



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA  
XX CICLO**

**COINVOLGIMENTO DELLA PROTEINA HS1 NELLA  
SOPRAVVIVENZA DEI LINFOCITI B NEOPLASTICI DI  
PAZIENTI CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

**Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa PAOLA ZANOVELLO**

**Supervisore: Ch.mo Prof. GIANPIETRO SEMENZATO**

**Correlatore: Dott. LIVIO TRENTIN**

**Dottoranda: Dott.ssa FEDERICA FREZZATO**

**31 gennaio 2008**



# INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b> .....	pag.	5
<b>RIASSUNTO</b> .....	pag.	7
<b>ABSTRACT</b> .....	pag.	9
<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag.	11
Leucemia Linfatica Cronica di tipo B (LLC-B).....	pag.	11
Epidemiologia ed eziologia.....	pag.	11
Presentazione clinica.....	pag.	12
Diagnosi.....	pag.	13
Patogenesi.....	pag.	16
Controllo dell'apoptosi.....	pag.	19
Trasduzione del segnale mediata dal BCR.....	pag.	20
Microambiente.....	pag.	24
Prognosi.....	pag.	26
Fattori prognostici clinici.....	pag.	26
Fattori prognostici biologici.....	pag.	27
Trattamento.....	pag.	32
Hematopoietic lineage cell-Specific Protein 1 (HS1).....	pag.	37
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	pag.	41
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	pag.	43
Pazienti.....	pag.	43
Analisi immunfenotipica.....	pag.	44
Separazione dei linfociti dal sangue periferico.....	pag.	45
Purificazione dei linfociti B mediante rosettazione con SRBC.....	pag.	46
Purificazione dei linfociti B mediante <i>kit</i> RosetteSep.....	pag.	47
Colture cellulari.....	pag.	48
Preparazione dei lisati cellulari.....	pag.	48
Immunoprecipitazione della proteina HS1 da lisati cellulari.....	pag.	49
Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS.....	pag.	50
Western blotting.....	pag.	51
Analisi dei linfociti B in microscopia confocale.....	pag.	52
Estrazione dell'RNA.....	pag.	53
Sintesi del cDNA.....	pag.	53
Valutazione dell'espressione genica di HS1 mediante Real Time-PCR....	pag.	54
<b>RISULTATI</b> .....	pag.	57
La proteina HS1 è overespressa nelle cellule B di LLC.....	pag.	57
L'espressione della proteina HS1 è aumentata nei pazienti a prognosi sfavorevole.....	pag.	58
L'espressione della proteina HS1 diminuisce dopo chemioterapia.....	pag.	59
La proteina HS1 viene clivata durante la risposta apoptotica delle cellule B di LLC.....	pag.	60
La proteina HS1 viene fosforilata in tirosina nei linfociti B neoplastici di LLC-B dopo stimolazione del BCR.....	pag.	61
HS1 è localizzata in modo anomalo nelle cellule leucemiche.....	pag.	62
Ridistribuzione di HS1 dopo stimolazione del BCR.....	pag.	63
HS1 co-localizza con la $\beta$ -actina nelle cellule B di LLC.....	pag.	64
HS1 co-localizza con il centrosoma nelle cellule B di LLC.....	pag.	65
<b>DISCUSSIONE</b> .....	pag.	67
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag.	71



## ABBREVIAZIONI

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>AcMo</b>	Anticorpo Monoclonale
<b>Ag</b>	Antigene
<b>Arp2/3</b>	Actin Related Protein 2/3
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated
<b>Bcl-2</b>	B-Cell Lymphoma-2
<b>BCR</b>	B-Cell receptor
<b>CD</b>	Cluster di Differenziazione
<b>cDNA</b>	DNA complementare
<b>CG</b>	Centro Germinativo
<b>CK2</b>	Casein Kinase 2
<b>DAPI</b>	4', 6-diamino-2-fenilindolo cloridrato
<b>ECL</b>	Enhanced ChemiLuminescence
<b>EGCG</b>	Epigallo Catechin 3-Gallato
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>F/H</b>	Ficoll/Hypaque
<b>FISH</b>	Fluorescence In Situ Hybridization
<b>FITC</b>	Isotiocianato di fluoresceina
<b>HAX-1</b>	HS1 Associated protein X 1
<b>Hb</b>	Emoglobina
<b>HS1</b>	Hematopoietic lineage cell Specific Protein 1
<b>hTERT</b>	Human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IgV<sub>H</sub></b>	Regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleuchina
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
<b>LLC-B</b>	Leucemia Linfatica Cronica di tipo B
<b>LPL</b>	Linfoma a Piccoli Linfociti
<b>Mcl-1</b>	Mantle cell Lymphoma-1
<b>MTOC</b>	Centro organizzatore dei microtubuli
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Signal
<b>PARP</b>	Poli ADP-Ribosio Polimerasi
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PL</b>	Prolinfociti
<b>Plts</b>	Piastrine
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>SDF1<math>\alpha</math></b>	Stromal cell-Derived Factor 1
<b>SDS-PAGE</b>	Sodio-Dodecil-Solfato Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide
<b>SH</b>	Src Homology
<b>SHM</b>	Ipermutazioni Somatiche
<b>sIG</b>	Immunoglobulina di superficie
<b>Syk</b>	Spleen tyrosine kinase
<b>TK</b>	Timidina chinasi
<b>TRITC</b>	Isotiocianato di tetrametilrodamina
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<b>ZAP-70</b>	Zeta-Associated Protein 70



## RIASSUNTO

La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B) è la forma più comune di leucemia nell'adulto ed è caratterizzata dall'accumulo clonale di piccoli linfociti B CD5+ dovuto sia ad una crescita incontrollata che ad una resistenza all'apoptosi. Diverse protein chinasi sono state chiamate in causa nella regolazione della sopravvivenza cellulare del clone leucemico. Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente dimostrato che la Src chinasi Lyn è overespressa, costitutivamente attiva e distribuita in maniera anomala nelle cellule B neoplastiche rispetto ai linfociti B normali. La nostra attenzione si è quindi focalizzata sulla proteina di 75 kDa HS1, che è uno dei maggiori substrati della tirosin chinasi Lyn dopo l'attivazione del BCR e che gioca un ruolo cruciale nell'apoptosi mediata dal BCR nella linea cellulare di linfoma murino WEHI-231.

In questo studio, i livelli della proteina HS1 sono stati valutati mediante analisi in western blotting in 43 pazienti affetti da LLC-B, che non erano in terapia al momento del prelievo, e in 26 controlli normali. Abbiamo osservato un aumento significativo dei livelli di proteina HS1 nelle cellule leucemiche rispetto ai linfociti B normali ( $p < 0.01$ ). Quando i livelli di HS1 sono stati correlati ad alcuni fattori prognostici, abbiamo osservato che pazienti con più di un fattore prognostico negativo, e pertanto a prognosi peggiore, presentavano una più alta espressione della proteina HS1 rispetto ai pazienti a prognosi migliore. Inoltre, i livelli di HS1 sono stati analizzati in 10 pazienti affetti da LLC-B trattati *in vivo* con fludarabina e ciclofosfamide; in 7 su 10 pazienti che rispondevano clinicamente alla terapia abbiamo osservato una riduzione dei livelli proteici di HS1. Nei pazienti che non avevano risposto alla terapia ( $n^{\circ}=3$ ) non abbiamo riscontrato alcuna riduzione.

Mediante utilizzo di tecniche di microscopia confocale e di ultracentrifugazione differenziale abbiamo inoltre osservato un'anomala distribuzione di HS1 nelle cellule leucemiche rispetto ai linfociti B normali. In sintesi, il pattern di espressione di HS1 mostrava una distribuzione a foci e una quota di HS1, pari a circa il 4-7%, era presente nel nucleo delle cellule leucemiche ma non nei linfociti B normali. Questa localizzazione nucleare scompariva dopo attivazione dei linfociti B leucemici via BCR. In altre parole, dopo stimolazione del BCR, abbiamo osservato una ridistribuzione di HS1 con scomparsa dal nucleo. Pre-incubando le cellule con PP2, un inibitore delle chinasi della famiglia Src, la ridistribuzione di HS1 veniva

inibita suggerendo pertanto che la scomparsa della frazione nucleare di HS1 è attribuibile a chinasi della famiglia Src che agiscono ad un qualche livello della cascata di trasduzione del segnale.

Infine, dal momento che HS1 può interagire con la  $\beta$ -actina mediante il complesso Arp2/3, abbiamo eseguito ulteriori esperimenti per verificare la connessione fra HS1 e alcuni elementi del citoscheletro. Abbiamo visto che sia nei linfociti B normali che in quelli leucemici la frazione citosolica di HS1 co-localizza con la  $\beta$ -actina. Inoltre, abbiamo dimostrato per la prima volta che, nelle cellule B di LLC ma non nei linfociti B normali, HS1 co-localizza con l' $\alpha$ -tubulina e, in particolare, con il centrosoma, suggerendo che HS1 potrebbe avere un ruolo nella riorganizzazione citoscheletrica delle cellule B leucemiche.

Tutte queste evidenze sembrano suggerire un possibile ruolo cardine di HS1 nella regolazione della sopravvivenza cellulare delle cellule B leucemiche e che così, questa proteina possa rappresentare un target per lo sviluppo di nuove terapie ad uso clinico.



## ABSTRACT

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common form of leukemia in adults and is characterized by the accumulation of clonal CD5+ B lymphocytes due to uncontrolled growth and resistance to apoptosis. Several protein kinase pathways have been claimed to be involved in the regulation of cell survival. We previously demonstrated that the Src kinase Lyn is overexpressed, constitutively active and anomalously distributed in malignant B cells as compared to normal B lymphocytes. Our attention was subsequently focused on the 75 kDa HS1 protein, which is one of the major substrate of Lyn kinase upon BCR cross-linking and plays a crucial role in BCR-induced apoptosis in the mouse B lymphoma cell line WEHI-231.

In the present study HS1 protein level was measured by western blotting analysis in 43 untreated B-CLL patients and in 26 normal controls. We found a significant difference in HS1 protein level between CLL and normal B cells, being mainly expressed in the leukemic patients with respect to normal controls ( $p < 0.01$ ). When we correlated HS1 protein level with prognostic factors, we observed that patients with more negative prognostic factors had a higher expression of HS1 protein regarding those with a better prognosis. We also analyzed HS1 in 10 CLL patients before and after *in vivo* therapy with fludarabine and cyclophosphamide; we found a significant reduction of both HS1 protein and mRNA levels in those patients which responded to therapy ( $n^{\circ}=7$ ) while non-responder patients ( $n^{\circ}=3$ ) did not show any change in HS1 levels.

Using confocal microscopy and subcellular cell fractionation, we observed an abnormal distribution of HS1 in leukemic cells with respect to normal B cells. In particular, the pattern of expression of HS1 appeared with a spotting distribution and a 4-7% aliquot of HS1 was present in the nucleus of leukemic B cells but not in normal B lymphocytes. This nuclear localization could not be observed following BCR triggering. In other words, after BCR engagement, we observed a redistribution of HS1 that was no longer detectable in the nucleus of stimulated leukemic cells. The pre-incubation of cells with PP2, a Src kinase inhibitor, prevents the IgM-mediated redistribution of HS1; so the disappearance of nuclear HS1 is attributable to Src kinases that act at some level of the signal cascade.

Since HS1 can interact with actin through the Arp 2/3 complex we performed additional experiments to investigate whether HS1 could interact with cytoskeletal

components. We observed that cytosolic HS1 co-localizes with  $\beta$ -actin both in normal and leukemic B cells. Moreover, for the first time, we demonstrated that in B-CLL, but not in normal B cells, HS1 co-localizes with  $\alpha$ -tubulin and, in particular, with the centrosome, suggesting that this protein could play a role in the cytoskeletal re-organization of leukemic B cells.

All these findings seem to suggest a pivotal role for HS1 in the regulation of cell survival of leukemic B cells and hint that this protein might represent a target for the development of new therapeutic approaches.

# **INTRODUZIONE**

## **Leucemia Linfatica Cronica di tipo B (LLC-B)**

### **Epidemiologia ed eziologia**

La leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) è una malattia linfoproliferativa cronica di natura monoclonale, caratterizzata da un accumulo nel sangue periferico, nel midollo osseo, negli organi linfatici e raramente anche in sedi extralinfatiche, di piccoli linfociti B maturi, con fenotipo di membrana CD19+/CD5+/CD23+, bloccati in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare<sup>1</sup>. Nei casi, meno frequenti, in cui prevalga l'interessamento linfonodale rispetto a quello ematico, la malattia viene spesso identificata come linfoma a piccoli linfociti (LPL).

La LLC-B è la forma più comune di leucemia nella popolazione adulta. Secondo i dati della Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT), nel periodo tra il 1998 e il 2002 i casi di LLC costituiscono il 33,5% del totale delle leucemie diagnosticate in Italia. Nello stesso periodo sono stati diagnosticati in media 5,6 casi di LLC ogni 100.000 uomini e 4,3 casi ogni 100.000 donne all'anno. In Italia si può stimare un numero medio annuo di nuovi casi di circa 1.600 fra i maschi e 1.150 fra le femmine. L'incidenza nella regione Veneto è stimata essere pari a 4,8 casi ogni 100.000 abitanti adulti, con circa 179 nuovi casi all'anno.

Il rischio di essere affetti da LLC cresce notevolmente con l'età; prima dei 60 anni, infatti, viene diagnosticato meno del 15% dei casi. Negli ultimi anni è stato documentato un aumento dell'incidenza della malattia nella popolazione al di sotto dei 55 anni, senza che venga modificato il tasso di incidenza globale. Analisi epidemiologiche mostrano che tale patologia è più frequente nel sesso maschile, con una ratio tra l'incidenza nei maschi e nelle femmine pari a 1,5-2:1.

L'eziologia è sconosciuta; l'esposizione ai comuni agenti cancerogeni non sembra associarsi allo sviluppo della malattia. È stata, invece, ben documentata una familiarità che interessa almeno il 5-10% dei casi. Ciò è emerso sia dall'osservazione che la malattia è molto rara in Cina, Corea e Giappone e che l'incidenza in questi gruppi etnici non si modifica nemmeno tra i soggetti emigrati in paesi a maggior incidenza, sia dalla constatazione, rilevata attraverso studi epidemiologici, che il rischio di ammalarsi per i parenti di primo grado di un soggetto affetto è circa 7-8 volte maggiore rispetto al rischio della popolazione generale. Inoltre, è stato messo in

evidenza come tra i casi familiari sussista il “fenomeno dell’anticipazione” per cui, con l’avanzare delle generazioni, l’esordio della malattia tende ad essere più precoce e il decorso clinico più severo<sup>2-6</sup>.

## **Presentazione clinica**

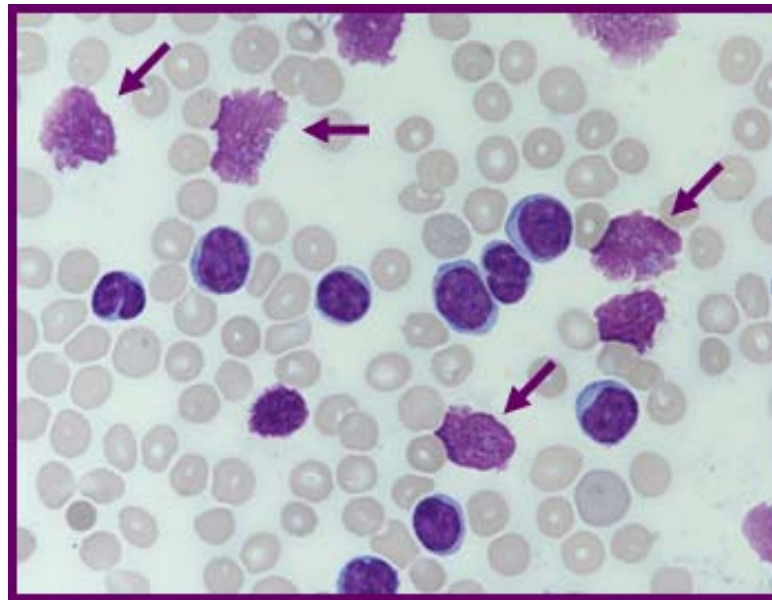
Il decorso clinico e la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC-B sono piuttosto variabili: alcuni soggetti rimangono asintomatici e non richiedono alcun trattamento per diversi anni, mentre altri hanno un andamento clinico aggressivo e difficilmente controllabile con la terapia. Molte volte la LLC-B viene accertata casualmente a seguito di esami di laboratorio di routine; in altri casi si manifesta con astenia, perdita di peso, malessere, febbre o febbre di basso grado, anemia e/o piastrinopenia, aumento di volume dei linfonodi ed epato-splenomegalia. I segni e i sintomi sono legati all’entità di infiltrazione dei tessuti. Con il progredire della malattia, l’infiltrazione midollare può provocare neutropenia o piastrinopenia. Alcuni pazienti possono manifestare fenomeni autoimmuni fra i quali il più frequente è l’anemia emolitica autoimmune (manifestata dall’11% dei pazienti). Il fenomeno dell’ipogammaglobulinemia, caratteristico dei soggetti affetti da LLC-B, può portare il paziente ad avere un quadro di immunodeficienza ad elevata mortalità per infezioni<sup>7-9</sup>.

Sebbene le cause di morte dei pazienti con LLC siano spesso da attribuire a patologie concomitanti, vista l’età avanzata della maggior parte di essi, e soprattutto alle complicanze infettive, in alcuni casi possono svilupparsi sindromi evolutive che segnano un netto peggioramento della prognosi. Una di queste è la sindrome di Richter, che consiste nella trasformazione della malattia in un linfoma a grandi cellule che si manifesta con un aggravamento rapido delle condizioni cliniche, comparsa di sintomi B e vistosa linfadenomegalia (mediana di sopravvivenza: circa 6 mesi). L’altra sindrome evolutiva è la trasformazione in leucemia prolinfocitica, anch’essa contrassegnata da rapido decadimento fisico e prognosi infausta (mediana di sopravvivenza: circa 14 mesi). Molto rara è l’insorgenza di una leucemia acuta linfoblastica in corso di LLC, mentre la comparsa di una leucemia acuta mieloide, così come quella di altre neoplasie non ematologiche, sono eventi correlabili al deficit immunologico e ai trattamenti chemio-radioterapici.

## Diagnosi

La diagnosi di LLC-B è in genere agevole e si basa sull'esame dell'emocromo, sullo studio morfologico del sangue periferico e midollare e sull'analisi immunofenotipica dei linfociti. I criteri diagnostici del National Cancer Institute prevedono:

- 1) un numero di linfociti nel sangue periferico superiore a 5.000/ $\mu$ l. Fino ad alcuni anni fa le linee guida richiedevano che la linfocitosi venisse riconfermata per almeno quattro settimane consecutive; attualmente, le conoscenze e le capacità tecniche acquisite soprattutto in relazione allo studio dell'immunofenotipo rendono non necessario questo criterio temporale. Morfologicamente, i linfociti leucemici appaiono di piccole dimensioni, del tutto simili ai linfociti maturi (diametro: 6-12 $\mu$ m), con scarso citoplasma basofilo e privi di granuli azzurrofilo; il nucleo è sprovvisto di nucleolo e la cromatina è addensata in zolle; caratteristica è la presenza delle cosiddette "ombre di Gumprecht", ossia cellule degenerate che vengono rotte nell'allestimento del preparato (fig. 1).

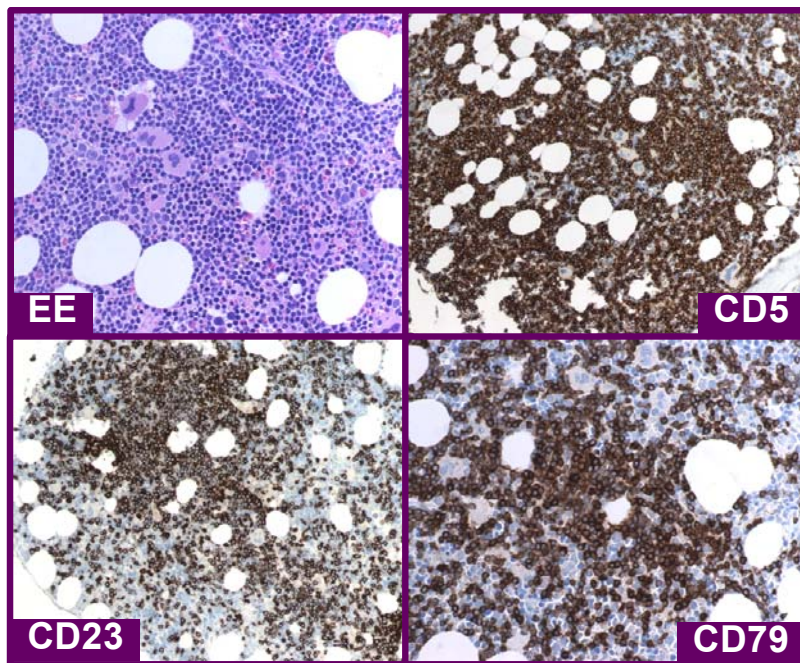


**Figura 1.** Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC. Le frecce indicano le ombre di Gumprecht, patognomoniche della LLC.

Il French-American-British Group (FAB) ha stabilito che il numero di linfociti atipici (prolinfociti, immunoblasti, linfoblasti) non debba superare il 10% nella formula leucocitaria (LLC tipica). La presenza di un numero di questi elementi compreso tra il 10 e il 55% configura il quadro di LLC atipica e, in

particolare, nel caso si tratti di prolinfociti (PL), della forma LLC/PL, caratterizzata da un andamento clinico più aggressivo. Un numero di prolinfociti maggiore del 55% comporta la diagnosi di leucemia prolinfocitica (LPL).

- 2) un'infiltrazione linfocitaria a livello midollare superiore al 30% delle cellule nucleate (fig. 2). Questo criterio non è essenziale per la diagnosi, a parte i rari casi di forme di LLC midollari pure, in cui la conta dei linfociti nel sangue periferico risulti  $<5.000/\mu\text{L}$ . Tuttavia, lo studio del midollo osseo, sia attraverso l'analisi morfologica dell'aspirato, sia attraverso i reperti dell'osteobiopsia, fornisce preziose informazioni per la definizione della prognosi e dello stadio, oltre a permettere un'accurata diagnosi differenziale dell'eventuale citopenia. L'infiltrazione del midollo osseo può avvenire secondo quattro configurazioni: nodulare, diffuso, interstiziale e misto. Il pattern nodulare suggerisce uno stadio precoce della malattia, mentre quello diffuso ed interstiziale sono tipici degli stadi più avanzati. Inoltre, solo dimostrando l'assenza di cellule leucemiche dal midollo è possibile definire uno stato di remissione completa.

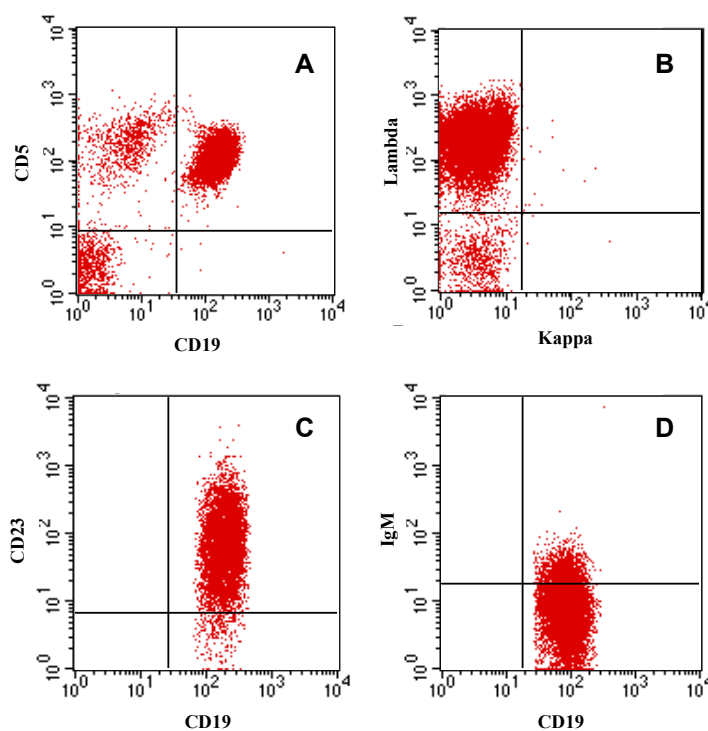


**Figura 2. Biopsia osteomidollare di un paziente affetto da LLC.** Preparato colorato con ematossilina-eosina (EE) e tre immagini immunohistologiche che evidenziano alcuni marcatori diagnostici.

