



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche**

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

**LE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI  
NELLA PATOGENESI DELLA  
LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DI TIPO B**

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

**Supervisore: Ch.mo Prof. FAUSTO ADAMI**

**Correlatore: Dott. LIVIO TRENTIN**

**Dottoranda: Dott.ssa ELISA AVE**

**31 gennaio 2010**



# INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b>	Pag.	5
<b>RIASSUNTO</b>	Pag.	7
<b>ABSTRACT</b>	Pag.	9
<b>1. INTRODUZIONE</b>	Pag.	11
<b>1.1 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)</b>	Pag.	11
<i>1.1.1 Tessuti di origine</i>	Pag.	11
<i>1.1.2 Caratterizzazione immunofenotipica</i>	Pag.	13
<i>1.1.3 Espansione e caratterizzazione funzionale</i>	Pag.	13
<i>1.1.4 Funzioni delle MSC</i>	Pag.	15
<i>1.1.5 Proprietà immunomodulatorie</i>	Pag.	17
<b>1.2 La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B)</b>	Pag.	21
<i>1.2.1 Epidemiologia ed eziologia</i>	Pag.	21
<i>1.2.2 Presentazione clinica</i>	Pag.	23
<i>1.2.3 Diagnosi</i>	Pag.	23
<i>1.2.4 Stadiazione e prognosi</i>	Pag.	26
<i>1.2.5 Cenni di terapia</i>	Pag.	31
<i>1.2.6 I linfociti B neoplastici</i>	Pag.	34
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	Pag.	43
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	Pag.	45
<b>3.1 Pazienti</b>	Pag.	45
<b>3.2 Isolamento delle cellule mesenchimali da midollo osseo</b>	Pag.	48
<b>3.3 Espansione <i>ex vivo</i> delle MSC</b>	Pag.	49
<b>3.4 Analisi immunofenotipica</b>	Pag.	50
<b>3.5 Colture differenziative</b>	Pag.	52
<i>3.5.1 Differenziazione osteogenica</i>	Pag.	52
<i>3.5.2 Differenziazione adipogenica</i>	Pag.	54
<b>3.6 Analisi molecolare dell'espressione genica delle MSC differenziate</b>	Pag.	56
<i>3.6.1 Estrazione dell'RNA</i>	Pag.	56
<i>3.6.2 Sintesi del cDNA</i>	Pag.	57
<i>3.6.3 Amplificazione del cDNA mediante PCR</i>	Pag.	58
<b>3.7 Isolamento dei linfociti B da sangue periferico</b>	Pag.	60
<b>3.8 Co-culture di cellule mesenchimali staminali e linfociti B allogenici</b>	Pag.	61
<b>3.9 Valutazione dell'apoptosi dei linfociti B</b>	Pag.	62
<i>3.9.1 Metodica dell'Annessina V</i>	Pag.	62
<i>3.9.2 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE) e western blotting</i>	Pag.	63
<b>3.10 Test di migrazione in camera di Boyden</b>	Pag.	66
<b>3.11 Analisi statistica</b>	Pag.	68
<b>4. RISULTATI</b>	Pag.	71
<b>4.1 Isolamento delle MSC da midollo osseo</b>	Pag.	71
<b>4.2 Caratterizzazione fenotipica</b>	Pag.	72
<b>4.3 Caratterizzazione funzionale</b>	Pag.	73
<b>4.4 Effetto delle MSC sull'apoptosi dei linfociti B di LLC e linfociti B normali</b>	Pag.	76
<i>4.4.1 Valutazione dell'apoptosi spontanea mediante Annessina V</i>	Pag.	76

<i>4.4.2 Valutazione dell'apoptosi spontanea mediante western blotting</i>	Pag.	79
<i>4.4.3 Analisi dell'effetto antiapoptotico delle MSC dopo trattamento chemioterapico in vivo</i>	Pag.	82
<b>4.5 Effetto chemiotattico esercitato dalle MSC sui linfociti B patologici</b>	Pag.	83
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	Pag.	85
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	Pag.	91

## ABBREVIAZIONI

<b>AcMo</b>	Anticorpi Monoclonali
<b>AIRT</b>	Associazione Italiana Registri Tumori
<b>APC</b>	Antigen Presenting Cell
<b>ATM</b>	Ataxia Teleangectasia Mutated
<b>Bcl-2</b>	B cell lymphoma 2
<b>BCR</b>	B-Cell Receptor
<b>BMP-4</b>	Bone Morphogenetic Factor-4
<b>Cbfa1</b>	Core Binding Factor $\alpha$ 1
<b>CDR</b>	Regioni Determinanti la Complementarietà
<b>CFU-F</b>	Colony Forming Unit Fibroblast
<b>CG</b>	Centro Germinativo
<b>CTL</b>	Cytotoxic T Lymphocytes
<b>D-MEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DC</b>	Dendritic Cell
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamminotetracetico
<b>F/H</b>	Ficoll Hypaque
<b>FAB</b>	French American British
<b>Fab</b>	Fragment antigen binding (Ig)
<b>Fc</b>	Fragment crystallisable (Ig)
<b>FCS</b>	Siero Fetale Bovino
<b>FDC</b>	Follicular Dendritic Cells
<b>FISH</b>	Fluorescence in Situ Hybridization
<b>FITC</b>	Isotiocianato di Fluoresceina
<b>flt-3</b>	fms related tirosin kynase 3
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>GVHD</b>	Graft Versus Host Disease
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HSC</b>	Hemopoietic Stem Cells
<b>hTERT</b>	human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>IDO</b>	Indoleamina 2,3 DiOssigenasi
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferon $\alpha$
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IgVH</b>	Geni delle catene pesanti delle immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleuchina
<b>IM</b>	Indice di migrazione
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>LLC-B</b>	Leucemia Linfatica Cronica di tipo B
<b>LPL</b>	Leucemia Prolinfocitica
<b>MCGS</b>	Mesenchymal Cell Growth Supplement
<b>Mcl-1</b>	Mantle Cell Lymphoma 1
<b>MSC</b>	Mesenchymal Stem Cell
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLC</b>	Nurse Like Cells
<b>PARP</b>	Poli-ADP-Ribosio Polimerasi

<b>PBPC</b>	Peripheral Blood Progenitor Cells
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>Ppary2</b>	Proliferator Activated Receptor $\gamma$ 2
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PVR</b>	Polio Virus Receptor
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>SDF-1</b>	Stromal derived Factor-1
<b>SDS</b>	Sodio Dodecil Solfato Elettroforesi Su Gel di
<b>PAGE</b>	Poliacrilamide
<b>SHM</b>	Ipermutazioni somatiche
<b>TAC</b>	Tetrameric Antibody Complex
<b>TC</b>	Tricolor
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TGF-<math>\beta</math>-1</b>	Transforming Growth Factor $\beta$ -1
<b>TK</b>	Timidina Kinasi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor
<b>ULPBP</b>	UL16-binding proteins
<b>ZAP-70</b>	Zeta-Associated Protein 70
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	$\alpha$ -Modified Eagle Medium

## 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+ nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici, dovuto sia ad un aumento della proliferazione che ad un difetto dei meccanismi di morte cellulare programmata. La resistenza all'apoptosi in questi linfociti favorisce la progressione della malattia attraverso un'aumentata sopravvivenza del clone neoplastico e l'induzione della resistenza ai farmaci citostatici. Tali alterazioni sono imputabili sia a fattori intrinseci che a fattori estrinseci derivanti dal microambiente. Poiché l'aumentata sopravvivenza ed il progressivo accumulo del clone linfocitario risultano selettivamente favoriti dall'interazione con cellule accessorie non tumorali presenti nel microambiente in cui esso risiede, in questa tesi abbiamo focalizzato l'attenzione sulle cellule mesenchimali staminali (MSC), allo scopo di valutare il loro ruolo nella sopravvivenza e nella compartimentalizzazione del clone B leucemico.

Le MSC costituiscono una frazione esigua (inferiore allo 0,01%) della popolazione di cellule midollari, sono cellule staminali multipotenti in grado di differenziare in diversi tessuti di origine mesenchimale; sono inoltre dotate di proprietà immunomodulatorie verso linfociti B, T, Natural Killer e cellule dendritiche.

In questa tesi le MSC sono state isolate dal sangue midollare di 47 pazienti affetti da LLC-B e sono state caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente mediante analisi citofluorimetrica (positività per CD73, CD90 e CD105, negatività per CD31, CD34 e CD45) e colture differenziative (adipociti ed osteociti) confrontandole con MSC di donatori sani. Successivamente si sono

allestite co-culture di linfociti B di pazienti affetti da LLC e MSC allo scopo di valutare l'effetto delle MSC sul clone neoplastico di LLC.

Le MSC ottenute dai pazienti non hanno presentato alterazioni dal punto di vista fenotipico né funzionale rispetto alle MSC di donatori sani, tuttavia esse hanno sviluppato interazioni capaci di favorire la sopravvivenza del clone leucemico. Gli esperimenti di co-cultura hanno dimostrato infatti che le MSC esercitano un effetto anti-apoptotico sui linfociti B neoplastici, documentato da un aumento significativo della sopravvivenza delle cellule B di LLC dopo 7 giorni di coltura, effetto verificatosi anche con MSC di donatori sani e invece molto meno marcato nei linfociti B normali.

Tale attività anti-apoptotica si è osservata, seppur di minore intensità, anche nei linfociti B di pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico *in vivo* con Fludabarina e Ciclofosfamida, suggerendo che le MSC possano essere implicate anche nei meccanismi di chemio resistenza del clone di LLC.

Infine l'analisi della migrazione cellulare dei linfociti B patologici in presenza di terreno condizionato derivante dalle colture di MSC ha dimostrato la capacità delle MSC di produrre stimoli chemiotattici in grado di richiamare in sede midollare il clone maligno, ma non i linfociti B normali.

I dati riportati suggeriscono che le MSC nei pazienti affetti da LLC-B, sebbene non mostrino alterazioni dal punto di vista fenotipico e funzionale, svolgono un ruolo attivo nel favorire la sopravvivenza e la compartimentalizzazione delle cellule B neoplastiche a livello midollare.



## ABSTRACT

B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) is the most common leukemia in adults and is characterized by the accumulation of mature clonal CD5+ B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow and lymphoid tissues. The defect in programmed cell death favours the disease progression through a prolonged survival of malignant cells and the induction of the drug-resistance. The defective apoptosis of B-CLL cells is not only due to intrinsic defects of the leukemic clone, but also to extrinsic factors that influence its behavior in the tissue microenvironment. Since the accumulation of monoclonal B cells is also supported by their interaction with surrounding cells, we focused our attention on mesenchymal stem cells (MSCs) in order to evaluate their role in survival and localization of neoplastic clone. MSCs can be isolated, expanded with high efficiency and induced to differentiate into multiple mesenchymal lineages under appropriated culture conditions. In addition, they show crucial immunoregulatory properties suppressing several T-, B- and NK-cell functions and affecting dendritic cell activities.

In the present study MSCs isolated from the bone marrow of 47 B-CLL patients were expanded *ex vivo* and characterized through fluocytometric analysis and differentiation cultures (adipocytes and osteocytes). While MSCs from B-CLL patients exhibited normal phenotype and differentiation capacities, when co-cultured with neoplastic B cells they exerted an anti-apoptotic effect reducing lymphocyte apoptosis. After 7 days of culture in presence of CLL-MSC, we observed a relevant extended survival of leukemic cells, but not of normal B lymphocytes. The same effect was observed on B-CLL cells isolated from 3 patients treated with pro-apoptotic compounds, suggesting an involvement of MSCs in drug-resistance. Finally, chemotaxis tests showed the ability of MSCs to

produce molecules promoting migration and localization of neoplastic B cells in bone marrow.

Taken together, these findings suggest that MSCs derived from patients with B-CLL, despite an apparent normal phenotype and normal differentiation ability, provide survival signals to neoplastic cells extending their lifespan and producing chemotactic factors favouring their accumulation in the bone marrow.

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le cellule mesenchimali staminali (MSC) sono una popolazione di cellule staminali non emopoietiche, dotate di capacità di autorinnovamento a lungo termine ed in grado di differenziare in diversi tessuti di origine mesenchimale. Friedenstein e Petrakova tra gli anni '60 e '70 del secolo scorso isolarono per la prima volta dal midollo osseo di ratto una popolazione di cellule in grado di aderire ad un supporto in plastica con fenotipo simil fibroblastico [1] [2]. Studi successivi dimostrarono la capacità di queste cellule di dare origine a colonie derivate da una singola cellula (chiamate CFU-F: colony forming unit-fibroblastic) e di differenziare in altri tipi cellulari di origine mesodermica, compresi osteoblasti, condrociti, adipociti e mioblasti [3] [4, 5].

