro* è risultata indistinguibile rispetto a quella delle piastrine differenziate *in vivo*. Inoltre, le

pastrine ottenute in vitro hanno mostrato una ottima funzionalità in test di adesione e aggregazione.

Va sottolineato che, in considerazione dell'alta frequenza di piastrinopenie in pazienti affetti da disordini neoplastici, l'espansione funzionale *in vitro* di megacariociti e piastrine potrà aprire nuove e interessanti prospettive trasfusionali in questi pazienti. L'espansione numerica di progenitori megacariocitari permetterà di allestire studi biochimici, che sono attualmente impossibilitati dalla bassa espansione numerica ottenibile con le tecnologie correnti. Inoltre, poiché l'anticorpo B203.13 reagisce specificamente con i B linfociti in via di maturazione così come con varie linee linfoblastoidi B (Daudi, CESS, HBL-1, MV4;11), sarà interessante valutare l'espressione dell'antigene B203.13 in leucemie e linfomi ottenuti da pazienti con un follow-up sufficiente. Tale indagine dovrebbe contribuire a chiarire un eventuale significato diagnostico/prognostico del pattern di reattività all'anticorpo B203.13.

Bibliografia

1. RODELLA L., REZZANI R., ZAULI G., MARIANI A.R., RIZZOLI R., VITALE M.: Apoptosis induced by natural killer cells is modulated by the NK active cytokines IL-2 and IL-12. *International Immunology*, 1998, in press.
2. VITALE M., ZAMAI L., FALCIERI E., ZAULI G., GOBBI P., SANTI S., CINTI C., WEBER G.: IMP dehydrogenase inhibitor, tiazofurin, induces apoptosis in K562 human erythroleukemia cells. *Cytometry*, 1997, 30: 61-66.
3. VITALE M., ZAULI G., BASSINI A., VISANI G., REZZANI R., and MANZOLI F.A.: Selective enrichment in human megakaryocyte progenitors by the B203.13 surface differentiation antigen. *British Journal of Haematology*, 1997, 99:766-769.
4. VITALE M., REZZANI R., RODELLA L., ZAULI G., GRIGOLATO P., CADEI M., HICKLIN D.J., and FERRONE S.: HLA Class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down regulation in high grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Research*, 1998, 58: 737-742.
5. ZAMAI L., FALCIERI E., GOBBI P., SANTI S., FALCONI M., MARHEFKA G., and VITALE M.: Anti-BrdU labeling of newly synthesized DNA in HL-60 cells triggered to apoptosis. *Cytometry*, 1996, 25: 324-332.
6. ZAMAI L., MARIANI A.R., ZAULI G., RODELLA L., REZZANI R., GOBBI P., MANZOLI F.A., and VITALE M.: Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry. *Cytometry*, 1998, in press.
7. ZAULI G., BASSINI A., VITALE M., GIBELLINI D., CELEGHINI C., CARAMELLI E., PIERPAOLI S., GUIDOTTI L. and CAPITANI S.: Thrombopoietin enhances the $\alpha_{1b}\beta_3$ -dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase. *Blood* 1997a, 89: 883-895.
8. ZAULI G., VITALE M., FALCIERI E., GIBELLINI D., BASSINI A., CELEGHINI C., COLUMBARO M. and CAPITANI S.: *In vitro* senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997b, 90: 2234-2243.

PRODUZIONE SU LARGA SCALA DI PROGENITORI E DI CELLULE EMATOPOIETICHE UMANE IN VITRO

M. Sanchez, E. Alfani, G. Visconti, A. R. Migliaccio e G. Migliaccio

Laboratorio di Biologia cellulare, Istituto Superiore di sanità, Roma

Introduzione

La produzione di cellule ematopoietiche mature in vivo dipende dall'interazione di una cellula staminale o di progenitori ematopoietici primitivi con una serie di fattori di crescita, molecole d'adesione e componenti della matrice extra-cellulare forniti dalle cellule accessorie e stromali ⁽¹⁾. È teoricamente possibile ottenere una produzione ex-vivo a lungo termine di cellule ematopoietiche da un piccolo numero di cellule staminali purificate ⁽²⁾. Cellule e progenitori ottenuti da cellule purificate mediante espansione in vitro sono in corso di sperimentazione clinica come terapia di supporto del trapianto di midollo osseo allo scopo di abbreviare i tempi di recupero delle funzioni ematopoietiche e quindi di ridurre i rischi di infezioni opportunistiche ⁽²⁾.

Il sangue placentare/cordonale è una sorgente alternativa di cellule staminali il cui uso è in rapida espansione ⁽³⁾. La bassa reazione immunitaria verso i tessuti del ricevente ha permesso di effettuare trapianti anche in presenza di forti differenze negli antigeni di istocompatibilità allargando il numero dei possibili riceventi ⁽³⁾. Tuttavia il sangue cordonale ha dimostrato anche una ridotta capacità di rimozione delle cellule tumorali del ricevente da parte delle cellule linfocitarie del donatore.

La possibilità di manipolare la risposta immunitaria di cellule mature o di progenitori verso antigeni virali o tumorali è alla base delle terapie immunitarie e cellulari dei tumori. Cellule linfocitarie mature sono esposte ad antigeni tumorali o virali per isolare cloni con attività citotossica ⁽⁴⁾. Cloni citotossici contro antigeni tumorali sono talvolta presenti ma inibiti in vivo. L'esposizione in vitro ad antigeni specifici tumorali o virali permette di attivarli, amplificarli e quindi reinfonderli al fine di effettuare una azione citotossica specifica contro le cellule tumorali ^(5, 6). Tuttavia, in assenza di cloni citotossici preesistenti, questo approccio terapeutico risulta inefficace. Le cellule T si formano nel timo attraverso un processo di differenziamento / selezione da progenitori multipotenti CD34⁺. Il timo tende ad atrofizzarsi con l'età anche se la sua funzionalità è essenziale per la formazione di cellule T CD4⁺ helper native ⁽⁷⁾. L'assenza o la riduzione di quest'ultime è stata legata all'insorgenza di malattie autoimmuni o alla aumentata disponibilità alle infezioni ⁽⁸⁾.