- 3) l'analisi dell'immunofenotipo dei linfociti è indispensabile per differenziare la LLC-B da altre condizioni linfoproliferative quali la LPL, la leucemia a

cellule capellute, il linfoma mantellare e altre forme di linfomi. Tre sono gli elementi caratterizzanti il fenotipo di membrana delle cellule della LLC-B:

- a) l'espressione di un unico tipo di catena leggera delle immunoglobuline ( $\kappa$  o  $\lambda$ );
- b) l'espressione dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD23) assieme ad un unico marcatore normalmente espresso sulle cellule T (CD5); il CD23 riveste particolare importanza nella diagnosi differenziale con il linfoma mantellare (CD5+ ma CD23-);
- c) la bassa espressione di CD79b e delle immunoglobuline di superficie (sIg), diversamente della LPL-B che esprime sIg ad alta intensità; nella LC-B esse risultano essere prevalentemente IgM, seguite da IgD, IgG e IgA; non è rara la coespressione di IgM e IgD (fig. 3).



**Figura 3. Citogrammi relativi ad un caso rappresentativo di LLC.** La popolazione di linfociti B (CD19+) esaminata nell'esempio risulta positiva per CD5 (pannello A) e per CD23 (pannello C), esprime un unico tipo di catena leggera ( $\lambda$ , pannello B) ed esprime IgM di superficie a bassa intensità (pannello D).

I linfociti T in corso di LLC-B risultano spesso aumentati, in particolare i CD8+ con riduzione della ratio CD4/CD8, e presentano caratteristiche di attivazione (CD25+ e HLA-DR+). Risultano aumentate anche le cellule Natural-Killer (CD16+, CD56+).

Altri esami di laboratorio sono generalmente eseguiti per confermare la diagnosi, definire l'estensione della malattia e prevenirne le complicanze:

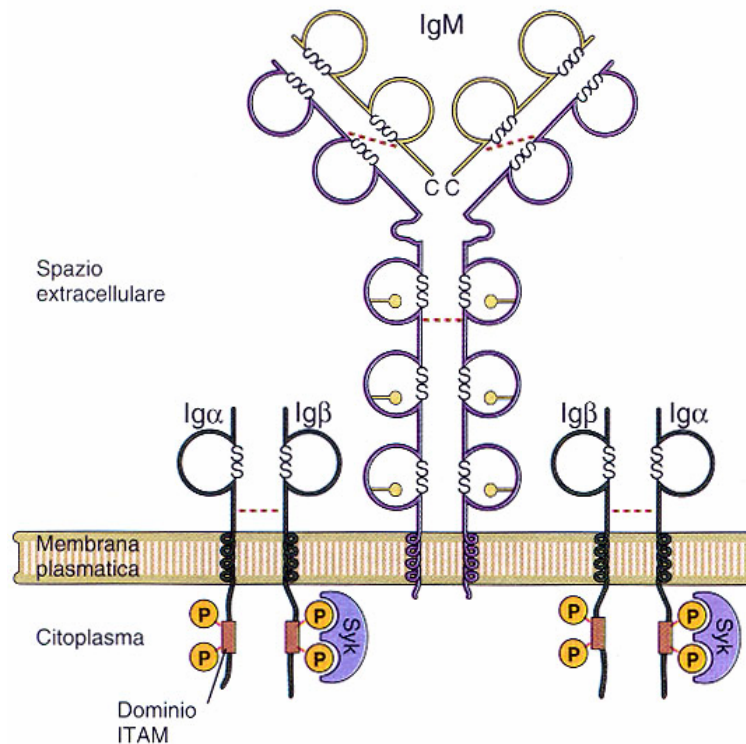
elettroforesi delle proteine sieriche e dosaggio delle Ig, test di Coombs, studio della funzionalità renale ed epatica; prima di iniziare una terapia immunosoppressiva è necessario accertarsi che non vi sia evidenza di infezioni da parte dei comuni agenti virali in atto (per esempio HBV, HCV, CMV)<sup>10</sup>.

## Patogenesi

La LLC-B è una malattia che si caratterizza clinicamente per il suo decorso estremamente variabile, a dispetto di una sostanziale uniformità delle caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche. I motivi di questo comportamento non sono ancora stati chiariti, tuttavia i progressi nel campo della biologia molecolare e le nuove acquisizioni riguardo la genetica dei linfociti B hanno consentito di individuare alcune caratteristiche discriminanti i casi a decorso favorevole da quelli a decorso più aggressivo.

I linfociti B sono le cellule del sistema immunitario che gestiscono la risposta di tipo umorale. Essi, opportunamente stimolati, sono in grado di differenziarsi da linfociti “vergini” in cellule secernenti anticorpi diretti contro uno specifico antigene (plasmacellule), o, in alternativa, in linfociti B detti “della memoria”, cioè cellule che non secernono anticorpi, ma che circolano nel sangue e che sono in grado di riconoscere uno specifico antigene e di attivarsi in risposta ad esso per dare inizio ad una risposta immunitaria più rapida ed efficace. Il riconoscimento dell’antigene avviene per mezzo del recettore per l’antigene delle cellule B (BCR), un complesso multimerico di membrana composto da un’immunoglobulina di superficie legata alla membrana plasmatica per mezzo della sua regione costante (Frammento cristallizzabile, Fc) e che rivolge all’esterno la sua regione legante l’antigene (Fab), a cui si associa per mezzo di un legame non covalente l’eterodimero  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79a/CD79b), deputato alla trasduzione intracellulare del segnale. La regione Fab comprende le regioni variabili (V) delle catene pesanti e leggere delle Ig, che sono le regioni che conferiscono al BCR la specificità per un antigene. Le regioni V a loro volta comprendono tre regioni ipervariabili, dette anche “regioni determinanti la complementarità” (CDR), in quanto rappresentano il sito che consente un legame ad alta affinità con l’antigene (fig. 4).





**Figura 4. Rappresentazione schematica del BCR.** Esso è costituito dal complesso formato da un'Ig di superficie e dalle molecole Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  che trasducono il segnale dopo il legame dell'Ig con l'antigene.

Ciò che differenzia un linfocita B “vergine” da un linfocita B “della memoria” è il fatto che nel primo le regioni V presentano una sequenza aminoacidica identica alla sequenza “germline” derivante dal processo di ricombinazione somatica che avviene nel corso della maturazione del linfocita nel midollo osseo; nel linfocita B “della memoria”, invece, le regioni V presentano una sequenza aminoacidica non identica alla sequenza “germline”. Questo perché, a livello dei geni che codificano le regioni V, si è verificato il processo delle ipermutazioni somatiche (SHM), che è alla base del fenomeno della maturazione dell'affinità.

Il linfocita B “vergine”, infatti, quando incontra l'antigene specifico per il suo BCR, si attiva e comincia a proliferare. Ciò avviene all'interno degli organi linfatici e richiede che vi sia la co-attivazione da parte dei linfociti T helper specifici per lo stesso antigene. Una parte di questa progenie entra nei follicoli linfoidi e forma il centro germinativo (CG), dove ha luogo un'intensa proliferazione. Qui, i geni delle Ig subiscono una serie di mutazioni puntiformi (all'incirca 1 ogni 1.000 paia di basi per ogni ciclo mitotico), che portano alla formazione di numerosissimi cloni con una diversa affinità per l'antigene. Questi vengono selezionati attraverso il contatto

con le cellule follicolari dendritiche che esprimono l'antigene sulla loro membrana; i linfociti che legano con maggiore affinità l'antigene sopravvivono, mentre gli altri vanno incontro ad apoptosi. Il repertorio linfocitario che così si sviluppa è dotato di recettori altamente affini per l'antigene e quindi in grado di attivare una risposta immunitaria più efficace e rapida.

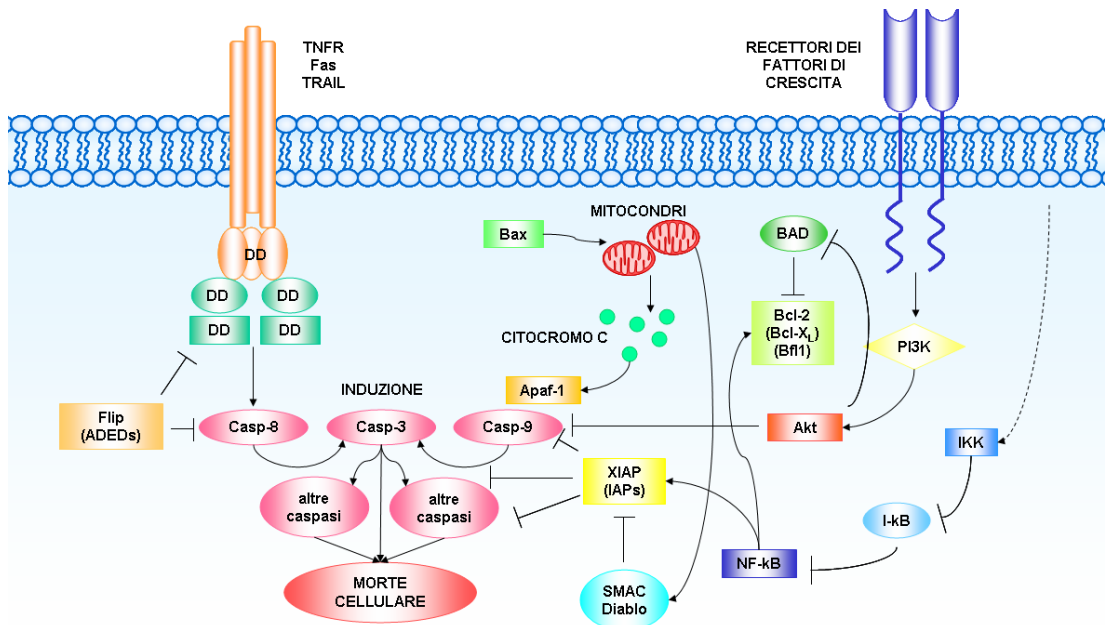
Inizialmente si è ritenuto che la LLC-B in realtà non fosse un'unica malattia, ma potesse essere divisa in due entità diverse, aventi origine da cellule ad un diverso stadio di maturazione, pre o post-CG. In realtà, lo studio dell'espressione genica condotto con la tecnica del DNA-microarray e l'analisi dell'immunofenotipo dei due sottotipi di LLC (mutato e non mutato), hanno evidenziato come essi derivino entrambi da linfociti B "della memoria"<sup>11</sup>. Ciò che li differenzia non è l'aver o meno incontrato l'antigene, in quanto ambedue derivano da cellule mature e differenziate, la cui espressione genica presenta una larga, ma non totale, sovrapposibilità, e il cui fenotipo è tipico dei linfociti che hanno incontrato l'antigene (CD23+, CD25+, CD27+). L'ipotesi oggi ritenuta più plausibile afferma che la differenza tra i due sottotipi sia legata al tipo di antigene incontrato e alla modalità di attivazione. Nel sottotipo non mutato, l'attivazione avverrebbe da parte di antigeni "a bassa avidità", ad esempio superantigeni, indipendentemente dai linfociti T helper e quindi senza che si formi il CG e avvenga il processo di ipermutazione somatica; nel sottotipo mutato, invece, l'attivazione sarebbe legata all'incontro con antigeni "ad alta avidità", con la partecipazione dei linfociti T helper e formazione del CG, con conseguente mutazione delle regioni V. La trasformazione neoplastica avverrebbe a carico di un clone reduce da uno di questi due processi alternativi<sup>12,13</sup>. Questa teoria rende conto dell'origine delle cellule leucemiche, ma non spiega il differente comportamento biologico dei due sottotipi, che è alla base del diverso comportamento clinico. Le forme di LLC "mutate", infatti, hanno un andamento estremamente indolente e possono rimanere asintomatiche per anni; quelle "non mutate", invece, sono più aggressive, richiedono un intervento terapeutico e possono essere causa di morte in breve tempo.

I numerosi sforzi volti a cercare dei criteri per definire la prognosi della malattia si incrociano con la ricerca dei meccanismi patogenetici che ne stanno alla base.

In particolare, i meccanismi cellulari che intervengono nella patogenesi della LLC sono il controllo dell'apoptosi, la trasmissione intracellulare del segnale del BCR e il microambiente.

## Controllo dell'apoptosi

La disregolazione del processo di morte cellulare programmata (apoptosi) è ormai largamente riconosciuto come uno dei meccanismi principali nella patogenesi di numerosi tumori; nella LLC essa assume un ruolo particolarmente importante. Le cellule di LLC, infatti, non possiedono un'elevata capacità replicativa e sono per lo più bloccate nelle fasi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare; il loro accumulo è legato al fatto che hanno perduto la capacità di andare incontro a morte cellulare programmata, per cui viene a mancare il meccanismo omeostatico che normalmente limita il numero di cellule circolanti. Paradossalmente è stato osservato che, una volta messe in coltura, queste stesse cellule vanno rapidamente incontro ad apoptosi. Ciò solleva il problema di capire se la resistenza all'apoptosi sia legata a fattori intrinseci alla cellula o dipenda da messaggi esterni che arrivano alla cellula dal microambiente in cui vive<sup>14,15</sup> (fig. 5).



**Figura 5. Via di trasduzione del segnale nel processo apoptotico.** Entrambe le vie, estrinseca (a sinistra) ed intrinseca (a destra), hanno in comune l'attivazione degli effettori centrali dell'apoptosi, un gruppo di proteasi (specifiche per delle cisteine) chiamate *caspasi*, che dirigono la distruzione degli elementi strutturali (citoscheletro) e funzionali (organuli) della cellula.

Per quanto riguarda i fattori intrinseci, molto importante è l'equilibrio tra fattori pro- e anti-apoptotici. Tra questi, i principali regolatori dell'apoptosi sono delle proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) che giocano un ruolo cruciale in questo meccanismo inibendo (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1 e Mcl-1) o promuovendo (Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bid, Bik e Hrk) l'apoptosi. L'eterodimerizzazione tra membri pro- e anti-apoptotici di questa famiglia e i livelli relativi di entrambi i tipi di proteine, può determinare la predisposizione a rispondere ad un determinato stimolo apoptotico<sup>16</sup>. In molti casi di LLC-B è stata riscontrata un'overespressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Mcl-1 (mantle cell lymphoma-1). Quando Bcl-2 è overespresso si ha un aumento del rapporto Bcl-2/Bax rispetto ai linfociti T e B di soggetti normali e una maggiore resistenza all'apoptosi<sup>17</sup>. La proteina Bcl-x<sub>S</sub> che, invece, inibisce la funzione di Bcl-2, è presente soltanto in tracce. Per quanto riguarda la proteina anti-apoptotica Mcl-1, essa è risultata overespressa nella LLC, specialmente in alcuni casi a rapida progressione e con una scarsa risposta alla terapia citoreduttiva. In particolare, uno studio condotto su un campione di pazienti affetti da LLC ha evidenziato come in circa un terzo di essi fosse presente un'inserzione di 6-18 paia di basi a livello del promotore del gene di Mcl-1; tale inserzione, assente in tutti i soggetti di controllo, si associava ad un'aumentata espressione della proteina a livello cellulare, mentre sul piano clinico si osservava una riduzione della risposta alla chemioterapia e della sopravvivenza<sup>17</sup>.

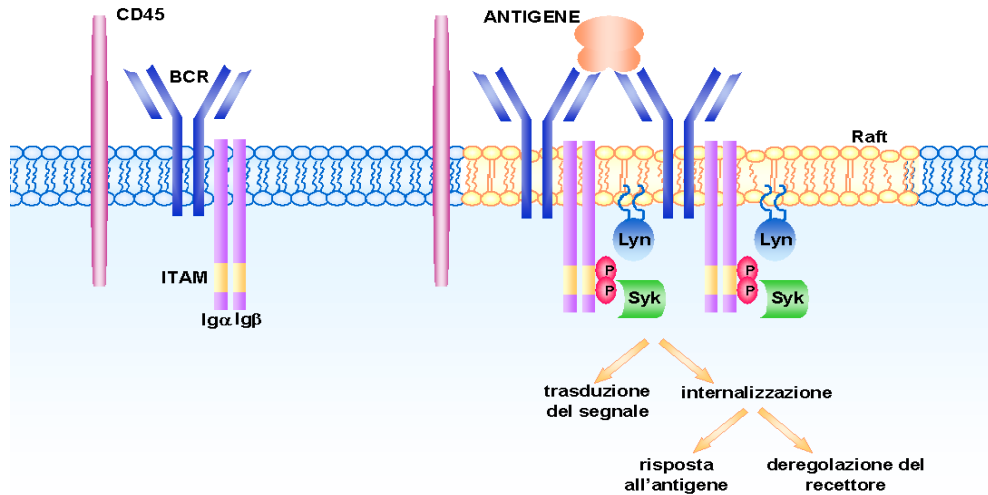
Altri fattori intrinseci critici per il controllo dell'apoptosi sono le proteine oncosoppressori p53 e ATM, la cui mancata o carente espressione è dovuta alla delezione delle regioni cromosomiche in cui mappano i geni che le codificano.

### **Trasduzione del segnale mediata dal BCR**

Nel processo di attivazione delle cellule B risulta fondamentale il ruolo svolto dal B-cell receptor (BCR) in quanto capace di dare inizio alla cascata di eventi che porta alla trasduzione dei segnali cellulari che determinano la sopravvivenza, la proliferazione e l'apoptosi della cellula (fig. 6).

Il recettore delle cellule B è un complesso multimerico di membrana formato da un'immunoglobulina (Ig), in grado di legare l'antigene (Ag), e dall'eterodimero Iga/Igβ (CD79a/CD79b) che media la trasduzione del segnale, associati non covalentemente, mediante un ponte disolfuro. Entrambe le molecole Iga e Igβ contengono, nel loro dominio citoplasmatico, un motivo ITAM (Immunoreceptor

Tyrosine-based Activation Motif) che è soggetto a fosforilazione da parte di chinasi della famiglia Src<sup>18</sup>. Questa fosforilazione si traduce nel reclutamento di altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale mediata dal BCR. Dati recenti



**Figura 6. Modello di trasduzione del segnale mediata dal BCR.** Quando l'Ag lega il BCR, la tirosin chinasi Lyn fosforila le sequenze ITAMs dei domini citoplasmatici di Igα e Igβ, creando così siti di legame per i domini SH2 di proteine quali la chinasi Syk; seguono diverse reazioni biochimiche che culminano nell'attivazione, differenziazione o proliferazione del linfocita B. Le tirosin chinasi Syk e Lyn fosforilano anche la proteina HS1.

indicano che il BCR può risiedere nella membrana delle cellule come dimero o multimer<sup>18</sup>. Il gruppo di Reth ha proposto che, in assenza di legame con l'Ag, il BCR è pre-assemblato in complessi recettoriali oligomerici che sono in grado di generare un livello basale di segnale, essenziale per il mantenimento delle cellule B.

Numerosi studi dimostrano che il BCR di cellule B di LLC ha una ridotta capacità nell'attuare i meccanismi di cattura, presentazione e risposta agli antigeni ed attiva una difettiva fosforilazione tirosinica dei substrati<sup>19</sup>. Nel caso specifico, il 75% dei pazienti affetti da LLC-B non esprime il dominio extracellulare di CD79b; in questi casi si ha un CD79b "difettoso", chiamato  $\Delta$ CD79b, generato da splicing alternativo del gene *b29* che codifica per CD79b e a cui mancano i tre esoni codificanti per il dominio extracellulare. Le cellule di LLC-B che presentano la forma deleta  $\Delta$ CD79b hanno, quindi, una trasduzione del segnale mediata dal BCR difettiva rispetto alle cellule normali<sup>20,21</sup>.

Nel processo di attivazione delle cellule B, una funzione importante è svolta dai microdomini di membrana chiamati *lipid rafts*. Questi domini, ricchi in colesterolo e glicosfingolipidi, fungono da piattaforma per la trasduzione del segnale e per la processazione dell'antigene all'interno della cellula. Tali domini

selettivamente includono determinate proteine e ne escludono altre, regolando in tal modo le interazioni proteiche. In essi è stata riscontrata un'alta concentrazione delle tirosin chinasi Lyn e Fyn, appartenenti alla famiglia Src, e di altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale quali Blk, Ras, c-Abl, PAG/cbp (una proteina di membrana coinvolta nella regolazione della famiglia Src) e actina. Altre proteine, come ad esempio CD45 e Syk, sembrano invece essere escluse dai *rafts* e reclutate in essi soltanto quando vi abbia traslocato il BCR a seguito del suo contatto con l'Ag<sup>22</sup>. Secondo il più recente modello proposto per spiegare la funzione del BCR nell'attivazione delle cellule B, si ritiene che in quelle quiescenti il BCR sia inizialmente escluso dai *lipid rafts*, però, una volta legato l'Ag, il BCR traslocherebbe all'interno di questi facendo partire la cascata di trasduzione del segnale.

È stato ampiamente dimostrato che Lyn è la proteina che, con la sua attività fosforilativa, dà inizio alla cascata di trasduzione del segnale indotta dalla stimolazione del BCR. La chinasi Lyn, dopo l'incontro dell'Ag col BCR, fosforila i residui tirosinici presenti nelle sequenze ITAMs dei domini citoplasmatici delle molecole Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , creando così siti di legame per i domini SH2 di diverse proteine coinvolte nella cascata di trasduzione del segnale, come le tirosin chinasi Syk (Spleen Tyrosine Kinase) e Btk (Bruton's Tyrosin Kinase). Lyn dunque partecipa agli stadi iniziali della trasduzione del segnale e gioca un ruolo essenziale nel mediare gli eventi successivi al contatto del BCR con l'antigene. Studi su topi *lyn*<sup>-/-</sup> hanno dimostrato che questa protein chinasi intracellulare partecipa oltre che positivamente, anche negativamente al segnale mediato dal BCR<sup>23</sup>. Promuove, infatti, meccanismi inibitori che spengono gli eventi innescati dal BCR disattivando, così, la cellula B. Ad esempio, Lyn è responsabile della fosforilazione di CD22, una proteina specifica dei linfociti B trovata associata al BCR nelle cellule non stimulate. Tra le molecole che legano la forma fosforilata di CD22, SHP-1 è quella in grado di mediare molte delle azioni inibitorie di CD22, tra cui quelle che porterebbero ad un'inibizione della proliferazione cellulare. Cellule *Lyn*<sup>-/-</sup> hanno una fosforilazione ridotta di CD22 e, conseguentemente, un aumento della proliferazione cellulare<sup>23</sup>.

Nei linfociti B è stata dimostrata un'associazione di Lyn anche con la tirosin chinasi non recettoriale FAK (Focal Adhesion Kinase), coinvolta in diverse cascate di trasduzione del segnale. La formazione di questo complesso potrebbe contribuire

alla riorganizzazione del citoscheletro nei linfociti B dopo l'avvenuto legame con l'Ag<sup>24</sup>.

Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che nei linfociti B di LLC la chinasi Lyn risulta essere overespressa e con una diversa localizzazione rispetto ai linfociti B normali. Lyn è presente in modo omogeneo in tutta la membrana, non solo all'interno dei *rafts* lipidici come nei linfociti B normali. Inoltre è stata riscontrata una diretta correlazione tra l'aumento dell'attività basale della tirosin chinasi, dovuto ad una sua attivazione costitutiva non mediata dal BCR, ed il difettivo meccanismo apoptotico caratterizzante i cloni cellulari neoplastici<sup>25</sup>.

Uno dei principali substrati di Lyn è HS1 (Hematopoietic lineage cell Specific protein 1), una proteina in grado di legare la F-actina e coinvolta nel processo apoptotico di alcune linee cellulari ematopoietiche. La fosforilazione di HS1 avviene, secondo un modello definito sequenziale, ad opera di Syk e Lyn. Sembra che anche la fosforilazione dei residui tirosinici della cortactina, proteina omologa ad HS1 e coinvolta nella motilità cellulare, avvenga secondo lo stesso meccanismo di reclutamento delle tirosin chinasi della famiglia Src<sup>26</sup>.