Tali cellule furono inizialmente denominate “*colony forming unit-fibroblast*” e “*marrow stromal fibroblast*” (MSF), termini poi abbandonati e sostituiti da “*marrow stromal cells*” (MSC), “*mesenchymal stem cells*” (MSC), e “*mesenchymal progenitor cells*” (MPC), per indicare una popolazione non omogenea di cellule multipotenti. Recentemente la comunità scientifica si è uniformata adottando il termine unico di “cellule mesenchimali staminali” (*mesenchymal stem cells*, MSC), proposto da Caplan nel 1991, a cui faremo riferimento nel corso di questa tesi [5] [6].

### 1.1.1 Tessuti di origine

Le MSC sono state isolate per la prima volta dal midollo osseo. Tale tessuto continua ad essere la fonte più accessibile e studiata, sebbene queste

cellule siano presenti a bassissima frequenza, attorno allo 0.01-0.0001% di tutte le cellule nucleate, e il loro numero sia destinato a diminuire con l'avanzare dell'età: 1/104 nel neonato, 0,5/106 in un adulto di 80 anni.

Con l'ampliarsi degli studi e delle conoscenze sulle MSC, tali cellule sono state isolate anche in altri tessuti quali il grasso sottocutaneo [7], il sangue di cordone ombelicale [8], i tessuti fetali [9] e il legamento periodontale [10]. La ricerca delle MSC nel sangue periferico ha prodotto invece risultati contrastanti: diversi autori negano l'esistenza di MSC circolanti, sostenendo l'impossibilità di isolare MSC dalla raccolta delle cellule progenitrici circolanti (PBPC) dopo terapia mobilizzante. [11, 12]. Tuttavia altre evidenze sperimentali confermano la possibilità di ottenere colture di cellule fibroblastoidi da sangue periferico di soggetti sani in presenza di siero fetale bovino, senza aggiunta di fattori di crescita [13, 14]. Una quota cospicua di cellule, analoghe per fenotipo e caratteristiche colturali alle MSC midollari adulte, ma con molte più potenzialità differenziative, è stata osservata nel sangue circolante di feto umano fino alla 7<sup>a</sup> settimana di gestazione, dopo la quale iniziano a calare di numero, persistendo fino alla 12<sup>a</sup> settimana [15]. La presenza quindi di una popolazione di MSC a bassissima frequenza nel sangue periferico durante lo sviluppo embrio-fetale suggerisce che tali cellule si distribuiscono ai vari distretti corporei e persistano poi nell'adulto come riserva per la riparazione e rigenerazione tissutale [16].

Attualmente il dibattito sulla possibilità di isolare le MSC da sangue periferico rimane ancora aperto, mentre il midollo osseo si conferma la fonte meglio caratterizzata ed in grado di garantire una resa migliore per l'allestimento di colture di MSC.

### ***1.1.2 Caratterizzazione immunofenotipica***

Contrariamente alle cellule staminali di origine ematopoietica (Hemopoietic Stem Cells, HSC), le MSC sono prive di un marcatore antigenico che, come la molecola CD34 per le HSC, le identifichi in modo univoco.

La caratterizzazione fenotipica delle MSC umane si basa sulla loro positività per alcuni antigeni non esclusivi delle MSC e sulla negatività per antigeni tipicamente espressi dalle cellule di derivazione emopoietica. Le MSC esprimono CD44 (recettore per l'acido ialuronico), CD90 e CD29 (molecole di adesione presenti sulle cellule stromali) [17, 18], CD105 (recettore endoglina di tipo III del Transforming Growth Factor  $\beta$ , riconosciuta dall'anticorpo SH-2) [19], CD73 (5'-ectonucleotidasi di membrana, presente nelle colture derivanti da cellule stromali midollari e riconosciuta dagli anticorpi SH-3 e SH-4) [20], STRO-1 (antigene presente nei precursori non-emopoietici del midollo osseo) [21] e CD54 (ICAM 1). Le MSC risultano invece negative per CD34 e CD45 (marcatori dei precursori emopoietici e delle cellule emopoietiche) e per CD31/PECAM-1 (marcatori endoteliali).

### ***1.1.3 Espansione e caratterizzazione funzionale***

Le MSC vengono isolate da sospensioni cellulari *ex-vivo* derivate da sangue midollare o da tessuti disaggregati nelle singole componenti cellulari e risospese in terreno liquido. Le cellule mononucleate vengono seminate in piastre o fiaschette di coltura ad una densità di circa 1.000 cellule/cm<sup>2</sup> in terreno tipo *modified Eagle Medium* ( $\alpha$ -MEM) o *Dulbecco's modified Eagle medium* (D-MEM), addizionato di siero fetale bovino ed antibiotici. Già dopo 24 ore alcune cellule aderiscono alla superficie in plastica, mentre la maggior parte rimane in sospensione e viene eliminata dopo 7 giorni, con il primo cambio di terreno. Nei

giorni successivi compaiono i primi foci di proliferazione, costituiti da aggregati di cellule altamente proliferanti che tendono alla confluenza reciproca, condizione che porta all'arresto della proliferazione ed alla differenziazione spontanea delle cellule in pre-adipociti. Pertanto quando il monostrato raggiunge uno stato di semi-confluenza (70-80% della superficie coperta dalle cellule), le cellule vengono staccate con tripsina e seminate in altre piastre per espandere la coltura.

Dopo circa 5-7 settimane si ottiene una popolazione omogenea di cellule aderenti, con aspetto simil-fibroblastico, la quale continua a proliferare senza differenziare spontaneamente fino a 40 generazioni [18].

Nel corso della coltura le MSC isolate ed espanse *in vitro* non modificano il proprio fenotipo di membrana né il proprio potenziale differenziativo multilineare, permanendo in uno stato indifferenziato. In presenza però di opportuni terreni condizionati sono in grado di differenziare nelle varie linee di origine mesodermica, come quella adipogenica, osteogenica, condrogenica e miogenica, proprietà che attesta la natura staminale di tali cellule [22]. La differenziazione adipocitaria viene indotta con un terreno contenente desametasone (1  $\mu\text{M}$ ), insulina e 3-isobutil-1-metilxantina, fattori che attivano le vie metaboliche della sintesi lipidica. Le MSC accumulano progressivamente goccioline lipidiche nel citoplasma, rivelate da colorazioni specifiche come Oil-red-O o Sudan nero. La differenziazione osteoblastica viene indotta con un terreno contenente desametasone in quantità minori rispetto a quello usato nella differenziazione adipocitaria (0.1  $\mu\text{M}$ ), acido ascorbico e  $\beta$ -glicerofosfato. Le cellule assumono una forma poligonale e depositano nello spazio extra-cellulare una matrice mineralizzata rifrangente la luce al microscopio ottico, che si colora intensamente mediante colorazioni tipo von Kossa o reazioni alla fosfatasi alcalina. La differenziazione condrocitaria viene ottenuta con un terreno simile a

quello osteogenico, contenente desametasone ed acido ascorbico, ma con l'aggiunta di Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), prolina ed altri fattori. Le cellule assumono una morfologia globosa e si dispongono in filiere simil-epiteliali. La matrice cartilaginea viene colorata intensamente mediante blu di toluidina e le cellule diventano positive, in immunistochemical, per il collagene di tipo II. La differenziazione miogenica viene indotta incubando le cellule con amphotericina B o con 5-fluorocitidina: si osserva un progressivo allungamento delle cellule, la formazione di miotubuli e la comparsa di attività contrattile spontanea o indotta da acetilcolina. L'avvenuta differenziazione miocellulare viene dimostrata in immunistochemical attraverso l'espressione di miogenina, myo D (fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione delle cellule mesenchimali in senso mioblastico) o miosina.

Recentemente è stata osservata la capacità delle MSC di differenziare anche in tessuti diversi da quelli di derivazione mesodermica, poiché, se sottoposte a stimoli adeguati *in vitro*, sono in grado di generare neuroni (cellule di origine ectodermica) [23], pneumociti [24], epatociti [25] e cellule epiteliali del tubulo renale [26] (tutte cellule di origine endodermica). Queste osservazioni sono state confermate *in vivo* nel modello murino: le MSC iniettate nel cervello ischemico del ratto assumono un fenotipo neuronale e migliorano il recupero funzionale dell'area danneggiata [27], mentre nei topi esposti alla bleomicina attecchiscono nel polmone e sono in grado di differenziare in pneumociti di tipo I [24].

#### ***1.1.4 Funzioni delle MSC***

Le MSC *in vivo* costituiscono una delle componenti di un microambiente altamente specializzato coinvolto nella regolazione di sopravvivenza, quiescenza e

differenziazione delle cellule staminali emopoietiche (HSC). Lo dimostra il fatto che, *in vitro*, siano in grado di sostenere colture di cellule emopoietiche a lungo termine in maniera simile alle colture di cellule stromali miste [17, 28] e, in modelli animali, il co-trapianto di MSC umane e cellule staminali emopoietiche favorisce l'attecchimento di quest'ultime [29]. L'emopoiesi infatti, sia durante la vita fetale che nella vita adulta, necessita di un adeguato microambiente (nicchia emopoietica) in grado di fornire opportuni segnali che regolino l'autorinnovamento, la proliferazione ed il differenziamento delle HSC in elementi maturi. Durante il periodo embrionale il sito dove avviene l'emopoiesi è inizialmente il sacco vitellino, dal secondo mese il fegato fetale e solo successivamente, verso il sesto-settimo mese, il midollo osseo. La presenza di MSC circolanti nel sangue cordonale e, in seguito, nel fegato fetale e nel midollo osseo [30], fa supporre che il microambiente in questi siti non sia inizialmente in grado di sostenere in maniera adeguata le HSC, attribuendo quindi alle MSC un ruolo nella migrazione e nell'attecchimento delle HSC, promuovendo la localizzazione dell'emopoiesi definitiva presso questi siti [31].

L'interazione tra le MSC e le HSC si esplica sia attraverso il contatto diretto cellula-cellula, sia attraverso la produzione di fattori solubili: le MSC producono una serie di citochine, tra cui Stem Cell Factor (SCF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Stromal Derived Factor 1 (SDF-1), Oncostatina M (OSM), Bone Morphogenetic Factor-4 (BMP-4), fms related tirosin Kynase (flt-3), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), in grado di mantenere le HSC in uno stato di quiescenza o di promuovere il loro *self-renewal* [32]. Esse producono inoltre una grande varietà di interleuchine (IL) tra cui IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 e, *in vitro* in presenza di IL-1 $\alpha$ , anche Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) e Granulocyte Colony



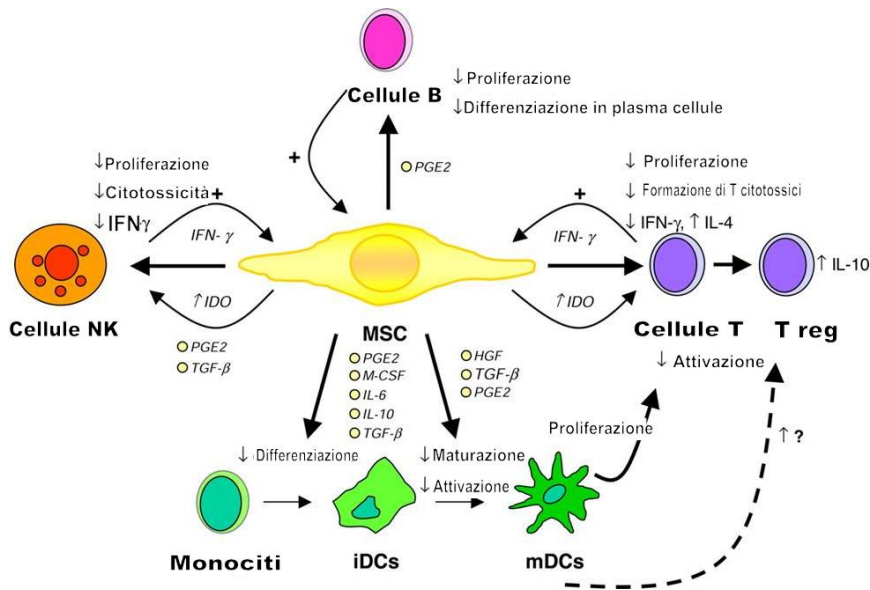
Stimulating Factor (G-CSF), coinvolti nella differenziazione delle HSC e di alcuni precursori più maturi [17].

