

Analisi in citometria a flusso dell'espressione della proteina ZAP-70 in pazienti affetti da leucemia linfatica cronica: linfociti separati o sangue intero?*

Chiara Colombo, Pierluigi Tramacere

Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio

ABSTRACT

Flow cytometry analysis of protein ZAP-70 expression in patients with chronic lymphocytic leukemia: peripheral blood mononuclear cells or whole blood? The analysis of cytoplasmic protein ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is considered an independent prognostic marker of disease progression. It can easily be assayed by flow cytometric technique, even if different results can be obtained using different methods. The purpose of this study was to verify if the use of different types of sample can also determine analytical variability. The flow cytometric expression of protein ZAP-70 was measured in 30 patients with CLL and 10 controls. A double determination was performed on whole blood and on peripheral blood mononuclear cells, according to the method using anti-CD19-PE antibody (IL) and anti-ZAP-70 AlexaFluor488 antibody (Caltag Laboratories). Using whole blood, the percentage of positive cells was more elevated than with the other sample type. For obtaining accurate results with whole blood, some procedural changes should be introduced, such as the avoidance of hemolysis and an increase in incubation time with the specific antibody.

**Questo lavoro rappresenta il contributo scientifico che la Dr.ssa C. Colombo ha presentato in occasione del ricevimento del premio intitolato alla memoria del Dr. Piero Bonvicini, istituito da MZ Congressi con gli auspici della SIBioC.*

INTRODUZIONE

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una malattia neoplastica maligna del sistema linfopoietico caratterizzata da proliferazione clonale e progressivo accumulo di piccoli linfociti monomorfi nel sangue periferico, nel midollo emopoietico, nei linfonodi e nella milza. È una patologia che colpisce più frequentemente in età senile, anche se è in aumento la percentuale di soggetti affetti dalla malattia con età inferiore ai 50 anni.

I sistemi di stadiazione attualmente in uso non sono in grado di predire il decorso della malattia fin dal suo esordio e non esistono indicazioni terapeutiche per pazienti in stadi iniziali di malattia (A e O-I), in cui il tempo di sopravvivenza può però essere estremamente variabile (compreso tra due e più di dieci anni). A causa di questa possibile variabilità si è tuttora alla ricerca di parametri predittivi che permettano già all'esordio di malattia di conoscere la potenziale rapidità evolutiva della patologia e quindi di indirizzare verso un eventuale precoce trattamento farmacologico.

I parametri finora associati ad aggressività di patologia sono particolari anomalie cromosomiche linfocitarie (trisomia 12, del 17q13 e del 11q23) (1,2), l'espressione sulle cellule leucemiche dell'antigene superficiale CD38 (3,4) e l'assenza di mutazioni nel gene codificante la regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline nel clone neoplastico (IgVH) (5). Recentemente, particolare importanza ha assunto lo stu-

dio dell'espressione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 nei linfociti leucemici (6,7), esame dapprima considerato solamente come surrogato allo stato mutazionale del gene IgVH e successivamente assunto a ruolo di vero e proprio indice prognostico indipendente di progressione di malattia (8).

L'analisi intracitoplasmatica di ZAP-70 può essere effettuata con diverse metodologie analitiche: microarray, immunocistochemica, immunoblotting o citometria a flusso. I microarray non sono però utilizzabili da tutti i laboratori a causa dell'elevato costo e della complessità metodologica, mentre con l'immunocistochemica e l'immunoblotting la quantificazione della proteina può essere sovrastimata a causa della concomitante presenza nei tessuti analizzati di linfociti T che presentano elevata espressione di ZAP-70. Queste due tecniche richiedono inoltre lunghi tempi di preparazione a differenza, invece, della tecnica citofluorimetrica che rimane tuttora la metodologia più facilmente utilizzabile dai laboratori, anche se recenti studi hanno dimostrato che particolare attenzione deve essere rivolta al tipo di clone anticorpale e ai fluorocromi utilizzati in quanto reattivi differenti possono presentare differenti gradi di sensibilità e specificità analitica (9). Nell'utilizzo di questa metodologia, poca attenzione è stata posta alla verifica della variabilità legata all'uso di sangue intero fresco piuttosto che di linfociti separati, tipi di campioni entrambi indicati in letteratura come utilizzabili per l'analisi dell'espressione proteica.

Scopo di questo studio è stato quello di verificare l'i-

doneità di questi due tipi di campione nell'analisi della proteina intracitoplasmatica ZAP-70 in citometria a flusso e definire in quali condizioni l'uso di sangue intero, campione di più facile e rapido utilizzo rispetto ai linfociti separati, sia equiparabile in termini analitici all'impiego delle sole cellule mononucleate.