Al segnale attivato dal BCR nei linfociti B normali partecipano anche molecole adattatrici, quali BLNK e BAM32, che svolgono un ruolo importante nel connettere le chinasi con i loro effettori. BLNK, per esempio, connette Syk e Btk con PLC $\gamma$ 2. L'effettore PI3K fosforila il fosfatidilinositolodifosfato (PIP<sub>2</sub>) producendo fosfatidilinositolotrifosfato (PIP<sub>3</sub>) il quale, attraverso il dominio fosforilato, recluta alcune molecole di membrana coinvolte nella trasduzione del segnale cellulare. PLC $\gamma$ 2 usa lo stesso substrato di PI3K, cioè il PIP<sub>2</sub>, per generare inositolotrifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerolo (DAG)<sup>27</sup>. L'IP<sub>3</sub> determina la liberazione di Ca<sup>2+</sup> intracellulare, mentre DAG va ad attivare la protein chinasi PKC: entrambi questi effettori inducono l'attivazione delle MAPK e la trascrizione dei fattori nucleari (NF $\kappa$ B e NFAT) implicati nel controllo del destino delle cellule B.

Nelle cellule B mature, come abbiamo appena visto, il BCR si associa ai *rafts* lipidici solo dopo il legame con l'Ag e il processo di trasduzione del segnale induce l'attivazione trascrizionale dei geni associati all'attivazione delle cellule B. Il BCR viene poi internalizzato e può essere degradato oppure mandato in un compartimento intracellulare chiamato MIIC (MHC-class-II-peptide-loading-compartment) dove avviene la processazione dell'Ag e la sintesi di complessi peptide-MHC (codificati dall'MHC di classe II) per la presentazione dell'Ag. I complessi MHC-peptide

vengono poi portati alla superficie cellulare, presentati alle cellule T e quindi riconosciuti dal TCR delle cellule T helper (Th). Così attivate, le cellule Th provvedono ad attivare, mediante liberazione di citochine, le cellule B. Nelle cellule B immature, il BCR è escluso dai rafts anche dopo il legame con l'Ag e, in questo caso, viene indotta l'apoptosi della cellula. Se la cellula B immatura non incontra l'Ag, lo sviluppo del linfocita continua fino alla sua maturazione<sup>28</sup>.

Un comportamento analogo a quello delle cellule B immature è descritto anche per il BCR di quelle cellule B rese tolleranti o anergiche da un'esposizione cronica all'Ag: il BCR è comunque escluso dal raft anche dopo il legame con l'Ag e il risultato è una mancata risposta cellulare<sup>29</sup>. Nei prelinfociti B, invece, una percentuale significativa di BCR e molecole segnale quali PLC $\gamma$ 2 e PI3K sono costitutivamente associati ai rafts e questo sembra generare un segnale di sopravvivenza e di differenziamento cellulare. In questi casi, molecole quali PI3K, RAS, RAF, ERK e NF $\kappa$ B sono fondamentali nel processo di trasduzione del segnale in associazione con il BCR. La PI3K è in grado di attivare e fosforilare AKT che, a sua volta, fosforila bersagli cellulari che sono coinvolti nella sopravvivenza cellulare, inclusi fattori che regolano l'apoptosi e il metabolismo del glicogeno. Tra le funzioni di AKT c'è quella di inibire l'attivazione di BAD, membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2, e quella di fosforilare, inibendola, la chinasi GSK3 (Glycogeno Synthase Kinase 3) nelle cellule B. GSK3 è attivo costitutivamente nelle cellule non stimolate, dove fosforila e destabilizza Myc e la ciclina D, entrambi richiesti per la progressione del ciclo cellulare. Sembra che la funzione di AKT consista nel promuovere la proliferazione cellulare indotta dal B-cell receptor. Quindi, la funzione di questa molecola non è soltanto quella di proteggere dal processo di morte cellulare, inibendo BAD, ma anche di promuovere e mantenere la sopravvivenza delle cellule B, inibendo GSK3<sup>28</sup>.

## **Microambiente**

La sopravvivenza dei linfociti B leucemici non è dovuta solo alla loro capacità di resistere all'apoptosi, mediante i meccanismi precedentemente discussi, ma risulta influenzata anche dall'ambiente circostante e dalle cellule che lo compongono (cellule stromali e cellule "nurse-like")<sup>30</sup>. È stato infatti dimostrato che le cellule B neoplastiche non sopravvivono in coltura e vanno rapidamente incontro a morte. Linfociti T e diversi tipi di cellule aderenti chiamate "cellule stromali" sono i



principali elementi del microambiente e conferiscono condizioni favorevoli alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule B leucemiche. Studi *in vivo* indicano che alcune citochine prodotte dai linfociti T (IL4, INF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) inibiscono la risposta apoptotica delle cellule B neoplastiche, mediante up-regolazione di Bcl-2. Le chemiochine (CXCL e CCL) presenti nel microambiente e i loro recettori (CXCR e CCR) rappresentano un gruppo di molecole che giocano un ruolo essenziale nella circolazione dei linfociti e nell'attrazione degli stessi verso il sito di infiammazione.

L'infiltrazione dei linfociti B leucemici nel midollo osseo e negli organi linfatici è regolata dalle interazioni delle chemiochine con i loro recettori che sono espressi dalle cellule B di LLC-B. Dati recenti indicano che le cellule B neoplastiche esprimono set specifici di recettori per chemiochine e rispondono in maniera selettiva ad alcune di esse raggiungendo, così, sedi precise<sup>31-32</sup>. In particolare è stato dimostrato che CCR7, recettore di CCL19 e di CCL12, molecole prodotte e rilasciate dalle venule ad endotelio alto che regolano l'accesso ai linfonodi, si trova overespresso sulla superficie delle cellule B di LLC, soprattutto ZAP-70+, determinando un aumento dell'infiltrazione dei linfociti nei linfonodi<sup>33</sup>. Anche CXCR3 è un recettore per chemiochine costitutivamente espresso nelle cellule B di LLC-B dove si comporta come un recettore funzionale in grado di trasdurre l'attività chemiotattica dopo aver legato determinate chemiochine (ad es.: IP-10/CXCL10 e Mig/CXCL9). Questo recettore non è espresso nei linfociti B normali per cui può rappresentare un marker per la LLC-B. La presenza di questo recettore sarebbe in grado di mediare il traffico delle cellule B neoplastiche da un sito ad un altro favorendo, così, il propagarsi della malattia nei vari distretti dell'organismo. Un secondo effetto potrebbe esplicarsi nella sua interazione con chemiochine che influenzino la crescita tumorale richiamando linfociti T con funzioni antitumorali<sup>34</sup>.

CXCR4, invece, è un recettore espresso sia nei linfociti B normali che nelle cellule B leucemiche dove, essendo overespresso, media un'attività chemiotattica più intensa rispetto ai normali, dopo aver legato la chemiochina CXCL12 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) prodotta dalle cellule "nurse like" del midollo osseo. La sovraespressione di CXCR4 non è correlata con altri marker prognostici, tuttavia, potrebbe essere considerato come target terapeutico perché sembra possa avere un ruolo nel proteggere le cellule B neoplastiche dall'apoptosi<sup>35</sup>.

CXCR5 è un altro recettore per chemiochine, accoppiato ad una G-protein, che lega CXCL13 (B Cell Attracting chemokine-1, BCA-1) causando l'accumulo di cellule B e T in compartimenti di organi linfoidi secondari<sup>33</sup>.

## Prognosi

Data l'estrema eterogeneità della malattia, la definizione della prognosi nella gestione di un caso di LLC-B riveste un ruolo decisivo e pone le maggiori difficoltà soprattutto per la valutazione di una corretta terapia, che potrà variare<sup>36</sup>.

Negli anni sono stati proposti diversi parametri, o fattori prognostici, che hanno lo scopo di consentire al medico di definire il decorso clinico per ciascun paziente. Tra questi ve ne sono alcuni di tipo clinico e altri di tipo biologico.

### Fattori prognostici clinici

**1) Stadiazione clinica:** essa si può condurre secondo i due sistemi comunemente utilizzati. Il sistema secondo Rai prevede la suddivisione in cinque stadi così definiti:

- stadio 0: linfocitosi assoluta  $>15.000/\mu\text{L}$  più linfocitosi midollare  $>40\%$ ;
- stadio 1: linfocitosi e linfadenomegalie;
- stadio 2: linfocitosi ed epato/splenomegalia, con o senza linfadenomegalia;
- stadio 3: linfocitosi con anemia ( $\text{Hb} < 11\text{g/dL}$ );
- stadio 4: linfocitosi con piastrinopenia ( $\text{Plts} < 100.000/\mu\text{L}$ ).

Questo sistema è stato in seguito modificato, definendo lo stadio 0 come stadio a basso rischio, raggruppando gli stadi 1 e 2 nello stadio a rischio intermedio, e gli stadi 3 e 4 nello stadio ad alto rischio<sup>37</sup>.

Il sistema secondo Binet individua solamente tre stadi:

- stadio A: linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfoidi coinvolte (comprendendo sia i linfonodi che la milza e il fegato);
- stadio B: linfocitosi periferica e midollare con più di tre aree linfoidi coinvolte;

- stadio C: anemia con Hb <10 g/dL e/o piastrinopenia con Plts <100.000/ $\mu$ L, indipendentemente dal numero di aree linfoidi coinvolte<sup>38</sup>.
- 2) **Tempo di raddoppiamento dei linfociti:** si ritiene che se esso è inferiore ai 12 mesi, si associa ad un peggior decorso clinico.
  - 3) **Modalità di infiltrazione del midollo osseo:** un pattern di infiltrazione diffuso si associa a una cattiva prognosi<sup>39,40</sup>.

### **Fattori prognostici biologici**

I meno recenti di questi parametri, detti fattori prognostici biologici “classici” della LLC-B, sono correlati all’espansione del clone leucemico, per cui sono indicativi solo quando la malattia è ormai in fase di peggioramento. Per questo motivo la loro utilità è limitata, in quanto essi non consentono di programmare una strategia terapeutica basata sul rischio di progressione che ogni singolo paziente presenta al momento della diagnosi. Essi comprendono:

- 1) **La percentuale di prolinfociti.** Se questa risulta <10% (LLC tipica) la probabilità di evoluzione in PL è decisamente scarsa; se invece la percentuale di prolinfociti è compresa tra 10% e 55% (LLC/PL) la probabilità che si verifichi un progressivo aumento dei prolinfociti nel sangue periferico è pari ad un terzo, mentre nel 18% dei casi può verificarsi l’evoluzione del quadro morfologico in PL conclamata<sup>41</sup>.
- 2) **Il valore di  $\beta$ 2 microglobulina.** Questo parametro è inversamente correlato con la sopravvivenza; un suo aumento è indice di un’umentata attività proliferativa delle cellule neoplastiche, essendo correlato al tempo di raddoppiamento linfocitario e ad un’imminente progressione nella stadiazione clinica<sup>42</sup>.
- 3) **Il valore di timidina chinasi (TK).** I livelli sierici di questo enzima si sono dimostrati in grado di identificare i pazienti affetti da una malattia indolente rispetto a quelli con un’elevata probabilità di progressione a breve termine. In particolare, livelli di TK <7,1U/l si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari a 49 mesi, mentre livelli di TK >7,1U/l si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari soltanto a 8 mesi<sup>43</sup>.

**4) Il valore di CD23 solubile.** La molecola CD23 è normalmente presente sulla membrana dei linfociti B dove media diverse funzioni; essa è in grado di prevenire l'apoptosi delle cellule del CG ed è coinvolta nella costimolazione della produzione dell'IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T. I frammenti di clivaggio della molecola (sCD23), i cui livelli possono essere determinati nel siero del paziente, risultano più elevati nei pazienti affetti da LLC ed è stato dimostrato come essi siano correlati allo stadio clinico secondo Rai e al numero di linfociti B circolanti. L'aumento del sCD23 anticipa di circa 48 mesi la progressione della malattia ed è un indice affidabile del rischio di morte del paziente<sup>44,45</sup>.

Negli ultimi anni le progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia hanno consentito di definire dei nuovi marcatori prognostici utilizzabili fin dal momento della diagnosi e in grado di definire in modo accurato il decorso clinico della malattia. Essi descrivono alcune caratteristiche biologiche del clone leucemico cruciali nel determinare la sua capacità di proliferazione e di invasione dei vari tessuti. Lo studio di questi marcatori si avvale di tecniche di immunocitofluorimetria, citogenetica e biologia molecolare. I marcatori principali e maggiormente studiati sono:

**1) Le ipermutazioni somatiche (SHM) dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgV<sub>H</sub>).** La presenza di SHM in percentuale inferiore al 2% rispetto alla sequenza "germline" identifica un gruppo di pazienti (SHM non mutati o SHM-) a prognosi negativa, con una mediana di sopravvivenza dopo la diagnosi di circa 8 anni, mentre una percentuale di mutazione uguale o superiore al 2% (SHM mutati o SHM+) identifica un gruppo di pazienti con mediana di sopravvivenza di circa 25 anni. Questo fattore prognostico, identificato nel 1999 da due distinti gruppi di ricercatori, ha assunto un importante significato per il suo elevato valore predittivo<sup>46,47</sup>. Il principale limite di questo marcatore è legato al fatto che la sua analisi è complessa e richiede l'impiego di metodiche costose e non disponibili di routine in tutti i laboratori. L'analisi del repertorio del BCR dei linfociti B leucemici e, in particolare, la distribuzione delle diverse famiglie di geni per le regioni V delle catene pesanti delle Ig espresse, ha evidenziato un'elevata frequenza del gene V<sub>H</sub> 3.21 che, indipendentemente dal suo stato mutazionale, si associa ad un andamento clinico più rapido ed aggressivo. Questo dato,

tuttavia, è stato evidenziato soprattutto tra i pazienti che vivono nei paesi del Nord Europa, mentre non è stato confermato nei paesi dell'area mediterranea<sup>48-50</sup>.

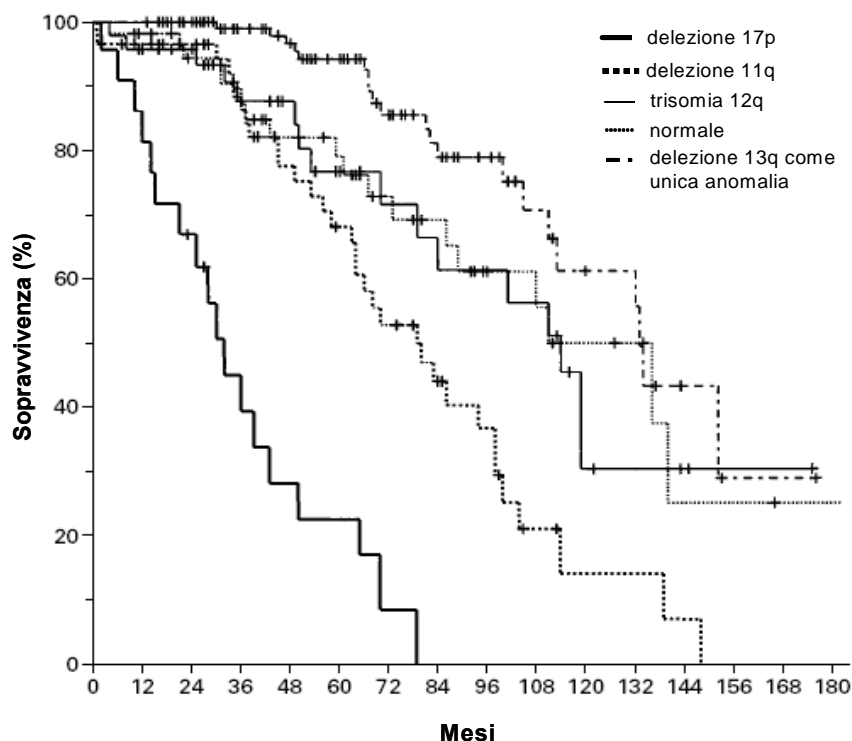
**2) L'espressione sulla membrana cellulare di CD38.** I casi di LLC-B con una quota di cellule CD38 positive superiore al 30% presentano una prognosi negativa. In realtà, il valore del cut-off per cui separare i casi CD38+ da quelli CD38- non è unanimemente definito in letteratura, con alcuni autori che lo hanno spostato al 20%<sup>51</sup>, o al 7%<sup>52</sup>. Rispetto alle SHM, CD38 ha un valore prognostico indipendente. Dapprima, infatti, si riteneva che la sua espressione correlasse strettamente con lo stato non mutato delle regioni V<sub>H</sub> delle Ig. Studi più approfonditi hanno invece ridimensionato questa affermazione che risulta non vera in circa un terzo dei casi. Questi presentano una mediana di sopravvivenza di circa 15 anni, un valore intermedio tra i casi SHM-/CD38+ e quelli SHM+/CD38-. Inoltre, un limite di questo marcatore è la sua variabilità nel corso della malattia, in particolare dopo trattamento. Sembra infatti che la chemioterapia colpisca prevalentemente le cellule CD38-, determinando, alla ripresa, un aumento delle cellule CD38+. Tuttavia sono stati identificati casi in cui l'espressione di CD38 varia anche in assenza di trattamento, sia nel senso di un aumento, sia di una diminuzione. Ciò limita la sua utilità nel definire la prognosi, tanto che negli ultimi anni ad esso vengono preferiti marcatori più attendibili e stabili nel tempo<sup>47,53,54</sup>.

**3) L'espressione intracitoplasmatica della protein chinasi associata alla catena ζ del TCR di 70 kDa (ZAP-70).** L'identificazione di questo nuovo fattore prognostico si deve alle indagini condotte con la tecnica del DNA microarray sulle cellule di LLC SHM+ o SHM- per determinare se vi fossero differenze nell'espressione genica<sup>55</sup>. Il gene codificante ZAP-70 è risultato quello che meglio correla con lo stato mutazionale delle Ig, essendo espresso nei casi non mutati e non espresso nei casi mutati<sup>56</sup>. Il grado di correlazione, in realtà, non è concorde in tutti gli studi condotti a tal proposito, variando da un valore minimo del 77%<sup>57</sup> ad uno massimo del 95%<sup>58</sup>. Queste differenze sono state attribuite alla presenza di altri fattori prognostici indipendenti, in particolare ad alcune alterazioni cromosomiche (del 17p e del 11q)<sup>59</sup>. La valutazione combinata di ZAP-70 e CD38 si è

dimostrata in grado di predire con un alto livello di confidenza sia la sopravvivenza globale che l'intervallo libero da terapia; questi due fattori sono quindi di estrema utilità nella valutazione dei pazienti in stadio precoce di malattia soprattutto al fine di definire una strategia terapeutica "risk adapted"<sup>60</sup>. L'analisi dell'espressione di ZAP-70 può essere effettuata per mezzo di diverse metodiche: la citofluorimetria, l'immunoistochimica, il western-blotting, la quantificazione dell'mRNA per mezzo di RT-PCR. Tra queste, quella che appare come la più vantaggiosa soprattutto per la sua ampia diffusione e semplicità di applicazione è la citofluorimetria.

**4) La presenza di alterazioni cromosomiche.** Le più frequenti sono alcune delezioni (11q22-23, 17p13, 13q14, 6q21) e la trisomia del cromosoma 12. Per mezzo della metodica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), effettuata sui nuclei in interfase dei linfociti leucemici, è possibile identificare la presenza di aberrazioni cromosomiche nell'80% circa dei casi. La prevalenza delle alterazioni più comuni è stata così stimata da uno studio multicentrico condotto in Germania: 13q- 55%; 11q- 18%; +12 16%; 17p- 7%; 6q- 7%<sup>61</sup>. Per ciascuna di queste alterazioni sono stati identificati un valore prognostico e una correlazione con specifiche caratteristiche cliniche della malattia: la delezione 13q, se è l'unica alterazione presente, si associa ad una morfologia cellulare tipica ed a un decorso clinico indolente; la trisomia 12 si associa alla forma atipica di LLC; la delezione 6q identifica un sottogruppo di casi a prognosi intermedia; la delezione 11q e la delezione 17p sono invece associate ad un decorso clinico aggressivo, con marcata linfadenomegalia e aumentata resistenza al trattamento. A questo proposito, l'US Intergroup Phase III Trial ha recentemente dimostrato, con uno studio prospettico, che rispetto agli altri marcatori prognostici, solo l'indagine citogenetica ha rilevanza nel predire l'intervallo libero da progressione della malattia dopo terapia con Fludarabina. La presenza di alterazioni cromosomiche ad alto rischio giustifica dunque il ricorso a trattamenti più aggressivi<sup>62</sup> (fig. 7). Le alterazioni cromosomiche sono indipendenti dallo stato mutazionale, anche se appare evidente una maggior frequenza di 11q- e 17p- tra i casi non mutati e di 13q- tra i casi mutati. Tuttavia, circa i due terzi dei casi non mutati non mostra alcuna alterazione cromosomica con un riconosciuto valore prognostico negativo. Questo dato

comporta che la citogenetica possa venire utilizzata quale ulteriore strumento di stratificazione del rischio da affiancare agli altri marcatori prognostici<sup>63,64</sup>.



**Figura 7. Curve di sopravvivenza relative alle più comuni alterazioni cromosomiche in pazienti con LLC.** I tempi di sopravvivenza media per i gruppi con del(17p), del(11q), 12+, cariotipo normale e del(13q) sono pari rispettivamente a 32, 79, 114, 111, 133 mesi. (Modificata da Dohner H et al. N Engl J Med 2000; 343: 1910-1916).

**5) L'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC.** L'analisi dell'attività telomerasica si è dimostrata altamente predittiva riguardo alla probabilità di sopravvivenza, essendo stata osservata una significativa differenza tra soggetti con alti livelli di hTERT, a prognosi peggiore, rispetto a quelli con bassi o indeterminabili livelli di hTERT. Un analogo significato è stato attribuito all'analisi della lunghezza dei frammenti di restrizione dei telomeri. Inoltre, approfondendo la loro associazione con lo stato mutazionale delle IgV<sub>H</sub>, entrambi questi fattori si sono dimostrati in grado di differenziare, all'interno dei due gruppi caratterizzati da una percentuale di mutazioni maggiore o minore del 2%, due sottogruppi con prognosi significativamente diversa. In particolare, il livello di hTERT si è rivelato efficace nello stratificare con maggior precisione il rischio di progressione tra i pazienti con IgV<sub>H</sub> mutate, mentre la lunghezza dei frammenti di restrizione

telomerici assume un maggior valore predittivo tra i pazienti con IgV<sub>H</sub> non mutate<sup>65,66</sup> (fig. 8).

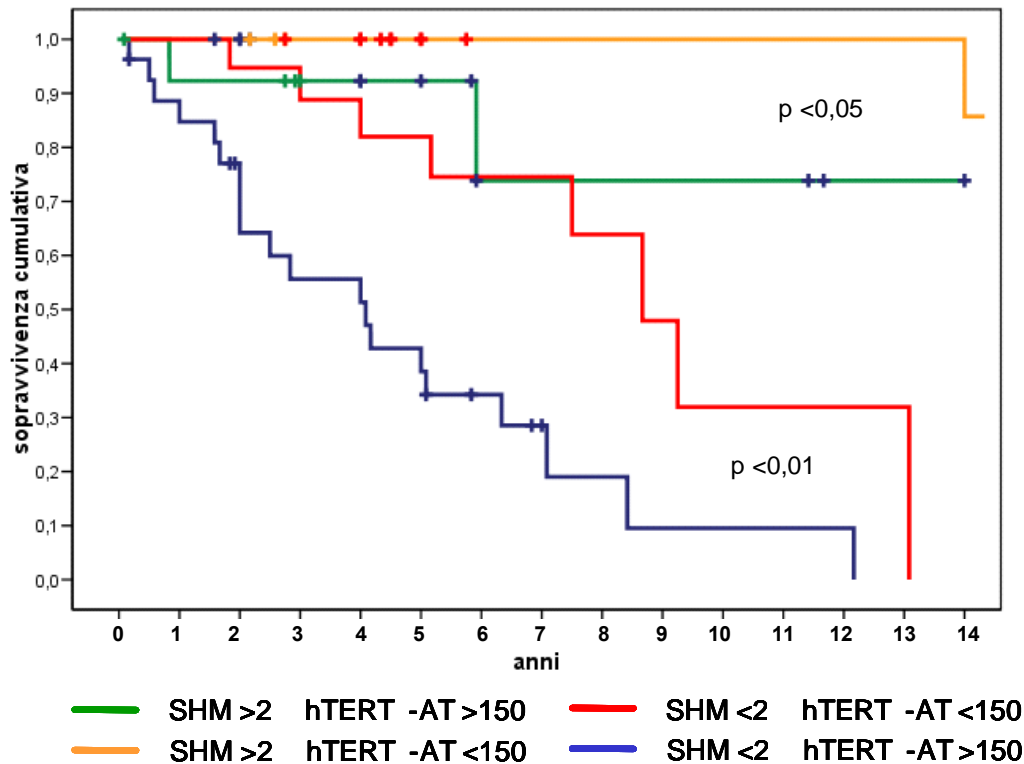


Figura 8. Curve di sopravvivenza relative ai gruppi di pazienti mutati e non mutati, differenziati secondo il livello di espressione di tutti i trascritti della telomerasi (hTERT-AT). Terrin L et al. Leukemia 2007; 21 : 965-972.

