

Progetto: **Analisi delle maturazione emopoietica mieloide midollare nella Shwachman-Diamond syndrome**

Borsista: Angela Mercuri

Anno: 2011/2012

Introduzione e Obiettivi

La Shwachman-Diamond syndrome (SDS) è un raro disordine autosomico recessivo solitamente identificato nell'età infantile (1,2,3), caratterizzato da insufficienza pancreatica e alterazioni midollari spesso associate ad anomalie scheletriche e dello sviluppo neurologico (4-6). Ulteriori aspetti clinici includono bassa statura, difetti nella crescita, disfunzioni del sistema immune, difetti renali e cardiaci, malattie epatiche, diabete mellito e una predisposizione a sindromi mielodisplastiche (MDS) ed a leucemia mieloide acuta (AML) (7-11), per lo più durante il secondo e terzo anno di vita. Circa il 90% dei casi di SDS è associata ad una mutazione nel gene SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome) presente su cromosoma 7 (12). Tale gene codifica per una proteina altamente conservata e multifunzionale, coinvolta nella biogenesi ribosomiale (13), motilità cellulare (14), regolazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (15) e stabilizzazione del fuso mitotico (16). L'espressione di tale proteina è notevolmente ridotta ma non assente nella maggior parte dei pazienti portatori della mutazione biallelica SBDS. Non è stato descritto nessun paziente con 2 alleli SBDS non funzionanti, suggerendo che la completa perdita della funzione del gene SBDS è incompatibile con la vita (17). Dal punto di vista ematologico la più comune anomalia è la neutropenia (4), solitamente intermittente, fluttuante da livelli bassi a normali; ciò causa ricorrenti infezioni batteriche che iniziano nel corso del primo anno di vita contribuendo considerevolmente alla mortalità durante la prima infanzia. Ulteriori manifestazioni ematologiche includono anemia e trombocitopenia (4,18) ed elevato rischio di sviluppare MDS e AML. A livello midollare è stata riscontrata una bassa frequenza di cellule CD34+, che presentano in vitro una ridotta capacità nel dare origine a colonie emopoietiche di tutti le filiere differenziative (19-22). Tuttavia, oltre ad un difetto a livello della cellula staminale e di quella progenitrice, il midollo SDS è caratterizzato da anomalie a livello stromale, con scarsa capacità di supportare e mantenere l'emopoiesi mediata da cellule CD34+ in colture a lungo termine (20)

L'obiettivo del progetto è:

- Analizzare le cellule staminali (CD34+CD38-) ed i progenitori emopoietici (CD34+CD38+) di bambini e ragazzi affetti da SDS, con lo scopo di identificare possibili alterazioni nel loro differenziamento.
- Valutare i cambiamenti fenotipici dei vari lineage emopoietici al fine di identificare possibili alterazioni fenotipiche precoci, predittive dell'insorgenza di MDS.

Lo studio delle varie popolazioni cellulari è stato effettuato attraverso analisi citofluorimetrica. Questa è una tecnica ben conosciuta nell'ambito dell'immunoematologia, in quanto permette di identificare differenti popolazioni cellulari attraverso il loro fenotipo e di valutarne lo stadio maturativo attraverso l'espressione di antigeni di superficie che cambiano durante la maturazione cellulare.

Metodi

Il midollo di 14 pazienti, 9 maschi e 5 femmine, affetti da SDS (età mediana 8 anni, range 1-37) e 6 donatori sani, 4 maschi e 2 femmine (età mediana 6,5 anni, range 1-15) è stato ottenuto, dopo consenso informato dei pazienti o dei genitori, dall'unità operativa dell'Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona.