Cellule T ottenute da progenitori multipotenti in vitro potrebbero essere utilizzate sia nella terapia di sostegno dopo trapianto di midollo osseo che nelle immunoterapie midollari.

Amplificazione ex-vivo di cellule T-linfocitarie da sangue cordonale

Cellule mononucleate ottenute da sangue cordonale sono state coltivate in un terreno senza siero supplementato con varie combinazioni di fattori di crescita. Stem Cell Factor (SCF), Interleukin-7 (IL-7) ed Interleukin-4 (IL-4) sono prodotti nel timo e sono necessari per la formazione di cellule T mature ⁽⁹⁾. In terreni privi di siero solo la combinazione di due o più fattori di crescita induce la proliferazione cellulare in vitro, mentre l'aggiunta di singoli fattori di crescita permette al massimo la sopravvivenza cellulare. SCF, (10 ng/ml) ed Interleukin-3 (IL-3, 10 ng/ml) in combinazione inducono proliferazione cellulare e dopo 10 giorni il numero di cellule e di progenitori è aumentato rispettivamente di $3,6 \pm 2,1$ e $5,5 \pm 2,0$ volte (tab.1). L'analisi del fenotipo indica che più del 99% delle cellule ottenute sono CD33⁺ e quindi mieloidi. Questi dati confermano quelli precedentemente ottenuti da colture di cellule purificate CD34⁺ ^(10, 11, 12).

Tabella 1. - Progenitori e cellule totali dopo 10 giorni di coltura in terreno senza siero.

fattori di crescita	progenitori*	cellule totali*
SCF+IL-3	5.5 ± 2.0	3.6 ± 2.1
SCF+IL-7	8.7 ± 1.5	6.4 ± 1.2
SCF+IL-4	10.2 ± 2.1	1.9 ± 0.2
SCF+IL-7+IL-2	11.6 ± 3.2	7.4 ± 2.3
SCF+IL-4+IL-2	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.3

*Incremento rispetto ai valori iniziali. (media \pm deviazione standard).

SCF ed IL-7, (10 ng/ml) inducono un aumento della proliferazione cellulare rispetto alla combinazione precedente ($6,4 \pm 1,2$), unitamente ad un ulteriore aumento del numero di progenitori mieloidi presenti nelle colture ($8,7 \pm 1,5$). Questo risultato è in contrasto con quanto ottenuto in colture di cellule CD34⁺ purificate. La presenza di cellule accessorie altera la risposta ai fattori di crescita implicando che la combinazione di fattori più efficace deve essere identificata anche in funzione della popolazione cellulare che si intende usare in vitro.

La coltura con SCF+IL7 induce un aumento di circa tre volte del numero complessivo di cellule linfoidi. Mentre il numero di cellule B-linfocitarie diminuisce riducendosi a circa un quinto della popolazione originaria, quello di CD4 (helper) aumenta di circa 5 volte e quello di CD8 (citotossici) di circa tre volte.

L'aggiunta di Interleukin-2 (IL-2, 100 U/ml) alle colture contenenti SCF ed IL-7 non comporta un ulteriore aumento del numero di cellule nucleate ($7,4 \pm 2,3$) ma incrementa ulteriormente il numero di progenitori mieloidi ($11,6 \pm 3,2$). Il numero complessivo di cellule linfoidi aumenta salendo di circa 4 volte rispetto all'inizio della coltura. Tuttavia,

tutto l'incremento deriva da un aumento di 6 volte del numero di cellule CD8⁺ mentre il numero di cellule B linfoidi (CD19⁺) e di cellule CD4⁺ rimane invariato.

SCF ed IL-4 in combinazione inducono una scarsa proliferazione cellulare (1,9±0,2) ma un cospicuo aumento del numero di progenitori mieloidi (10,2±2,1). L'aggiunta di IL-2 inibisce sia la produzione di cellule mature che di progenitori.

Derivazione da progenitori multipotenti delle cellule T in coltura

L'incremento del numero di cellule T in coltura può derivare sia da cellule mature attivate che dalla differenziazione di progenitori multipotenti o linfoidi. RAG-1, RAG-2 e pTα sono geni specifici del differenziamento linfoide, espressi nel timo allo stadio di timociti CD4 e CD8 doppio positivi e non in cellule mature⁽¹³⁾. I trascritti di RAG-1, RAG-2 e pTα sono rilevabili mediante RT-PCR solo dopo 10 g di coltura.

Durante il differenziamento T linfocitario i geni codificanti le subunità α e β del TCR subiscono un riarrangiamento nelle sezioni variabili. Ogni clone di cellule mature esprime un riarrangiamento caratteristico. È quindi possibile analizzare i singoli cloni e la loro abbondanza relativa in vitro mediante RT-PCR della regione variabile Vβ della subunità β del T-Cell Receptor (TCR)⁽¹⁴⁾. L'analisi dei riarrangiamenti permette di dimostrare che in vitro avviene una produzione ma anche una estinzione clonale di cellule T derivanti da progenitori indifferenziati.

Cellule CD34⁺ fetali, neonatali ed adulte sono in grado di differenziare in cellule T sia in vitro che in vivo^(15, 16, 17, 18). È tuttavia strettamente necessaria la presenza di cellule accessorie, di origine endoteliale, presenti sia nel timo fetale che adulto. Questa interazione cellulare richiede contatto diretto^(13, 19), ma non è specie-specifica in quanto frammenti di timo di origine murina sono in grado di supportare il differenziamento di cellule purificate CD34⁺ umane⁽¹⁵⁾.

Cellule CD34⁺ purificate da sangue cordonale, coltivate in vitro con SCF+IL-7 danno origine ad un numero di progenitori e di cellule nucleate molto più basso rispetto a colture analoghe stimolate con SCF+IL-3. In entrambi i casi le cellule hanno un fenotipo preponderante CD33⁺. Vi sono due possibili interpretazioni di questo risultato che comportano la presenza nella frazione mononucleare del sangue cordonale alternativamente di a) cellule progenitrici linfoidi CD34⁻ oppure b) di cellule accessorie necessarie per il differenziamento linfoide dei progenitori CD34⁺.