Le MSC sono inoltre precursori delle cellule reticolari, periciti specializzati dei sinusoidi ematici che prendono stretto contatto con le HSC e le cellule emopoietiche in via di maturazione, degli adipociti e degli osteoblasti, tutte cellule presenti nello stroma midollare e che, a loro volta, regolano la sopravvivenza, l'auto-rinnovamento, la migrazione ed il differenziamento delle HSC.

Studi recenti attribuiscono alle MSC la capacità di migrare verso organi e tessuti danneggiati per prendere parte al processo riparativo. Le MSC infatti legano la P-selectina, molecola espressa dalle cellule endoteliali, permettendone quindi l'extravasazione per raggiungere la sede del danno [33].

### ***1.1.5 Proprietà immunomodulatorie***

Dal punto di vista immunologico le MSC sono scarsamente immunogeniche poiché non esprimono le molecole co-stimolatorie (CD80, CD86, CD40) necessarie per la stimolazione diretta dei linfociti T [34] e non sono soggette a lisi da parte dei linfociti T citotossici [35]. Lo dimostra il fatto che MSC allogene HLA *mismatched*, se trapiantate in modelli sperimentali di roditore o babbuino, non vengono rigettate [36]. Le MSC esplicano inoltre un'azione immunosoppressiva nei confronti di numerosi effettori immunitari (Figura 1).



**Figura 1. Le proprietà immunomodulatorie delle MSC.** iDCs: cellule dendritiche immature. mDCs: cellule dendritiche mature. Adattato da Nauta A.J. *et al.*, Journal of Immunology, 2007 [37]

### MSC e linfociti T

I primi studi su MSC murine, umane e di babuino dimostrarono la capacità di tali cellule di inibire, *in vitro*, sia la proliferazione delle cellule T indotta da alloantigeni e mitogeni [38], sia l'attivazione dopo stimolazione con anticorpi CD3 e CD28 [39]. I meccanismi molecolari attraverso cui si esplica tale attività regolatoria non sono stati ancora completamente chiariti. Essa non è legata ad un effetto pro-apoptotico sulle cellule T proliferanti, bensì ad un blocco in fase G0 del ciclo cellulare [40]. Tale inibizione sembra dipendere in parte dall'interazione diretta cellula-cellula, ma anche dalla produzione di fattori solubili: TGF-β1, HGF, Prostaglandina E-2 (PGE-2) [38] e l'enzima indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO) [41] sono stati proposti come possibili mediatori in grado di inibire la proliferazione dei linfociti T.

L'azione immunomodulatoria delle MSC è rivolta anche alle cellule T regolatorie, poiché le MSC sono in grado di reclutare e mantenere cellule T con fenotipo regolatorio (CD4+/CD25+/FOXP3+) [42]. Inoltre, in colture di cellule mononucleate ottenute da sangue periferico e stimulate con mitogeni, la presenza

di MSC determina un aumento della popolazione di cellule CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> [43, 44].

Studi condotti sull'uomo nell'ambito della Graft Versus Host Disease (GVHD) mostrano che le MSC sono in grado di inibire la formazione di linfociti T citotossici (CTL), mentre non interferiscono con la lisi mediata da queste cellule [35, 45].

### MSC e linfociti B

Le MSC umane sono in grado di inibire *in vitro* la proliferazione dei linfociti B stimolati con IL-2, IL-4 e CD40 ligando, inducendone l'arresto in fase G0/G1 del ciclo cellulare, e riducono la produzione di Immunoglobuline (Ig) di tipo A, G, ed M, interferendo con il processo differenziativo del linfocita B. Anche l'espressione di molecole coinvolte nelle funzioni chemiotattiche dei linfociti B, come i recettori chemiochinici CXCR4, CXCR5 e CCR7, risulta diminuita in seguito a co-cultura con le MSC, effetto che si traduce in una ridotta chemiotassi delle cellule B in risposta alle chemiochine CXCL12/SDF-1 $\alpha$  e CXCL13 [46].

L'azione svolta sui linfociti B sembra esplicarsi soprattutto attraverso la produzione di fattori solubili la cui natura non è ancora stata completamente chiarita. Uno studio recente dimostra che la stimolazione di linfociti B con CXCL12/SDF-1 $\alpha$  comporta l'attivazione della cascata delle MAP chinasi, determinando il blocco della proliferazione e della differenziazione linfocitaria [47].

### MSC e cellule Natural Killer (NK)

Le MSC *in vitro* inibiscono la proliferazione, indotta da IL-2 o IL-15, la secrezione di IFN- $\gamma$  e la capacità citotossica delle cellule NK [48]. Sono coinvolti diversi meccanismi, alcuni mediati da fattori solubili, altri determinati dal contatto cellula-cellula. È stato dimostrato che la secrezione di PGE-2 da parte delle MSC è in grado di influenzare parzialmente la proliferazione delle cellule NK e la loro attività citotossica, ma non interferisce con la produzione di citochine o l'espressione di recettori attivanti, come CD56. Tuttavia gli effetti sulle cellule NK si osservano solo a concentrazioni elevate di MSC, condizione che si discosta da quella riscontrata fisiologicamente.

Benché le MSC siano considerate scarsamente immunogeniche, studi recenti dimostrano che cellule NK attivate sono in grado di provocarne la lisi. Le MSC esprimono infatti diversi ligandi, come UL16-binding proteins (ULBP), Polio Virus Receptor (PVR) e Nectina-2, riconosciuti da recettori attivanti presenti sulle cellule NK [49].

### MSC e cellule dendritiche (DC)

Le MSC sono in grado di interferire con la differenziazione e la maturazione delle DC, infatti l'aggiunta di MSC in colture di monociti o di progenitori CD34<sup>+</sup> ne indirizza la differenziazione in cellule con caratteristiche macrofagiche. Inoltre, DC generate in presenza di MSC mostrano una ridotta efficacia nel processo di attivazione dei linfociti T in quanto non si verificano l'up-regolazione delle MHC di classe II, di CD83 e l'espressione di molecole co-stimolatorie, come avviene solitamente durante il loro normale processo maturativo [50, 51]. La presenza di MSC comporta anche la riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui Tumor Necrosis Factor (TNF-

$\alpha$ ), IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, l'aumento della produzione della citochina anti-infiammatoria IL-10 [43, 52] ed il blocco della proliferazione, dovuto all'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 [53]. Tali condizioni portano alla formazione di DC immature con fenotipo soppressorio o inibitorio e una ridotta capacità di attivare i linfociti T.

### MSC e neutrofil

Le MSC sono in grado di interferire con il *burst* respiratorio dei neutrofil e di ritardare l'apoptosi spontanea di neutrofil quiescenti o attivati, attraverso un meccanismo IL-6-dipendente [54]. Alcuni studi ipotizzano che a livello midollare le MSC proteggano dall'apoptosi i neutrofil presenti in situ, preservando le loro funzioni effettrici e prevenendone l'eccessiva o inappropriata attivazione metabolica. Simili meccanismi potrebbero operare nel polmone, dove è stata recentemente identificata una popolazione di MSC residenti [55].

## **1.2 La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B)**

### ***1.2.1 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 G0/G1 del ciclo cellulare. Nei casi, meno frequenti, in cui prevalga l'interessamento linfonodale rispetto a quello ematico, la malattia viene spesso identificata come linfoma a piccoli linfociti.

La LLC-B è la forma più comune di leucemia nella popolazione adulta. Secondo i dati dell' Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT), nel periodo tra il 1998 ed 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 gli uomini e 1.150 fra le donne. L'incidenza nella regione Veneto è 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 modificazioni del 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 della LLC-B è sconosciuta; l'esposizione ai comuni agenti cancerogeni non sembra associarsi allo sviluppo della malattia. È stata invece ben documentata una familiarità che interessa il 5-10% dei casi. Inoltre il rischio di ammalarsi per i parenti di primo grado di un soggetto affetto è circa 7-8 volte maggiore rispetto alla popolazione generale ed 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 ed il decorso clinico più severo [56-60].

### ***1.2.2 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. Spesso 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 ed 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 (11% dei pazienti); se si associa alla comparsa di piastrinopenia autoimmune (2% dei pazienti) si configura la sindrome di Evans. 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 [61-63].

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 quali la sindrome di Richter e la trasformazione in leucemia prolinfocitica (LPL).

### ***1.2.3 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

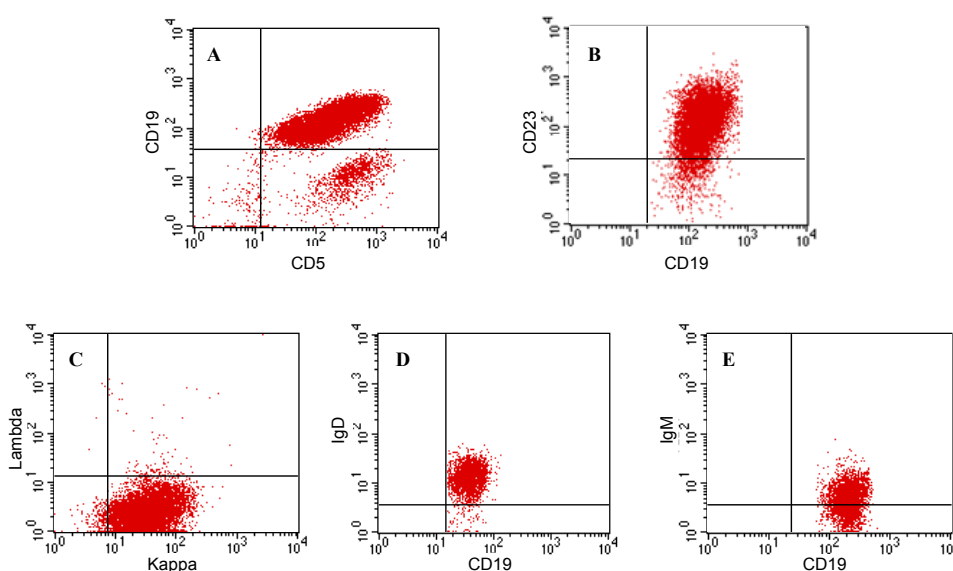
sull'analisi immunofenotipica dei linfociti. I criteri diagnostici del National Cancer Institute prevedono [63]:

1) l'analisi immunofenotipica dei linfociti. Tre sono gli elementi caratterizzanti il fenotipo di membrana delle cellule della LLC-B:

a) l'espressione dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD23) assieme ad un marcatore, il CD5, normalmente espresso sulle cellule T e su una piccola percentuale di linfociti B chiamati B1a (CD5). Il CD23 riveste particolare importanza nella diagnosi differenziale con il linfoma mantellare (CD5+ ma CD23-);

b) l'espressione di un unico tipo di catena leggera ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) delle immunoglobuline (Ig) indicante la monoclonalità delle cellule leucemiche;

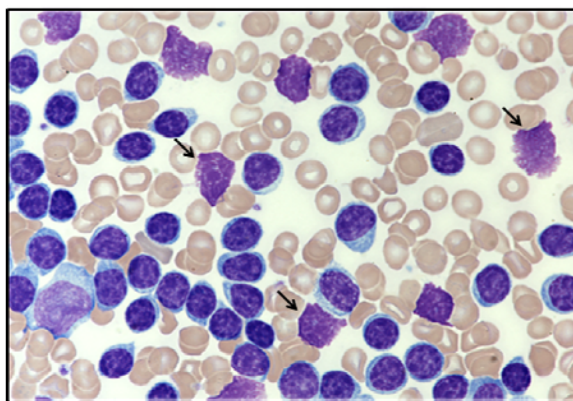
c) la bassa espressione di CD79b e delle immunoglobuline di superficie (sIg) diversamente dalla LPL-B che esprime sIg ad alta intensità; nella LLC-B le Ig prevalentemente espresse sono del tipo IgM, seguite da IgD, IgG e IgA; non è rara la coespressione di IgM e IgD (Figura 2).



**Figura 2. 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 B), esprime un unico tipo di catena leggera ( $\kappa$ , pannello C) ed esprime IgD e IgM di superficie a bassa intensità (pannelli D ed E).