L'analisi immunofenotipica del comparto staminale più immaturo e dei vari lineage emopoietici (granulocitario, monocitario, eritrocitario e linfocitario B) è stata effettuata mediante un pannello di anticorpi che ha permesso di studiare la frazione cellulare di interesse (**Tab. 1**);

Tubi	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	Note
# 01	CD16	CD13	CD38	CD34	CD11b	CD45	Granulo
# 02	CD71	CD105	CD38	CD34	CD117	CD45	Eritro
# 03	CD64	CD14	CD38	CD34	CD33	CD45	Mono
# 04	CD20	CD10	CD38	CD34	CD19	CD45	B cell
# 05	HLA-DR	CD133	CD38	CD34	CD117	CD45	HSC
# 06	CD25	CD90	CD38	CD34	CD33	CD45	HSC
# 07	CD45RA	CD45RO	CD38	CD34		CD45	HSC

[Tab.1]

I campioni di midollo osseo sono stati aliquotati in provette da citometria, circa $1,5 \times 10^6$ cellule/provetta. Le cellule sono state marcate con combinazioni di anticorpi monoclonali secondo quanto riportato in **Tab. 1** e incubate al buio per 15 min a temperatura ambiente; i globuli rossi sono stati lisati con una soluzione lisante a base di cloruro di ammonio. Successivamente i campioni sono stati lavati, centrifugati a 400g per 5 min e risospesi in PBS, quindi acquisiti mediante FACSCanto (BD Biosciences) a sei fluorescenze. L'analisi dei dati è stata eseguita con il software FlowJo (TreeStar).

Risultati

Analisi del comparto CD34+ (cellule staminali e /o progenitori)

La percentuale di cellule CD34+ è risultata inferiore, anche se non significativamente, nel midollo dei pazienti rispetto alla stessa popolazione nei soggetti di controllo ($p=0,151$). Successivamente è stato valutata la differenziazione mieloide o linfoide delle cellule CD34+, identificata rispettivamente dall'espressione di CD117 e di CD19. La popolazione CD34+CD117+ nei pazienti è risultata significativamente ridotta rispetto ai controlli ($p=0,004$), mentre non è stata riscontrata nessuna differenza significativa per la componente linfoide CD34+CD19+ ($p=0,31$).

Successivamente sono state indagate eventuali differenze nell'espressione di diversi antigeni sulle cellule del comparto staminale emopoietico CD34+CD38-. Gli unici marcatori che presentavano differenze significative di espressione tra pazienti e controlli erano CD117 e CD105, rispettivamente diminuito e aumentato ($p=0,009$; $p=0,0047$). Lo stesso tipo di analisi è stata eseguita anche sulla popolazione CD34+ totale. L'espressione di CD133 e del CD117 era significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli ($p=0,0005$, $p=0,001$).

Analisi della maturazione

Sono stati analizzati i lineage granulocitario, monocitario ed eritrocitario e il comparto linfoide B, identificati in base a caratteristiche fenotipiche e fisiche (SSC) (fig. 1 A-D).

L'analisi percentuale dei vari compartimenti cellulari ha evidenziato una riduzione significativa della componente granulocitaria ($p=0,008$) ed un aumento della componente monocitaria ($p=0,028$) nei pazienti rispetto alla controparte normale. Non risultavano percentualmente alterati il comparto linfoide B e quello eritrocitario ($p=0,415$, $p=0,521$, rispettivamente).

In un secondo momento sono stati analizzati gli stadi maturativi dei vari lineage in base all'espressione di combinazioni di antigeni espressi in modo differenziale durante la maturazione di ciascun tipo cellulare. Per il comparto granulocitario, la maturazione è stata studiata valutando il pattern di espressione di CD16 vs CD11b (fig. 2A). L'analisi ha evidenziato una riduzione significativa dei promielociti (CD16-/CD11b- $p=0,005$), nei pazienti rispetto ai controlli. Non erano significativamente differenti, invece, le altre popolazioni individuate, cioè mielociti (CD16-/CD11b+), metamielociti (CD16+/-/CD11b+) e granulociti maturi (CD16+/CD11b+), anche se per queste ultime due sottopopolazioni si poteva osservare nei pazienti un lieve riduzione rispetto al normale ($p=0,07$ e $p=0,08$, rispettivamente).

Nella maturazione monocitaria, analizzata studiando CD14 vs CD64 (fig. 2B), è stato rilevato un significativo aumento della popolazione monocitaria matura (CD14+/CD64+; $p=0,0009$), nei pazienti SDS rispetto ai soggetti di controllo. Non sono state identificate differenze nelle popolazioni monocitarie più immature.

Il lineage eritroide è stato valutato considerando l'espressione di CD105 vs CD117 (fig. 2C). Non sono state riscontrate differenze tra pazienti e controlli.