Coculture di cellule purificate CD34⁺ con cellule mononucleate autologhe irradiate, danno origine ad una popolazione cellulare con un fenotipo principalmente CD33⁺ (>97%) ma anche ad una popolazione con un fenotipo T, CD4 o CD8 singoli positivi, CD45RA⁺, TCRαβ⁺ con basso side e forward scatter.

L'analisi dell'espressione dei geni specifici RAG-1, RAG-2 e pTα conferma che in queste condizioni avviene una differenziazione linfocitaria. L'analisi dei riarrangiamenti del TCR mostra un alto numero di nuovi cloni. Cellule CD4 o CD8 positive mature da sangue cordonale non proliferano in terreno senza siero supplementato con SCF+IL-7

ed il numero di riarrangiamenti della subunità TCR β tende a diminuire con il progredire delle colture. Le cellule mononucleate irradiate non sopravvivono fino alla fine dei 20 giorni di coltura.

Conclusioni

Questi dati dimostrano che le cellule mononucleate del sangue cordonale contengono una popolazione cellulare che è in grado di supportare il differenziamento T linfoide di cellule CD34⁺ in vitro. Le cellule T prodotte in vitro sono native e il fenotipo risultante (CD4 o CD8) può essere modulato mediante l'aggiunta di IL-2. Questo risultato unitamente alla larga disponibilità di sangue cordonale apre la strada a una varietà di applicazioni che vanno dalla preparazione in vitro di cloni citotossici contro antigeni tumorali alla possibilità di ottenere cellule CD4 helper da utilizzare in terapie di mantenimento in soggetti immunodepressi o per accelerare il recupero delle funzionalità immunitarie dopo trapianto.

Bibliografia

1. SPYRIDONIDIS A. *et al.*: Hematopoietic cell proliferation and differentiation. *Current Opinion in Hematology* 1996, 3 (4):321-328.
2. EMERSON S.G.: Ex-vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapies. *Blood* 1996, 87 :3082-3088.
3. CAIRO M.S. *et al.*: Placental and/or Umbilical Cord Blood: An alternative source of Hematopoietic Stem Cells for transplantation. *Blood* 1997, 90 (12):4665-4678.
4. CHANG A.E. *et al.*: Current status of adoptive immunotherapy of cancer. *Critical Review in Oncology Hematology* 1996, 22 (3):213-228.
5. YEE G.C.: The future of cell therapy. *Pharmacotherapy* 1996, 16 (3 Pt 2):109S-115S.
6. CARDOSO A.A. *et al.*: Ex vivo generation of human anti-pre-B leukemia-specific autologous cytolytic T cells. *Blood* 1997, 90 (2):549-561.
7. HEITGER A. *et al.*: Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA⁺) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997, 90 (2):850-857.
8. TANCHOT C. *et al.*: Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *Journal of Experimental Medicine* 1997, 186 (7):1099-1106.
9. FEHLING H.J. *et al.*: Early $\alpha\beta$ T cells development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Current Opinion in Immunology* 1997, 9 :263-275.
10. MIGLIACCIO G. *et al.*: Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34⁺ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. *Blood* 1992, 79 (10):2620-2627.
11. VAN DE VEN C. *et al.*: IL-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34⁺ cell population from cord blood vs adult bone marrow. *Experimental Hematology* 1995, 23 :1289-1295.
12. WILLIAMS S.F. *et al.*: Selection and expansion of peripheral blood CD34(+) cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 1996, 87 :1687-1691.

13. ANDERSON G. *et al.*: Cellular interactions in thymocyte development. *Annual Review of Immunology* 1996, 14 :73-99.
14. CHOI Y. *et al.*: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1989, 86 :8941-8945.
15. YEOMAN H. *et al.*: Human bone marrow and umbilical cord blood cells generate CD4+ and CD8+ single-positive T cells in murine fetal thymus organ culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993, 90 :10778-10782.
16. BARCENA A. *et al.*: Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+ lineage- cells in human thymic organ culture. *Journal of Experimental Medicine* 1994, 180 :123-132.
17. PLUM J. *et al.*: Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate to T cells in a mouse thymic microenvironment. *Blood* 1994, 84 :1587-1593.
18. RES P. *et al.*: CD34+CD38^{dim} cells in the human thymus can differentiate into T, Natural Killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996, 87 :5196-5206.
19. TAGOH H. *et al.*: Induction of recombination activating gene expression in a human lymphoid progenitor cell line: requirement of two separate signals from stromal cells and cytokines. *Blood* 1996, 88 (12):4463-4473.

(I) PURIFICAZIONE, CARATTERIZZAZIONE ED AMPLIFICAZIONE IN VITRO DI CELLULE STAMINALI DI SANGUE PERIFERICO ADULTO E SANGUE CORDONALE. (II) ESPANSIONE E DIFFERENZIAZIONE MONOLINEA (ERITROIDE, MEGACARIOCITICA, GRANULOCITICA, MONOCITICA) IN CULTURA DI PROGENITORI PURIFICATI

Mauro Valtieri, Marco Gabbianelli, Elisabetta Montesoro, Elvira Pelosi, Paola Samoggia, Ugo Testa, Cesare Peschle