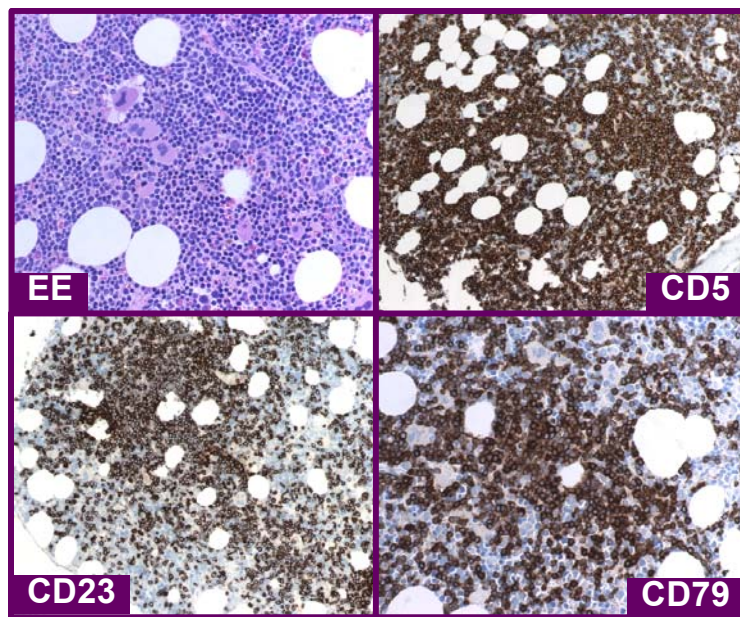
2) un numero di linfociti nel sangue periferico superiore a 5.000/ $\mu$ l. Morfologicamente, i linfociti leucemici appaiono di piccole dimensioni, del tutto simili ai linfociti maturi (diametro: 6-12 $\mu$ m), con scarso citoplasma basofilo e privi di granuli azzurrofilo; il nucleo è sprovvisto di nucleolo 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 (Figura 3). 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;



**Figura 3. Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC-B.** Le frecce indicano le ombre di Gumprecht, patognomoniche della LLC-B.

3) un’infiltrazione linfocitaria a livello midollare superiore al 30% delle cellule nucleate (Figura 4). 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 inferiore a 5.000/ $\mu$ 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, diffusa, interstiziale e mista. L'infiltrazione di tipo nodulare è generalmente associata ad uno stadio precoce della malattia, mentre il tipo diffuso e quello interstiziale sono tipici degli stadi più avanzati.



**Figura 4. Biopsia osteomidollare di un paziente affetto da LLC.** Preparato colorato con ematossilina-eosina (EE) e tre immagini immunohistologiche che evidenziano alcuni marcatori diagnostici.

#### ***1.2.4 Stadiazione e 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. Negli anni sono stati proposti diversi fattori prognostici allo scopo di consentire al medico di definire il decorso clinico di ciascun paziente. Tra questi ve ne sono alcuni di tipo clinico e altri di tipo biologico.

### Fattori prognostici clinici

1) Stadiazione clinica: si può condurre secondo due sistemi: secondo Rai e secondo Binet. Il sistema secondo Rai prevede la suddivisione in cinque stadi così definiti:

- stadio 0: linfocitosi assoluta  $>5.000/\mu\text{l}$  più linfocitosi midollare  $>30\%$ ;
- stadio 1: linfocitosi e linfadenomegalia;
- stadio 2: linfocitosi periferica ed epato/splenomegalia, con o senza linfadenomegalia;
- stadio 3: linfocitosi e anemia con emoglobina (Hb) $<11\text{g/dl}$ ;
- stadio 4: linfocitosi e piastrinopenia con piastrine (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 [64].

Il sistema secondo Binet individua tre stadi:

- stadio A: linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfoidi coinvolte (comprendendo i linfonodi, la milza e il fegato);
- stadio B: linfocitosi periferica e midollare con più di tre aree linfoidi coinvolte;
- stadio C: anemia con Hb $<10\text{g/dl}$  e/o piastrinopenia con Plts $<100.000/\mu\text{l}$ , indipendentemente dal numero di aree linfoidi coinvolte [65].

2) Tempo di raddoppiamento dei linfociti: se esso è inferiore ai 12 mesi, si associa ad un peggior decorso clinico [66].

3) Modalità di infiltrazione del midollo osseo: un pattern di infiltrazione diffuso si associa ad una cattiva prognosi [67, 68].

### Fattori prognostici biologici

I 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-B tipica) la probabilità di evoluzione in LPL è decisamente scarsa; tuttavia se la percentuale di prolinfociti è compresa tra il 10 e 55% (LLC/PL) la probabilità di evoluzione verso un quadro conclamato di LPL a prognosi infausta aumenta al 18% [69];
- 2) il valore di  $\beta 2$  microglobulina. Questo parametro è inversamente correlato con la sopravvivenza; un suo aumento è indice di un’ aumentata attività proliferativa delle cellule neoplastiche, essendo correlato al tempo di raddoppiamento linfocitario e ad un’imminente progressione nella stadiazione clinica [70];
- 3) il valore di timidina chinasi (TK). In particolare, livelli di  $TK < 7,1 U/l$  si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari a 49 mesi, mentre livelli di  $TK > 7,1 U/l$  si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari a 8 mesi [71];
- 4) il valore di CD23 solubile (sCD23). L’aumento del sCD23, correlato allo stadio clinico secondo Rai e al numero di linfociti B leucemici circolanti, anticipa di circa 48 mesi la progressione della malattia ed è un indice affidabile del rischio di prognosi infausta [72, 73].

Le progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia e le nuove tecniche di biologia molecolare hanno consentito di definire nuovi marcatori prognostici utilizzabili fin dalla diagnosi per definire il decorso clinico della malattia e discriminare la necessità di terapie tempestive. I marcatori più studiati sono:

- 1) le ipermutazioni somatiche (SHM) dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgVH). La presenza di SHM in percentuale inferiore al 2% rispetto alla sequenza “germline” identifica un gruppo di pazienti (pazienti 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% (pazienti mutati o SHM+) identifica un gruppo di pazienti con mediana di sopravvivenza di circa 25 anni [61, 74, 75].
- 2) 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% [76]. Per ciascuna di queste alterazioni sono stati identificati un valore prognostico ed una correlazione con specifiche caratteristiche cliniche della malattia: la delezione 13q, se è l’unica alterazione presente, si associa ad una morfologia cellulare tipica e ad un decorso clinico indolente; la trisomia 12 si associa alla forma atipica di LLC-B; 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. 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.

- 3) 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. Studi recenti hanno infatti dimostrato che l'espressione di CD38 riflette l'attivazione delle cellule neoplastiche ed, in particolare, correla con la loro attività proliferativa [74, 77-79]. Rispetto alle SHM, CD38 ha un valore prognostico indipendente.
- 4) L'espressione intracitoplasmatica della protein chinasi associata alla catena  $\zeta$  del TCR di 70kDa (ZAP-70). Si è osservato che l'espressione di ZAP-70 non è stabile nel tempo, ma sembra variare durante il decorso clinico ed, in particolare, sembra correlare con l'aggressività della patologia [80]. 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" [81].
- 5) L'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC-B. L'enzima telomerasi è un complesso ribonucleoproteico che contiene una specifica trascrittasi inversa (hTERT) in grado di estendere le estremità telomerasiche prevenendone il consumo, evitando così che la cellula, dopo un certo numero di cicli replicativi, vada

incontro ad apoptosi. Nella LLC-B l'analisi dell'attività telomerasica si è dimostrata altamente predittiva della probabilità di sopravvivenza. Esiste infatti una significativa differenza tra i pazienti con alti livelli di hTERT, a prognosi peggiore, e quelli con bassi livelli di hTERT. Un analogo significato è stato attribuito all'analisi della lunghezza dei frammenti di restrizione dei telomeri. Inoltre, in associazione con lo stato mutazionale delle IgVH, questi fattori hanno permesso di identificare ulteriori sottogruppi di pazienti 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 IgVH mutate, mentre la lunghezza dei frammenti di restrizione telomerici assume un maggior valore predittivo tra i pazienti con IgVH non mutate [82, 83].

### ***1.2.5 Cenni di terapia***

La decisione di 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*” [84].

Le possibilità terapeutiche comprendono farmaci con diversi meccanismi d'azione, fino ad opzioni più radicali come l'auto/allotrapiano di HSC. 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.

Dalla metà degli anni novanta, il trattamento di prima scelta per gran parte dei casi di LLC-B è rappresentato dall'uso degli analoghi delle purine, tra cui la Pentostatina, la Cladribina e la Fludarabina. Il primo farmaco è un inibitore dell'adenosina deaminasi, gli altri due invece fungono da inibitori della DNA-polimerasi. Nella LLC-B la Fludarabina (25-30 mg/m<sup>2</sup> per 5 giorni al mese, per 3-6 mesi) si è dimostrata essere il trattamento più efficace. Essa, utilizzata singolarmente, è in grado di dare una risposta globale nell'80% dei casi e una risposta completa nel 30% dei casi [85]. Attualmente si ritiene che gli analoghi delle purine possano avere un'azione sinergica con i farmaci alchilanti, impedendo la riparazione dei danni provocati al DNA nelle cellule leucemiche [86]. Sulla base di questo presupposto sono stati condotti alcuni studi 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). Allo stesso tempo, la combinazione dei due farmaci ha comportato una maggiore tossicità midollare, con una maggior incidenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia, senza determinare un aumento delle complicanze infettive [87]. Tuttavia è emerso che determinati subset di LLC-B, in particolare quelli che presentano la delezione del cromosoma 17, risultano resistenti alla terapia convenzionale con Fludarabina, evidenziando la necessità di approfondire le conoscenze dei meccanismi



patogenetici della LLC-B, al fine di ridurre il fenomeno della chemioresistenza ed individuare nuovi potenziali bersagli terapeutici.

Un importante passo in avanti è stato compiuto con l'introduzione dell'immunoterapia, basata sull'uso di anticorpi monoclonali (AcMo) diretti contro antigeni di superficie presenti sulle cellule leucemiche. Il Rituximab è un AcMo chimerico diretto contro il CD20, un antigene espresso su tutti i linfociti B, ma nella LLC-B caratteristicamente espresso solo a bassa intensità. Per tale 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 [88, 89].

Alemtuzumab, un AcMo diretto contro il CD52, espresso nel 95% dei linfociti umani, si è dimostrato molto efficace nell'indurre remissione nei pazienti con LLC-B 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 [90].

Un altro antigene di superficie, potenziale target per l'immunoterapia in quanto sovraespresso nelle cellule B di LLC, è il CD23. Il Lumiliximab è un AcMo diretto contro il CD23 in grado di indurre apoptosi nelle cellule leucemiche ed in particolare, la sua efficacia aumenta se combinato al Rituximab o ad altri agenti chemioterapici [91].

Un recente trial clinico randomizzato di fase III ha invece valutato l'efficacia della combinazione di Fludarabina e Ciclofosfamide con l'Oblimersen, un oligonucleotide antisenso che, legandosi all'mRNA di Bcl-2, ne inibisce la

traduzione. Tale trattamento combinato 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 [92].

### ***1.2.6 I linfociti B neoplastici***

I linfociti B sono le cellule del sistema immunitario responsabili della risposta di tipo umorale. Se opportunamente stimolati essi sono in grado di differenziarsi da linfociti “vergini” in cellule secernenti anticorpi diretti contro uno specifico antigene (plasmacellule), o, in alternativa, in linfociti B “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 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.

I linfociti B di LLC-B sono piccoli linfociti B “della memoria” caratterizzati da alcuni marcatori di superficie riconoscibili da specifici anticorpi monoclonali (AcMo). Tali antigeni sono: CD19, CD21, CD5, CD23, CD25 ed HLA-DR (Figura 5). In particolare, le cellule di LLC-B esprimono molti dei marcatori di superficie presenti nelle cellule B mature localizzate nella zona mantellare dei follicoli linfatici secondari.

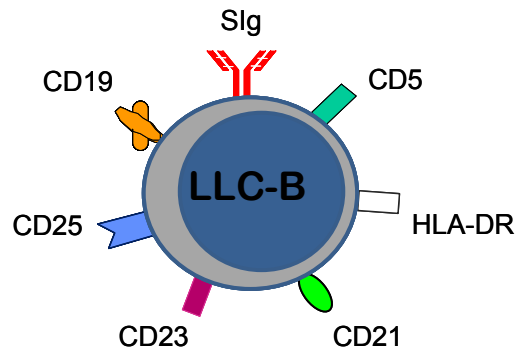


Figura 5. Fenotipo caratteristico di un linfocita B di LLC-B.

Il linfocita viene interessato dall'evento leucemico in uno stadio precoce di maturazione, quando esprime Ig di superficie a bassa densità di tipo IgM e/o IgD; il clone neoplastico che ne deriva, bloccato in tale stadio, è composto da linfociti con catene leggere dello stesso isotipo. I linfociti B di LLC circolanti sono bloccati nella fase G0/G1 del ciclo cellulare ed il loro accumulo è legato alla loro incapacità ad andare incontro a morte cellulare programmata, venendo quindi a mancare il meccanismo omeostatico che normalmente limita il numero di cellule circolanti (Figura 6).