MATERIALI E METODI

L'espressione della proteina intracitoplasmatica ZAP-70 è stata analizzata in citometria a flusso mediante strumento Coulter Epics XL-MCL (Instrumentation Laboratory), in doppia marcatura, in 30 pazienti affetti da LLC in cura presso la Divisione di Medicina del Presidio Ospedaliero di Desio, nonché in 10 soggetti appartenenti sani di età simile a quella dei pazienti affetti da patologia leucemica (mediana: 60 anni). Nel lavoro è stata rispettata la Dichiarazione di Helsinki e per ciascun individuo arruolato nello studio si è ottenuto il consenso informato.

L'espressione proteica è stata valutata, per ciascun soggetto, sia in linfociti separati, ottenuti mediante isolamento su gradienti di densità, che in sangue intero K₃EDTA utilizzando, per la fase di fissazione e di permeabilizzazione, i reattivi e la procedura forniti nel kit Fix & Perm (Caltag Laboratories). Come descritto dalla procedura, i campioni sono stati allestiti aggiungendo a 100 µL (l'equivalente di 10⁶ cellule) di linfociti separati o di sangue intero fresco, 10 µL di anticorpo anti-CD19-PE (IL) ed incubati per 10 min a 4-8 °C. Successivamente sono stati sottoposti a fissazione mediante l'aggiunta di 100 µL di fixation medium (reagente A) (Caltag Laboratories) e incubati per 10 min a temperatura ambiente al riparo dalla luce. I campioni sono quindi stati lavati con soluzione di Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (1mL) (Gibco) e il pellet ottenuto dopo centrifugazione a 350-400 g per 2 min è stato sottoposto a permeabilizzazione della membrana linfocitaria mediante aggiunta di 100 µL di "permeabilization medium" (reagente B) (Caltag Laboratories) ed incubato con l'anticorpo specifico anti-ZAP-70 Alexa Fluor 488 (5 µL) per 20 min a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Dopo un lavaggio finale con soluzione HBSS (1 mL), ciascun campione è stato risospeso in un volume finale di 0,5 mL di HBSS e sottoposto ad analisi entro 1 ora dalla preparazione.

Per ciascun campione è stato allestito un "controllo negativo" preparato secondo la metodica precedentemente descritta, sostituendo però all'anticorpo anti-ZAP-70 un anticorpo isotipico (mouse-IgG1) (Caltag Laboratories) marcato con lo stesso fluorocromo utilizzato per l'anticorpo specifico. Il controllo negativo è stato utilizzato per delineare le soglie di fluorescenza in ciascun soggetto in modo tale che l'area di interesse per il segnale di fluorescenza della proteina ZAP-70 nei linfociti CD19⁺ (area di doppia positività ZAP-70⁺/CD19⁺) avesse meno dello 0,1% di elementi e quella di interesse per il segnale di fluorescenza dei linfociti T ed NK (ZAP-70⁺/CD19⁻) meno dell'1% di cellule (Figura 1). Come riportato in letteratura, un paziente è stato considerato positivo al test quando la percentuale dei linfociti

B esprimenti la proteina è risultata superiore al 20% dei linfociti B totali (8).

RISULTATI

Il raffronto dei dati ottenuti nei 10 soggetti sani analizzando in doppio i campioni di sangue intero e di linfociti separati ha evidenziato una costante sovrastima nella percentuale di cellule esprimenti la proteina intracitoplasmatica ZAP-70 quando si utilizzava il primo tipo di campione (valore medio, rispettivamente, di 13,8% e 4,7%) (Tabella 1). È importante notare che in questi soggetti, con l'utilizzo di sangue intero, in 3 casi su 10 il risultato è stato superiore al 20%, valore soglia convenzionalmente utilizzato per definire "positivo al test" un paziente. Viceversa, con l'utilizzo di linfociti separati, tutti i 10 soggetti analizzati hanno presentato espressione negativa ed il valore medio ottenuto (4,7%) è risultato del tutto simile al valore medio di popolazione riportato in letteratura (5-6%) (9).

Lo stesso comportamento analitico osservato nei soggetti sani si è riprodotto anche nei 30 soggetti affetti da LLC, dove si è parimenti osservata una costante sovrastima dei risultati processando campioni di sangue intero, ciò con particolare evidenza nei soggetti con bassa percentuale di cellule ZAP-70 positive.