Laboratorio di Ematologia ed oncologia, Istituto Superiore di sanità, Roma

Introduzione

Le cellule staminali ematopoietiche possiedono tre importanti proprietà: (a) elevata capacità di auto-mantenimento; (b) largo potenziale differenziativo e (c) prolungato mantenimento nella fase G_0 - G_1 del ciclo cellulare (1). Queste caratteristiche si stemperano gradualmente nei progenitori ematopoietici differenzianti (2). Dopo induzione della proliferazione, le cellule staminali ed i progenitori primitivi vanno incontro a divisioni simmetriche (totale identità delle due cellule: automantenimento) oppure asimmetriche (progressiva deviazione del fenotipo iniziale: differenziamento) (3). La differenziazione ematopoietica è stata interpretata secondo il modello stocastico (4), il modello induttivo (5) o quello ibrido (6). Secondo l'ipotesi stocastica, eventi molecolari intrinseci preprogrammati (ad una frequenza fissa) danno origine al differenziamento, mentre i fattori ematopoietici permettono la sopravvivenza e la proliferazione di cellule già programmate. Secondo il modello induttivo, i fattori di crescita associati a meccanismi regolatori ambientali cellulo-mediati modulano il differenziamento cellulare. In via alternativa l'ipotesi ibrida prevede che gli eventi stocastici prevalgano negli stadi precoci dello sviluppo, mentre gli eventi deterministici abbiano un ruolo chiave nella vita adulta, dove è richiesta un'omeostasi puntuale in numerosi eventi di stress ematopoietico. A tal proposito i progenitori ematopoietici esprimono i recettori dei fattori di crescita multipotenti (IL-3 e GM-CSF) ma non dei fattori di crescita oligo o unipotenti (Epo, Tpo, G-CSF, M-CSF) (7). L'espressione di questi recettori per fattori di crescita tardivi è associata con la progressiva maturazione cellulare lungo linee differenziative mutualmente esclusive; ad esempio il recettore per Epo aumenta nei proeritroblasti e diminuisce nei mieloblasti (7). Inoltre, l'interazione del fattore di crescita alto con il proprio recettore stimola l'espressione del recettore per il fattore ematopoietico distale (8). A prescindere dal modello proposto e dagli eventi causali del differenziamento è generalmente accettato che la decisione differenziativa della cellula ematopoietica sia associata all'attivazione di un programma genetico specifico mediato da una rete di fattori trascrizionali che orchestrano i programmi genetici a livello trascrizionale (9-11).

L'enorme quantità di conoscenze accumulate recentemente sui meccanismi molecolari dell'ematopoiesi è stata basata su modelli cellulari patologici (linee cellulari leucemiche) o parafisiologici (linee immortalizzate di progenitori murini dipendenti da fattori di crescita) oppure su animali transgenici dove la distruzione di geni selezionati ha generato fenotipi che ne hanno definito la funzione (9-12). Tuttavia questi studi presentano alcune limitazioni nel caso di ridondanza genica, interferenza della distruzione genica selettiva sui geni adiacenti, effetti letali durante l'ontogenesi, mancanza di specificità tessutale e differenze specie-specifiche (11).

Gli studi molecolari sull'ematopoiesi normale sono stati invalidati dalla scarsità di tessuto disponibile e dalla rarità di cellule staminali e progenitori ematopoietici. Il nostro contributo in tal senso è stato la purificazione di questi elementi cellulari dal sangue periferico adulto, associata ad elevato recupero e la messa a punto di sistemi differenziativi omogenei unilinea (13-20). In questi sistemi le cellule staminali e progenitrici vengono indotte a graduale differenziamento e maturazione lungo linee ematopoietiche specifiche, fornendo così lo strumento per valutare l'espressione e la funzione di geni regolatori durante l'ematopoiesi.

Materiali e metodi

Purificazione di progenitori e cellule staminali ematopoietiche (13-20). - Il sangue periferico adulto è stato ottenuto da donatori maschi consenzienti di 20-40 anni. Il sangue è stato separato mediante il gradiente di densità Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml). Le cellule mononucleate raccolte sono state lavate, risospese in IMDM 20% FCS e trattate con tre cicli di aderenza su plastica. Le cellule sono state quindi sottoposte ad un'ulteriore separazione per gradiente di densità discontinuo, mediante Percoll, e le frazioni corrispondenti a densità di 1.052 e 1.056 g/ml. Sono state raccolte, lavate estensivamente, e quindi trattate con una miscela di anticorpi monoclonali anti-linfociti T, B, NK, monociti e granulociti (gli anticorpi anti CD-71, CD-45, CD11a sono stati anche inclusi). Sono quindi state aggiunte microsferi metalliche coperte da anticorpi anti IgG di topo (delle differenti sottoclassi) e anti IgM (Dynabeads M450) alla concentrazione di 4 microsferi per cellula e dopo opportuna incubazione le cellule positive sono state separate dalle negative mediante magnete. Altre microsferi, coperte da anticorpi purificati per affinità anti IgG1 (specifiche per Fc; Dynabeads 110.4), sono state aggiunte alla concentrazione di 10/cellula e di nuovo separate in campo magnetico. Il sangue cordonale è stato separato con la medesima metodologia con l'aggiunta dell'anticorpo anti-glycophorin-A allo scopo di eliminare l'eccesso di eritroblasti presenti in questo tessuto (21-23).

Coltura liquida dei progenitori e cellule staminali ematopoietiche. - 5×10^4 cellule staminali e progenitrici/ml sono state coltivate in IMDM FCS⁺ contenente BSA (10 mg/ml), transferrina umana saturata con ferro [500 µg/ml LDL umane (40 µg/ml),

insulina (10 µg/ml), nucleosidi (10 µg/ml di ciascuno)] e supplementato con differenti combinazioni di fattori di crescita; nella coltura eritroide IL-3 (0.01/ml), GM-CSF (0.001 ng/ml) Epo (3 U/ml). Nella coltura granulocitopoietica IL-3 (1 U/ml) GM-CSF (0.1 ng/ml), G-CSF (500 U/ml). Nella coltura megacariocitopoietica TPO (100 mg/ml). Nella coltura monocitopoietica, dove la presenza di FCS (40%) si è rivelata indispensabile, ligando di FLT3 (100 ng/ml) e M-CSF (500 U/ml).

Immunofluorescenza. - Le cellule in coltura liquida sono state contate ogni due giorni, diluite per non superare la concentrazione di 2.5×10^5 /ml e prelevate per analisi morfologica ed immunofluorescenza per fattori trascrizionali. Le cellule sono state citocentrifugate, fissate con metanolo per 5 minuti a 37°C, con acetone per 2 minuti a -10°C ed incubate con opportune diluizioni di anticorpi anti GATA-2, GATA-1, NF-E2, Tal-1, Lmo2 per 30 minuti a 4°C.