La maturazione delle cellule B è stata analizzata mediante l'espressione di CD10 vs CD20 (fig. 2D). In questo comparto è stato osservato un aumento significativo dei linfociti B maturi (CD10-/CD20+ $p=0,01$) e delle plasmacellule (CD10-/CD20-/CD38+ $p=0,01$), nei pazienti rispetto ai controlli. Per le altre sottopopolazioni B individuabili, cioè ematogoni (CD10+/CD20-) e cellule pre-B (CD10+/CD20+), non sono state riscontrate significative differenze tra i due gruppi in esame.

Discussione e Conclusioni

L'espressione dell'antigene CD34 identifica una popolazione cellulare morfologicamente e immunologicamente eterogenea, funzionalmente caratterizzata dalla capacità di generare in vitro aggregati clonali derivati da progenitori più o meno immaturi e dalla capacità in vivo di ricostituire il sistema linfo-mielopoietico in un ospite letalmente irradiato (23,24). Studi immunocistochimici hanno dimostrato che l'antigene CD34 è specifico per lo stadio, ma non per la filiera differenziativa: infatti, indipendentemente dalla linea differenziativa, esso viene espresso solo da cellule ontologicamente immature (25) e i livelli di espressione della molecola CD34 declinano con la progressiva maturazione. A livello del sistema emopoietico la cellula staminale più immatura presenta un'elevata espressione di CD34 associata alla concomitante presenza di ulteriori marcatori, quali CD133, CD105, CD117, e alla mancata espressione di CD38; nel corso della maturazione l'espressione di CD34 diminuisce, così come quella di CD133, CD105 e CD117 mentre l'espressione di CD38 aumenta. La ridotta espressione di CD133 e CD117 sulla popolazione CD34+ totale nei pazienti rispetto ai controlli potrebbe essere interpretata come uno stadio

differenziativo più avanzato di tale popolazione cellulare nei pazienti SDS rispetto alla controparte normale. Nella popolazione più immatura CD34+CD38-, invece, è stata ritrovata un'elevata espressione del CD105 e una ridotta espressione del CD117 nei pazienti rispetto ai controlli; per quanto riguarda l'espressione del CD133, invece, non c'era alcuna differenza tra i due gruppi analizzati. Il significato di quest'ultimo risultato non è ancora ben chiaro; in letteratura, però, è riportata l'inibizione della progressione nel ciclo cellulare dei precursori primitivi da parte del CD105 (componente del recettore TGFbeta), azione esercitata riducendo l'espressione di CD117 (26). Questo dato potrebbe quindi essere interpretato come la presenza di una popolazione più quiescente nei pazienti SDS rispetto alla controparte normale. Ulteriori studi potranno fornirci informazioni più precise.

L'analisi dei vari lineage emopoietici evidenzia una riduzione della componente granulocitaria nei pazienti SDS rispetto ai controlli; tale dato trova conferma anche in letteratura. Per quanto riguarda la popolazione linfoide B, percentualmente non si riscontravano differenze tra i due gruppi analizzati, tuttavia è stata trovata un'alterazione nelle fasi finali di maturazione, dovute all'aumento dei linfociti B maturi e delle plasmacellule nei pazienti SDS; tale aumento, era bilanciato dalla diminuzione non significativa, nelle fasi iniziali della maturazione, che contribuiva a mantenere stabile la percentuale della popolazione linfoide B totale. Per la componente monocitaria, invece, è stato evidenziato l'aumento dei monociti maturi nei pazienti rispetto ai controlli.

In conclusione, sia per il comparto più immaturo che per i vari lineage emopoietici saranno necessari studi più approfonditi. Per il primo potrebbe essere utile indagare maggiormente la popolazione CD105+CD117^{low} all'interno delle CD34+/CD38-, valutando, ad esempio, la lunghezza dei telomeri di tale popolazione, e confrontandola successivamente con quella della popolazione CD133+CD117+; questo ci permetterebbe di capire se la popolazione CD105+CD117^{low} sia veramente una popolazione più quiescente; potrebbe essere utile, inoltre, studiare il mantenimento dell'emopoiesi da parte delle cellule stromali mesenchimali del midollo osseo; in letteratura è riportata una scarsa capacità nel mantenimento dell'emopoiesi da parte dello stroma midollare nella SDS, anche se non è ben chiaro a carico di quale popolazione cellulare. Per quanto riguarda invece lo studio dei lineage emopoietici, si potrebbe studiare il midollo di pazienti affetti da MDS, che potrebbe evidenziare possibili analogie tra le due patologie e fornire un aiuto nel permettere di identificare i marcatori predittivi di MDS nei pazienti SDS.