Si è quindi proceduto ad analizzare le possibili cause determinanti la sovrastima analitica nei campioni di sangue intero iniziando, prima di tutto, col rimuovere l'emolisi, prodotta nella fase di permeabilizzazione, mediante un lavaggio del campione con soluzione HBSS prima dell'aggiunta dell'anticorpo specifico anti-ZAP-70, mantenendo inalterate le altre fasi procedurali del metodo. Le prove di rimozione dell'emolisi (come pure tutte le successive) sono state effettuate su un numero limitato di campioni e, più precisamente, su 3 soggetti presentanti differenti percentuali di cellule ZAP-70 positive (valori bassi, intermedi ed elevati).

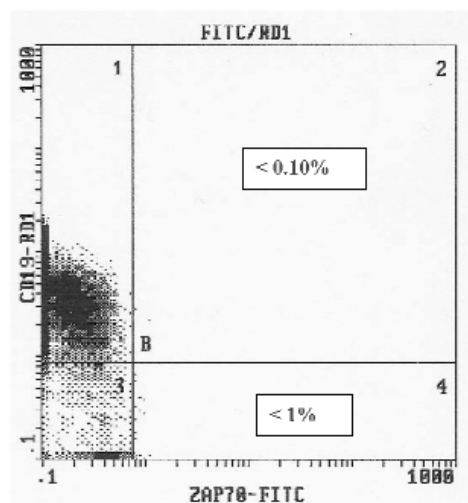


Figura 1
Citogramma in doppia fluorescenza rappresentativo dell'analisi di un bianco campione (controllo negativo) utilizzato per il posizionamento delle soglie di positività.

Tabella 1

Confronto dei risultati ottenuti in 10 soggetti apparentemente sani nell'analisi dell'espressione di ZAP-70 utilizzando come tipo di campione sangue intero o linfociti separati

Soggetto n.	Sangue intero (% cellule ZAP-70+)	Linfociti separati (% cellule ZAP-70+)	Differenza (%)
1	22,5	5,6	16,9
2	18,6	5,8	12,8
3	8,6	3,1	5,6
4	10,9	1,1	9,8
5	8,3	2,2	6,1
6	23,8	7,7	16,1
7	14,5	5,7	8,9
8	4,8	2,8	2,0
9	24,4	7,5	16,9
10	1,8	0,3	1,5
Mediana	12,7	4,4	9,4

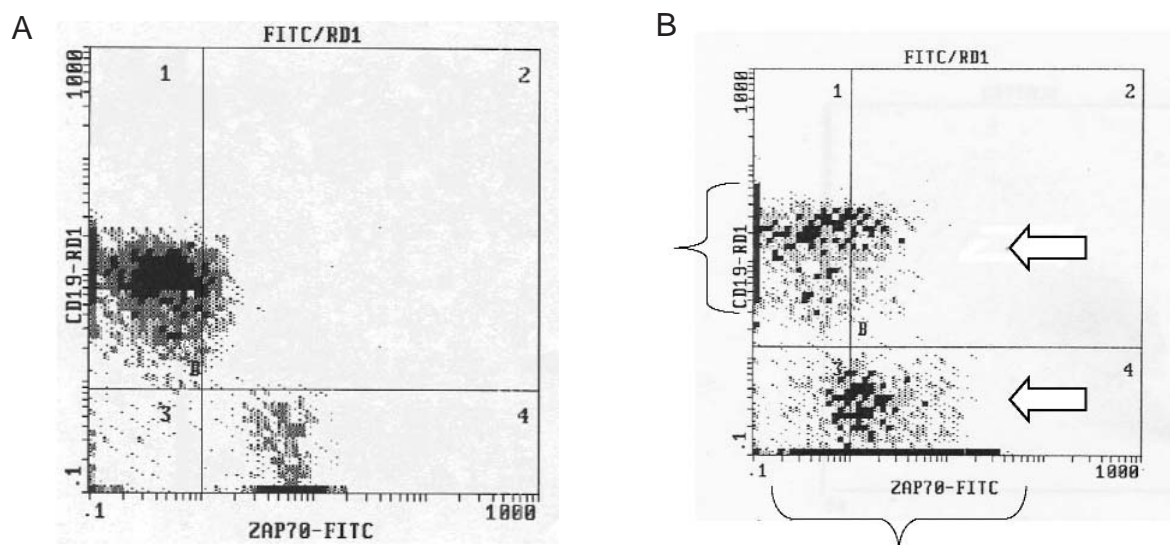
In tutti i soggetti testati, la rimozione dell'emolisi ha tuttavia determinato a confronto del quadro precedentemente osservato una significativa diminuzione del segnale di fluorescenza relativo alla proteina ZAP-70, e ciò sia a carico dei linfociti B che dei linfociti T, riduzione evidenziabile sia come allargamento della linea di base delle due popolazioni cellulari che come spostamento delle due nuvole cellulari verso l'asse delle ordinate (Figura 2).