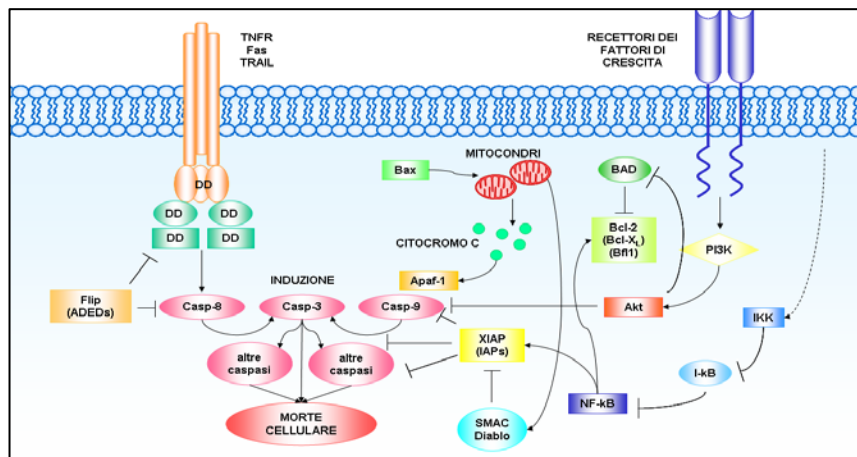


Figura 6. Vie di trasduzione del segnale nel processo apoptotico. Entrambe le vie, estrinseca (a sinistra) ed intrinseca (a destra), hanno in comune l'attivazione degli effettori centrali dell'apoptosi, un gruppo di proteasi chiamate *caspasi*, che dirigono la distruzione degli elementi strutturali (citoscheletro) e funzionali (organuli) della cellula.

Tale alterazione è imputabile sia a fattori intrinseci, propri del linfocita neoplastico, ma anche a fattori estrinseci, considerando che i linfociti B patologici

isolati dai pazienti con LLC mostrano una prolungata sopravvivenza *in vivo*, mentre vanno rapidamente incontro ad apoptosi spontanea *in vitro* [93].

### Fattori intrinseci di sopravvivenza

Per quanto riguarda i fattori intrinseci, 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 in questo meccanismo inibendo (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1 e Mcl-1) o promuovendo (Bax, Bak, Bcl-xS, Bid, Bik e Hrk) l'apoptosi. L'eterodimerizzazione tra membri pro- e anti-apoptotici di questa famiglia e i relativi livelli di entrambi i tipi di proteine possono determinare la predisposizione a rispondere ad un determinato stimolo apoptotico [94]. In molti casi di LLC-B è stata riscontrata una sovraespressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Mcl-1 (mantle cell lymphoma-1). Quando Bcl-2 è sovraespresso si ha un aumento del rapporto Bcl-2/Bax rispetto ai linfociti T e B di soggetti normali [95] e una maggiore resistenza all'apoptosi. La proteina Bcl-xS, che inibisce la funzione di Bcl-2, è presente soltanto in tracce. Per quanto riguarda la proteina anti-apoptotica Mcl-1, essa è risultata sovraespressa nella LLC-B, specialmente in alcuni casi a rapida progressione e con una scarsa risposta alla terapia citoreduttiva.

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. Inoltre, nei linfociti B di LLC, il recettore Fas (CD95) risulta poco o per nulla espresso e di conseguenza, manca la via apoptotica mediata da Fas che normalmente è presente nei linfociti B dei soggetti sani [96]. Anche se rese Fas

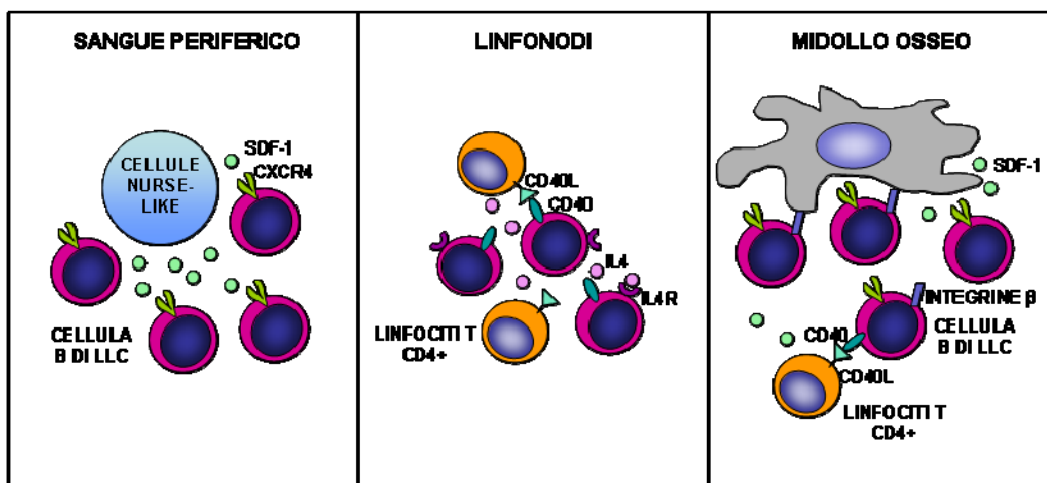
positive da un processo di attivazione in vitro, le cellule B di LLC sono generalmente resistenti all'apoptosi mediata da Ac anti-Fas.

Rivestono un ruolo importante anche le alterazioni a carico del BCR, complesso necessario per dare inizio alla cascata di eventi che porta alla trasduzione dei segnali cellulari che determinano la sopravvivenza, la proliferazione e l'apoptosi della cellula. 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 [97]. 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 il dominio extra-cellulare. 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 [98, 99].

La chinasi Lyn 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 [100]. Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che nei linfociti B di LLC la chinasi Lyn risulta 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 [101].

## Fattori estrinseci di sopravvivenza

La sopravvivenza dei linfociti B leucemici non è dovuta solo alla loro capacità intrinseca di resistere all'apoptosi, ma è influenzata anche dal microambiente che li circonda e dalle cellule che lo compongono. Le cellule B patologiche prendono stretto contatto con diverse cellule accessorie a livello del sangue periferico (cellule "nurse like"), dei linfonodi (linfociti T CD4+) e del midollo osseo (linfociti T CD4+, cellule stromali, cellule follicolari dendritiche) (Figura 7).



**Figura 7. Interazioni tra linfociti B di LLC e cellule componenti il microambiente a livello del sangue periferico, dei linfonodi e del midollo osseo.** Nel sangue periferico di pazienti con LLC-B sono presenti cellule che *in vitro* differenziano in cellule aderenti definite "nurse like" capaci di proteggere i linfociti B neoplastici dall'apoptosi spontanea. I pazienti affetti da LLC-B presentano un aumento dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, localizzati prevalentemente a livello midollare e linfonodale, dove si concentrano in prossimità dei centri di proliferazione e secernono citochine (IL-4, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) che inibiscono l'apoptosi delle cellule neoplastiche. A livello midollare le cellule stromali esercitano un effetto anti-apoptotico sia mediante interazioni dirette che attraverso fattori solubili.

Le cellule B neoplastiche infatti, se isolate dal sangue periferico o dai tessuti linfoidi di soggetti con LLC-B e poste *in vitro*, vanno rapidamente incontro ad apoptosi spontanea, mentre la presenza di cellule stromali midollari e cellule "nurse like" è in grado di prolungarne la sopravvivenza [102, 103].

Le cellule B patologiche dei pazienti affetti da LLC-B derivano da aggregati proliferanti di prolinfociti e paraimmunoblasti, che costituiscono i cosiddetti pseudofollicoli o centri di proliferazione. Sia nel midollo osseo che nei

linfonodi infiltrati dalle cellule di LLC-B è presente una popolazione di linfociti T CD4+ esprimenti CD40 ligando (CD40L), membro delle superfamiglia del Tumor Necrosis Factor ed espresso dai linfociti T attivati. Queste cellule tendono a concentrarsi in prossimità dei centri di proliferazione, prendendo stretto contatto con i linfociti B patologici, i quali a loro volta esprimono costitutivamente il recettore per CD40L. La stimolazione via CD40/CD40L protegge le cellule neoplastiche dall'apoptosi e ne induce la proliferazione [104]. Studi *in vitro* indicano inoltre che alcune citochine prodotte dai linfociti T, quali IL-4, INF- $\alpha$  ed INF- $\gamma$ , inibiscono la risposta apoptotica delle cellule B neoplastiche mediante up-regolazione di Bcl-2 [61]. I linfociti B di LLC sono a loro volta in grado di plasmare il microambiente in cui si accumulano. Infatti, linfociti B di LLC proliferanti isolati dai linfonodi e da midollo osseo esprimono costitutivamente l'mRNA delle chemiochine CCL17 e CCL22, in grado di attrarre i linfociti T attivati [105], innescando un circuito autocrino in grado di sostenere il clone neoplastico [106].

Nei pazienti con LLC il midollo osseo è inesorabilmente infiltrato dal clone linfocitario ed il pattern e l'entità dell'infiltrato correlano con lo stadio e la prognosi della malattia. Poiché le cellule stromali svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del normale sviluppo dei linfociti B, diversi autori suggeriscono che le interazioni con le cellule stromali siano coinvolte nella progressione della malattia e nello sviluppo di resistenza al trattamento farmacologico. Le cellule stromali midollari esercitano la loro azione sia attraverso interazioni dirette, mediate prevalentemente da integrine di superficie, sia attraverso fattori solubili. Lagneau e colleghi [102] riuscirono ad inibire parzialmente l'adesione tra cellule B neoplastiche e cellule stromali usando una combinazione di quattro anticorpi diretti contro CD11a, CD18 (integrina  $\beta$ 1) e contro CD29 e CD49 (integrina  $\beta$ 2),

molecole presenti sulla superficie delle cellule leucemiche. Gli stessi autori osservarono inoltre la correlazione tra l'incremento della sopravvivenza nei linfociti B patologici e l'aumento della proteina anti-apoptotica Bcl-2, in seguito al contatto con le cellule stromali. Inoltre, poiché le integrine possiedono un dominio intracitoplasmatico connesso con i microfilamenti del citoscheletro, esse sono probabilmente responsabili dell'aumentata capacità di adesione mostrata dai linfociti B di LLC rispetto ai B normali, in relazione alla loro capacità di localizzazione nelle sedi di accumulo [107]. Un'altra proteina di membrana coinvolta nella sopravvivenza dei linfociti patologici è la Plexina-B1, espressa dalle cellule dello stroma midollare, dalle cellule follicolari dendritiche (FDC) e dai linfociti T attivati, il cui ligando è CD100, una proteina transmembrana appartenente alla famiglia delle semaforine, uniformemente espressa sulla membrana dei linfociti patologici. Le cellule B di LLC CD100+ esposte in vitro alla Plexina-B1 mostrano un'aumentata attività proliferativa e una prolungata sopravvivenza [108].

Le cellule stromali inoltre sono in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule di LLC mediante CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , chemiochina costitutivamente prodotta a livello del midollo osseo da parte delle cellule stromali midollari e coinvolta nel normale processo di sviluppo dei linfociti B [109, 110]. Le cellule stromali midollari producono costitutivamente elevati livelli di CXCL12/SDF-1 $\alpha$  e i linfociti B neoplastici, esprimendo elevati livelli di CXCR4, recettore di CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , vengono richiamati in situ dove in seguito si accumulano.

Nel sangue periferico di pazienti con LLC-B Tsukada e colleghi hanno invece isolato una popolazione di cellule mononucleate che in vitro differenziano in cellule rotondeggianti e aderenti, denominate cellule "nurse like" (NLC), fenotipicamente analoghe alle cellule stromali midollari. Tali cellule prendono



stretto contatto con il clone linfocitario maligno riducendone l'apoptosi spontanea attraverso la produzione di CXCL12/SDF-1 $\alpha$  [103].

A livello degli organi linfatici secondari sono invece presenti le cellule follicolari dendritiche, cellule stromali presentanti l'Ag strettamente associate ai linfociti B di LLC nella fase precoce di infiltrazione del midollo osseo e dei linfonodi. L'interazione tra la molecola di adesione CD44, presente sulla superficie dei linfociti B, e le FDC determina un aumento dell'espressione di Mcl-1, una proteina antiapoptotica appartenente alla famiglia di Bcl-2, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule leucemiche [111].