Dopo lavaggio, è stato aggiunto l'anticorpo secondario marcato con FITC per 30 minuti a 4°C. Dopo ulteriore lavaggio le cellule sono state osservate al microscopio con lampada UV per fluorescenza.

Risultati e discussione

La procedura di purificazione descritta permette di isolare una popolazione di cellule che esprimono il CD34 al 90-95% e soprattutto generano colonie in percentuale simile. Le colonie si sviluppano tutte fra il giorno 12 e 17 di coltura in mezzo semisolido e sono di grandi dimensioni. Il recupero dei progenitori è di circa il 70% del numero inizialmente presente nel sangue non trattato. La coltura liquida eritroide (E) è caratterizzata da una crescita di circa tre logaritmi del numero di cellule iniziali nell'arco di 17 giorni. Durante la prima settimana si osserva un progressivo calo di espressione di CD34 consensuale al decremento di blasti, mentre aumenta il numero assoluto di cellule clonogeniche che progressivamente differenziano da progenitori a precursori, come si evince dalla caduta delle dimensioni delle colonie da esse generate. Durante la seconda settimana cominciano a maturare progressivamente le cellule terminali con aumento progressivo dall'espressione di glicoforina-A e la comparsa di tutti gli elementi eritroblastici maturanti riconoscibili morfologicamente. Al termine della coltura oltre il 95% delle cellule è glicoforina A positiva e questi eritroblasti sono in grande maggioranza ortocromatici con alcuni policromatofili.

La coltura granulocitopoietica (G) è caratterizzata da una amplificazione cellulare di circa due logaritmi in relazione alla più scarsa capacità proliferativa della linea granulocitopoietica rispetto a quella eritroide.

Nuovamente, durante la prima settimana, si assiste ad un progressivo decremento delle cellule CD34⁺ e dei blasti, i quali, durante la seconda settimana maturano progressivamente acquisendo l'espressione di CD15 e la morfologia granulocitaria neutrofila.

La coltura megacariocitopoietica (MK) è caratterizzata da una crescita numerica globale piuttosto ridotta (circa 5 volte) con una maturazione completa a megacariociti con più di 20 nuclei in 12 giorni.

Infine la coltura monocitopoietica (M), con una crescita di circa 50 volte, è associata al consueto calo di cellule CD34⁺ durante la prima settimana ed al progressivo aumento di monociti maturi CD14⁺ e CD11b⁺ durante la seconda settimana di coltura.

La espressione di fattori trascrizionali eritroidi, come GATA-1, NF-E2, tal-1 e Lmo2 risulta elevata durante tutto l'arco maturativo della coltura E ed Mk mentre risulta soppressa, con differenze minori, nella coltura G ed M. In particolare, mentre GATA-1 ed NF-E2 sono virtualmente poco espressi o assenti nell'arco di tutto il differenziamento G ed M, tal-1 ed Lmo2 risultano espressi durante la prima settimana e soppressi successivamente sia nella coltura G ed M.

GATA-2 al contrario, risulta espresso e mantenuto nella prima settimana della coltura E, G ed Mk con progressivo successivo decremento, mentre cala precocemente nella coltura M.

Il precoce ruolo funzionale di GATA-2 è indicato dai gravi difetti ematopoietici nei topi GATA-2 (24) così come dalla inibizione della formazione di tutti i tipi di colonie dopo trattamento con oligomeri antisenso per mRNA di GATA-2 (15). Il ruolo di tal-1 e GATA-1 come fattori trascrizionali specifici per la differenziazione eritroide è stato osservato mediante trattamento con oligomeri antisenso (15-17) ed anche in modelli animali dopo knock-out (25-26).

I sistemi di coltura monolinea rappresentano quindi un importante strumento per lo studio degli eventi trascrizionali che sottendono l'ematopoiesi.

Bibliografia

1. MULLER-SIENBURG C., TOROK-STORB B., VISSER J., STORB E.: Hematopoietic stem cells. Heidelberg, Springer, 1992.
2. OGAWA M.: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, 81,284-2853.
3. Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R., Mochan, B. The cell cycle, cell lineages and cell differentiation. *Curr. Topics Dev. Biol.* 1972, 7: 229-256.
4. TILL J.E., MCCULLOCH E.A., SIMINOVITCH L.: A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1964, 51: 29-??
5. CURRY J.L., TRENTIN J.J.: Haemopoietic spleen colony-stimulating factors. *Science* 1967, 236: 1229-??.
6. JUST U., STOCKING C., SPOONER E., DEXTER T.M., OSTERTAG W.: Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 1991, 64: 1163-1173.
7. TESTA U., FOSSATI C., SAMOGGIA P., MASCIULLI R., MARIANI G., HASSAN H.J., SPOSI N.M., GUERRIERO R., ROSATO V., GABBIANELLI M., PELOSI E., VALTIERI M., PESCHLE C.: Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood* 1996, 88: 3391-3406.
8. TESTA U., PELOSI E., GABBIANELLI M., FOSSATI C., CAMPISI S., ISACCHI G., PESCHLE C.: Cascade transactivation of growth factor receptors in early human hematopoiesis. *Blood* 1993, 81: 1442-1456.