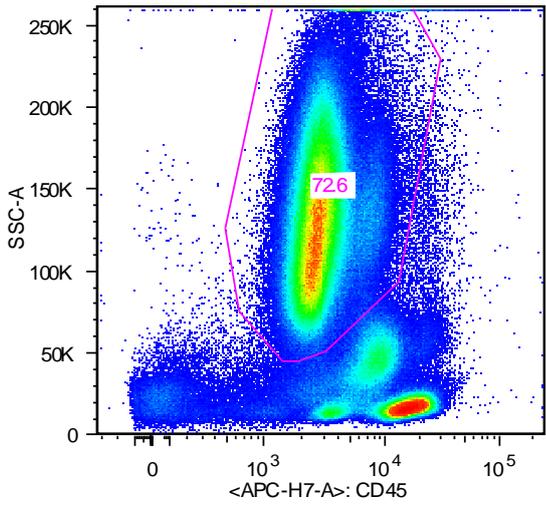


Fig. 1A

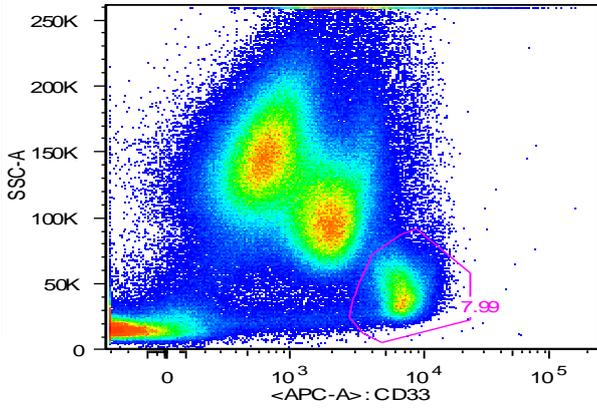


Fig. 1B

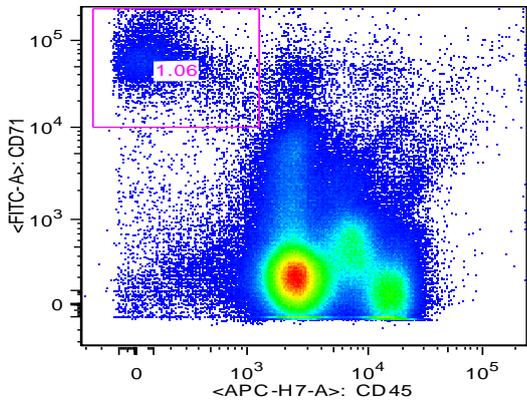


Fig. 1C

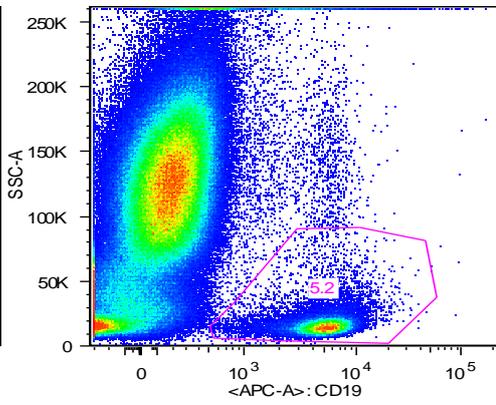


Fig. 1D

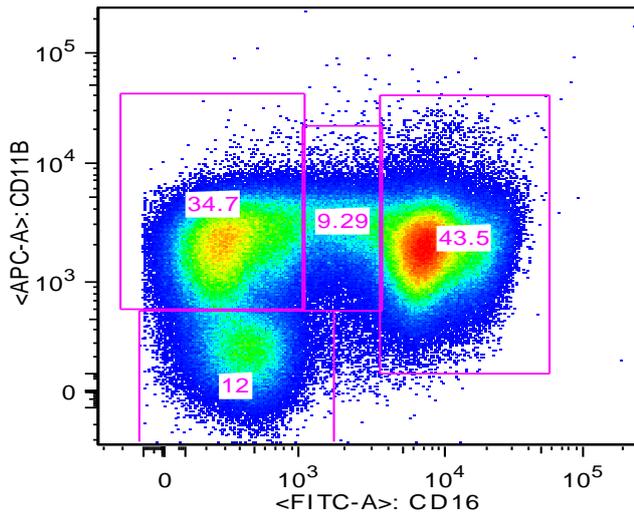


Fig. 2A

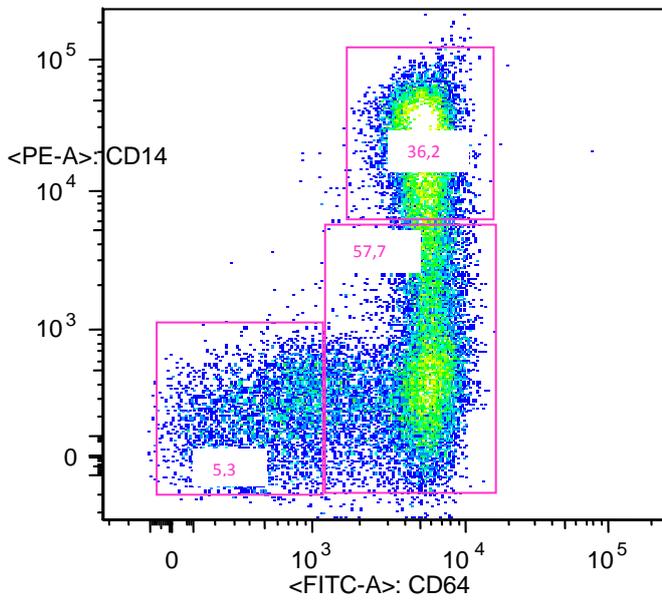


Fig. 2B

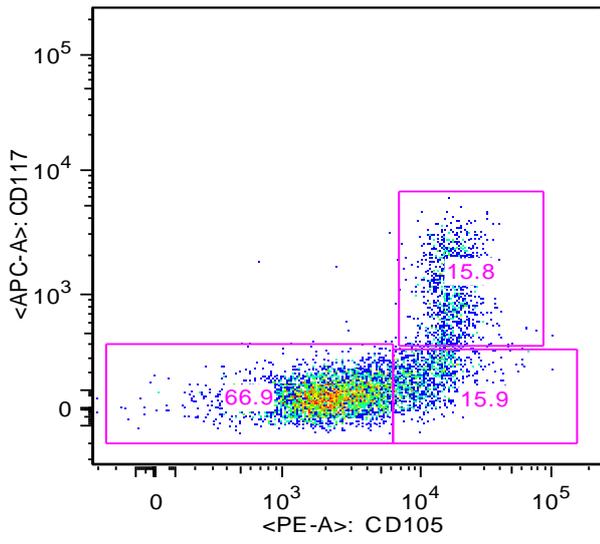


Fig. 2C

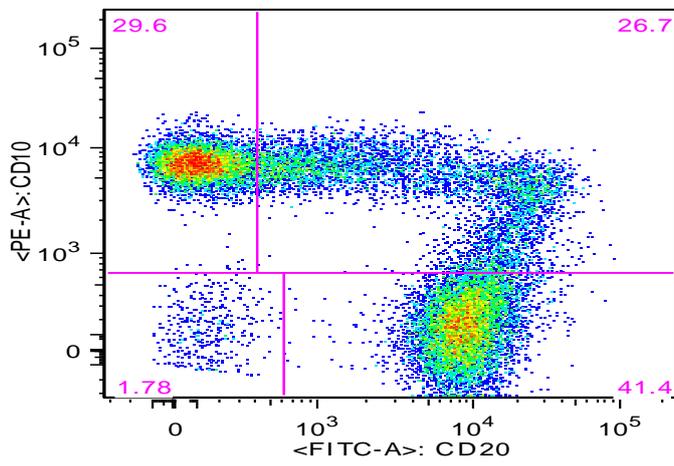


Fig. 2D

Bibliografia

1. Shwachman H, Diamond LK, Oski FA, et al. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J Pediatr* 1964;65:645–663.
2. Nezeloff C, Watchi M. L'hypoplasie congenitale lipomateuse du pancreas exocrine chez l'enfant (Deux observations et revue de la litterature). *Arch Fr Pe'diatr* 1961;18:1135–1172.
3. Bodian M, Sheldon W, Lightwood R. Congenital hypoplasia of the exocrine pancreas. *Acta Paediatr* 1964;53:282–293.
4. Aggett PJ, Cavanagh NP, Matthew DJ, et al. Shwachman's syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child* 1980;55:331–347.
5. Burke V, Colebatch JH, Anderson CM, et al. Association of pancreatic insufficiency and chronic neutropenia in childhood. *Arch Dis Child* 1967;42:147–157.
6. Pringle EM, Young WF, Haworth EM. Syndrome of pancreatic insufficiency, blood dyscrasia, and metaphyseal dysplasia. *Proc R Soc Med* 1968;61:776–777
7. Burroughs L, Woolfrey A, Shimamura A. ShwachmanDiamond syndrome: a review of the clinical presentation, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23: 233–248.
8. Dokal I, Rule S, Chen F, Potter M, Goldman J. Adult onset of acute myeloid leukaemia (M6) in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1997; 99:171-173