Nell'ipotesi che questa diminuzione fosse dovuta ad una incompleta saturazione del legame antigene-anticorpo, si è proceduto a prolungare il tempo di incubazione con l'anticorpo specifico, con incrementi di 10 min, ottenendo il migliore risultato ad un tempo di incubazione di 40 min.

Come si può osservare nel caso riportato nella

Figura 3, apportando le modifiche procedurali sopra riportate (rimozione dell'emolisi e raddoppio del tempo di incubazione con l'anticorpo specifico), il valore della proteina ZAP-70 ottenuto analizzando sangue intero è risultato sovrapponibile al valore ottenuto processando linfociti separati.

Sono stati quindi rianalizzati 10 campioni di pazienti affetti da LLC precedentemente misurati, seguendo la procedura modificata (Tabella 2). I risultati ottenuti erano sostanzialmente equiparabili, con una differenza media calcolata tra i valori ottenuti con sangue intero e quelli su linfociti separati pari a 0,96%, in confronto a quella di 14% ottenuta senza le modifiche procedurali.

**Figura 2**

Analisi dell'espressione della proteina ZAP-70 in un soggetto affetto da leucemia linfatica cronica effettuata su un campione di sangue intero processato con (B) e senza (A) rimozione dell'emolisi. Con la rimozione dell'emolisi (B), si evidenzia la diminuzione del segnale di fluorescenza relativo alla proteina ZAP-70, sia a carico dei linfociti T che dei linfociti B, con un allargamento della linea di base (parentesi) delle due popolazioni cellulari e con uno spostamento delle due nuvole cellulari verso l'asse delle ordinate (freccie).

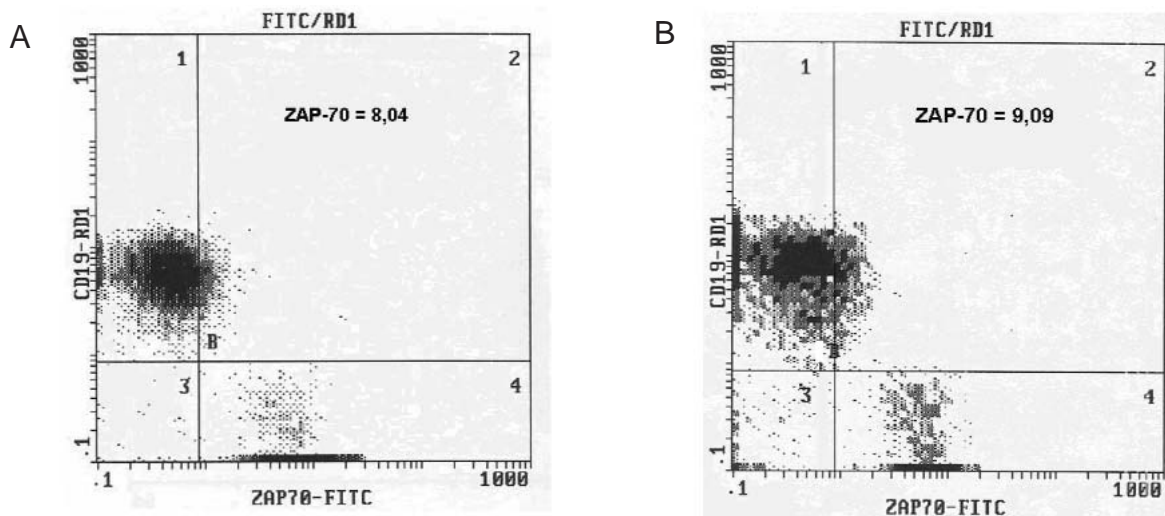


Figura 3

Analisi dell'espressione della proteina ZAP-70 in un soggetto affetto da leucemia linfatica cronica effettuata su un campione di sangue intero processato con le specifiche modifiche procedurali (rimozione dell'emolisi e raddoppio del tempo di incubazione con l'anticorpo specifico) (A) e su un campione di linfociti separati (B). La percentuale di cellule esprimenti la proteina ZAP-70 ottenuta sui due campioni è equiparabile.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, nuovi parametri biologici si sono dimostrati utili alla formulazione di un giudizio prognostico per pazienti affetti da LLC, quali l'espressione dell'antigene superficiale CD38 sulle cellule leucemiche, particolari alterazioni citogenetiche e lo stato mutazionale del gene IgVH. Più recentemente l'attenzione è stata rivolta verso l'espressione della proteina intracitoplasmatica ZAP-70, oggi effettivamente considerato un valido ed indipendente indice prognostico di progressione di malattia (10,11).