9. ORKIN S.H.: Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 4955-4958.
10. KEHRL J.H.: Hematopoietic lineage commitment: role of transcription factors. *Stem Cells* 1995, 13: 223-241.
11. SHIVDASANI R.A., ORKIN S.H.: The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996, 87: 4025-4039.
12. GREENBERGER J.S., SAKAKEENY M.A., HUMPRIS R.K., EAVES C.J., ECKNER R.J.: Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, 80: 2931-2935.
13. LABBAYE C., VALTIERI M., TESTA U., GIAMPAOLO A., MECCIA E., STERPETTI P., PAROLINI I., PELOSI E., BULGARINI D., CAYRE Y.E., PESCHLE C.: Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA-1 expression in purified adult progenitor culture. *Blood* 1994, 83: 651-656.
14. GIAMPAOLO A., STERPETTI P., BULGARINI D., SAMOGGIA P., PELOSI E., VALTIERI M., PESCHLE C.: Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 1994, 84: 3637-3647.
15. LABBAYE C., VALTIERI M., BARBERI T., MECCIA E., MASELLA B., PELOSI E., CONDORELLI G., TESTA U., PESCHLE C.: Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2 and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J. Clin. Invest.* 1995, 95: 2346-2358.
16. CONDORELLI G.L., TESTA U., VALTIERI M., VITELLI L., DE LUCA A., BARBERI T., MONTESORO E., CAMPISI S., GIORDANO A., PESCHLE C.: Modulation of retinoblastoma gene in normal adult hematopoiesis: peak expression and functional role in advanced erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 4808-4812.
17. CONDORELLI G.L., VITELLI L., VALTIERI M., MARTA I., MONTESORO E., LULLI V., BAER R., PESCHLE C.: Coordinate expression and developmental role of Id2 protein and TAL1/E2A heterodimer in erythroid progenitor differentiation. *Blood* 1995, 86: 164-175.
18. SPOSI N.M., ZON L.I., CARÈ A., VALTIERI M., TESTA U., GABBIANELLI M., MARIANI G., BOTTERO L., MATHER C., ORKIN S.H., PESCHLE C.: Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 6353-6357.
19. GUERRIERO R., TESTA U., GABBIANELLI M., MATTIA G., MONTESORO E., MACIOCE G., PACE A., ZIEGLER B., HASSAN H.J., PESCHLE C.: Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood* 1995, 86: 3725-3736.
20. GABBIANELLI M., PELOSI E., MONTESORO E., VALTIERI M., LUCHETTI L., SAMOGGIA P., VITELLI L., BARBERI T., TESTA U., LYMAN S., PESCHLE C.: Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood* 1995, 86: 1661-1670.
21. ZIEGLER B.L., THOMA S., LAMPING C.P., VALTIERI M., MULLER R., SAMOGGIA P., BUHRING H.J., PESCHLE C., FLIEDNER T.M.: Surface antigen expression on CD34+ cord blood cells: comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution (LD) RT-PCR of chymopapain-treated or untreated cells. *Cytometry* 1996, 25: 46-57
22. ZIEGLER B.L., LAMPING C.P., THOMA S.J., FLIEDNER T.M.: Analysis of gene expression in small numbers of purified hemopoietic progenitor cells by RT-PCR. *Stem Cells* 1995, 13: 106-116.
23. ZIEGLER B.L., LAMPING C., THOMA S., THOMAS C.A., FLIEDNER T.M.: Single-cell cDNA-PCR. *Methods in Neurosciences* 1995, 26: 62-??
24. TSAI F.Y., KELLER G., KUO F.C., WEISS M., CHEN J., ROSENBLATT M., ALT F.W., ORKIN S.H.: An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994, 371: 221-226.

25. PEVNY L., SIMON M.C., ROBERTSON E., KLEIN W.H., TSAI S.F., D'AGATI V., ORKIN S.H., COSTANTINI F.: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991, 349: 257-260.
26. SHIVDASANI R.A., MAYER E.L., ORKIN S.H.: Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 1995, 373: 432-434.

SVILUPPO DI SOSTITUTI DEL SANGUE MEDIANTE MUTAGENESI SITO-SPECIFICA DELL'EMOGLOBINA UMANA

Maurizio Brunori ^{1, 2}, Carlo Travaglini Allocatelli ¹, Adriana Erica Miele ², Stefano Santanché ², Beatrice Vallone ² e Andrea Bellelli ¹

¹ *Centro di Studio sulla biologia molecolare, Centro Nazionale delle ricerche (CNR), Roma;* ² *Dipartimento di Scienze biochimiche "A. Rossi Fanelli", Università "La Sapienza", Roma*

Introduzione

I rischi connessi con la trasfusione di sangue, in particolar modo quelli inerenti alla trasmissione di malattie infettive quali l'AIDS e l'epatite virale, insieme ai problemi di insufficiente disponibilità di donatori hanno in tempi recenti stimolato la ricerca di preparati alternativi al sangue da usarsi per infusione endovenosa. In questa ottica sono state sperimentate trasfusioni di soluzioni di emoglobina; questa proteina è infatti trattenuta in circolo per un tempo relativamente lungo ed è responsabile del trasporto dell'ossigeno.

Tra le diverse strategie impiegate per realizzare questi preparati l'impiego di emoglobina umana ricombinante sintetizzata in batteri sembra offrire i più promettenti sviluppi. Infatti con l'utilizzo di metodiche di ingegneria genetica vengono superati tanto la ridotta disponibilità di sangue umano quanto la possibilità di trasmettere malattie infettive. Inoltre è importante sottolineare il fatto che la manipolazione del gene dell'emoglobina umana rende possibile la sintesi di proteine mutanti a livello di specifici aminoacidi, mediante mutagenesi sito-specifica. È pertanto possibile produrre varianti dell'emoglobina che mostrino alterazioni della funzionalità idonee ad ottimizzare il trasporto dell'ossigeno e la resistenza ai processi di autoossidazione.

Molti problemi sono connessi con l'impiego trasfusionale di emoglobina in soluzione; ad esempio la tossicità a carico di vari organi tra i quali il rene, l'elevata affinità per l'ossigeno, l'attività vasocostrittrice dell'emoglobina e l'autoossidazione. Noi abbiamo affrontato in particolare: (1) la troppo elevata affinità per l'ossigeno, a sua volta legata alla rimozione degli effettori allosterici presenti nel globulo rosso (ad es. il 2, 3 bisfosfo glicerato) e (2) l'autoossidazione, che trasforma il ferro ferroso in ferro ferrico, incapace di legare l'ossigeno, controbilanciata nel globulo rosso dall'azione dei sistemi enzimatici riducenti.