9. Huigens PC. Syndrome of Shwachman-Diamond and leukemia. *Scand J Haematol*. 1997;18:20
10. Woods WG, Roloff JS, Lukens JN, Krivit W. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. *J Pediatr*. 1981; 99:425-428
11. Dror Y, Squire J, Durie P, et al. Malignant myeloid transformation with isochromosome 7(q) in Shwachman-Diamond syndrome. *Leukemia* 1998;12:1591–1595
12. Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, Rommens JM. 2003. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003;33: 97–101.
13. Wong Chi C., Traynor D., Basse N., Kay R.R., and Warren A.J. Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 2011;118:4305-4312.
14. Wessels D, Srikantha T, Yi S, Kuhl S, Aravind L, Soll DR. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene encodes an RNA-binding protein that localizes to the pseudopod of *Dictyostelium amoebae* during chemotaxis. *J Cell Sci*. 2006;119:370–379.
15. Ambekar C, Das B, Yeger H, Dror Y. SBDS-deficiency results in deregulation of reactive oxygen species leading to increased cell death and decreased cell growth. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55: 1138–1144.
16. Austin KM, Gupta ML, Coats SA, Tulpule A, Mostoslavsky G, Balazs AB, Mulligan RC, Daley G, Pellman D, Shimamura A. Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118: 1511–1518.
17. Zhang S, Shi M, Hui CC, Rommens JM. Loss of the mouse ortholog of the shwachman diamond syndrome gene (Sbds) results in early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 6656– 6663
18. Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol*. 2002; 118: 701-713.
19. Woods WG, Krivit W, Lubin BH, et al. Aplastic anemia associated with the Shwachman syndrome. In vivo and in vitro observations. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1981;3:347–351.

20. Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome: An inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty microenvironment. *Blood* 1999;94:3048–3054.
21. Saunders EF, Gall G, Freedman MH. Granulopoiesis in Shwachman's syndrome (pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction). *Pediatrics* 1979;64:515–519.
22. Suda T, Mizoguchi H, Miura Y, et al. Hemopoietic colonyforming cells in Shwachman's syndrome. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1982;4:129–133
23. Sutherland RD, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1992, 1:115-129.
24. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in human can be distinguished from colony-forming cells by expression of CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 1989, 169:1721-1731
25. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12.8 recognises a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony forming cells and their precursors. *Blood* 1986, 67:842-845
26. Sansilvestri P., Cardoso A. A, Batard P., Panterne B., Hatzfeld A., Lim B., Lévesque JP., Monier MN., Hatzfeld J. Early CD34^{high} cells can be separated into Kit^{high} cells in which Transforming Growth Factor- β (TGF- β) downmodulates c-kit and KIT^{low} cells in which anti-TGF- β upmodulates c-kit. *Blood* 1995,88: 1729-1735