Pur essendosi dimostrati tutti dotati di un sicuro potere predittivo, i fattori prognostici biologici più recenti richiedono ulteriori studi clinici controllati per standardizzarli e per rendere unanime la loro identificazione ed interpretazione, al fine di poter definire, con maggior sicurezza, la loro capacità di indicare il miglior atteggiamento terapeutico<sup>67</sup>. A questo scopo sono in corso numerosi studi prospettici, sia su pazienti in stadi precoci di malattia, sia su pazienti in stadi più avanzati.

## Trattamento

La decisione su quando iniziare un trattamento nella LLC-B dipende dai sintomi clinici, dallo stadio e dall'attività della malattia. Una terapia citostatica è



sempre indicata nei pazienti ad alto rischio (stadio 3 e 4 di Rai, C di Binet), mentre nei pazienti a rischio intermedio e basso (stadio 0,1 e 2 di Rai, A e B di Binet) l'indicazione si pone solo se si è in presenza di: tempo di raddoppiamento linfocitario inferiore ad un anno; aumento delle linfadenopatie; sintomi legati all'ingombro splenico e/o all'ipersplenismo; comparsa di sintomi sistemici (sintomi B) e/o di prurito. Negli altri casi, è indicata una strategia di "watch and wait"<sup>68</sup>.

Le possibilità terapeutiche comprendono farmaci con diversi meccanismi d'azione, fino ad opzioni più radicali come l'auto/allotropiano di cellule staminali. In ogni caso, dato il carattere indolente della patologia, la terapia non mira alla completa guarigione, cioè all'eliminazione del clone leucemico, ma si limita a controllarne l'espansione.

La scelta della terapia è legata all'età e allo stato generale del paziente. Nei pazienti più anziani (>65), la terapia di prima scelta è costituita dall'associazione di clorambucile (10mg/die per 1-4 settimane) e prednisone (25mg/die per 1-4 settimane) mentre in alcuni casi la terapia si basa sull'uso di fludarabina, da sola o associata a ciclofosfamide. La constatazione che il trattamento con clorambucile è in grado di indurre una risposta in almeno il 70% dei casi, ma che solo nel 10% si tratta di una risposta completa e che non ha effetti sulla sopravvivenza, lo rende attualmente adatto ad una terapia prevalentemente palliativa, con somministrazioni giornaliere fino al raggiungimento di una risposta massima o al sopraggiungere di effetti tossici. Gli steroidi non hanno dimostrato un effetto rilevante sulla sopravvivenza mentre sono ben noti i loro effetti avversi, in particolare nel favorire le infezioni opportunistiche. Tuttavia, essi sono utilizzati per contenere le complicanze autoimmuni della malattia<sup>69</sup>.

Negli anni passati, sulla base delle esperienze nel campo dei linfomi a basso grado, si è tentato di utilizzare combinazioni di chemioterapici quali CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina, Prednisone) o COP (Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone); sebbene essi diano con elevata frequenza risposte complete, non hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza a fronte, peraltro, di una maggiore tossicità. Attualmente rappresentano un'opzione utilizzabile nei pazienti ad alto rischio che richiedono un'azione terapeutica energica<sup>70,71</sup>.

Dalla metà degli anni novanta, il trattamento di prima scelta per gran parte dei casi di LLC è rappresentato dall'uso degli analoghi delle purine. In questa classe di farmaci sono annoverati la Pentostatina, la Cladribina e la Fludarabina; il primo è

un inibitore della adenosina deaminasi, mentre gli altri due agiscono come inibitori della DNA-polimerasi. Tra questi, quello che si è dimostrato più efficace nella LLC-B è la Fludarabina (25-30mg/m<sup>2</sup> per 5 giorni al mese, per 3-6 mesi). Essa, utilizzata singolarmente, è in grado di dare una risposta globale nell'80% dei casi e una risposta completa nel 30% dei casi; inoltre, rispetto alla combinazione Clorambucile-Prednisone, la durata delle remissioni raggiunte è maggiore. Gli effetti collaterali sono prevalentemente dovuti alla mielosoppressione<sup>72</sup>. Nonostante gli effetti positivi in termini di risposta globale, la Fludarabina e gli altri analoghi delle purine non si sono dimostrate altrettanto efficaci nel migliorare il tasso di sopravvivenza rispetto al Clorambucile o agli agenti alchilanti<sup>73-76</sup>. Attualmente si ritiene che gli analoghi delle purine possano avere un'azione sinergica con gli alchilanti, impedendo la riparazione dei danni inflitti da questi al DNA delle cellule leucemiche<sup>77</sup>. Sulla base di questo presupposto sono stati condotti alcuni trials clinici utilizzando combinazioni di questi farmaci. Il già citato US Intergroup Trial ha recentemente dimostrato che la combinazione di Ciclofosfamide e Fludarabina è in grado, rispetto alla sola Fludarabina, di dare un maggior tasso di risposta globale (74,3% vs 59,5%), di risposte complete (23,4% vs 4,6%) ed un aumento della sopravvivenza libera da malattia (31,6 vs 19,2 mesi). Al contrario, la combinazione dei due farmaci ha comportato una maggiore tossicità midollare, con maggior incidenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia, senza che questo determinasse un aumento delle complicanze infettive<sup>78</sup>.

Un ulteriore passo in avanti è stato compiuto con l'introduzione dell'immunoterapia, cioè l'uso di anticorpi monoclonali (AcMo) diretti contro antigeni di superficie delle cellule leucemiche. Il Rituximab è un AcMo chimerico diretto contro il CD20, un antigene espresso su tutti i linfociti B ma che nella LLC-B è caratteristicamente espresso a bassa intensità. Per questo motivo il Rituximab possiede solo una modesta attività se utilizzato singolarmente. Tuttavia, studi preclinici hanno evidenziato la capacità del Rituximab di aumentare l'efficacia di farmaci citotossici in linee cellulari resistenti, alterando la trasmissione dei segnali antiapoptotici; un esempio di come ciò accada è il blocco da parte del farmaco del recettore per IL-10 che inibisce l'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2<sup>79,80</sup>. Inoltre, si è osservato che la Fludarabina è in grado di aumentare l'efficacia del Rituximab nell'indurre la lisi cellulare mediata dal complemento, attraverso la "down-regulation" cellulare delle proteine regolatorie del complemento CD55 e

CD59<sup>81</sup>. L'associazione del Rituximab alla Fludarabina e alla Ciclofosfamide è stata valutata in alcuni studi sia come terapia iniziale sia nei casi recidivanti o refrattari a terapie precedenti. In entrambi i casi, essa ha dimostrato un miglioramento del tasso di risposte globali e complete, queste ultime documentate anche a livello molecolare. Nei pazienti mai trattati precedentemente, la sopravvivenza libera da malattia si è dimostrata superiore a quattro anni in circa i due terzi dei pazienti<sup>82,83</sup>. Gli effetti avversi del Rituximab sono essenzialmente correlati all'infusione endovenosa, a causa del rilascio di citochine (febbre, brividi, ipotensione, nausea); essendo più comuni alla prima infusione, si possono contenere adottando inizialmente dosi ridotte, per poi aumentarle gradualmente.

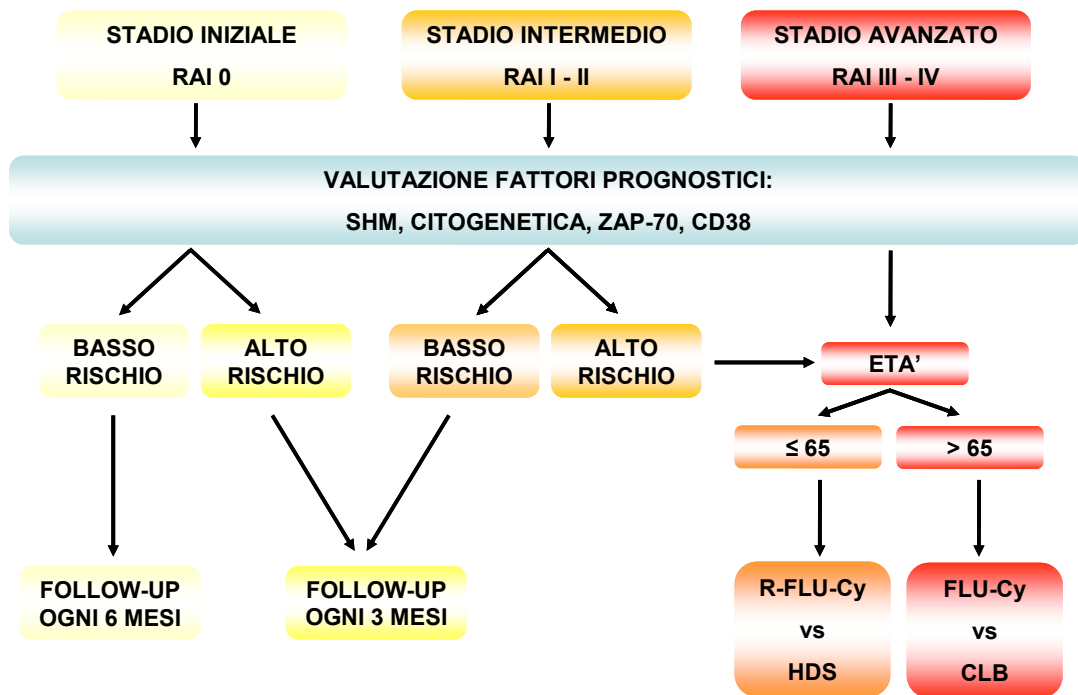
Il Campath-1H (alemtuzumab) è un AcMo diretto contro il CD52, espresso nel 95% dei linfociti umani, nei monociti e nei macrofagi. Può essere somministrato per via sottocutanea. Si è dimostrato molto efficace nell'indurre remissione nei pazienti con LLC recidivante o refrattaria, con buoni risultati anche nei pazienti mai trattati in precedenza. Inoltre, può venire utilizzato nei pazienti che hanno risposto alla Fludarabina per eliminare la malattia residua midollare<sup>84</sup>. Tuttavia, esso può provocare un'immunosoppressione marcata, per cui è necessaria una terapia di profilassi per l'infezione da *Pneumocistis carinii* e VZV, oltre al monitoraggio della riattivazione del CMV. L'associazione con Fludarabina e Ciclofosfamide è gravata da importante tossicità midollare, evento che comporta una particolare precauzione in termini di tempistica e durata di somministrazione dell'alemtuzumab<sup>85</sup>.

Gli studi sulla patogenesi della LLC-B hanno offerto altri bersagli terapeutici; uno di questi è la proteina anti-apoptotica Bcl-2, che, nei pazienti in cui risulta espressa, si associa alla resistenza ai farmaci comunemente utilizzati. Un recente trial clinico randomizzato di fase III ha valutato l'efficacia dell'Oblimersen, un oligonucleotide antisense che, legandosi all'mRNA di Bcl-2, ne inibisce la traduzione, associato a Fludarabina e Ciclofosfamide. Esso si è dimostrato efficace nel migliorare la percentuale di risposte globali e complete nei pazienti refrattari o recidivanti esaminati, rispetto alla sola associazione di Fludarabina e Ciclofosfamide<sup>86</sup>.

Il trapianto di cellule staminali è un'opzione possibile ma ancora non ben definita. Il trapianto autologo ha un alto tasso di risposte complete, ma è gravato da un'elevata probabilità di recidiva e sono necessari ulteriori studi che ne confrontino il rapporto rischio-beneficio rispetto alla chemioterapia. L'allogtrapianto è indicato

nei pazienti refrattari in stadio avanzato ma, pur essendo l'unica strategia potenzialmente in grado di guarire dalla malattia, è fortemente limitato dall'età del paziente, che non può essere superiore ai 45 anni<sup>87,88</sup> (fig. 9).

Oltre alla terapia citoriduttiva, la LLC si avvale anche di terapie sostitutive e di supporto, quali le emotrasfusioni di emazie o di piastrine, l'antibioticotераpia e la somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa.



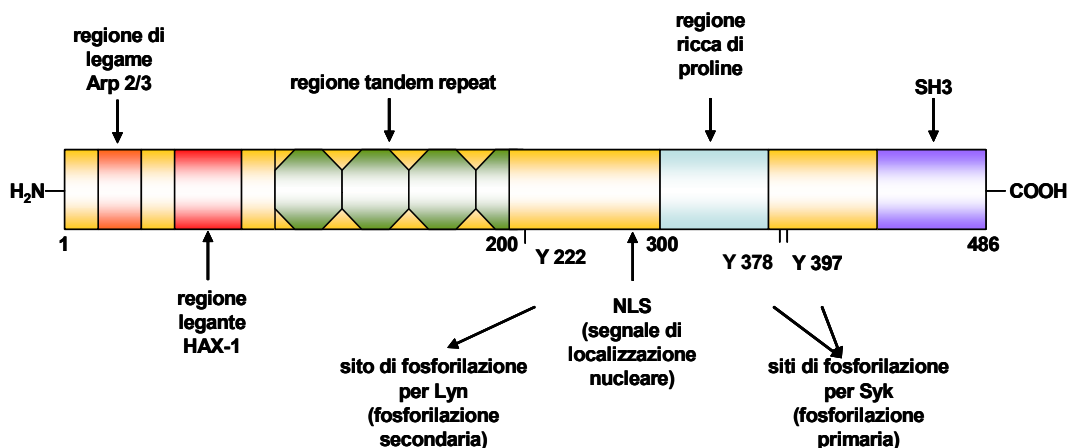
**Figura 9. Possibile schema decisionale per il trattamento della LLC.** R-FLU-Cy: Rituximab, Fludarabina, Ciclofosfamide; HDS: Chemioterapia ad alte dosi; CLB: Clorambucile.

## Hematopoietic lineage cell-Specific Protein 1 (HS1)

HS1 o HCLS1 (Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1) è una proteina di 75 KDa, costituita da 486 aminoacidi prevalentemente idrofilici, ed è il primo marcatore ematopoietico scoperto, anche se la sua presenza è stata recentemente documentata nel tessuto polmonare sano ed in alcuni tumori solidi<sup>89,90</sup>. Il gene codificante la proteina HS1 mappa nel cromosoma 3q13 e sembra originare da un evento di duplicazione genica, assieme al gene della cortactina, proteina omologa ad HS1<sup>91</sup>.

La struttura di HS1 è funzionale alla sua interazione con altre proteine del signalosoma, nella cascata di trasduzione del segnale che parte dal BCR, e ad un eventuale ruolo nella regolazione dell'espressione genica<sup>89</sup>. La metà N-terminale è prevalentemente basica, mentre quella C-terminale ha una maggiore percentuale di aminoacidi acidi. A partire dall'estremità N-terminale di HS1 sono presenti i seguenti elementi strutturali (fig. 10):

- una regione acida N-terminale, con un motivo Asp-Asp-Trp, capace di legare il complesso Arp2/3 (Actin related protein 2/3)<sup>92</sup>. Tale regione è presente anche in proteine coinvolte nel riarrangiamento citoscheletrico, come WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein);
- una regione responsabile del legame con la proteina mitocondriale HAX-1 (HS1 Associated protein X-1), che è simile a Bcl-2<sup>93,94</sup>;
- una sequenza di 37 aminoacidi, ripetuta tre volte e mezzo, dotata di un'organizzazione secondaria del tipo "elica-giro-elica", struttura presente in molti fattori di trascrizione, e in grado di legare l'actina del citoscheletro<sup>89-91</sup>;
- un dominio con struttura ad  $\alpha$ -elica, contenente un segnale di localizzazione nucleare (NLS)<sup>91</sup>;
- una regione centrale ricca di proline, che termina con una ripetizione di prolina-glutammato, capace di interagire col dominio SH3 di diverse proteine come ad esempio le tirosin-chinasi della famiglia Src (Lck, Lyn);
- un dominio SH3 all'estremità C-terminale, che presenta un'alta percentuale di omologia con quello della cortactina, sebbene leghi proteine differenti<sup>91-95</sup>.



**Figura 10. Struttura schematica della proteina HS1.** I numeri indicano i residui tirosinici fosforilati dalla chinasi Syk nella fosforilazione primaria (Y378 e Y397) e quello fosforilato dalle chinasi Src nella fosforilazione secondaria (Y222).

HS1 non è dotata né di un peptide segnale, né di siti di N-glicosilazione, né di una regione transmembrana, ma contiene diversi potenziali siti di fosforilazione<sup>89</sup>. Si tratta di una proteina intracellulare a prevalente localizzazione citoplasmatica<sup>90</sup> e, in minor misura, nucleare, la cui funzione non è ancora chiara.

È stato dimostrato che, a seguito del *cross-linking* recettoriale, HS1 è fosforilata in tirosina<sup>96</sup> nei linfociti B e T, nei mastociti e negli eritrociti<sup>91</sup> ad opera delle tirosin-chinasi non recettoriali Syk e Lyn<sup>97,98</sup>.

HS1 segue un modello di fosforilazione sequenziale, secondo cui Syk dona un gruppo fosfato ai siti di fosforilazione primaria (Tyr-378 e Tyr-397), generando siti di legame ad alta affinità per il dominio SH2 delle Src-chinasi (il legame è una condizione necessaria perché avvenga la fosforilazione secondaria). Successivamente HS1 viene fosforilata dalla tirosin-chinasi Lyn nel sito di fosforilazione secondaria Tyr-222<sup>97-99</sup>.

In topi Knock Out per HS1, è stato dimostrato un coinvolgimento della proteina nella trasduzione del segnale mediata dai recettori per l'antigene sia nei linfociti B che nei linfociti T, sebbene il ruolo della proteina non sia stato ancora determinato. Inoltre, in modelli murini è stato confermato il ruolo di HS1 nei processi di delezione e di espansione clonale in entrambi i sottotipi linfocitari. L'assenza di HS1 causa un difetto nella proliferazione delle cellule B e T di milza e nel processo apoptotico avviato dopo l'attivazione del BCR<sup>100</sup>. Inoltre, studi condotti su cellule B di linfoma murino (WEHI-231) hanno dimostrato che ridotti livelli della

proteina HS1 si associano a resistenza all'apoptosi, indotta dal legame dell'antigene al BCR<sup>101</sup>.

Recentemente il significato della fosforilazione di HS1 è stato studiato in cellule leucemiche di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica. La fosforilazione della proteina in pazienti con fattori prognostici negativi è risultata costitutiva, mentre in quelli con prognosi più favorevole, la frazione di proteina fosforilata è molto ridotta. Dopo stimolazione del BCR con anti-IgM, si verifica un aumento della fosforilazione di HS1. Sembra, quindi, che nei pazienti leucemici la fosforilazione sia dovuta ad un'attivazione persistente della via di trasduzione del segnale che fa capo al BCR. Pazienti che mostrano una predominanza della forma fosforilata della proteina hanno una sopravvivenza media significativamente ridotta<sup>102</sup>.

La proteina HS1 è substrato della caspasi 3 nell'apoptosi indotta dall'anticorpo anti-Fas (CD95) in cellule Jurkat<sup>103</sup>. Il taglio indotto dalla caspasi 3 potrebbe inattivare la proteina, tuttavia è possibile che alcuni dei frammenti prodotti acquistino una nuova funzione, per esempio trascrizionale, richiesta per il processo apoptotico<sup>104</sup>. È stato, inoltre, osservato che la fosforilazione di HS1 in ser/thr da parte della chinasi CK2 nelle cellule Jurkat rende la proteina resistente al taglio della caspasi 3, con conseguente effetto anti-apoptotico<sup>103</sup>. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione di HS1, è ipotizzabile che la sua funzione sia mediata dall'interazione con altre proteine. È stata individuata una proteina di 35 kDa, HAX-1, localizzata prevalentemente nei mitocondri e, in minor misura, nel reticolo endoplasmatico e nella membrana nucleare, in grado di interagire con HS1<sup>93</sup>. Alcuni studi hanno ipotizzato che HS1 possa trasmettere il segnale del recettore per l'antigene agli organelli subcellulari, interagendo con HAX-1, dotata di una funzione antiapoptotica. Il legame di HS1 ad HAX-1 potrebbe annullare l'effetto antiapoptotico di HAX-1, ma il meccanismo non è ancora noto<sup>93,94</sup>.

Grazie al dominio costituito da una sequenza di 37 aminoacidi ripetuta per tre volte e mezzo, HS1 è in grado di legare l'actina<sup>91</sup>. Inoltre, HS1 è in grado di interagire con il complesso Arp 2/3, essenziale nell'assemblaggio dell'actina, ragion per cui è stato proposto un coinvolgimento di HS1 nelle modificazioni dell'actina e, quindi, del citoscheletro<sup>91,92,105</sup>. Infine, dopo l'attivazione del BCR, la proteina HS1, fosforilata da Syk, è reclutata assieme al complesso Arp 2/3 nei microdomini di membrana ricchi in colesterolo e in glicosfingolipidi, dove promuoverebbe

l'assemblaggio dei filamenti di actina nel meccanismo di presentazione dell'antigene e di formazione delle sinapsi immunologiche<sup>106,107</sup>.



## SCOPO DELLA TESI

Questo progetto di ricerca ha previsto lo studio di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale dei linfociti B di LLC. Il clone neoplastico, infatti, è caratterizzato da una trasduzione del segnale difettiva rispetto alle cellule normali, cui si aggiunge la presenza di difetti nei meccanismi di apoptosi. Entrambi questi processi prevedono una serie di fosforilazioni e defosforilazioni, mediate da tirosin chinasi, che regolano l'attività cellulare.

Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che la protein-chinasi Lyn, una delle prime molecole ad essere coinvolta nel signalling del BCR, è overespressa, costitutivamente attiva e distribuita in modo anomalo nei linfociti B neoplastici di LLC-B rispetto ai linfociti B dei soggetti normali. Di conseguenza, la nostra attenzione si è focalizzata sui substrati di Lyn e, in particolare, sulla proteina HS1 per verificare un suo eventuale coinvolgimento nella patogenesi della LLC-B.

In particolare, in questa tesi abbiamo analizzato:

- l'espressione di HS1 nei linfociti neoplastici di pazienti affetti da LLC, per vedere se essa fosse aumentata rispetto ai soggetti sani, analogamente a quanto riscontrato per la chinasi Lyn;
- il significato clinico di HS1, in particolar modo il suo ruolo prognostico;
- la modificazione dell'espressione di HS1 nei pazienti dopo terapia;
- la localizzazione di HS1 nelle cellule leucemiche di pazienti con LLC e nei linfociti B normali;
- le sue modificazioni dopo stimolazione del BCR;
- infine, considerata l'interazione di HS1 con l'actina nei linfociti normali, ne abbiamo analizzato l'interazione con elementi del citoscheletro.

La caratterizzazione della proteina HS1 è stata eseguita mediante l'utilizzo di metodiche biochimiche (western blotting e immunoprecipitazione), di biologia cellulare, biologia molecolare (real time-PCR) e di microscopia confocale.



# MATERIALI E METODI

## Pazienti

In questa tesi sono stati analizzati 43 pazienti (26 maschi e 17 femmine) di età compresa tra i 42 e i 95 anni, affetti da LLC-B, afferenti all'Unità Operativa di Ematologia e Immunologia Clinica del Policlinico Universitario di Padova. Di questi pazienti, solo uno presentava sintomi di tipo B alla diagnosi.