La struttura cristallografica dell'emoglobina e della più semplice mioglobina suggerisce che alcuni residui aminoacidici possono svolgere un ruolo particolare nella modulazione della reattività della proteina, a causa della prossimità e della possibile interazione specifica con il gruppo prostetico eme. Spiccano tra questi l'istidina prossimale (His F8) che fornisce l'unico legame covalente tra la proteina ed il ferro dell'eme, l'istidina

distale (His E7) che stabilizza con un legame idrogeno l'ossigeno legato al ferro, la fenilalanina CD1 universalmente invariante, la treonina E10, la valina E11 e la leucina B10.

Esperimenti di caratterizzazione biochimica condotti in precedenza nel nostro ed in altri laboratori su mutanti sito-specifici della mioglobina hanno rivelato che i mutanti dei siti E7, E10, E11 e B10 legano stabilmente l'eme e mantengono almeno in parte le proprietà funzionali della proteina nativa. In particolare, il mutante che presenta le sostituzioni tirosina B10, glutamina E7 e arginina E10 è caratterizzato da ridotta affinità per l'ossigeno e bassa velocità di autoossidazione (3). Queste alterazioni funzionali se trasferibili all'emoglobina umana hanno potenziale interesse per la sintesi di una proteina utilizzabile come sostituto del sangue; pertanto le mutazioni relative sono state introdotte nel gene dell'emoglobina e costituiscono l'oggetto della presente ricerca.

Risultati

Mutagenesi e purificazione delle emoglobine mutanti. - La disponibilità del gene sintetico per l'emoglobina umana (HbA) (Hoffmann *et al.* 1990) ha reso possibile l'ottenimento di mutanti sito-specifici con caratteristiche funzionali alterate.

La strategia utilizzata per la mutagenesi ha previsto la separazione delle catene α e β ed il loro sub-clonaggio nel vettore pUC19 (New England Biolabs); questi costrutti sono stati a loro volta sottoposti a cicli successivi di mutagenesi sito-specifica diretta da primer (U.S.E. Pharmacia). Gli oligonucleotidi utilizzati sono stati i seguenti:

- 1) α B10: 5'-GC TGA AGC GTA CGA GCG TAT GTT CC -3'
Tyr
- 2) α E7: 5'-G GTT AAA GGT CAG GGT AAA AAA GTT GCT GAT GC -3'
Gln
- 3) β B10: 5'-GGT GAA GCG TAC GGT CGT CTG CTG G -3'
Tyr
- 4) β E7: 5'-GTT AAA GCC CAG GGT AAA AAA GTT CTG GGT GC -3'
Gln

Una volta ottenuti separatamente i mutanti, le catene α e β sono state escisse dal vettore di mutagenesi e inserite nel vettore di espressione pKK223-3 (Pharmacia) in modo da avere tre costrutti diversi con i quali è stato trasformato il ceppo TB-1 di *E. coli*. Sono state così prodotte le seguenti proteine: 1) Hb α QY+ β wt; 2) Hb α wt+ β QY; 3) Hb α QY+ β QY. Alti livelli di espressione delle emoglobine ricombinanti sono stati raggiunti in fermentazioni in presenza di tracce di CO presso il Servizio Biologico I.S.S.

Caratterizzazione funzionale. - L'affinità per l'ossigeno delle emoglobine mutanti è stata determinata mediante il metodo tonometrico descritto da Rossi Fanelli & Antonini (1958). I parametri delle isoterme di ossigenazione (figura 1) sono stati calcolati mediante la equazione di Hill e sono riportati in tabella 1.

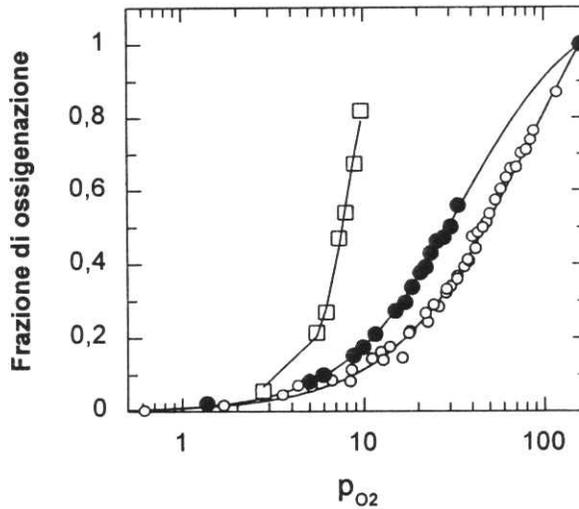


Figura 1. - Isoterme di legame con l'ossigeno.

HbA (\square), *Hb* α wt+ β QY (\bullet), *Hb* α QY+ β QY (\circ). Gli esperimenti sono stati effettuati a 20°C in tampone bis-Tris 0.1M, pH 7.0.

È evidente dai dati che i mutanti presentano una ridotta affinità per l'ossigeno in accordo con le aspettative, e una ridotta cooperatività, inaspettata per *Hb* α QY + β QY, e verosimilmente dovuta alla eterogeneità delle catene α e β mutate.

Tabella 1. - Dati funzionali dell'emoglobina umana e dei mutanti.

	n	p_{50} (mmHg)	k_{on} CO ($s^{-1}M^{-1}$)	k_{off} O ₂ (s^{-1})
HbA	2.9	7.1	1.34×10^3	30
Hb α wt+ β QY	1.4	29.6	1.01×10^5	24
Hb α QY+ β QY	1.25	49.2	3.0×10^3	16 (140*)

La cinetica di combinazione con il CO misurata con un apparato di stopped-flow (figura 2) rivela che *Hb* α wt+ β QY mantiene la stessa costante apparente di combinazione della emoglobina nativa, nonostante l'eterogeneità già osservata negli esperimenti di equilibrio con l'ossigeno. Questo apparente paradosso dipende dal fatto che la catena α nativa si combina preferenzialmente con il ligando; a questa reazione conseguono la transizione allosterica T→R ed infine la combinazione con il CO delle catene β mutate. Nel caso della *Hb* α QY + β QY entrambe le catene sono mutate ed hanno bassa affinità

per l'ossigeno; non stupisce quindi che la velocità di combinazione con il CO risulti circa 50 volte più bassa di quella dell'emoglobina nativa.