Le tecniche per lo studio dell'espressione di questa proteina nei linfociti leucemici comprendono metodologie il più delle volte costose e complesse sotto il punto di vista procedurale (per es. i microarray) o suscettibili di misinterpretazioni (per es. immunoblotting e immunofissazione) a causa di potenziale inquinamento dei tessuti analizzati da parte di linfociti T che presentano un'alta espressione della proteina ZAP-70.

La tecnica citofluorimetrica rimane la metodologia più facilmente utilizzabile dalla maggior parte dei laboratori, anche se è stato dimostrato che a seconda del clone anticorpale, del fluorocromo (FITC, AlexaFluor 488) o del tipo di fissativo e permeabilizzante (paraformaldeide/metanolo o paraformaldeide/saponina) usati nella procedura si possono ottenere diversi gradi di sensibilità e specificità analitica (12).

I due tipi di campione più comunemente indicati in letteratura per l'analisi dell'espressione proteica in citometria a flusso sono sangue intero fresco e linfociti separati, ma poca attenzione è stata rivolta a verificare la correlazione dei risultati quando si utilizza l'uno o l'altro di questi campioni.

Scopo del nostro studio è stato verificare se l'uso di sangue intero, campione di più facile e rapido utilizzo

rispetto i linfociti separati, fosse equiparabile in termini analitici a quello delle sole cellule mononucleate.

Dal confronto delle prove effettuate su 10 soggetti apparentemente sani è emerso che, adottando la stessa procedura analitica per i due tipi di campioni, con l'utilizzo di sangue intero si ha una costante sovrastima della percentuale di cellule ZAP-70 positive. Il valore medio ottenuto in questi campioni è risultato marcatamente più elevato del valore medio della popolazione di riferimento riportato in letteratura (5-6%) (9); inoltre il 30% di questi soggetti presentava una percentuale di cellule esprimenti la proteina superiore al 20%, tale da venire perciò erroneamente classificati come soggetti "positivi al test" anche se privi di patologia. Negli stessi soggetti, viceversa, i valori di espressione proteica ottenuti processando il campione di cellule mononucleate sono risultati del tutto conformi ai valori riportati in letteratura.

In base alle prove da noi effettuate, per ottenere risultati equiparabili in termini analitici con l'uso di sangue intero rispetto ai linfociti separati devono necessariamente essere effettuate due modifiche procedurali: la rimozione dell'emolisi, indotta dalla fase di permeabilizzazione, mediante lavaggio degli elementi cellulari prima di effettuare l'incubazione con l'anticorpo anti-ZAP-70 ed il raddoppio, rispetto a quello descritto nella procedura originaria, del tempo di incubazione con l'anticorpo specifico per permettere la completa saturazione del legame dell'anticorpo con l'antigene ZAP-70.

I motivi che ci hanno indotto ad effettuare la rimozione dell'emolisi sono scaturiti, prima di tutto, dall'osservazione oggettiva che essa era presente solo in uno dei due tipi di campione (non essendo possibile con i linfociti separati) ed, in secondo luogo, dalla consapevolezza che l'emolisi è un fattore interferente ben conosciuto in molteplici reazioni analitiche, tra cui le reazioni di legame antigene-anticorpo. L'ipotesi formulata è stata che la

Tabella 2

Confronto dei risultati ottenuti nell'analisi dell'espressione di ZAP-70 in 10 soggetti affetti da leucemia linfatica cronica (LLC) utilizzando come tipo di campione sangue intero (con o senza rimozione dell'emolisi) e linfociti separati.