Di ciascun paziente sono stati valutati: la concentrazione di emoglobina, il numero delle piastrine e quello dei leucociti, la percentuale di linfociti e lo stadio clinico secondo Rai alla diagnosi. Il valori dell'emoglobina alla diagnosi erano compresi fra 6,7 e 17,0g/dl, quelli delle piastrine fra 81.000 e 561.000/ $\mu$ l e quelli dei globuli bianchi variavano da 8.300 a 311.00/ $\mu$ l con una percentuale di linfociti compresa tra il 43% e il 95%. 13 pazienti si presentavano in stadio 0, 14 in stadio 1, 8 in stadio 2, 2 in stadio 3 e 6 in stadio 4.

Mediante analisi citofluorimetrica abbiamo caratterizzato le cellule B utilizzando un pannello di AcMo diretti verso i seguenti Ag: CD5, CD19, CD23 (non inserito in tabella), CD38, CD79b, IgD, IgM e ZAP-70; i risultati di tale indagine sono stati riportati in tabella I. Tutti i linfociti B leucemici dei 43 pazienti presi in esame erano positivi per i marcatori CD5, CD19 e CD23, tipicamente coespressi nella LLC-B e quelli di 13 soggetti lo erano anche per CD38. Mediante metodiche di biologia molecolare è stato valutato lo stato mutazionale dei geni  $IgV_H$ : 16 soggetti su 43 sono risultati privi di SHM nella regione variabile delle Ig. Per i nostri esperimenti, abbiamo utilizzato come controlli normali i linfociti B ottenuti dal sangue periferico di 26 soggetti sani.

I pazienti 13, 14, 20, 22, 26, 27, 31, 37, 41 e 43, di cui sono stati valutati i livelli di HS1 pre e post-chemioterapia, sono stati sottoposti a trattamento convenzionale con AcMo anti-CD20 (rituximab), secondo lo schema R-FC, a base di rituximab 375mg/m<sup>2</sup> per 1 giorno, fludarabina 25mg/m<sup>2</sup> per 3 giorni e ciclofosfamide 350mg/m<sup>2</sup> per 3 giorni, ogni 28 giorni; questa terapia viene somministrata in pazienti con prognosi sfavorevole alla diagnosi.

**Tabella I. Caratteristiche ematochimiche, cliniche, immunofenotipiche e molecolari dei 43 pazienti presi in esame in questo studio.**

paziente n°	età (anni)	sex	stadio RAI	WBC (/mm3)	linfociti %	stato mutazionale	ZAP70 %	CD19/5 %	CD19/38 %	CD79b %	sigM %	sigD %
1	83	M	0	53.000	43	mutato	NEG	91	NEG	65	8	96
2	49	M	0	30.000	88	mutato	POS	87	POS	69	10	52
3	65	F	0	13.000	76	mutato	POS	61	NEG	98	56	89
4	58	M	0	22.000	84	mutato	POS	87	NEG	90	31	49
5	73	F	0	22.000	80	non mutato	POS	87	NEG	97	NEG	NEG
6	63	M	0	20.000	80	mutato	NEG	60	NEG	2	NEG	NEG
7	48	F	0	33.000	83	non mutato	NEG	86	NEG	89	14	4
8	62	F	0	43.000	68	mutato	POS	70	NEG	75	17	68
9	47	M	0	11.300	58	non mutato	POS	65	NEG	89	4	11
10	50	M	0	8.300	65	mutato	NEG	95	NEG	8	NEG	17
11	74	M	0	68.000	85	mutato	NEG	71	NEG	82	NEG	67
12	63	F	0	28.000	82	non mutato	NEG	92	NEG	91	12	6
13	57	M	0	110.000	82	non mutato	NEG	91	POS	94	NEG	8
14	74	M	I	80.000	88	non mutato	POS	90	POS	13	16	18
15	80	M	I	9.300	48	nd	NEG	51	POS	98	66	39
16	67	M	I	33.000	85	mutato	POS	71	POS	98	99	94
17	74	F	I	25.000	85	non mutato	POS	86	POS	64	74	57
18	61	M	I	9.700	60	mutato	NEG	55	NEG	97	30	39
19	67	M	I	24.000	89	non mutato	POS	77	NEG	76	NEG	34
20	49	F	I	101.000	77	mutato	NEG	97	NEG	49	15	42
21	59	M	I	11.500	78	mutato	POS	81	NEG	72	NEG	NEG
22	83	M	I	84.000	81	non mutato	NEG	70	NEG	12	6	61
23	77	M	I	41.000	88	mutato	POS	76	NEG	24	26	12
24	61	M	I	80.000	95	non mutato	POS	90	POS	91	2	NEG
25	64	M	I	100.000	66	mutato	POS	73	POS	89	73	37
26	52	F	I	109.000	86	mutato	NEG	96	NEG	45	16	42
27	75	M	I	60.000	84	mutato	NEG	96	NEG	97	NEG	NEG
28	66	F	II	31.000	77	nd	NEG	92	NEG	91	5	85
29	42	F	II	22.000	76	mutato	NEG	75	NEG	53	3	57
30	68	F	II	60.000	95	mutato	POS	92	NEG	46	47	35
31	69	F	II	67.000	95	mutato	POS	95	NEG	45	43	32
32	64	F	II	48.000	80	nd	NEG	89	NEG	88	31	35
33	62	M	II	27.000	79	nd	NEG	80	NEG	92	10	62
34	60	M	II	22.000	49	mutato	NEG	82	NEG	5	13	30
35	43	M	II	42.000	81	non mutato	POS	64	POS	70	85	15
36	65	F	III	25.000	85	non mutato	POS	57	NEG	57	11	40
37	81	M	III	34.000	88	non mutato	POS	79	POS	12	NEG	6
38	77	M	IV	14.000	58	mutato	NEG	81	POS	75	NEG	NEG
39	55	M	IV	77.000	82	mutato	NEG	89	POS	100	22	71
40	95	F	IV	40.000	90	mutato	NEG	57	NEG	100	58	99
41	71	F	IV	70.000	92	non mutato	POS	95	NEG	95	47	60
42	71	F	IV	25.000	90	non mutato	POS	92	NEG	90	45	60
43	63	M	IV	311.000	90	non mutato	POS	96	POS	34	NEG	NEG

## Analisi immunofenotipica

L'analisi immunofenotipica dei linfociti ottenuti dal sangue periferico dei pazienti affetti da LLC-B è stata eseguita mediante analisi citofluorimetrica, una tecnica che consente la valutazione multiparametrica delle caratteristiche antigeniche di singole cellule attraverso l'analisi della luce visibile e fluorescente che queste emettono mentre fluiscono attraverso un mezzo liquido.

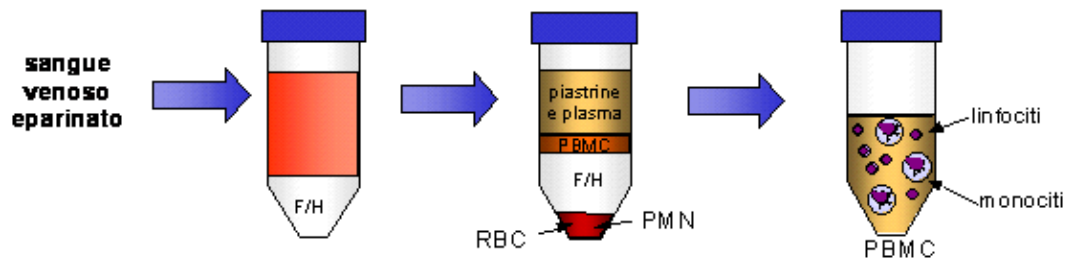
L'immunofenotipizzazione si basa sull'identificazione di antigeni di superficie e citoplasmatici grazie alla disponibilità di AcMo coniugati con fluorocromi. La presenza di un dato antigene è rilevata ed utilizzata come indicatore dell'appartenenza ad una linea cellulare, nonché del suo livello maturativo. I fluorocromi usati in questa tesi sono stati l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), che emette un segnale di fluorescenza a 530nm (verde), la ficoeritrina (PE), che emette a 585nm (rosso) ed il TRI-COLOR (TC) che, invece, emette a 667nm, quando colpiti da un fascio laser monocromatico con  $\lambda$  uguale a 488 nm; infine, l'allofococianina (APC), che emette un segnale di fluorescenza a 690nm, quando eccitata da un fascio laser monocromatico di  $\lambda$  di 635nm.

I campioni cellulari sono stati analizzati con citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) e i dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando il programma Cell Quest. Per ogni analisi sono stati acquisiti 15.000 eventi.

## **Separazione dei linfociti dal sangue periferico**

I linfociti dei nostri pazienti affetti da LLC-B sono stati isolati dal sangue periferico. Da un prelievo di sangue venoso eparinato si sono ottenute le cellule mononucleate procedendo con una stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H). Tale metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Le cellule mononucleate e le piastrine, a minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa i globuli rossi e i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta. Le piastrine sono state separate dalle cellule mononucleate mediante lavaggi successivi.

Il sangue periferico è stato prima diluito in rapporto 1:6, data l'alta conta leucocitaria dei pazienti con LLC, con sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si è proceduto con una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti a 20°C con freno (fig.11); il fondello è stato risospeso in una quantità adeguata di soluzione fisiologica e le cellule sono state contate nella camera di Burker.



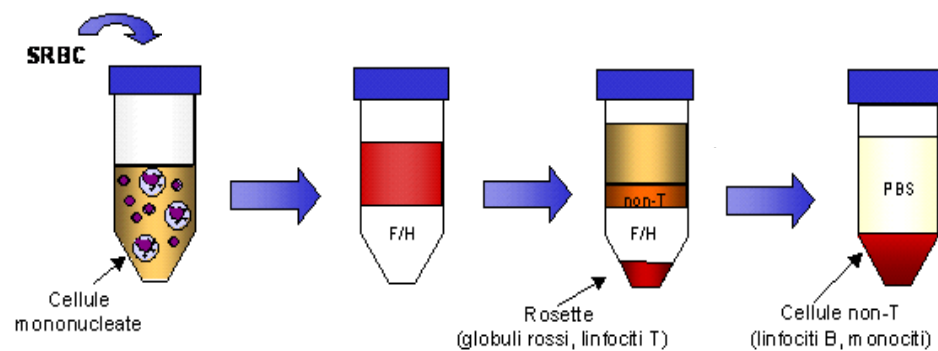
**Figura 11. Isolamento delle cellule mononucleate dal sangue periferico.** Tramite centrifugazione su F/H sono state isolate le cellule mononucleate dal sangue periferico (monociti e linfociti). Le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano sopra lo strato di F/H perché hanno densità minore; al contrario, i globuli rossi (RBC) e i granulociti hanno una maggiore densità rispetto al F/H e si raccolgono sul fondo della provetta.

## **Purificazione dei linfociti B mediante rosettazione con SRBC**

Nella maggioranza dei casi di LLC, la percentuale di cellule B leucemiche era superiore all'85% dei PBMC (peripheral blood mononuclear cells) isolati; nei casi in cui la popolazione cellulare presentava una percentuale di linfociti T superiore al 15%, abbiamo effettuato la purificazione dei linfociti B tramite rosettazione con globuli rossi di montone (SRBC) trattati con neuroaminidasi. La rosettazione permette di rimuovere i linfociti T dalle altre cellule mononucleate, sfruttando la loro capacità di legarsi e formare rosette con i SRBC. Questi ultimi, infatti, esprimono sulla loro superficie il recettore specifico per il marcatore CD2 dei linfociti T; il trattamento con neuroaminidasi degli SRBC rende più accessibile il recettore al legame con il CD2.

Aliquote da  $25 \times 10^6$  di cellule mononucleate sono state trasferite in un tubo da centrifuga da 10ml, dove è stato aggiunto 1ml di SRBC trattati con neuroaminidasi. PBMC e globuli sono stati, quindi, incubati a 37°C per 25 minuti, al termine dei quali sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti a 200g senza freno e successivamente sottoposti ad una nuova incubazione a 4°C per 30 minuti. È stato successivamente aspirato il sovrantante ed è stato aggiunto terreno di coltura RPMI 1640 (Invitrogen; Paisley, UK). La miscela è stata risospesa delicatamente, successivamente stratificata sopra la soluzione di F/H e centrifugata a 4°C per 20

minuti a 900g senza freno: i linfociti T circondati dai globuli rossi di montone, definiti “rosette”, si depositano sul fondo della provetta, avendo una densità superiore a quella dello strato di F/H, mentre le cellule mononucleate non T (monociti e linfociti B) si concentrano al di sopra dello strato di F/H (fig. 12). Lo strato presente all’interfaccia, che contiene cellule non T, è stato trasferito in una provetta da 10ml. Sono stati eseguiti due lavaggi con soluzione fisiologica a 400g a 20°C per 10 minuti con freno e, al termine, le cellule sono state risospese in fisiologica e contate nella camera di Burker.



**Figura 12. Rosettazione dei linfociti B ottenuti dalla separazione su F/H.** Se le cellule mononucleate ottenute mediante separazione su F/H contengono una percentuale di linfociti T  $\geq 15\%$ , si utilizza la tecnica della rosettazione per rimuovere questi ultimi. La rosettazione sfrutta la capacità dei linfociti T di legarsi, mediante il loro marcatore CD2, ai SRBC trattati con neuroaminidasi e di formare rosette che vengono rimosse tramite ulteriore stratificazione su F/H.

## Purificazione dei linfociti B mediante *kit* RosetteSep

Per ottenere i linfociti B normali direttamente dal sangue intero di donatori sani, abbiamo utilizzato il *kit* RosetteSep (StemCell Technologies), che sfrutta un *cocktail* di anticorpi diretti contro antigeni di superficie espressi dalle cellule ematopoietiche (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) e la glicoforina A espressa dagli eritrociti, per selezionare negativamente le cellule B dal sangue intero. Questa miscela di anticorpi si lega alle cellule non B e ai globuli rossi creando delle immunorosette. Ad ogni ml di sangue, ottenuto da *buffy coat*, sono stati aggiunti 50 $\mu$ l di RosetteSep e si è proceduto ad un’incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Il campione è stato poi diluito 1:2 con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X + 2%FBS (Fetal Bovine Serum) ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato su F/H. Si è proceduto, quindi, con una centrifugazione a 900g a temperatura

ambiente per 30 minuti cui ha fatto seguito l'aspirazione dell'anello formatosi all'interfaccia F/H contenente le cellule B. Queste ultime sono state risospese in PBS1X + 2%FBS e centrifugate a 400 g per 10 minuti. Infine, le cellule sono state risospese in PBS1X e contate.

## **Colture cellulari**

I linfociti B isolati dal sangue periferico sono stati risospesi in terreno RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, UK) alla concentrazione di  $5 \times 10^6$ /ml e messi in piastre da 12 o da 24 pozzetti. Sono stati aggiunti gli stimoli di interesse e le cellule sono state lasciate ad incubare in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO<sub>2</sub> al 5% e raccolte: dopo 2 e 10 minuti per l'analisi della fosforilazione tirosinica di HS1; dopo 10 minuti per la microscopia confocale; dopo 24 ore per la valutazione dell'apoptosi.

In particolare, le sostanze da noi usate sono state: l'anti-IgM (10µg/ml) (CALTAG; Burlingame, CA) per l'attivazione del BCR; l'inibitore specifico per le Src-chinasi PP2 (10µM) (CALBIOCHEM; Darmstadt, Germania); i farmaci fludarabina (30µM) (SCHERING; Berlino, Germania), clorambucile (30µM), desametasone (10µM), ciclosporina A (8µM) (Sigma Aldrich; Milano, Italia) e il composto EGCG (Epigallo catechin 3-gallato, 10µM) (CALBIOCHEM; Darmstadt, Germania). In alcuni esperimenti le cellule sono state preincubate per 30 minuti con l'inibitore della caspasi 3 Z-VAD fmk (50µM) (CALBIOCHEM; Darmstadt, Germania). Le dosi utilizzate di farmaco sono state scelte in base alla IC<sub>50</sub> (Concentrazione Inibente 50), capace di indurre la morte nel 50% delle cellule, determinata in esperimenti preliminari.

## **Preparazione dei lisati cellulari**

Per ogni campione sono state lisate aliquote da 250.000 e 500.000 di linfociti B in 50µl del seguente tampone:

- Tris-HCl 50mM pH 6,8;
- EDTA 5mM;
- Glicerolo 10%;



- SDS (sodio dodecil solfato) 2%;
- $\beta$ -mercaptoetanolo 1%;
- colorante (blu di bromofenolo o pironina), (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Successivamente tali lisati sono stati agitati, sottoposti a una temperatura di 100°C per 5 minuti e, quindi, a SDS/PAGE (Elettroforesi su Gel di Poliacrilamide).

## **Immunoprecipitazione della proteina HS1 da lisati cellulari**

L'immunoprecipitazione è una metodica immunologica, impiegata per la determinazione quantitativa di una specifica proteina presente in una miscela. Con questa tecnica, l'Ac specifico della proteina bersaglio è aggiunto ad aliquote di lisati cellulari, con conseguente formazione di immunocomplessi. Questi ultimi possono essere poi raccolti con diverse modalità. In questa tesi è stato utilizzato l'adsorbimento dell'immunocomplesso alla proteina G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology; Inc. Santa Cruz, CA). Questa metodica assicura il più alto recupero, in quanto non si ha adsorbimento aspecifico alle biglie di proteina G PLUS-Agarose da parte di proteine contaminanti.

Nel dettaglio, le cellule B purificate (aliquote da  $4 \times 10^6$ ) sono state lisate per 1 ora a 4°C in 500 $\mu$ l del seguente tampone:

- Tris-HCl 20mM, pH 7.5;
- glicerolo 10%;
- Triton X-100 1%;
- EDTA 1mM;
- NaCl 150mM;
- ortovanadato di sodio 1mM;
- cocktail di inibitori proteasici;
- PMSF (fluoruro di fenilmetansulfanide, inibitore delle serin-treonin chinasi) 1mM (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 15 minuti a 15.700g. Al sovranatante sono stati aggiunti 3,5 $\mu$ l di Ac monoclonale anti-HS1 (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) ed il tutto è stato lasciato in agitazione a 4°C per tutta la notte. L'immunocomplesso è stato fatto precipitare aggiungendo 20 $\mu$ l di proteina G PLUS-Agarose, equilibrata in Tris-HCl 50mM pH 7.5 e NaCl 150mM, e lasciando ad

incubare a 4°C per 40 minuti in agitazione. I campioni sono stati poi centrifugati per 3 minuti a 800g su microcentrifuga. Il precipitato, costituito dall'immunocomplesso legato alla proteina G PLUS-Agarose, è stato lavato tre volte con 1ml del tampone Tris-HCl 50mM pH 7.5 e Ortovanadato di sodio 100µM e risospeso in 30µl dello stesso. Infine, il pellet è stato risospeso nel tampone di lisi, descritto nel paragrafo precedente, e successivamente sottoposto a SDS/PAGE.

## **Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS**

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS è uno dei metodi più usati per separare le proteine di una miscela sulla base del loro diverso peso molecolare. L' SDS è un detergente ionico che si lega saldamente alle proteine e ne provoca la denaturazione. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1,4g di detergente, fornendo alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa. Pertanto, durante l'elettroforesi, tutti i complessi proteina-SDS si muovono verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al loro peso molecolare. Facendo "correre", contemporaneamente al campione, proteine *standard* di peso molecolare noto è possibile determinare quello delle proteine del campione.

Il gel di poliacrilamide in SDS viene preparato seguendo il metodo di Laemmli. La piastra elettroforetica è costituita da due tipi di gel:

- gel superiore o impaccatore (stacking gel) a pH 6.8, che serve a concentrare le proteine del campione in modo che siano tutte allineate all'inizio della corsa elettroforetica;
- gel inferiore o di separazione (running gel) a pH 8.8, nel quale avviene la vera e propria separazione delle proteine.

La piastra, delle dimensioni di 8×10cm, viene fissata nell'apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham Biosciences; San Francisco, CA). La corsa elettroforetica ha una durata di 2 ore ad un'intensità di corrente di 20mA.

## Western blotting

Il western blotting o immunoblotting è un saggio immunologico in grado di rivelare tracce di una specifica proteina in una miscela eterogenea, combinando l'elevato potere risolutivo dell'elettroforesi su gel con la specificità degli anticorpi. Il western blotting è una metodica ad elevata sensibilità, che rivela quantità di proteina dell'ordine dei nanogrammi.

Dopo SDS/PAGE, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa per l'azione di un campo elettrico, ottenuto applicando all'apposito apparecchio una corrente di 350mA per 2 ore e 30 minuti. Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento è costituito da: Tris 25mM, glicina 192 mM, metanolo 20% e SDS 0.1% con pH finale pari a 8.0 (tampone A). Al termine del *blotting*, la membrana viene lasciata per 30 minuti nel tampone di saturazione composto da Tris-HCl 50mM, pH 7.5 NaCl 150mM, BSA 3% (tampone B), per saturare i siti aspecifici. Segue un'incubazione per tutta la notte a 4°C con l'Ac primario diluito nel seguente tampone: Tris-HCl 50mM, pH 7.5, NaCl 150mM, BSA 1% (tampone C).

Per il nostro studio abbiamo impiegato i seguenti anticorpi: anti- $\beta$ -actina monoclonale (Sigma Aldrich; Milano, Italia); anti-HS1 monoclonale (Becton Dickinson; Milano, Italia); anti-HS1 policlonale (gentilmente fornito dalla Prof.ssa A. Brunati, Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova); anti-PARP-clivata monoclonale (Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, MA). Sono stati successivamente eseguiti tre lavaggi di 10 minuti ciascuno a temperatura ambiente, utilizzando il tampone C addizionato di Tween 0.1%, e chiamato tampone di lavaggio. La membrana è stata, quindi, incubata per 30 minuti con un Ac secondario anti-IgG, ottenuto contro la specie animale immunizzata per avere l'Ac primario. L'Ac secondario è coniugato con l'enzima perossidasi e viene opportunamente diluito nel tampone C (Amersham International Biotechnology; Buckinghamshire, Inghilterra). Sono stati effettuati altri tre lavaggi e successivamente la membrana è stata sottoposta alla rivelazione anticorpale con il sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL) (Amersham International Biotechnology; Buckinghamshire, Inghilterra). I reagenti luminolo e  $H_2O_2$ , a contatto con la membrana, nella posizione in cui si è legata la perossidasi e, quindi, in corrispondenza del complesso Ag-Ac, danno luogo ad una reazione di ossidazione

con emissione di luce. Sopra la membrana viene posta una lastra autoradiografica, che viene impressionata dalla luce emessa.

## **Analisi dei linfociti B in microscopia**

Per visualizzare la distribuzione subcellulare della proteina HS1 nei linfociti B leucemici e normali, abbiamo allestito dei vetrini per microscopia confocale e a fluorescenza su cui sono state fissate le cellule da studiare. I linfociti B sono stati seminati sui pozzetti del vetrino, precedentemente ricoperti di poli-L-lisina (Sigma Aldrich; Milano, Italia) ad una concentrazione di circa 30.000 cellule/pozzetto. Per fissare le cellule sono stati aggiunti 50 $\mu$ l di paraformaldeide al 4% per pozzetto a temperatura ambiente per 10 minuti. Le cellule, così fissate, sono state lavate per due volte con PBS1X e permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,1% a temperatura ambiente per 4 minuti. Prima di procedere all'incubazione con l'Ac primario, i legami aspecifici sono stati saturati impiegando BSA al 2% per 30 minuti. Le cellule sono state successivamente incubate per un'ora, al buio, con l'anticorpo primario monoclonale IgG1 anti-HS1 (Becton Dickinson; Milano, Italia) con diluizione 1:150 (dalla soluzione madre 250 $\mu$ g/ml) e lavate per tre volte in PBS 1X. Viene successivamente eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) anti-IgG1 (CALTAG; Burlingame, CA) per HS1. Al termine, le cellule sono state nuovamente sottoposte a tre lavaggi con PBS 1X. I vetrini sono stati chiusi con vetrini coprioggetto e osservati ai microscopi confocale Biorad 2100 e a fluorescenza Olympus IX81. Le immagini sono state acquisite ed elaborate utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging).

Per gli esperimenti di co-localizzazione sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-HS1 policlonale seguito dal secondario anti-rabbit alexa 488 (Invitrogen; Milano, Italia) e anti-tubulina monoclonale (Sigma Aldrich; Milano, Italia) seguito dal secondario anti-mouse TexasRed (Invitrogen; Milano, Italia). Per la colorazione dei filamenti di actina è stata utilizzata la falloidina coniugata con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) (Sigma Aldrich; Milano, Italia). I nuclei sono stati marcati con il colorante 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI), in grado di legarsi al DNA.

## Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da  $4 \times 10^6$  linfociti ottenuti dal sangue periferico dei pazienti utilizzando il protocollo "RNeasy Mini Kit Protocol" (Qiagen, Hilden, Germany), secondo le indicazioni del fornitore. I linfociti sono stati lisati utilizzando una soluzione contenente  $\beta$ -mercaptoetanolo e tampone di lisi e successivamente processati tramite ripetute aspirazioni con ago da 20G. Dopo aggiunta di 350 $\mu$ l di etanolo al 70%, il campione è stato trasferito in una colonnina di purificazione (fornita dal *kit*) e poi centrifugato a 8.000g per 15 secondi, con successiva eliminazione dell'eluato. È stato eseguito, quindi, un lavaggio con 700 $\mu$ l di tampone RW1 e, dopo centrifugazione a 8.000g per 15 secondi, sono stati effettuati altri due lavaggi del materiale nella colonnina con 500 $\mu$ l di tampone RPE contenente etanolo. Per eluire l'RNA, legato alla membrana, sono stati aggiunti alla colonnina 30 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O priva di RNAsi ed è stata eseguita una centrifugazione a 8.000g per 1 minuto, raccogliendo l'eluato contenente l'RNA.

Per verificare la qualità dell'RNA ottenuto, sono stati seminati 2 $\mu$ l di campione in un gel di agarosio all'1% in tampone tris-acetato (TAE) 1X, con bromuro di etidio (10mg/ml) al 5% V/V; l'elettroforesi è stata eseguita a 60V per 20 minuti. L'RNA estratto è stato poi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro. È stata preparata una diluizione 1:200 del campione di RNA e sono state determinate le assorbanze (A) alle lunghezze d'onda di 260nm ( $\lambda$  dei nucleotidi) e 280nm ( $\lambda$  delle proteine). È stato calcolato, dunque, il rapporto  $A_{260}/A_{280}$ : in caso di un valore inferiore a 2, il preparato di RNA è contaminato da proteine e non è utilizzabile. È stata, infine, calcolata la concentrazione di RNA del campione, applicando la seguente formula:

$$A_{260} \times \text{fattore di diluizione} \times 40 = \text{concentrazione dell'RNA in } \mu\text{g/ml.}$$

Il valore 40 corrisponde alla concentrazione di RNA espressa in  $\mu\text{g/ml}$ , alla quale si ottiene  $A_{260}$  pari a 1.

## Sintesi del cDNA

La retrotrascrizione da RNA a cDNA (DNA complementare) si avvale dell'enzima retrotrascrittasi, una DNA polimerasi RNA-dipendente, che genera un filamento di cDNA a partire da un mRNA usato come stampo. In questa tesi è stato

utilizzato come stampo l'RNA totale e la reazione è stata eseguita con un primer oligo-dT, in grado di appaiarsi alla coda di poliA in 3' tipica dell'mRNA eucariotico. Ciò consente alla retrotrascrittasi di sintetizzare cDNA dalle molecole di mRNA presenti nella reazione. La retrotrascrittasi utilizzata è l'Avian Myeloblastoma Virus (AMV); questo enzima ha un'attività polimerasica 5'→3' (con RNA o DNA come stampo) e un'attività 3'→5' di RNasi H, che degrada il filamento di RNA della doppia elica RNA-DNA, prodotta durante la sintesi del cDNA. Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il *kit* di retrotrascrizione Reverse Transcription System (Promega Corporation; Madison, WI). La miscela di reazione è composta da:

- 4µl di MgCl<sub>2</sub> 25mM;
- 2µl di tampone RT 10X;
- 2µl della miscela dei 4 deossinucleosidi trifosfati (dNTP mix) 10mM;
- 0,5µl di un enzima inibitore delle Rnasi 40µg/µl;
- 0,75µl di AMV retrotrascrittasi 25µg/µl;
- 1µl di Primer Oligo(dT) 0,5mg/ml;
- 2µg di RNA;
- H<sub>2</sub>O priva di RNasi a volume finale di 20µl.

Tale miscela è stata incubata a 42°C per 15 minuti, poi posta a 99°C per 3 minuti (per bloccare la reazione) e, infine, messa in ghiaccio per qualche minuto. Il cDNA, così ottenuto, è stato conservato a -80°C oppure utilizzato immediatamente per allestire la reazione di amplificazione mediante Polimerase Chain Reaction (PCR) del filamento di DNA complementare all'mRNA bersaglio (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR).

## **Valutazione dell'espressione genica di HS1 mediante Real Time-PCR**

Dopo aver estratto e retrotrascritto l'RNA da cellule B di pazienti affetti da LLC-B prima e dopo chemioterapia, si è proceduto con le amplificazioni mediante la reazione di Real-time PCR. Queste sono state ottenute mediante ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems; Foster City, CA), in un volume di 15µl. La Master Mix usata, SYBR Green PCR, fornita dalla ditta Applied Biosystems, conteneva la DNA polimerasi AmpliTaq Gold; a questa sono stati

aggiunti i primers (5 $\mu$ M) e 1,5 $\mu$ l di cDNA per ottenere un volume di reazione finale di 15 $\mu$ l. I primers utilizzati per le amplificazioni di HS1 e di GAPDH sono: HS1: Forward 5'- GTG AGA ACC AGC AGG GAA CAC -3', Reverse 5'- CAT TGT CCT CCG GGA GAG TCT -3'; GAPDH: Forward 5'- AAT GGA AAT CCC ATC ACC ATC T -3', Reverse 5'- CGC CCC ACT TGA TTT TGG -3'.

Questi primers sono stati ottenuti usando il software Primer Express (Applied Biosystems). Le condizioni di reazione sono state: denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguita da 15 secondi a 95°C e da 1 secondo a 60°C. Il tutto è stato ripetuto per 50 cicli. Ogni campione è stato amplificato in duplicato. Per ogni master mix è stato eseguito un controllo negativo e sia per GAPDH che per HS1 sono state generate due curve *standard*, usando il cDNA di cellule Jurkat alle seguenti diluizioni: 1, 1:5, 1:25 e 1:125. La quantità relativa di mRNA è stata determinata per confronto con le curve *standard*. Il risultato di ciascun campione è stato normalizzato rispetto all'espressione di GAPDH. Inoltre, è stata generata una curva di dissociazione per distinguere gli amplificati specifici da quelli aspecifici.

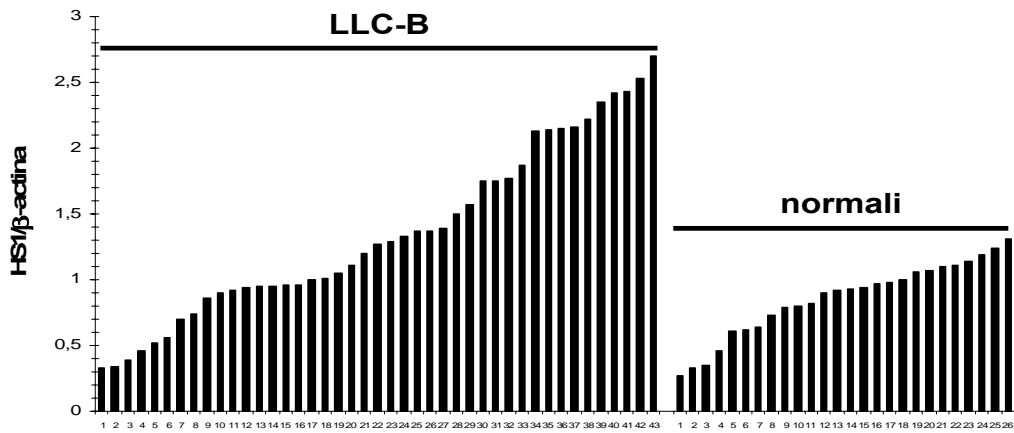




# RISULTATI

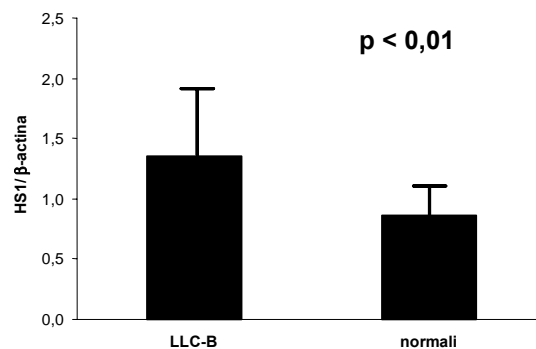
## La proteina HS1 è overespressa nelle cellule B di LLC

Mediante western blotting abbiamo valutato il livello di espressione proteica di HS1 nei linfociti B normali e nelle cellule leucemiche di 43 pazienti con LLC, non in terapia al momento del prelievo. Abbiamo eseguito l'analisi densitometrica, utilizzando la  $\beta$ -actina come proteina di riferimento, e abbiamo confrontato i livelli proteici di HS1 nelle cellule B leucemiche rispetto ai linfociti B normali (fig. 13).



**Figura 13. Espressione della proteina HS1 in cellule B normali e leucemiche.** Il lisato totale di cellule B ( $5 \times 10^5$  per campione) di 43 pazienti con LLC-B e di 26 soggetti normali è stato sottoposto a SDS-PAGE al 10%, trasferito su membrana di nitrocellulosa e rivelato in successione con anti-HS1 monoclonale e anti  $\beta$ -actina. Il grafico mostra i valori ottenuti dall'analisi densitometrica del rapporto HS1/ $\beta$ -actina ( $p < 0,01$ ).

Nelle cellule neoplastiche, i livelli di HS1 variavano da 0,33 a 2,70 e la media ottenuta ( $1,36 \pm 0,66$ ) era significativamente superiore a quanto osservato nei linfociti B normali ( $0,86 \pm 0,29$ ;  $p < 0,01$ ; fig. 14).

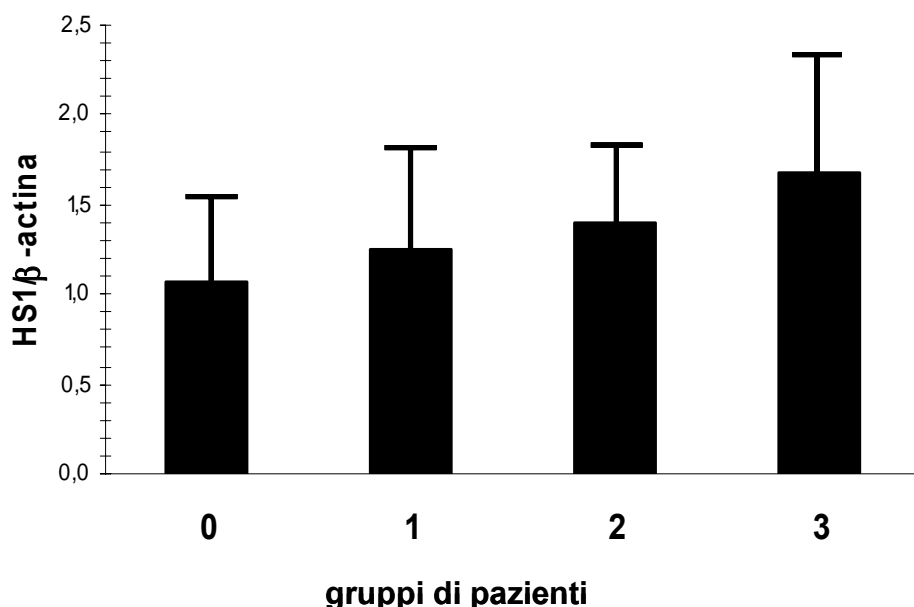


**Figura 14. Medie dei rapporti HS1/ $\beta$ -actina in cellule B normali e leucemiche.** Le medie sono state ottenute rispettivamente dai 26 controlli normali e dai 43 pazienti con LLC-B riportati nella figura 13.

## L'espressione della proteina HS1 è aumentata nei pazienti a prognosi sfavorevole

Abbiamo comparato i livelli di espressione proteica di HS1 in relazione a vari fattori prognostici.

A ciascun paziente è stato assegnato un valore in relazione al numero di fattori prognostici negativi presenti alla diagnosi, quali: l'assenza di ipermutazioni somatiche, l'espressione della proteina ZAP-70, il tempo di raddoppiamento dei linfociti inferiore o uguale a 6 mesi e la presenza di sintomi alla diagnosi. I pazienti sono stati così suddivisi in 4 gruppi (0-3), a seconda dell'assenza (gruppo 0) o presenza di uno o più fattori prognostici (1 = un solo fattore prognostico negativo presente; 2 = due fattori prognostici negativi presenti e 3 = tre fattori prognostici negativi presenti). Le medie dei livelli di HS1, ottenute nei diversi gruppi di pazienti, sono risultate pari a:  $1,08 \pm 0,55$  nel primo,  $1,25 \pm 0,60$  nel secondo,  $1,39 \pm 0,49$  nel terzo e  $1,68 \pm 0,69$  nel quarto gruppo. Abbiamo osservato che l'espressione di HS1 aumentava al crescere del numero di fattori prognostici negativi (fig. 15); tuttavia, le differenze tra i vari gruppi non sono risultate statisticamente significative e, pertanto, questo dato andrà confermato in una casistica più ampia.

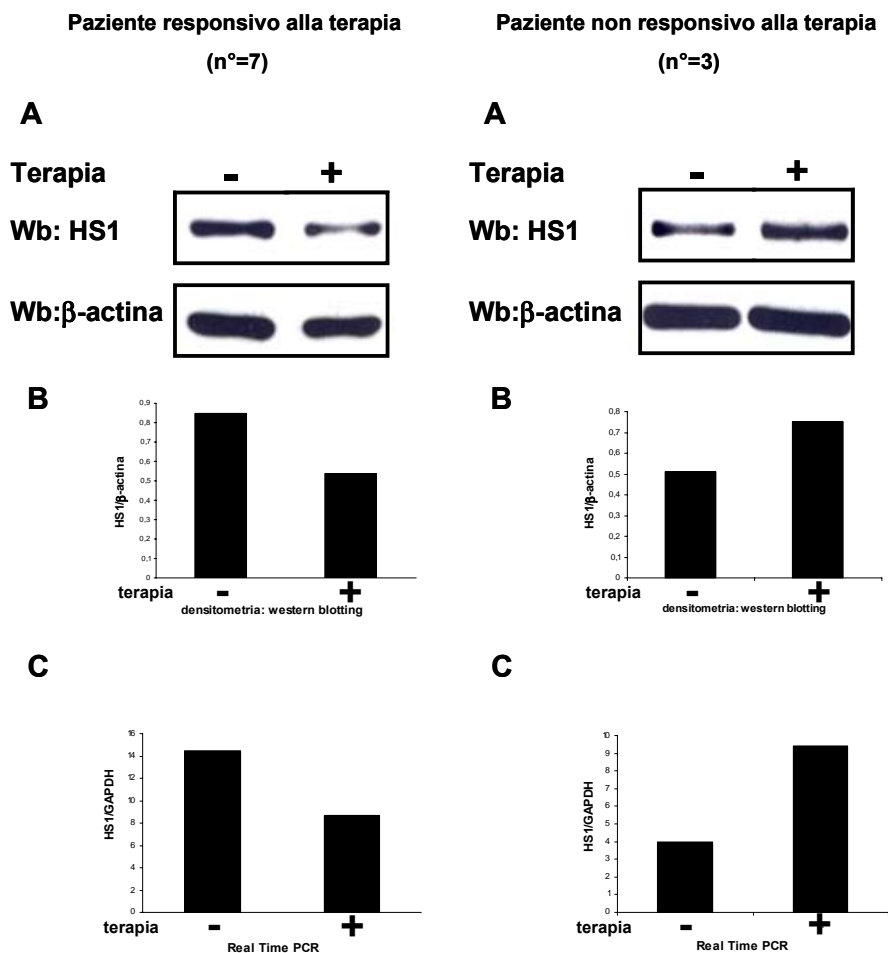


**Figura 15. Confronto fra le medie del rapporto HS1/β-actina di pazienti con LLC-B raggruppati in base al numero di fattori prognostici negativi.** Abbiamo considerato come fattori prognostici negativi: l'assenza di ipermutazioni somatiche, l'espressione della proteina ZAP-70, la presenza di sintomi alla diagnosi e il tempo di raddoppiamento dei linfociti inferiore o uguale a 6 mesi. I pazienti sono stati così suddivisi nei seguenti gruppi: 0 = assenza di fattori prognostici negativi; 1 = un solo fattore prognostico negativo presente; 2 = due fattori prognostici negativi presenti e 3 = tre fattori prognostici negativi presenti.

## L'espressione della proteina HS1 diminuisce dopo chemioterapia

In 10 pazienti con LLC di tipo B, i livelli di HS1 sono stati valutati prima e dopo terapia con fludarabina e ciclofosfamide, come riportato in dettaglio nella sezione "Materiali e Metodi".

Dopo trattamento chemioterapico, l'espressione di HS1 è risultata ridotta rispetto al valore basale soltanto nei 7 pazienti che avevano risposto clinicamente alla terapia (fig. 16). Nei rimanenti 3 casi, non responsivi, non abbiamo rilevato alcuna riduzione della proteina, bensì un aumento (fig. 17). Quando l'espressione genica di HS1 è stata valutata mediante Real-Time PCR, i livelli di mRNA correlavano con quelli proteici, determinati in western blotting (figg. 16C e 17C).

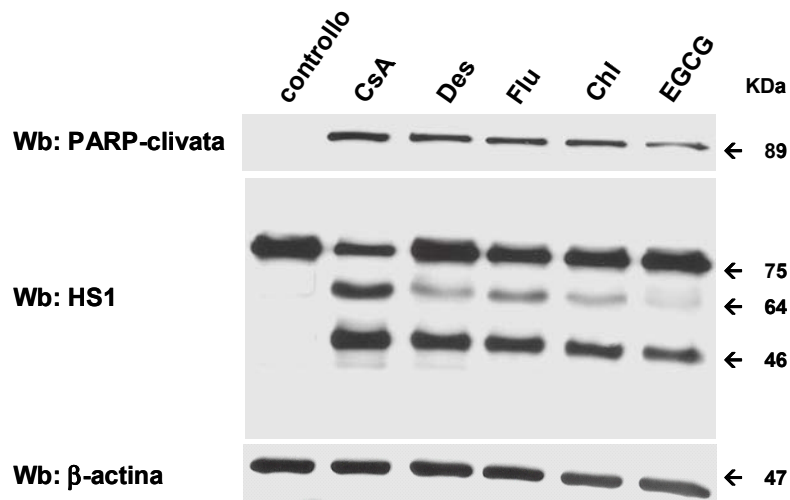


**Figure 16 (a sinistra) e 17 (a destra). Effetto della terapia *in vivo* con fludarabina e ciclofosfamide sui livelli della proteina HS1.** La figura 16 è rappresentativa dei 7 pazienti che avevano risposto alla terapia e la figura 17 è rappresentativa dei 3 pazienti che non avevano risposto alla terapia. Le cellule B ( $5 \times 10^5$  per campione), ottenute da pazienti con LLC-B prima e dopo terapia con fludarabina e ciclofosfamide, sono state lisate e analizzate mediante western blotting (A). I grafici riportano l'analisi densitometrica del rapporto HS1/β-actina dei dati ottenuti da western blotting (B) e il rapporto HS1/GAPDH dei dati ottenuti da Real Time-PCR (C).

## La proteina HS1 viene clivata durante la risposta apoptotica delle cellule B di LLC

Alcuni studi hanno dimostrato il coinvolgimento di HS1 nel processo apoptotico di linee cellulari linfoblastoidi. In particolare, la proteina è risultata substrato della caspasi 3 durante l'apoptosi Fas-indotta delle cellule della linea Jurkat<sup>103,104</sup>. Abbiamo pertanto studiato il comportamento di HS1 in cellule leucemiche di LLC, durante l'apoptosi indotta da farmaci impiegati nella terapia della LLC-B e dall'EGCG (epigallo catechin 3-gallato), polifenolo del thè verde capace di prevenire la carcinogenesi<sup>108</sup>.

I nostri esperimenti hanno evidenziato che l'induzione dell'apoptosi, indicata dalla comparsa della forma clivata di 89kDa della PARP (Poli-ADP Ribosio Polimerasi), si associa alla riduzione dei livelli di espressione di HS1 e alla comparsa di due frammenti di 64 e 46kDa rispettivamente, riconosciuti dall'anticorpo policlonale anti-HS1 (fig. 18).



**Figura 18. Clivaggio della proteina HS1 nelle cellule B di LLC-B in apoptosi.** Le cellule B di LLC sono state piastrate per 24 ore da sole (controllo) o in presenza di ciclosporina A (8 $\mu$ M), di desametasone (10 $\mu$ M), di fludarabina (20 $\mu$ M), di clorambucile (50 $\mu$ M) o di EGCG (10 $\mu$ M). Il lisato totale di cellule B è stato sottoposto a SDS-PAGE, trasferito su membrana di nitrocellulosa e rivelato in successione con l'anticorpo anti-PARP clivata, per evidenziare l'apoptosi, con l'anticorpo anti-HS1 policlonale e con l'anticorpo anti  $\beta$ -actina.

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti pre-incubando le cellule per 30 minuti con l'inibitore delle caspasi z-VAD-fmk. Abbiamo ottenuto il blocco del clivaggio della proteina HS1 e, in parallelo, una riduzione della risposta apoptotica delle cellule leucemiche, monitorata dalla comparsa della forma clivata della PARP (fig. 19).

I nostri dati dimostrano che l'apoptosi *in vitro* dei linfociti B di LLC-B è legata al clivaggio della proteina HS1, che avviene attraverso l'attivazione delle caspasi.

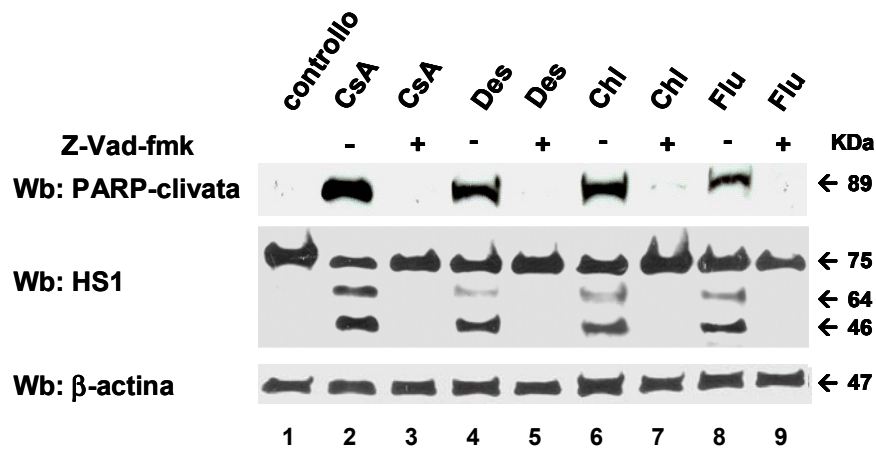


Figura 19. Clivaggio della proteina HS1 nelle cellule B di LLC-B in apoptosi. Nelle colonne 3, 5, 7 e 9 le cellule leucemiche sono state pre-incubate per 30 minuti con l'inibitore della caspasi, Z-VAD-fmk (50 $\mu$ M).

## La proteina HS1 viene fosforilata in tirosina nei linfociti neoplastici di LLC-B dopo stimolazione del BCR

Considerati gli elevati livelli di Lyn e il fatto che questa è costitutivamente attiva nella LLC<sup>25</sup>, abbiamo verificato se HS1, suo substrato, fosse costitutivamente fosforilata nei linfociti B leucemici di LLC. Abbiamo osservato che HS1 non è costitutivamente fosforilata in tirosina nelle cellule fresche appena isolate da questi soggetti; tuttavia, la fosforilazione in tirosina può essere indotta dalla stimolazione con un anticorpo anti-IgM (fig. 20).