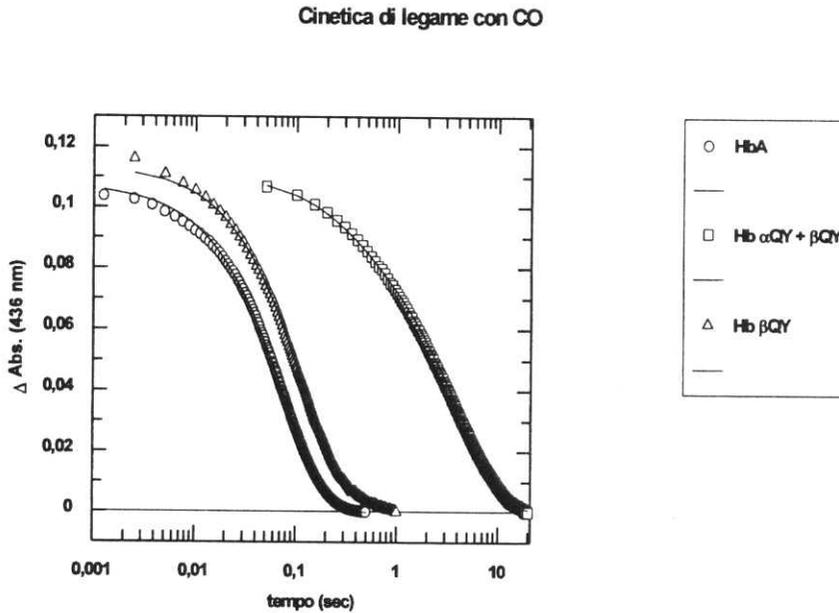


Figura 2. - *Cinetica di combinazione con il CO.*

La cinetica di dissociazione dell'ossigeno dalla proteina completamente ossigenata (figura 3) rivela in entrambe le proteine mutanti esaminate una modesta diminuzione della costante di velocità. È importante sottolineare che in questo esperimento viene esaminata prevalentemente la reazione caratteristica dello stato R dell'emoglobina; in un esperimento di oxygen pulse (1) è stata misurata anche la reazione caratteristica dello stato T della Hb $\alpha QY + \beta QY$ che è risultata circa 10 volte più rapida. Questo risultato è in buon accordo con la ridotta cooperatività osservata negli esperimenti di equilibrio in quanto nell'emoglobina nativa la differenza tra i due stati ammonta ad un fattore di circa 50.

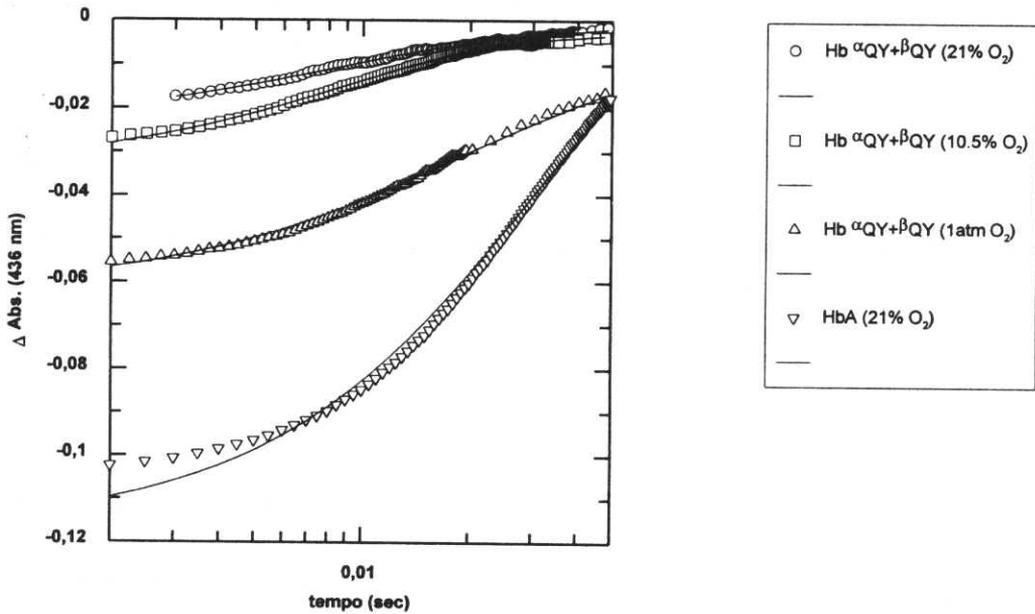


Figura 3. - Esperimento di dissociazione dell'ossigeno (oxygen pulse).

Conclusioni e prospettive

I risultati presentati mettono in luce che i mutanti sito-specifici della emoglobina umana ottenuti rappresentano un primo importante passo verso la costruzione e la sintesi di emoglobina da usarsi come sostituto artificiale del sangue. La bassa affinità per l'ossigeno, riscontrata anche in assenza di effettori allosterici, costituisce infatti la necessaria premessa per l'utilizzazione di emoglobina in soluzione nelle trasfusioni. Attualmente il nostro gruppo è impegnato, oltre che in una più dettagliata caratterizzazione funzionale, nella cristallizzazione delle emoglobine mutanti al fine di poterne determinare la struttura tridimensionale ad alta risoluzione; questo permetterà di ricavare informazioni importanti sul ruolo giocato dalle catene laterali degli aminoacidi introdotti con la mutagenesi nella stabilizzazione dei ligandi.

Bibliografia

1. GIBSON Q.H.: The contribution of the α and β chains to the kinetics of oxygen binding to and dissociation from hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973, 70, 1-4.
2. HOFFMAN S.J., LOOKER D.L., ROERICH J.M., COZART P.E., DURFEE S.L., TEDESCO J.L. and STETLER G.L.: Expression of fully functional tetrameric hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 8521-8525.
3. TRAVAGLINI ALLOCATELLI C., CUTRUZZOLA' F., BRANCACCIO A., VALLONE B. and BRUNORI M.: Engineering ascaris hemoglobin oxygen affinity in sperm whale myoglobin: role of tyrosine B10. *FEBS Lett.* 1994, 352: 63-66.