L'infiltrazione dei linfociti B leucemici nel midollo osseo e negli organi linfatici è regolata inoltre dalle interazioni delle chemiochine con i loro recettori espressi dalle cellule B di LLC-B. Dati recenti indicano che le cellule B neoplastiche esprimono specifici pattern di recettori chemiochinici, rispondendo selettivamente alle chemiochine prodotte dai diversi elementi del microambiente [112, 113]. Tra questi vi è CXCR3, recettore costitutivamente espresso nelle cellule B di LLC-B ed in grado di trasdurre l'attività chemiotattica in seguito al legame con determinate chemiochine (ad es.: IP-10/CXCL10 e Mig/CXCL9). La presenza di CXCR3 sarebbe in grado di mediare il traffico delle cellule B neoplastiche da un sito ad un altro favorendo la diffusione della malattia nei vari distretti dell'organismo [114]. Questo recettore non è espresso nei linfociti B normali per cui può rappresentare un marcatore per la LLC-B.

Le cellule endoteliali delle venule ad endotelio alto, che regolano l'accesso ai linfonodi, producono invece CCL19 e CCL12, chemiochine che si legano a CCR7, recettore sovraespresso sulla superficie delle cellule B di LLC, determinando un aumento dell'infiltrazione linfocitaria nei linfonodi [115].



## 2. SCOPO DELLA TESI

L'osservazione che, nei pazienti con LLC, le cellule B neoplastiche *in vitro* vanno rapidamente incontro ad apoptosi spontanea suggerisce che il vantaggio di sopravvivenza di cui gode il clone leucemico dipende anche da segnali derivanti dal microambiente in cui esso si localizza. Poiché in tali pazienti, l'entità ed il tipo di infiltrato midollare correla sia con lo stadio clinico della patologia sia con la prognosi, diventa importante identificare i tipi cellulari con cui i linfociti patologici prendono contatto. In questa tesi abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule mesenchimali staminali (MSC), in quanto componenti fondamentali del microambiente midollare, allo scopo di valutare il loro ruolo nella sopravvivenza e nella localizzazione del clone B leucemico. Abbiamo quindi:

- 1) isolato e caratterizzato le MSC dal midollo osseo di pazienti affetti da LLC-B, mantenendo come confronto le MSC derivate da donatori sani. La caratterizzazione delle MSC è stata eseguita tramite analisi immunofenotipiche e saggi di differenziazione in senso adipogenico ed osteogenico;
- 2) verificato se esse siano in grado di favorire la sopravvivenza del clone neoplastico, determinando:
  - il grado di apoptosi spontanea dei linfociti, sia patologici che normali, in presenza di MSC, sia di pazienti affetti da LLC che di donatori sani;
  - il grado di apoptosi nei linfociti B isolati da pazienti trattati *in vivo* con farmaci citostatici, per valutare il loro ruolo nei meccanismi di chemio resistenza;

- 3) analizzato il ruolo delle MSC nella compartimentalizzazione del clone neoplastico, valutando la capacità delle MSC di produrre stimoli chemiotattici per i linfociti B patologici.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Pazienti**

In questa tesi sono stati utilizzati 63 campioni di sangue midollare e 23 campioni di sangue periferico complessivamente provenienti da 78 pazienti affetti da LLC-B ed afferenti all'Unità Operativa di Ematologia e Immunologia Clinica (Dir.: Prof. G. Semenzato) del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Padova.

Nella Tabella I sono riportati i pazienti da cui abbiamo ottenuto i campioni di midollo per l'isolamento delle MSC. In tabella II invece i pazienti da cui abbiamo ottenuto i campioni di sangue periferico per l'isolamento dei linfociti B neoplastici. In particolare di ciascun paziente abbiamo riportato lo stadio clinico secondo Rai, la terapia al momento del prelievo, il numero di globuli bianchi presenti nel sangue periferico, la percentuale di linfociti, la percentuale di linfociti neoplastici e lo stato mutazionale dei geni IgVH.

Dei 63 pazienti da cui abbiamo ottenuto i campioni di sangue midollare, 42 erano maschi e 21 femmine, di età compresa tra 40 e 78 anni. 33 pazienti si trovavano in stadio 0 secondo Rai, 17 in stadio 1, 9 in stadio 2, 3 in stadio 3 e 1 in stadio 4; inoltre 8 pazienti erano sottoposti a terapia al momento del prelievo. Il numero di linfociti presenti nel sangue midollare era pari a  $46,70\% \pm 22,30$ . Questi pazienti presentavano una percentuale di linfociti B patologici, che coesprimono CD5 e CD19, pari a  $59,15\% \pm 24,19$  dei linfociti B totali. 34 pazienti presentavano uno stato mutazionale  $\geq 2\%$  nella regione variabile delle Ig e 18 erano caratterizzati da uno stato non mutato delle catene pesanti delle Ig, mentre in 11 casi le analisi molecolari non hanno permesso di valutare lo stato mutazionale del paziente.

**Tabella I. Caratteristiche ematochimiche, immunofenotipiche e molecolari dei pazienti da cui sono stati ottenuti i campioni di sangue midollare per l'isolamento delle MSC.**

Paziente	Età	Sesso	Stadio RAI	Terapia al momento del prelievo	BMMC	Linfociti %	stato mutazionale	CD 19 %*	CD 19/5 %*	MSC
1	61	M	0	no	8x106	26	mutato	63	58	si
2	56	F	0	no	5x106	40	mutato	51	49	no
3	66	F	0	no	9x106	38	mutato	38	36	si
4	73	M	2	si	11x106	75	non mutato	46	46	si
5	66	M	1	si	30x106	70	non mutato	97	92	si
6	61	F	0	no	0,2x106	10	n.d.	6	2	si
7	71	M	0	no	2x106	52	mutato	46	42	no
8	40	M	0	no	8x106	56	non mutato	73	72	si
9	60	M	1	no	16x106	5	mutato	46	43	no
10	64	F	0	no	4x106	5	n.d.	23	13	si
11	61	F	2	si	4x106	5	non mutato	5	2	si
12	60	F	0	no	1x106	61	n.d.	56	47	no
13	70	M	1	no	2,5x106	52	non mutato	64	63	no
14	68	M	2	no	40x106	64	non mutato	88	85	si
15	69	M	1	si	12x106	13	non mutato	11	11	si
16	62	M	2	no	8x106	26	mutato	59	54	si
17	56	M	0	no	2x106	32	n.d.	78	73	si
18	56	M	2	no	2x106	6	non mutato	14	8	si
19	52	M	0	no	16,8x106	54	mutato	87	86	si
20	56	F	1	no	7x106	87	mutato	86	86	si
21	47	M	2	no	70x106	78	non mutato	86	86	si
22	61	F	0	no	1x106	36	mutato	58	54	no
23	78	M	0	no	6,7x106	40	mutato	58	56	si
24	59	F	2	no	1,4x106	19	mutato	35	34	si
25	72	M	4	no	36,4x106	35	non mutato	40	39	no
26	54	M	0	no	7x106	42	mutato	70	68	si
27	51	M	0	no	50x106	27	mutato	47	40	si
28	48	M	1	no	2x106	47	mutato	84	83	si
29	78	M	1	no	90x106	87	mutato	93	92	si
30	55	M	1	no	20x106	52	mutato	73	70	si
31	66	F	0	no	7x106	70	mutato	85	83	si
32	72	F	0	no	7x106	59	mutato	74	72	no
33	60	M	0	no	51x106	71	n.d.	85	84	si
34	55	M	1	no	160x106	18	mutato	67	60	si
35	67	M	2	no	40x106	50	mutato	66	64	no
36	49	M	0	no	140x106	62	non mutato	82	81	si
37	75	M	0	no	20x106	34	mutato	71	71	si
38	58	F	3	no	4,9x106	41	non mutato	66	66	si
39	67	F	0	no	85x106	80	mutato	67	64	no
40	69	M	1	no	30x106	56	mutato	52	50	si
41	51	M	0	no	44,6x106	37	n.d.	59	54	si
42	64	M	1	no	100x106	25	non mutato	90	87	no
43	50	F	0	no	14x106	18	non mutato	26	1	si
44	50	M	1	no	7,7x106	64	n.d.	70	70	si
45	70	M	1	no	30x106	90	mutato	98	98	si
46	66	M	0	no	14x106	40	mutato	80	79	si
47	60	F	1	no	5,7x106	43	n.d.	61	56	si
48	52	F	0	no	4,6x106	40	non mutato	61	57	no
49	66	M	2	no	287x106	87	mutato	94	77	no
50	65	M	0	no	61,2x106	37	mutato	60	54	si
51	70	F	1	no	80x106	70	non mutato	75	50	si
52	63	M	0	no	6x106	43	mutato	72	70	si
53	63	M	0	no	11x106	55	mutato	69	67	si
54	60	M	1	no	60x106	40	n.d.	53	43	si
55	75	M	3	si	10x106	40	mutato	73	68	si
56	56	F	0	no	60x106	52	non mutato	56	45	si
57	71	F	0	no	8x106	25	n.d.	23	22	si
58	49	F	0	no	45x106	62	mutato	71	69	si
59	65	M	0	si	45x106	50	mutato	79	79	no
60	60	M	0	no	10,8x106	75	non mutato	87	85	si
61	77	M	3	si	69x106	72	mutato	89	89	no
62	63	M	1	no	12x106	50	mutato	79	79	no
63	58	F	0	no	13x106	48	n.d.	46	43	si

BMMC: cellule mononucleate ottenute dal midollo osseo.

\*: percentuale relativa al totale dei linfociti.

n.d.: valore non determinato.

Dei 23 pazienti da cui abbiamo ottenuto i campioni di sangue periferico, 17 erano maschi e 6 femmine, di età compresa tra 40 e 84 anni. 3 pazienti si trovavano in stadio 0 secondo Rai, 6 in stadio 1, 5 in stadio 2, 2 in stadio 3 e 7 in stadio 4. Il numero di globuli bianchi nel sangue periferico variava da 9.500 a 216.000, con una percentuale di linfociti pari a  $79,08\% \pm 13,07$ . Questi pazienti presentavano una percentuale di linfociti B patologici, che coesprimono CD5 e CD19, pari a  $82,17\% \pm 17,53$  dei linfociti B totali. 11 pazienti presentavano ipermutazioni somatiche nella regione variabile delle Ig e 9 non presentavano mutazioni somatiche, mentre in 3 casi le analisi molecolari non hanno permesso di valutare lo stato mutazionale del paziente.

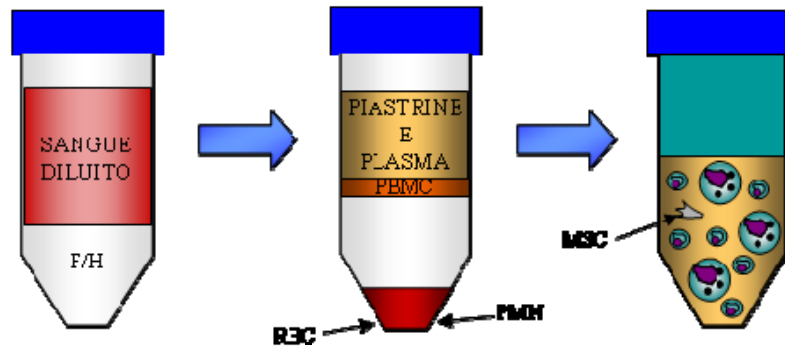
**Tabella II. Caratteristiche ematochimiche, immunofenotipiche e molecolari dei pazienti da cui sono stati ottenuti i campioni di sangue periferico per l'isolamento dei linfociti B neoplastici.**

Pazienti	Età	Sesso	Stadio RAI	WBC / mm <sup>3</sup>	Linfociti %	CD 19 %*	CD 19/5 %*	Stato mutazionale
4	73	M	2	77.000	75	40	39	non mutato
5	66	M	1	9.500	85	68	68	non mutato
8	40	M	1	80.700	82	94	94	non mutato
19	52	M	0	18.800	86	100	99	mutato
21	47	M	2	65.700	79	66	66	non mutato
25	73	M	1	21.400	64	85	85	non mutato
39	67	F	0	31.300	77	33	32	mutato
49	66	M	2	216.000	90	96	84	mutato
64	67	F	2	100.020	77	95	95	mutato
65	84	M	4	50.000	27	86	85	mutato
66	69	M	4	21.900	81	89	89	mutato
67	60	M	2	29.000	80	98	98	n.d.
68	67	M	4	43.700	83	91	69	mutato
69	77	M	4	196.100	69	96	95	mutato
70	77	M	4	43.800	80	92	90	non mutato
71	68	M	4	98.000	80	93	93	non mutato
72	77	M	4	36.400	85	85	74	non mutato
73	68	F	1	51.400	85	95	90	non mutato
74	68	M	1	80.000	91	93	93	mutato
75	73	F	3	56.250	79	96	95	n.d.
76	72	F	0	57.000	86	87	87	mutato
77	59	M	1	36.000	88	86	80	n.d.
78	74	F	3	31.300	90	90	90	mutato

### **3.2 Isolamento delle cellule mesenchimali staminali da midollo osseo**

I campioni di sangue midollare sono stati ottenuti da 63 soggetti di età compresa tra i 40 e i 78 anni, affetti da LLC-B. Da ciascun paziente sono stati prelevati 1-2 ml di sangue midollare, sottoposti poi a separazione cellulare mediante stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H; GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) per ottenere le cellule mononucleate (che comprendono anche le MSC). A tale scopo ciascun campione è stato prima filtrato attraverso un ago da 26 G e diluito 1:6 con sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente ed agitato delicatamente. Si è poi proceduto con una stratificazione su (F/H), metodo che 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 al di sopra dello strato di F/H, mentre i globuli rossi e i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta. Le piastrine sono state separate dalle cellule mononucleate mediante lavaggi successivi. Si è quindi proceduto con una centrifugazione a 900 g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto ad un lavaggio con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400 g per 10 minuti a 20°C con freno (Figura 6); il fondello cellulare è stato risospeso in una quantità adeguata di soluzione fisiologica e le cellule sono state contate nella camera di Burker.