Soggetto n.	Sangue intero senza rimozione emolisi (% cellule ZAP-70+)	Sangue intero con rimozione dell'emolisi (% cellule ZAP-70+)	Linfociti separati (% cellule ZAP-70+)	Differenza tra sangue intero senza rimozione emolisi e linfociti (%)	Differenza tra sangue intero con rimozione emolisi e linfociti (%)
LLC 1	27,5	8,0	9,0	18,4	-1,1
LLC 2	86,4	68,8	70,9	15,5	-2,1
LLC 3	9,6	6,1	1,4	6,3	4,8
LLC 4	50,9	33,4	35,1	15,8	-1,7
LLC 5	13,0	0,2	2,5	10,5	-2,3
LLC 6	17,1	1,6	2,3	14,8	-0,8
LLC 7	25,4	2,5	3,4	22,0	-1,0
LLC 8	18,6	0,7	3,3	17,2	-2,5
LLC 9	24,7	6,1	11,6	13,1	-5,8
LLC 10	8,8	5,2	2,6	6,1	2,6
Mediana	21,7	5,7	3,4	15,2	-1,4

presenza di emoglobina a concentrazioni elevate potesse favorire, direttamente o con meccanismo mediato dalla proteina stessa, un legame aspecifico dell'anticorpo anti-ZAP-70 sulle cellule linfocitarie con conseguente sovrastima del segnale fluorescente. L'osservazione diretta al microscopio a fluorescenza delle sospensioni cellulari marcate in presenza di emoglobina ha rilevato, di fatto, un segnale prevalentemente localizzato alla superficie cellulare e non in sede intracitoplasmatica. La rimozione dell'emolisi ha infatti ridotto il segnale di fluorescenza a carico dei linfociti, ma questa riduzione si è dimostrata superiore all'atteso e per di più evidente anche nei linfociti T ed NK, elementi cellulari ad elevata concentrazione di proteina ZAP-70.

Questa seconda osservazione ha indotto ad ulteriormente ipotizzare che l'azione di permeabilizzazione cellulare, nel campione di sangue intero, fosse stata in qualche modo incompleta sui linfociti a causa del suo concomitante effetto operato sulle emazie: i linfociti presenti nel campione di sangue intero avrebbero così presentato un numero minore di "varchi citoplasmatici" per l'anticorpo rispetto a quelli presenti nel campione di cellule mononucleate separate per gradiente di densità e conseguentemente la loro marcatura con anticorpo anti-ZAP-70 sarebbe stata inferiore. Per tale motivo si è proceduto ad allungare il tempo di incubazione con l'anticorpo specifico al fine di permettere una completa saturazione del legame antigene-anticorpo osservando, in effetti, un progressivo e correlato aumento del segnale di fluorescenza in tutti i linfociti con l'aumentare del tempo di incubazione, con ottimizzazione del segnale al suo raddoppio (40 min).

A conferma che in presenza di emazie si ha una incompleta azione di permeabilizzazione sulle membrane linfocitarie, sta anche l'osservazione che operando una seconda fase di permeabilizzazione (dopo il lavaggio eseguito per rimuovere l'emolisi) ed effettuando una

incubazione "standard" (20 min) con anticorpo specifico anti-ZAP-70, il segnale di fluorescenza risulta ottimale e sovrapponibile a quello rilevabile nei linfociti separati. Questa modalità operativa comporterebbe, però, se applicata, un consumo eccessivo di reattivo permeabilizzante.

In conclusione, il nostro studio ha evidenziato che nella determinazione dell'espressione della proteina intracitoplasmatica ZAP-70 in citometria a flusso è possibile utilizzare come campione sia linfociti separati che sangue intero. In quest'ultimo caso devono però essere apportate specifiche modifiche procedurali alla procedura "standard" al fine di evitare una sovrastima dei risultati che potrebbe causare un erroneo inquadramento dei pazienti affetti da LLC in categorie prognostiche a maggiore rischio di progressione di malattia esponendoli, potenzialmente, anche a inutili trattamenti farmacologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in LLC. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.
2. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Acquired chromosome 11q deletion involving the ataxia teleangiectasia locus in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicobiologic features. *J Clin Oncol* 2000;18:2607-14.
3. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukaemia patients at risk of disease progression. *Blood* 2003;101:1263-83.
4. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. Clinical significance of CD38 expression in LLC. *Blood* 2001;98:2633-9.
5. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:377-9.
6. Weistner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*

- 2003;101:4944-51.
7. Orchard J, Ibbotson R, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004;363:105-11.
 8. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable region mutations in LLC. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.
 9. Letestu R, Rawston A, Ghia P, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. *Cytometry Part B* 2006;70B:309-14.
 10. Rassenti LZ, Lang H, Tracy L, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:893-901.
 11. Del Principe I, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;351:893-901.
 12. Gibbs G, Bromidge T, Howe D, et al. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory. *Clin Lab Haem* 2005;27:258-66.