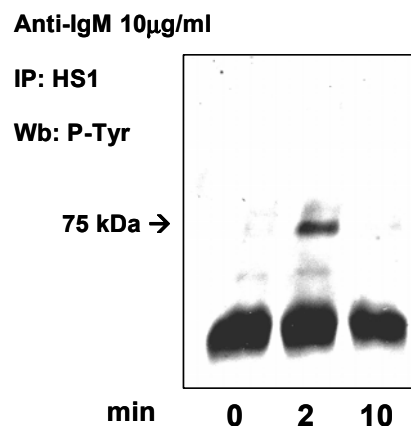
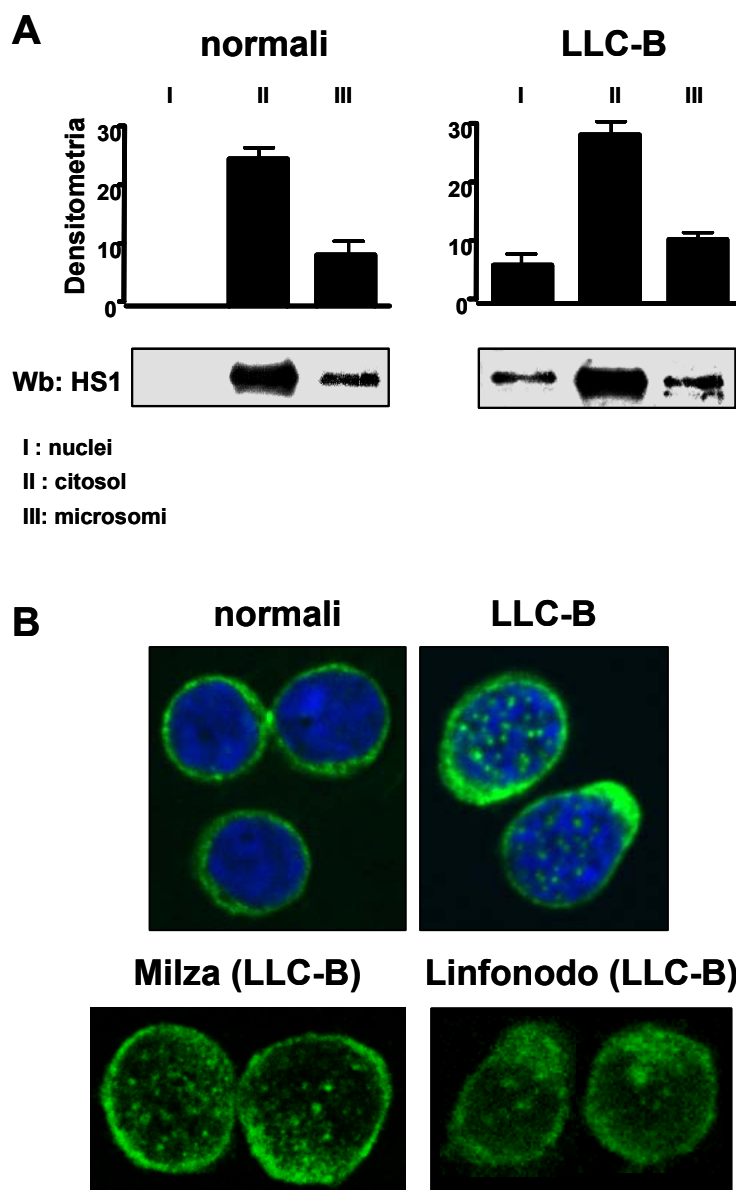


Figura 20. Analisi della fosforilazione tirosinica della proteina HS1 in cellule B di LLC-B dopo stimolazione del BCR. Cellule B di pazienti con LLC-B sono state incubate a 37°C con un anticorpo anti-IgM. Dopo 0, 2 e 10 minuti le cellule sono state raccolte e la proteina HS1 è stata immunoprecipitata. I campioni, così trattati, sono stati sottoposti a SDS-PAGE e western blotting e le membrane sono state rivelate con un anticorpo che riconosce le tirosine fosforilate.

## HS1 è localizzata in modo anomalo nelle cellule leucemiche

In collaborazione con il gruppo della Prof.ssa A. Brunati (Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova), abbiamo analizzato la localizzazione subcellulare della proteina HS1 nei linfociti B normali e neoplastici mediante ultracentrifugazione differenziale. Come riportato in figura 21A, HS1 si trova prevalentemente nel citosol sia nei linfociti B normali che in quelli leucemici. Il risultato interessante è che, nelle cellule B neoplastiche dei pazienti affetti da LLC, una piccola aliquota (4-7%) della proteina si trova localizzata nel nucleo.

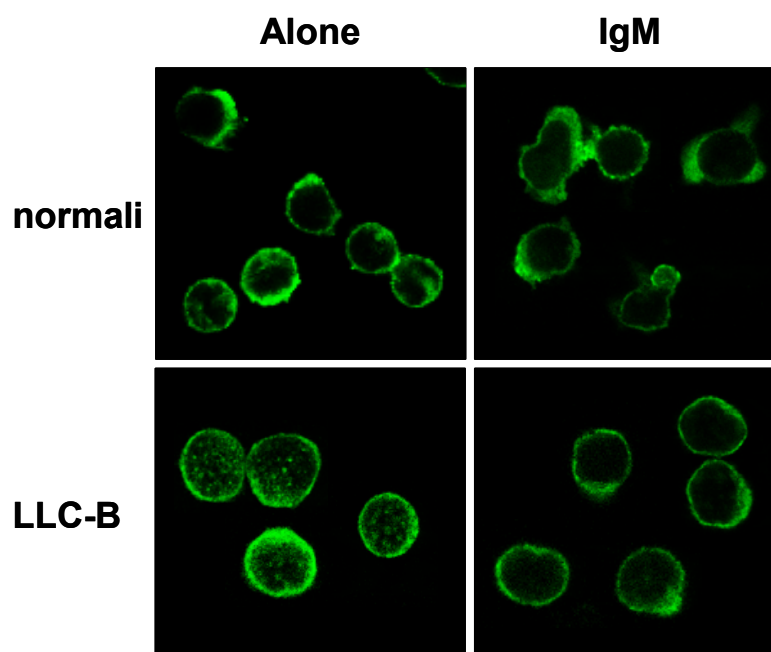


**Figura 21. Localizzazione subcellulare di HS1 in cellule B normali e leucemiche.** A. Localizzazione di HS1 nelle diverse frazioni subcellulari. La figura è rappresentativa di diversi esperimenti effettuati su 10 pazienti con LLC e su 5 controlli normali. B. Analisi al microscopio confocale della proteina HS1 (FITC, verde) in cellule B normali ottenute da sangue periferico e cellule B leucemiche ottenute da sangue periferico, da milza e da linfonodo. I nuclei sono stati marcati con il colorante DAPI, in grado di legarsi al DNA.

Questo dato è stato confermato anche mediante l'allestimento di preparati per la microscopia confocale. La figura 21B mostra come HS1 sia uniformemente distribuita nel citosol dei linfociti B sia normali che leucemici, ma in questi ultimi essa è presente anche sotto forma di foci nucleari. L'esperimento è stato condotto anche nei linfociti B estratti dalla milza e da un linfonodo di un paziente con LLC e, anche in queste sedi, HS1 ha mostrato una distribuzione nucleare.

## Ridistribuzione di HS1 dopo stimolazione del BCR

Considerato che HS1 viene fosforilata dopo stimolazione del BCR, abbiamo valutato la sua localizzazione cellulare dopo attivazione. Come si può osservare in figura 22, HS1 scompare dal nucleo dopo stimolazione del BCR dei linfociti B leucemici con anti-IgM. Pertanto, è ipotizzabile che, dopo il legame del BCR con l'antigene, la proteina vada incontro ad una ridistribuzione, scomparendo dal nucleo delle cellule leucemiche stimolate.

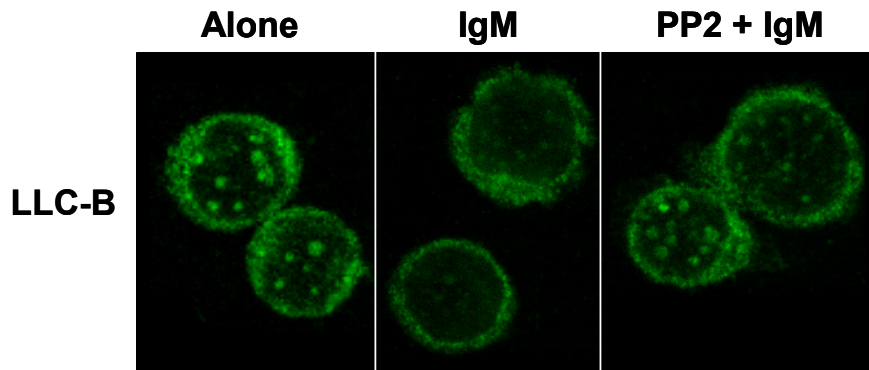


**Figura 22. Ridistribuzione di HS1 dopo stimolazione del BCR.** L'analisi della proteina HS1 (FITC, verde) al microscopio confocale è stata eseguita prima e dopo incubazione delle cellule B (normali e leucemiche) con un anticorpo anti-IgM per 10 minuti a 37°C.

Abbiamo eseguito lo stesso esperimento preincubando le cellule con PP2 (fig. 23), un inibitore delle Src chinasi, prima della stimolazione del BCR; in questo caso

non abbiamo osservato alcuna modificazione nella distribuzione di HS1 rispetto alle condizioni basali.

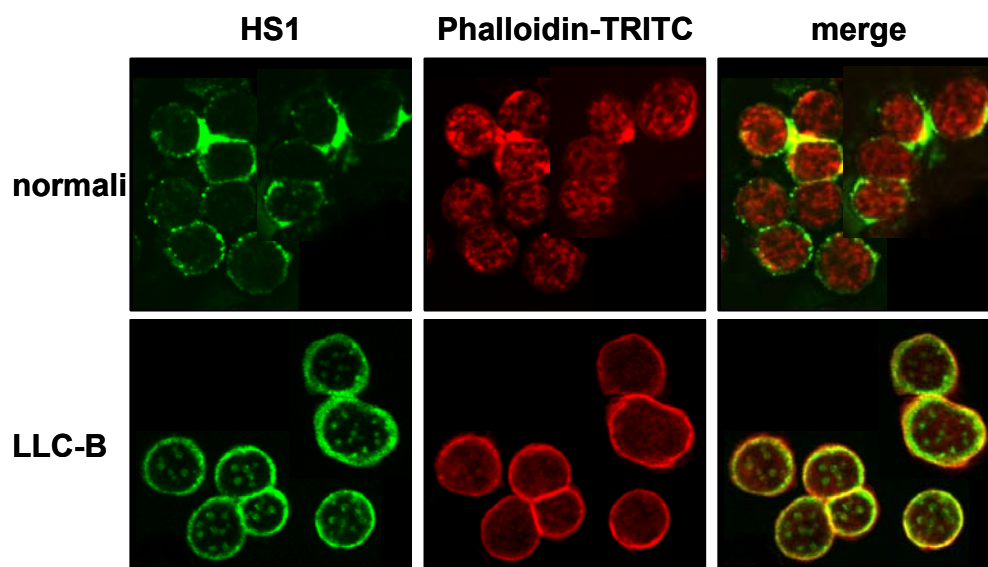
Pertanto, possiamo affermare che la scomparsa di HS1 dal nucleo è imputabile alle tirosin-chinasi Src, attive a qualche livello nella cascata di trasduzione del segnale mediata dal BCR.



**Figura 23. Ridistribuzione di HS1 dopo stimolazione del BCR.** Lo stesso esperimento della figura 22 è stato eseguito preincubando le cellule B di LLC-B con PP2, inibitore delle chinasi della famiglia Src.

## HS1 co-localizza con la $\beta$ -actina nelle cellule B di LLC

Considerato che HS1 è una proteina cardine nella regolazione del citoscheletro, in quanto contiene nella sua struttura un sito di legame per la  $\beta$ -actina, siamo andati a verificare come fosse l'interazione di HS1 con questo elemento nelle cellule di LLC. Abbiamo osservato che, sia nelle cellule B normali che in quelle leucemiche, HS1 co-localizza con la  $\beta$ -actina (fig. 24).



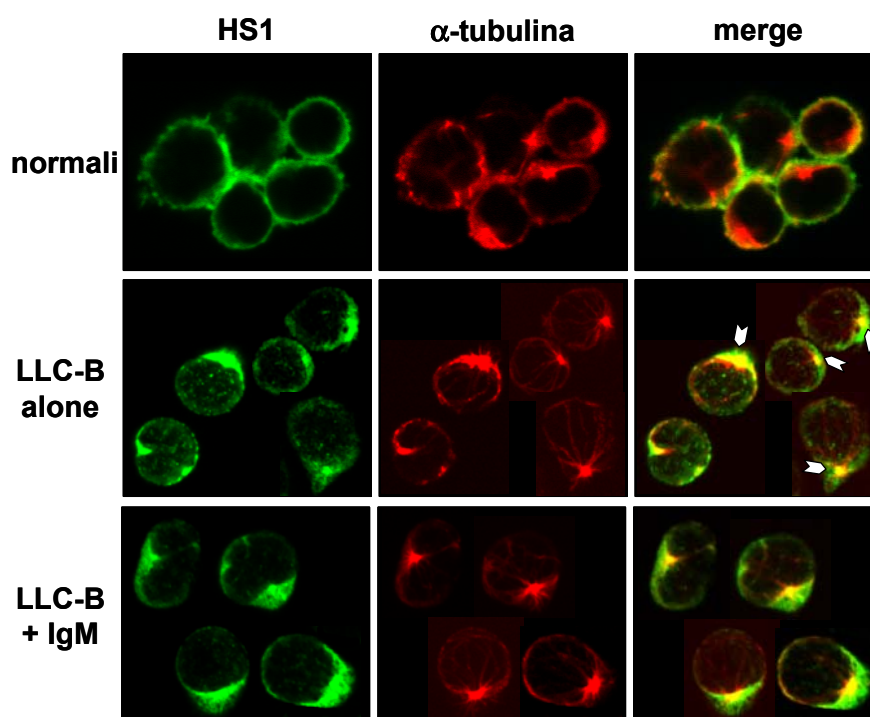
**Figura 24. Interazione della proteina HS1 con la  $\beta$ -actina.** Analisi al microscopio confocale di cellule B normali e leucemiche. Le cellule sono state colorate con Ac anti-HS1 seguito dall'appropriato Ac secondario coniugato-FITC (verde) e con la falloidina-TRITC (rosso) che lega i filamenti di actina. Le immagini di sovrapposizione (giallo) rappresentano la co-localizzazione (merge) della proteina HS1 con la  $\beta$ -actina.



In particolare, soltanto la frazione citosolica di HS1 co-localizza con i filamenti di actina, mentre l'aliquota nucleare non risulta associata all'actina del nucleoscheletro. Questa co-localizzazione suggerisce come la frazione citosolica di HS1 possa essere coinvolta nei processi di riarrangiamento del citoscheletro delle cellule leucemiche.

## HS1 co-localizza con il centrosoma nelle cellule B di LLC

Come ci aspettavamo, considerata la struttura di HS1, questa proteina co-localizza con la  $\beta$ -actina. Abbiamo, di conseguenza, voluto verificare se HS1 co-localizzasse anche con l' $\alpha$ -tubulina, anche se nella sua struttura non sono noti siti di legame per questa molecola. Mediante analisi di microscopia confocale abbiamo dimostrato per la prima volta che, soltanto nelle cellule B di LLC e non nei linfociti B normali, HS1 co-localizza con l' $\alpha$ -tubulina e, in particolare, con il centrosoma che è il centro organizzatore dei microtubuli (MTOC) (fig. 25).



**Figura 25. Interazione della proteina HS1 con il centrosoma.** Analisi al microscopio confocale di cellule B normali e leucemiche. Le cellule sono state colorate con Ac anti-HS1 seguito dall'appropriato Ac secondario coniugato-FITC (verde) e con Ac anti-tubulina seguito dal suo Ac secondario coniugato-Texas Red (rosso). Le immagini di sovrapposizione (giallo) rappresentano la co-localizzazione (merge) della proteina HS1 con la tubulina. Le frecce bianche indicano il centrosoma.

Questa struttura, presente in tutte le cellule animali e spesso associata alla membrana nucleare durante l'interfase nel ciclo cellulare, è necessaria per la sopravvivenza degli organismi. Il fatto che HS1 e la tubulina interagiscano suggerisce che la proteina da noi studiata possa essere coinvolta nel riarrangiamento citoscheletrico mediato dai microtubuli che avviene nelle cellule B di LLC.

## DISCUSSIONE

La leucemia linfatica cronica di tipo B è una malattia linfoproliferativa cronica, di natura monoclonale, caratterizzata dall'accumulo di linfociti B dovuto sia ad un aumento della proliferazione sia a difetti nei meccanismi apoptotici<sup>7</sup>. Questi linfociti neoplastici, dunque, mancano di una risposta adeguata e fisiologica a molti segnali extracellulari che normalmente inducono la morte cellulare programmata e, nella maggior parte dei casi, non sono in grado di attivare la via di trasduzione del segnale mediata dal recettore per l'antigene.

Questo progetto di ricerca è stato portato avanti per esaminare quali molecole, fra quelle che controllano i numerosi passaggi coinvolti nella trasduzione del segnale, potessero essere responsabili della prolungata sopravvivenza e dell'accumulo dei linfociti B neoplastici di pazienti con LLC-B. Per rispondere a questa domanda, abbiamo analizzato la proteina HS1, substrato della tirosin chinasi Lyn che avevamo precedentemente dimostrato essere anomala e contribuire all'aumentata sopravvivenza dei linfociti B di LLC-B<sup>25</sup>.

HS1 è una proteina intracellulare, maggior substrato delle protein tirosin chinasi ed è coinvolta nella trasduzione del segnale che avviene dopo il legame dell'antigene al recettore sia dei linfociti B che T. HS1 è associata alla chinasi Lyn e viene rapidamente fosforilata in tirosina dopo il cross-linking delle IgM di superficie nelle cellule B<sup>26</sup>.

Per il nostro studio abbiamo ottenuto i linfociti B dal sangue periferico di 43 pazienti affetti da LLC e di 26 controlli normali valutando, innanzitutto, l'espressione proteica di HS1 e dimostrando che questa proteina, presente sia nei linfociti B normali che in quelli leucemici, è overespressa nei secondi rispetto ai primi ( $p < 0,01$ ). Inoltre, mettendo a confronto i livelli proteici di HS1 nei nostri pazienti, abbiamo osservato che HS1 era maggiormente espressa in quelli che presentavano una prognosi più sfavorevole. Le differenze fra i gruppi prognostici di pazienti non sono statisticamente significative, ma esiste un trend nell'espressione di HS1 che aumenta all'aumentare del numero dei fattori prognostici negativi presentati dai pazienti. Di conseguenza, in una prospettiva futura, la nostra intenzione è quella di confermare questa correlazione in un numero maggiore di casi per capire se HS1 possa avere un ruolo prognostico in questa patologia.

Per verificare il potenziale coinvolgimento di HS1 in questa patologia, la proteina è stata anche analizzata in alcuni pazienti che erano soggetti a terapia con fludarabina e ciclofosfamide. I nostri esperimenti, condotti sulle cellule ottenute dal paziente prima e dopo la terapia, dimostrano che sia l'espressione proteica che genica di HS1 sono soggette ad un decremento dopo il trattamento; questo evento si verifica soltanto in quei pazienti che erano clinicamente responsivi alla terapia.

Riassumendo, HS1 si trova overespressa nelle cellule B di LLC-B rispetto ai linfociti B normali e lo è maggiormente nei pazienti che presentano una prognosi più sfavorevole; è pertanto ipotizzabile che HS1 sia coinvolta nel mantenimento della sopravvivenza dei linfociti B leucemici dal momento che una terapia efficace è in grado di ridurne l'espressione nei nostri pazienti.

Diversi studi mettono in evidenza il coinvolgimento di HS1 nella morte cellulare programmata<sup>101,109</sup>. Alcuni di questi spiegano che HS1 viene clivata nelle cellule della linea Jurkat durante l'apoptosi indotta da un anticorpo anti-Fas<sup>104</sup>. I nostri risultati, ottenuti incubando le cellule leucemiche con sostanze pro-apoptotiche, sono in accordo con questa scoperta e ciò potrebbe rappresentare una conferma della nostra ipotesi sul coinvolgimento di HS1 nel mantenimento della sopravvivenza delle cellule B leucemiche. Nonostante ciò, non è ancora stato descritto un ruolo specifico e fisiologico per la proteina HS1 o per uno dei suoi frammenti; tuttavia è possibile avanzare alcune ipotesi. Dal momento che HS1 possiede un segnale di localizzazione nucleare<sup>110</sup> e presenta un'alta omologia di sequenza aminoacidica con alcuni fattori di trascrizione, è ipotizzabile che questa molecola possa agire come un modulatore della trascrizione genica.

Nella linea cellulare di linfoma murino WEHI-231, bassi livelli di HS1 sono associati ad una mancata risposta apoptotica, conferendo così ad HS1 una funzione pro-apoptotica<sup>101</sup>; questo è in contrasto con i nostri dati, ottenuti sulle cellule B di LLC nelle quali l'aumento della sopravvivenza cellulare è associata a più elevati livelli di HS1, suggerendo, in questo caso, un'attività anti-apoptotico della proteina.

Utilizzando tecniche di microscopia confocale e di ultracentrifugazione differenziale, abbiamo osservato che la proteina HS1 è distribuita in maniera anomala nelle cellule B neoplastiche rispetto a quelle normali; mentre nei linfociti B normali HS1 è localizzata soltanto nel citosol, nei linfociti B neoplastici HS1 è rintracciabile sia nel citosol che nel nucleo dove presenta una caratteristica distribuzione a foci. Quando mettiamo in coltura le cellule in presenza di un

anticorpo anti-IgM, che funziona da stimolo apoptotico per le cellule di LLC-B, la frazione nucleare di HS1 scompare. I nostri dati sottolineano che nelle cellule B maligne, una quota di HS1 è già presente nel nucleo e la sua scomparsa da questo, sia essa dovuta a degradazione o al passaggio nel citoplasma, ha luogo dopo il triggering del BCR con la conseguente attivazione delle Src chinasi. Questi risultati, che confermano la nostra ipotesi sul possibile ruolo anti-apoptotico di HS1, suggeriscono un'anomala attività nucleare di HS1, che presumibilmente contribuisce al mantenimento della sopravvivenza delle cellule B leucemiche.

Oltre ad essere coinvolta nell'apoptosi, sebbene il meccanismo utilizzato non sia ancora chiaro, la proteina HS1 è stata anche implicata nel legame con l'actina e altre proteine del citoscheletro, come il complesso Arp2/3, grazie alla sua struttura che permette tali interazioni<sup>104</sup>. Alcuni studi dimostrano che HS1 è essenziale negli eventi che portano all'assemblaggio dell'actina nelle cellule T e alla formazione della sinapsi immunologica<sup>106,107</sup>. Così, la nostra attenzione si è anche focalizzata sul possibile ruolo di HS1 nelle interazioni col citoscheletro. Mediante la microscopia confocale abbiamo osservato che HS1 co-localizza con l'actina, come ci aspettavamo, sia nelle cellule B normali che in quelle neoplastiche e questa associazione ci fa ritenere che HS1 possa svolgere un ruolo anche nel rimodellamento citoscheletro che avviene nelle cellule neoplastiche. Inoltre, dal momento che durante il processo apoptotico assistiamo alla riorganizzazione dell'actina<sup>109</sup>, probabilmente esiste una relazione fra il ruolo di HS1 nella morte cellulare programmata e la sua interazione con il citoscheletro o con molecole ad esso associate.

Procedendo con i nostri esperimenti abbiamo dimostrato, per la prima volta, che HS1 co-localizza perfettamente, nelle cellule leucemiche ma non nei linfociti B normali, con il centrosoma, centro organizzatore dei microtubuli che ha un ruolo centrale nel processo mitotico in quanto necessario alla formazione del fuso e alla determinazione della polarità dei microtubuli<sup>111</sup>. Quest'interazione, nelle cellule B leucemiche, avviene nonostante non sia mai stato descritto nella struttura di HS1 un sito di legame per la tubulina e questo potrebbe significare che la proteina è coinvolta nel riarrangiamento citoscheletrico mediato dai microtubuli nelle cellule B neoplastiche.