**Figura 6. Isolamento delle cellule mononucleate dal sangue midollare.** Tramite centrifugazione su F/H sono state isolate le cellule mononucleate dal sangue midollare. Le cellule mononucleate (che comprendono le MSC) 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. RBC: globuli rossi. PMN: leucociti polimorfocitici. PBMC: cellule mononucleate del sangue periferico. MSC: cellule mesenchimali staminali.

### 3.3 Espansione *ex vivo* delle MSC

Le cellule mononucleate ottenute dal sangue midollare sono state risospese in 7 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Paisley, UK) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FCS), 1% di PenStrep (Penicillina 5000 U/ml, Streptomina 5000 µg/ml; Invitrogen) e Ciprofloxacina alla concentrazione di 10 µg/ml (Ciproxin; Bayer, Leverkusen, Germany). Le cellule sono state poste in fiaschette di plastica alla concentrazione di 1.000 cellule/cm<sup>2</sup> e incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le prime cellule aderiscono alla fiaschetta già dopo 24-48 ore dalla semina, ma il terreno viene rimosso e sostituito con terreno fresco dopo 7 giorni, eliminando così le cellule rimaste in sospensione. Nei giorni successivi si osserva la comparsa di alcuni foci di proliferazione, costituiti da aggregati di cellule altamente proliferanti che tendono alla confluenza reciproca. Per espandere le colture le piastre sono state lavate con 2 ml di Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X ed incubate a 37 °C con 1 ml di Tripsina allo 0,25% (Invitrogen). Le cellule in sospensione sono state trasferite in terreno addizionato con il 10% di FCS (che arresta la reazione di

digestione enzimatica) e risospese in DMEM per essere nuovamente piastrate ad una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup>.

### **3.4 Analisi immunofenotipica**

L'analisi immunofenotipica è stata eseguita mediante citofluorimetria a flusso, una tecnica che consente la valutazione multiparametrica delle caratteristiche antigeniche di singole cellule in sospensione, sia attraverso misure di tipo ottico, che sfruttando fenomeni di diffusione della luce e di fluorescenza.

Lo strumento impiegato è un analizzatore FACS Calibur e i dati sono stati processati usando il programma CellQuest (BD Biosciences, Milano, IT).

Le tecniche di fluorescenza sono basate sull'impiego di uno o più fluorocromi, molecole che sono in grado, dopo essere state colpite da una luce avente una certa lunghezza d'onda, di emettere fluorescenza ad una lunghezza d'onda superiore. I fluorocromi vengono legati in modo covalente agli anticorpi monoclonali (AcMo), utilizzati per riconoscere strutture antigeniche sulla superficie o all'interno delle cellule; l'immunofenotipizzazione si basa sull'identificazione di questi antigeni. In questa tesi sono stati utilizzati quattro fluorocromi: l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), la ficoeritrina (PE) ed il TRI-COLOR (TC), che emettono un segnale di fluorescenza rispettivamente a 530 nm (verde), a 585 nm (rosso) ed a 667 nm quando colpiti da un fascio laser monocromatico con  $\lambda$  uguale a 488 nm; l'alloficocianina (APC) emette invece un segnale di fluorescenza a 690 nm quando eccitata da un fascio laser monocromatico di  $\lambda$  pari a 635 nm.

La citometria a flusso è stata impiegata per valutare il fenotipo delle MSC poiché era necessario verificare la presenza di una popolazione cellulare omogenea, negativa per antigeni caratteristici delle cellule di derivazione

emopoietica, quali CD14, CD31, CD34 e CD45 e positiva per antigeni normalmente presenti sulle MSC, quali CD105, CD73, CD90 (Tabella III).

**Tabella III. Marcatori di superficie utilizzati per la caratterizzazione fenotipica delle MSC.**

ANTIGENE	DENOMINAZIONE	FUNZIONE	ESPRESSIONE CELLULARE
CD14	LPSR	Recettore per il lipopolisaccaride	monociti, macrofagi, cellule di Langherans, granulociti (bassa intensità)
CD31	PECAM-1	Interazioni cellula-cellula o cellula-matrice	monociti, piastrine, granulociti, cellule endoteliali, linfociti
CD34	gp 150-120 Mucosialina	Interazioni cellula-cellula o cellula-matrice	cellule staminali emopoietiche, precursori emopoietici, cellule endoteliali
CD45	LCA	Tirosin fosfatasi	cellule emopoietiche, escluso eritrociti e piastrine
CD73 (SH3 e SH4)	Ecto-5'-nucleotidasiThy-1	Catalizza la conversione delle purine da 5' nucleosidi a nucleotidi	cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule dendritiche, cellule stromali, cellule mesenchimali staminali
CD 90	Thy-1	Interazioni cellula-cellula o cellula-matrice	cellule staminali emopoietiche, neuroni, fibroblasti, cellule stromali, cellule mesenchimali staminali
CD105 (SH2)	Endoglina	Parte del complessorecettoriale per TGF- $\beta$	cellule endoteliali, precursori eritroidi, monociti attivati, macrofagi, cellule mesenchimali staminali

I campioni cellulari per l'analisi citofluorimetrica sono stati così allestiti:

- 1) le MSC derivanti da ciascuna coltura primaria sono state seminate in pozzetti con superficie pari a 0,4 cm<sup>2</sup>. Una volta a confluenza le cellule (circa 10.000) sono state rimosse da ogni pozzetto mediante digestione enzimatica delle interazioni cellula-substrato con 500  $\mu$ l di soluzione Accutase (Sigma, Saint Louis, USA) contenente enzimi proteolitici e collagenasici, ma non tripsina, per evitare di degradare le molecole di superficie presenti sulle MSC;
- 2) le cellule sono state risospese in 100  $\mu$ l di PBS 1X e marcate con 5  $\mu$ l dei seguenti AcMo: anti CD14 umano FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), anti CD31 FITC (Becton Dickinson), anti CD34 PE (Becton Dickinson), anti CD90 FITC (Abd Serotech, Oxford, UK), anti CD73 PE

(Becton Dickinson) e con 2,5 µl di anti CD45 FITC (Caltag-Invitrogen, Paisley, UK), anti CD105 PE (Caltag-Invitrogen) e incubate a temperatura ambiente per 13 minuti al buio;

- 3) al termine della marcatura è stato effettuato un lavaggio con PBS 1X per eliminare l'eccesso di anticorpo che non si è legato all'epitopo corrispondente. Si è quindi proceduto alla lettura del campione con citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson) e i dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando il programma Cell Quest. Per ogni analisi sono stati acquisiti 20.000 eventi.

Anche i linfociti B di LLC ottenuti da sangue periferico sono stati caratterizzati mediante analisi citofluorimetrica per individuare l'entità della popolazione di cellule B patologiche. A tale fine è stato utilizzato un pannello di AcMo diretti contro CD5, CD19, CD23 e CD38 (Becton Dickinson).

### **3.5 Colture differenziative**

Per accertare la multipotenzialità delle MSC ottenute è indispensabile dimostrarne la capacità differenziativa in tipi cellulari di derivazione mesodermica (adipociti, osteociti e condrociti). Le MSC sono quindi state coltivate in presenza di terreni di induzione osteogenica ed adipogenica, verificando l'avvenuta differenziazione mediante colorazioni specifiche.

#### ***3.5.1 Differenziazione osteogenica***

Per indurre la differenziazione osteogenica, le MSC, tra il quarto ed il quinto passaggio, sono state messe in coltura per 4 settimane con hMSC Osteogenic Single Quots (Cambrex Bio Science Walkersville Inc., Walkersville, USA) contenente 0,5% di Desametasone, 0,5% di Acido Ascorbico, 11% di

Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS), 2% di L-glutamina, 1% di  $\beta$ -glicerofosfato. Durante questo periodo le cellule perdono la loro morfologia fusata, simil fibroblastica, assumendo una forma poligonale e depositando nello spazio extracellulare una matrice mineralizzata ricca di calcio, evidenziata mediante colorazione Von Kossa.

Prima di procedere alla colorazione le cellule sono state fissate con una soluzione di formalina al 4%. Il protocollo che è stato utilizzato è il seguente:

- rimuovere il terreno di coltura dai pozzetti;
- eseguire un lavaggio con PBS 1X sterile;
- aggiungere ad ogni pozzetto 3 ml di formalina al 4% e lasciare agire per 5 minuti;
- rimuovere la formalina e aggiungere ad ogni pozzetto 3 ml di formalina fresca al 4%.

Per evidenziare la matrice mineralizzata depositata dalle MSC nello spazio extracellulare, una volta eseguita la fissazione in formalina, le cellule sono state colorate con il seguente protocollo:

#### Colorazione Von Kossa

I reagenti utilizzati per la colorazione sono:

- soluzione di nitrato d'argento all'1%, preparata dalla soluzione madre al 2,5% (Fluka BioChemika);
- soluzione di tiosolfato al 5% (Sigma).

La procedura per l'allestimento dei preparati prevede i seguenti passaggi:

- 1) ricoprire i pozzetti dove sono state seminate le cellule con la soluzione di nitrato d'argento all'1%. Porre quindi la piastra sotto la luce ultravioletta per 20 minuti;

- 2) effettuare due lavaggi con acqua distillata e rimuovere l'argento che non ha reagito con la matrice mineralizzata incubando la piastra con una soluzione di tiosolfato di sodio per 5 minuti;
- 3) effettuare un ultimo lavaggio con acqua distillata;
- 4) si può procedere quindi con l'acquisizione delle immagini con il microscopio Olympus BX60 (Olympus, Milano, Italia).

### ***3.5.2 Differenziazione adipogenica***

Per indurre la differenziazione adipogenica sono necessari due diversi tipi di terreno: uno di induzione (Adipogenic Induction Single Quots; Cambrex Bio Science Walkersville Inc.) contenente lo 0,2% di Indometacina, lo 0,1% di Isobutilmetilxantina, l'1,1% di Insulina umana ricombinante, lo 0,5% di Desametasone, l'11% di Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS), il 2% di L-glutamina ed un terreno di mantenimento contenente l'1,1% di Insulina umana ricombinante, il 2% di L-glutamina, l'11% di MCGS. Per indurre una differenziazione ottimale sono necessari 3 cicli di induzione/mantenimento: ad ogni ciclo le cellule vengono coltivate con terreno di induzione, sostituito dopo 3 giorni con terreno di mantenimento. Completati i 3 cicli, è necessario coltivare le cellule ancora per 7 giorni con terreno di mantenimento: le MSC accumulano progressivamente goccioline lipidiche nel citoplasma, che si colorano di rosso con Oil-Red-O.

#### **Colorazione con Oil-Red-O**

I reagenti utilizzati per questa colorazione sono:

- Oil Red O stock (Sigma), soluzione madre (0.7 gr di Oil Red O in 200 ml di isopropanolo);

- Oil Red O Working solution 0.6%. La Working solution viene preparata al momento dell'uso. Deve essere filtrata con un filtro da 0,2  $\mu\text{m}$  e lasciata a temperatura ambiente per 20 minuti.