Dato il suo complesso coinvolgimento nel controllo del ciclo cellulare, non sorprende che il centrosoma sia implicato nella tumorigenesi: diverse anomalie nel

numero dei centrosomi, taglia e morfologia sono state osservate in quasi tutti i tipi di tumore umano, inclusi quello della mammella, colon, fegato, midollo, cervice e prostata. La perturbazione del core centrosomico, o delle proteine ad esso associate, è legata alla regolazione del ciclo cellulare ed implicata nel processo di trasformazione neoplastica<sup>112</sup>. La localizzazione centrosomica delle proteine coinvolte nelle malattie genetiche umane e l'identificazione di nuove proteine associate hanno dimostrato che numerosi processi cellulari possono essere perturbati dalla disfunzione del centrosoma.

Nonostante la comune osservazione che la maggior parte delle cellule B di LLC sono bloccate in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare, è ormai dimostrato che queste cellule presentano anche un'attività proliferativa<sup>113</sup>. Recentemente è stato dimostrato che, nelle cellule di LLC, il processo di replicazione del centrosoma è deregolato correlando così con la loro attività proliferativa e, di conseguenza, con una prognosi sfavorevole per questi pazienti<sup>114</sup>.

HS1, interagendo con il centrosoma nelle cellule B neoplastiche, probabilmente contribuisce al mantenimento di questa attività proliferativa, rinforzando, così, l'ipotesi di un ruolo di HS1 nella conservazione della sopravvivenza delle cellule B leucemiche. Tuttavia, questo fatto deve essere ulteriormente investigato per verificare, ad esempio, se questa interazione possa subire delle variazioni dopo aver incubato le cellule con stimoli apoptotici o chemiotattici. Inoltre, come conseguenza dei nostri risultati, HS1 potrebbe essere annoverata fra le proteine che partecipano alla nucleazione, ancoraggio e rilascio dei microtubuli dal centrosoma, anche se sarà necessario definire in maniera più specifica la relazione HS1-centrosoma.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che HS1 ha un ruolo importante nel mantenimento della sopravvivenza delle cellule B neoplastiche. Per questa ragione, potrebbe costituire un nuovo target per lo sviluppo di un nuovo trattamento da somministrare ai pazienti affetti da LLC-B. La proposta per un futuro uso terapeutico di HS1 focalizza, ancora una volta, l'attenzione sulla via BCR-Lyn-HS1-attivazione cellulare e resistenza all'apoptosi. Sia Lyn che HS1 si prestano a diventare bersagli terapeutici al fine di rendere le cellule leucemiche responsive agli stimoli apoptotici, farmaco-indotti, durante il trattamento dei pazienti affetti da LLC-B.

## BIBLIOGRAFIA

1. Herrinton L.J.: Epidemiology of the Revised European-American Lymphoma Classification subtypes. *Epidemiol. Rev.*, 20:187-203 (1998).
2. Weiss N.S.: Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 53:139-142 (1979).
3. Boggs D.R., Chen S.C., Zhang Z.N. and Zhang A.: Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am. J. Hematol.*, 25:349-354 (1987).
4. Yuille M.R., Matutes E., Marossy A., Hilditch B., Catovsky D. and Houlston R.S.: Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br. J. Haematol.*, 109:794-799 (2000).
5. Capalbo S., Trerotoli P., Ciancio A., Battista C., Serio G. and Liso V.: Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur. J. Haematol.*, 65:114-117 (2000).
6. Wiernik P.H., Ashwin M., Hu X.P., Paietta E. and Brown K.: Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 113:407-414 (2001).
7. Caligaris-Cappio F. and Hamblin T.J.: B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a bird of different feather. *J. Clin. Oncol.*, 17:399-408 (1999).
8. Ward J.H.: Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2:253-257 (2001).
9. Dhiel L.F. and Ketchum L.H.: Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukaemia: autoimmune haemolytic anemia, pure red cell aplasia and autoimmune thrombocytopenia. *Semin. Oncol.*, 25:80-85 (1998).
10. Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M., Kay N., Keating M.J., O'Brien S. and Rai K.R.: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87:4990-4997 (1996).
11. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Mattioli M., Cattoretti G., Husson H., Freedman A., Inghirami G., Cro L., Baldini L., Neri A., Califano A. and Dalla-Favera R.: Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.*, 194:1625-1638 (2001).

12. Chiorazzi N. and Ferrarini M.: B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 21:841-894 (2003).
13. Stevenson F.K. and Caligaris-Cappio F.: Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103:4389-4395 (2004).
14. Ghia P. and Caligaris-Cappio F.: The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv. Cancer Res.*, 79:157-173 (2000).
15. Collins R.J., Verschuer L.A., Harmon B.V., Prentice R.L., Pope J.H. and Kerr J.F. : Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.*, 71:343-350 (1989).
16. Packham G. and Stevenson F.K.: Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 114: 441-449 (2005).
17. Saxena A., Viswanathan S., Moshynska O., Tandon P., Sankaran K. and Sheridan D.P.: Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 75: 22-33 (2004).
18. Niiro H., Clark E.A.: Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 945-956 (2002).
19. Reth M. and Wienands J.: Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 453-479 (1997).
20. Alfarano A., Indraccolo S., Circosta P., Minuzzo S., Vallario A., Zamarchi R., Fregonese A., Calderazzo F., Faldella A., Aragno M., Camaschella C., Amadori A. and Caligaris-Cappio F.: An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93:2327-2335 (1999).
21. Cragg M.S., Chan H.T.C., Fox M.D., Tutt A., Smith A., Oscier D.G., Hamblin T.J. and Glennie M.J.: The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signalling for apoptosis. *Blood*, 100:3068-3076 (2002).
22. Gupta N. and DeFranco A.L.: Visualizing lipid rafts dynamics and early signalling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol. Biol. Cell.*, 14:432-444 (2003).



23. DeFranco A.L., Chan V.W. and Lowell C.A.: Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Semin. Immunol.*, 10:299-307 (1998).
24. Mlinaric-Rascan I. and Yamamoto T.: B cell receptor signaling involves physical and functional association of FAK with Lyn and IgM. *FEBS Lett.*, 498:26-31 (2001).
25. Contri A., Brunati A.M., Trentin L., Cabrelle A., Miorin M., Cesaro L., Pinna L.A., Zambello R., Semenzato G. and Donella-Deana A.: Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 115: 369-378 (2005).
26. Egashira M., Kitamura D., Watanabe T. and Niikawa N.: The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic Cell Genet.*, 72:175-6 (1996).
27. Niiro H. and Clark E.A.: Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature Rev. Immunol.*, 2:945-956 (2002).
28. Sproul T.W., Malapati S., Kim J. and Pierce S.K.: Cutting edge: B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B cells. *J. Immunol.* 165:6020-6023 (2000).
29. Weitnraub B.C., Jun J.E., Bishop A.C., Shokat K.M., Thomas M.L., Goodnow C.C.: Entry of B cell receptor into signalling domains is inhibited in tolerant B cells. *J. Exp. Med.*, 191:1443-1448 (2000).
30. Caligaris-Cappio F.: Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 123:380-383 (2003).
31. Trentin L., Zambello R., Agostini C., Siviero F., Adami F., Marcolongo R., Raimondi R., Chisesi T., Pizzolo G. and Semenzato G.: Expression and functional role of tumor necrosis factor receptors on leukemic cells from patients with type B chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 81:752-758 (1993).
32. Trentin L., Cabrelle A., Facco M., Carollo D., Miorin M., Tosoni A., Pizzo P., Binotto G., Nicolardi L., Zambello R., Adami F., Agostini C. and Semenzato G.: Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood*, 104:502-508 (2004).

33. Richardson S.J., Matthews C., Catherwood M.A., Alexander H.D., Carey B. S., Farrugia J., Gardiner A., Mould S., Oscier D., Copplestone J.A. and Prentice A.G.: ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 107:3584-3592 (2006).
34. Trentin L., Agostini C., Facco M., Piazza F., Perina A., Siviero M., Gurrieri C., Galvan S., Adami F., Zambello R. and Semenzato G.: The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J. Clin. Invest.*, 104:115-121 (1999).
35. Luo C., Pan H., Mines M., Watson K., Zhang J. and Fan G.H.: CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 281:30081-30093 (2006).
36. Rai K.R. and Han T.: Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 4:447-456 (1990).
37. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N. and Pasternack B.S.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46:219-234 (1975).
38. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S. and Gremy F.: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48:198-206 (1981).
39. Montserrat E.: Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol. J.*, 3:7-9 (2002).
40. Mauro F.R., De Rossi G., Burgio V.L., Caruso R., Giannarelli D., Monarca B., Romani C., Baroni C.D. and Mandelli F.: Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica*, 79:334-341 (1994).
41. Melo J.V., Catovsky D., Gregory W.M. and Galton D.A.: The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br. J. Haematol.*, 65:23-29 (1987).

42. Keating M.J.: Chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 26:107-114 (1999).
43. Hallek M., Langenmayer I., Nerl C., Knauf W., Dietzfelbinger H., Adorf D., Ostwald M., Busch R., Kuhn-Hallek I., Thiel E. and Emmerich B.: Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93:1732-1737 (1999).
44. Sarfati M., Chevret S., Chastang C., Biron G., Stryckmans P., Delespesse G., Binet J.L., Merle-Beral H. and Bron D.: Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 88:4259-4264 (1996).
45. Vinante F., Vassanelli A., Zanotti R., Nadali G., Krampera M., Vincenzi C., Morosato L., Chilosi M. and Pizzolo G.: Circulating levels of soluble CD23 reflect clinical and biological features of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 25:189-194 (1995).
46. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G. and Stevenson F.K.: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94:1848-1854 (1999).
47. Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S.L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S.M., Schulman P., Vinciguerra V.P., Rai K.R., Ferrarini M. and Chiorazzi N.: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94:1840-1847 (1999).
48. Tobin G., Thunberg U., Johnson A., Thorn I., Soderberg O., Hultdin M., Botling J., Enblad G., Sallstrom J., Sundstrom C., Roos G. and Rosenquist R.: Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99:2262-2264 (2002).
49. Ghia P., Stamatopoulos K., Belessi C., Moreno C., Stella S., Guida G., Michel A., Crespo M., Laoutaris N., Montserrat E., Anagnostopoulos A., Dighiero G., Fassas A., Caligaris-Cappio F. and Davi F.: Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*, 105:1678-1685 (2005).

50. Falt S., Merup M., Tobin G., Thunberg U., Gahrton G., Rosenquist R. and Wennborg A.: Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106:681-689 (2005).
51. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM and Albitar M: CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98:181-186 (2001).
52. Ghia P., Guida G., Stella S., Gottardi D., Geuna M., Strola G., Scielzo C. and Caligaris-Cappio F.: The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, 101:1262-1269 (2003).
53. Hamblin T.J., Orchard J.A., Ibbotson R.E., Davis Z., Thomas P.W., Stevenson F.K. and Oscier D.G.: CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99:1023-1029 (2002).
54. Ghia P., Guida G., Scielzo C., Geuna M. and Caligaris-Cappio F.: CD38 modifications in chronic lymphocytic leukemia: are they relevant? *Leukemia*, 18:1733-1735. (2004).
55. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., Simon R., Davis R.E., Yu X., Yang L., Pickeral O.K., Rassenti L.Z., Powell J., Botstein D., Byrd J.C., Grever M.R., Cheson B.D., Chiorazzi N., Wilson W.H., Kipps T.J., Brown P.O. and Staudt L.M.: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 194:1639-1647 (2001).
56. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., Wright G., Davis R.E., Henrickson S.E., Zhao H., Ibbotson R.E., Orchard J.A., Davis Z., Stetler-Stevenson M., Raffeld M., Arthur D.C., Marti G.E., Wilson W.H., Hamblin T.J., Oscier D.G. and Staudt L.M.: ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101:4944-4951 (2003).

57. Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., Chen L., Keating M.J., Gribben J.G., Neuberg D.S., Flinn I.W., Rai K.R., Byrd J.C., Kay N.E., Greaves A., Weiss A. and Kipps T.J.: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 351:893-901 (2004).
58. Crespo M., Bosch F., Villamor N., Bellosillo B., Colomer D., Rozman M., Marce S., Lopez-Guillermo A., Campo E. and Montserrat E.: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 348:1764-1775 (2003).
59. Krober A., Bloehdorn J., Hafner S., Buhler A., Seiler T., Kienle D., Winkler D., Bangerter M., Schlenk R.F., Benner A., Lichter P., Dohner H. and Stilgenbauer S.: Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 24:969-975 (2006).
60. Del Giudice I., Morilla A., Osuji N., Matutes E., Morilla R., Burford A., Maravelaki S., Owusu-Ankomah K., Swansbury J., A'Hern R., Brito-Babapulle V. and Catovsky D.: Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 104:2124-2132 (2005).
61. Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., Dohner K., Bentz M. and Lichter P.: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 343:1910-1916 (2000).
62. Grever M.R., Lucas D.M., Dewald G.W., Neuberg D.S., Reed J.C., Kitada S., Flinn I.W., Tallman M.S., Appelbaum F.R., Larson R.A., Pajetta E., Jelinek D.F., Gribben J.G. and Byrd J.C.: Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J. Clin. Oncol.*, 25:799-804 (2007).
63. Krober A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Bruckle E., Lichter P., Dohner H. and Stilgenbauer S.: V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100:1410-1416 (2002).

64. Oscier D.G., Gardiner A.C., Mould S.J., Glide S., Davis Z.A., Ibbotson R.E., Corcoran M.M., Chapman R.M., Thomas P.W., Copplestone J.A., Orchard J.A. and Hamblin T.J.: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*, 100:1177-1184 (2002).
65. Terrin L., Trentin L., Degan M., Corradini I., Bertorelle R., Carli P., Maschio N., Bo M.D., Noventa F., Gattei V., Semenzato G. and De Rossi A.: Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia*, 21:965-972 (2007).
66. Ricca I., Rocci A., Drandi D., Francese R., Compagno M., Lobetti Bodoni C., De Marco F., Astolfi M., Monitillo L., Vallet S., Calvi R., Ficara F., Omede P., Rosato R., Gallamini A., Marinone C., Bergui L., Boccadoro M., Tarella C. and Ladetto M.: Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*, 21:697-705 (2007).
67. Binet J.L., Caligaris-Cappio F., Catovsky D., Cheson B., Davis T., Dighiero G., Dohner H., Hallek M., Hillmen P., Keating M., Montserrat E., Kipps T.J. and Rai K.: Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107:859-861 (2006).
68. Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M., Kay N., Keating M.J., O'Brien S. and Rai K.R.: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87:4990-4997 (1996).
69. Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J.L. and Travade P.: Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 338:1506-1514 (1998).
70. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia: A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 75:1422-1425 (1990).

71. Jaksic B., Brugiattelli M., Krc I., Losonczy H., Holowiecki J., Planinc-Peraica A., Kusec R., Morabito F., Iacopino P. and Lutz D.: High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer*, 79:2107-2114 (1997).
72. Keating M.J., O'Brien S., Lerner S., Koller C., Beran M., Robertson L.E., Freireich E.J., Estey E. and Kantarjian H.: Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*, 92:1165-1171 (1998).
73. Rai K.R., Peterson B.L., Appelbaum F.R., Kolitz J., Elias L., Shepherd L., Hines J., Threatte G.A., Larson R.A., Cheson B.D. and Schiffer C.A.: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 343:1750-1757 (2000).
74. Lepage M., Chevret S., Cazin B., Boudjerra N., Feugier P., Desablens B., Rapp M.J., Jaubert J., Autrand C., Divine M., Dreyfus B., Maloum K., Travade P., Dighiero G., Binet J.L. and Chastang C.: Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*, 98:2319-2325 (2001).
75. Dillman R.O., Mick R. and McIntyre O.R.: Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *J. Clin. Oncol.*, 7:433-438 (1989).
76. Robak T., Blonski J.Z., Kasznicki M., Gora-Tybor I., Dwilewicz-Trojaczek J., Boguradzki P., Konopka L., Ceglarek B., Sulek J., Kuliczowski K., Wolowicz D., Stella-Holowiecka B., Skotnicki A.B., Nowak W., Moskwa-Sroka B., Dmoszynska A. and Calbecka M.: Cladribine combined with cyclophosphamide and mitoxantrone as front-line therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 15:1510-1516 (2001).
77. Yamauchi T., Nowak B.J., Keating M.J. and Plunkett W.: DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin. Cancer Res.*, 7:3580-3589 (2001).

78. Flinn I.W., Neuberg D.S., Grever M.R., Dewald G.W., Bennett J.M., Paietta E.M., Hussein M.A., Appelbaum F.R., Larson R.A., Moore D.F. Jr and Tallman M.S.: Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J. Clin. Oncol.*, 25:793-798 (2007).
79. Demidem A., Lam T., Alas S., Hariharan K., Hanna N. and Bonavida B.: Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12:177-186 (1997).
80. Alas S., Emmanouilides C. and Bonavida B.: Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 7:709-723 (2001).
81. Di Gaetano N., Xiao Y., Erba E., Bassan R., Rambaldi A., Golay J. and Introna M.: Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br. J. Haematol.*, 114:800-809 (2001).
82. Wierda W., O'Brien S., Wen S., Faderl S., Garcia-Manero G., Thomas D., Do K.A., Cortes J., Koller C., Beran M., Ferrajoli A., Giles F., Lerner S., Albitar M., Kantarjian H. and Keating M.: Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 23:4070-4078 (2005).
83. Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller C., Wierda W., Detry M.A., Lynn A. and Kantarjian H.: Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 23:4079-4088 (2005).
84. Montillo M., Cafro A.M., Tedeschi A., Brando B., Oreste P., Veronese S., Rossi V., Cairoli R., Pungolino E. and Morra E.: Safety and efficacy of subcutaneous Campath-1H for treating residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia responding to fludarabine. *Haematologica*, 87:695-700 (2002).
85. Stilgenbauer S. and Dohner H.: Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 347:452-453 (2002).



86. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E., Larratt L.M., Skotnicki A., Koziner B., Chanan-Khan A.A., Seymour J.F., Bociek R.G., Pavletic S. and Rai K.R.: Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 25:1114-1120 (2007).
87. Moreno C., Villamor N., Colomer D., Esteve J., Martino R., Nomdedeu J., Bosch F., Lopez-Guillermo A., Campo E., Sierra J. and Montserrat E.: Allogeneic stem-cell transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 23:3433-3438 (2005).
88. Dreger P. and Montserrat E.: Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16:985-992 (2002).
89. Kitamura D., Kaneko H., Miyagoe Y., Ariyasu T. and Watanabe T.: Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Research*, 17: 9367-9379 (1989).
90. Fischer U., Michel A. and Meese E.U.: Expression of the gene for hematopoietic cell specific protein is not restricted to cells of hematopoietic origin. *Int. J. Mol. Med.*, 15: 611-615 (2005).
91. GSH van Rossum A., Schuurung-Scholtes E., van Buuren-van Seggelen V., Kluin P.M. and Schuurung E.: Comparative genome analysis of cortactin and HS1: the significance of the F-actin binding repeat domain. *BMC Genomics*, 6:1-14 (2005).
92. Hao J.J., Zhu J., Zhou K., Smith N. and Zhan X.: The Coiled-coil Domain Is Required for HS1 to Bind to F-actin and Activate Arp2/3 Complex. *J. Biol. Chem.*, 280: 37988-37994 (2005).
93. Suzuki Y., Demoliere C., Kitamura D., Takeshita H., Deuschle U. and Watanabe T.: HAX-1, a Novel Intracellular Protein, Localized on Mitochondria, Directly Associates with HS1, a Substrate of Src Family Tyrosine Kinases. *J. Immunol.*, 158: 2736-2744 (1997).
94. Cilenti L., Soundarapandian M.M., Kyriazis G.A., Stratico V., Singh S., Gupta S., Bonventre J.V., Alnemri E.S. and Zervos A.S.: Regulation of HAX-1 Anti-apoptotic Protein by Omi/HtrA2 Protease during Cell Death. *J. Biol. Chem.*, 279: 50295-50301 (2004).

95. Brunati A.M., Deana R., Folda A., Massimino M.L., Marin O., Ledro S., Pinna L.A. and Donella-Deana A.: Thrombin-induced Tyrosine Phosphorylation of HS1 in Human Platelets Is Sequentially Catalyzed by Syk and Lyn Tyrosine Kinases and Associated with the Cellular Migration of the Protein. *J. Biol. Chem.*, 280: 21029-21035 (2005).
96. Yamanashi Y., Okada M., Semba T., Yamori T., Umemori H., Tsunasawa S., Toyoshima K., Kitamura D., Watanabe T. and Yamamoto T.: Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Immunology*, 90:3631-3635 (1993).
97. Ruzzene M., Brunati A.M., Marin O., Donella-Deana A. and Pinna L.A.: SH2 Domains Mediate the Sequential Phosphorylation of HS1 Protein by p72<sup>syk</sup> and Src-Related Protein Tyrosine Kinases. *Biochemistry*, 35:5327-5332 (1996).
98. Brunati A.M., Donella-Deana A., James P., Quadroni M., Contri A., Marin O. and Pinna L.A.: Molecular Features Underlying the Sequential Phosphorylation of HS1 Protein and Its Association with c-Fgr Protein-tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.*, 274:7557-7564 (1999).
99. Brunati A.M., Bordin L., Clari G., James P., Quadroni M., Baritono E., Pinna L.A. and Donella-Deana A.: Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood*, 96: 1550-1557 (2000).
100. Taniuchi I., Kitamura D., Maekawa Y., Fukuda T., Kishi H. and Watanabe T.: Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, 14:3664-3678 (1995).
101. Fukuda T., Kitamura D., Taniuchi I., Maekawa Y., Benhamou L.E., Sarthou P. and Watanabe T.: Restoration of surface IgM-mediated apoptosis in an anti-IgM-resistant variant of WEHI-231 lymphoma cells By HS1, a protein-tyrosine kinase substrate. *Immunology*, 92:7302-7306 (1995).
102. Scielzo C., Ghia P., Conti A., Bachi A., Guida G., Geuna M., Alessio M. and Caligaris-Cappio F.: HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J. Clin. Invest.*, 115:1644-1650 (2005).

103. Ruzzene M., Penzo D. and Pinna L.A.: Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.*, 364: 41-47 (2002).
104. Chen Y., Kori R., John B. and Tan T.: Caspase-Mediated Cleavage of Actin-Binding and SH3-Domain-Containing Proteins Cortactin, HS1, and HIP-55 during Apoptosis. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, 288:981-989 (2001).
105. Muzio M., Scielzo C., Frenquelli M., Bachi A., De Palma M., Alessio M., Ghia P. and Caligaris-Cappio F.: HS1 complexes with cytoskeleton adapters in normal and malignant chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*, 21:2067-2070 (2007).
106. Gomez T.S., McCarney S.D., Carrizosa E., Labno C.M., Comiskey E.O., Nolz J.C., Zhu P., Freedman B.D., Clark M.R., Rawlings D.J., Billadeau D.D. and Burkhardt J.K.: HS1 Functions as an Essential Actin-Regulatory Adaptor Protein at the Immune Synapse. *Immunity*, 24:741-752 (2006).
107. Billadeau D.D. and Burkhardt J.K.: Regulation of Cytoskeletal Dynamics at the Immune Synapse: New Stars Join the Actin Troupe. *Traffic*, 7:1451-1460 (2006).
108. Tachibana H., Koga K., Fujimura Y. and Yamada K.: A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature structural and molecular biology*, 11:380-381 (2004).
109. Yamanashi B.Y., Fukuda T., Nishizumi H., Inazu T., Higashi K., Kitamura D., Ishida T., Yamamura H., Watanabe T. and Yamamoto T.: Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J.Exp Med.*, 185:1387-1392 (1997).
110. He H., Watanabe T., Zhan X., Huang C., Schuurin E., Fukami K., Takenawa T., Kumar C., Simpson R.J. and Maruta H.: Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol. Cell. Biol.*, 18:3829-3837 (1998).
111. Azimzadeh J. and Bornens M.: Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell. Sci.*, 120:2139-2142 (2007).
112. Nigg E.A.: Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int. J. Cancer.*, 119:2717-2723 (2006).

113. Chiorazzi N.: Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract. Res. Clin. Hematol.*, 20:399-413 (2007).
114. Hensel M., Zoz M., Giesecke C., Benner A., Neben K., Jauch A., Stilgenbauer S., Ho A.D. and Krämer A.: High rate of centrosome aberrations and correlation with proliferative activity in patients with untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer.*, 121:978-83 (2007).