La procedura per l'allestimento dei preparati prevede i seguenti passaggi:

- 1) rimuovere la formalina dai pozzetti ed eseguire tre lavaggi con acqua distillata;
- 2) aggiungere 1 ml di Oil Red O Working solution per pozzetto, e lasciare agire la soluzione per 50 minuti a temperatura ambiente;
- 3) rimuovere il colorante ed eseguire 4 lavaggi con acqua distillata;
- 4) eseguire la controcolorazione di Wright Giemsa modificata per evidenziare il nucleo e il citoplasma delle cellule.

*Controcolorazione di Wright Giemsa modificata (kit Diff Quik, Dade Behring)*

La colorazione di Wright-Giemsa modificata è normalmente utilizzata per colorare gli strisci di sangue periferico. La variante rapida della colorazione Wright Giemsa utilizza la tiazina e l'eosina, in presenza di tampone fosfato. La tiazina, (azure B) è un prodotto dell'ossidazione del blu di metilene ed essendo caricata positivamente si lega alle strutture acide delle cellule (acidi nucleici e nucleoproteine), l'eosina invece, caricata negativamente, colora le componenti basiche delle cellule (costituenti citoplasmatiche).

In questa tesi le MSC non differenziate e le MSC dopo induzione adipogenica, sono state colorate con la controcolorazione di Wright Giemsa modificata al fine di definire la struttura cellulare di queste cellule.

I reagenti utilizzati per la controcolorazione sono:

- soluzione acida a base di eosina: 1,22 g/l di Eosina G in tampone fosfato a pH 6,6 e sodioazide (Diff Quik 2, Dade Behring);

- soluzione basica a base di tiazina: 1,1 g/l di Tiazina-Farbstoff in tampone fosfato a pH 6,6 (Diff Quik 3, Dade Behring).

Il protocollo adottato per l'allestimento dei preparati è il seguente:

- 1) eseguire tre lavaggi con acqua distillata
- 2) aggiungere la soluzione colorante Diff Quik 2 a base di eosina in modo da coprire il pozzetto (circa 2 ml) e lasciare agire per 15 secondi, ripetendo l'operazione 3 volte;
- 3) aggiungere la soluzione colorante Diff Quik 3 a base di tiazina e lasciare agire per 15 secondi; ripetendo l'operazione 3 volte;
- 4) risciacquare con acqua deionizzata;
- 5) si può procedere quindi all'acquisizione delle immagini con il microscopio Olympus BX60.

### **3.6 Analisi molecolare dell'espressione genica delle MSC differenziate**

#### ***3.6.1 Estrazione dell'RNA***

L'RNA totale è stato estratto dalle MSC differenziate in adipociti ed osteociti utilizzando il protocollo "RNeasy Mini Kit Protocol" (Qiagen, Hilden, Germany). Le MSC sono state lisate utilizzando una soluzione contenente  $\beta$ -mercaptoetanololo e tampone di lisi e successivamente processate tramite ripetute aspirazioni con ago da 20 G. 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 8.000 g per 15 secondi, con successiva eliminazione dell'eluito. È stato eseguito, quindi, un lavaggio con 700  $\mu$ l di tampone RW1 e, dopo centrifugazione a 8.000 g per 15 secondi, sono stati effettuati altri due lavaggi del



materiale nella colonnina con 500 µl di tampone RPE contenente etanolo. Per eluire l'RNA, legato alla membrana, sono stati aggiunti alla colonnina 30 µl di H<sub>2</sub>O priva di RNasi ed è stata eseguita una centrifugazione a 8.000 g per 1 minuto, raccogliendo l'eluato contenente l'RNA.

Per verificare la qualità dell'RNA ottenuto, sono stati seminati 2 µl di campione in un gel di agarosio all'1% in tampone tris-acetato (TAE) 1X, con bromuro di etidio (10 mg/ml) al 5% V/V; l'elettroforesi è stata eseguita a 60 V 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 260 nm ( $\lambda$  dei nucleotidi) e 280 nm ( $\lambda$  delle proteine). Il rapporto tra i valori ottenuti dalle letture a queste due lunghezze d'onda fornisce l'indice di purezza degli acidi nucleici: un valore compreso tra 1,8 e 2 è indice di una preparazione pura. 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 µg/ml, alla quale si ottiene  $A_{260}$  pari a 1.

### **3.6.2 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. Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il kit di retrotrascrizione SuperScript III First-Strand (Invitrogen).

Una prima miscela di reazione (**MIX 1**) è stata allestita con Oligo(dT) alla concentrazione di 50  $\mu$ M, Annealing Buffer e con Acqua RNasi/DNasi-free, in un volume finale di 8  $\mu$ l. A ciascun campione di RNA è stata aggiunta questa prima soluzione e si è proceduto alla denaturazione per 5 minuti a 65°C ed al successivo raffreddamento a 4°C per 1 minuto. È stata successivamente aggiunta una seconda miscela di reazione (**MIX 2**), contenente 2X First-Strand Reaction Mix (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dNTPs 1mM) e SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix. I campioni sono stati incubati nel termociclatore a 50°C per 50 minuti, a 85°C per 5 minuti e raffreddati in ghiaccio. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -80°C fino al momento della sua amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR).

### ***3.6.3 Amplificazione del cDNA mediante PCR***

Il cDNA ottenuto è stato amplificato usando primers specifici per geni implicati nella differenziazione adipogenica (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ 2, Ppar $\gamma$ 2) ed osteogenica (Core Binding Factor  $\alpha$ 1, Cbfa1). Le reazioni di PCR sono state condotte nel termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, Foster City, USA) in un volume finale di 50 $\mu$ l. La soluzione di reazione è stata allestita con MgCl<sub>2</sub> 25 mM, PCR buffer II 10X, dNTPmix 10 mM primer forward e reverse 10 pM/ $\mu$ l, AmpliTaq Gold 5 U/ml, H<sub>2</sub>O priva di RNasi ed il cDNA da amplificare. Come controllo negativo è sempre stato allestito un ulteriore campione da amplificare contenente la soluzione di reazione

ed acqua distillata sterile. Come gene house keeping di riferimento è stato utilizzato il gene della  $\beta$ -actina.

Le reazioni si sono svolte nelle seguenti fasi:

- attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 2 minuti;
- denaturazione a 95°C per 40 secondi per Ppary2 e Cbfa1; a 94°C per 30 secondi per  $\beta$ -actina;
- annealing con tempo e temperatura diversi a seconda del primer;
- estensione a: 72°C per 40 secondi per Ppary2 e  $\beta$ -actina; a 72°C per 1 minuto per Cbfa1;
- estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Le sequenze dei primers utilizzati e le dimensioni delle sequenze amplificate sono riportati in Tabella III. Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

- 62°C temperatura di annealing ( $T_{an}$ ) per 40 secondi e 35 cicli per Ppary2;
- 55°C  $T_{an}$  per 40 secondi e 35 cicli per Cbfa1;
- 55°C  $T_{an}$  per 30 secondi e 35 cicli per  $\beta$ -actina.

I campioni amplificati sono stati poi sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE 1X, con bromuro di etidio (10 mg/ml) al 5% V/V, caricando in ciascun pozzetto un volume di campione pari a 10  $\mu$ l; l'elettroforesi è stata condotta a 80V per 60 minuti. Le bande di prodotto sono state rilevate mediante transilluminatore ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, California).

**Tabella IV. Primers dei geni utilizzati per verificare la differenziazione delle MSC in adipociti ed osteociti e del gene *house keeping* impiegato come riferimento.**

Gene	Sequenza del primer forward 5'→3' Sequenza del primer reverse 5'→3'	Amplificato
Ppar $\gamma$ 2	F: 5'-TGAACGACCAAGTAACTCTCC-3' R: 5'-CTCATGTCTGTCTCTCCGTCTTC-3'	460 bp
Cbfa1	F: 5'-GGCCTTCCACTCTCAGTAAGA-3' R: 5'-GATTCATCCATTCTGCCACTA-3'	474 bp
$\beta$ -actina	F: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	550 bp

### 3.7 Isolamento di linfociti B da sangue periferico

Poiché per i nostri studi era necessario ottenere una popolazione di soli linfociti B, priva cioè di altre popolazioni linfocitarie contaminanti (linfociti T e cellule NK), la metodica utilizzata è dipesa dalla percentuale di cellule B dei campioni in esame. Nel caso di una percentuale di linfociti B superiore al 90% dei linfociti totali abbiamo utilizzato la separazione su F/H, analogamente a quanto descritto per la separazione delle cellule mononucleate da sangue midollare. Nel caso invece di una percentuale di linfociti B inferiore al 90% dei linfociti totali abbiamo utilizzato il kit *RosetteSep* (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Questo kit prevede l'utilizzo di complessi anticorpali tetrameric (TAC) per l'immunodeplezione di cellule positive per gli antigeni CD2 (espresso da linfociti T e dalle cellule NK), CD3 (espresso dai linfociti T), CD16 (espresso dalle cellule NK e dai monociti), CD36 (espresso dalle piastrine, dagli eritrociti e dai monociti), CD56 (espresso dalle cellule NK), CD66b (espresso dai neutrofili) e glicoforina A (espressa dagli eritrociti). I complessi tetrameric di anticorpi inducono legami crociati tra le cellule "non B", che presentano gli antigeni sopra elencati e la glicoforina A dei globuli rossi, formando delle immuno-rosette. Questi legami determinano un aumento della densità delle cellule legate, le quali

dopo stratificazione su F/H sedimenteranno sul fondo della provetta. Al contrario, i linfociti B, non legati a nessun anticorpo, dopo centrifugazione su F/H si localizzeranno in corrispondenza dell'interfaccia F/H.

La procedura *RosetteSep* prevede l'aggiunta di 50  $\mu$ l di una miscela di TAC per ogni millilitro di campione di sangue periferico e la successiva incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione il campione viene diluito 1:3 con PBS 1X e stratificato su F/H. Si centrifuga a 900 g a temperatura ambiente per 30 minuti e si aspira l'anello formatosi all'interfaccia F/H contenente le cellule B. Queste ultime si risospendono in PBS 1X al 2% di FCS e si centrifugano a 400 g per 10 minuti. La stessa metodica è stata utilizzata anche per l'isolamento di linfociti B da *buffy coat*, utilizzati come controlli normali.

### **3.8 Co-culture di cellule mesenchimali staminali e linfociti B allogenici.**

Abbiamo allestito co-culture di linfociti B ottenuti dal sangue periferico di pazienti affetti da LLC o di donatori sani con:

- 1) MSC isolate da pazienti con LLC-B;
- 2) MSC isolate da midollo osseo di donatori sani, utilizzate come controllo non patologico;
- 3) una linea di cellule stromali midollari umane (HS5; Promochem, Teddington, UK) utilizzate come controllo positivo, in base ai dati già presenti in letteratura [102].

Le cellule MSC sono state seminate in piastre da 12 pozzetti con fondo piatto e superficie di 1,2 cm<sup>2</sup>; dopo il raggiungimento della confluenza sono stati aggiunti 300.000 linfociti B, ottenendo un rapporto MSC : linfociti B pari a 1:4.

Abbiamo quindi incubato le piastre a 37°C, in atmosfera umidificata contenente CO<sub>2</sub> al 5% e raccolto le cellule in sospensione rispettivamente dopo 3, 5 e 7 giorni per la valutazione dell'apoptosi.

Allo scopo di valutare se l'eventuale effetto antiapoptotico delle MSC fosse attribuibile a fattori solubili o a interazioni dirette cellula-cellula, sono state allestite colture di *transwell*. Tale sistema consente di separare fisicamente le cellule B dalle MSC (mediante un supporto permeabile con pori di 3 µm), mentre permette il passaggio di fattori solubili tra i due compartimenti.

### **3.9 Valutazione dell'apoptosi dei linfociti B**

#### **3.9.1 Metodica dell'Annexina V**

L'apoptosi dei linfociti B in presenza ed in assenza delle MSC è stata valutata impiegando l'“Annexin V Apoptosis Detection kit” (BD Pharmingen, San José, CA). Durante i primi stadi dell'apoptosi la membrana plasmatica va incontro a profonde modificazioni che segnalano lo stato apoptotico della cellula ai macrofagi, i quali provvedono alla sua eliminazione. Sulla superficie esterna viene esposta la fosfatidilserina (PS), un aminofosfolipide a carica negativa normalmente espresso solo sul lato interno della membrana plasmatica. L'annexina V è una proteina che, in presenza di elevate concentrazioni di Ca<sup>2+</sup>, riconosce e lega selettivamente la fosfatidilserina, risultando quindi utile per l'identificazione delle cellule apoptotiche che espongono il fosfolipide in superficie. La metodica utilizzata prevede la seguente procedura:

- 1) si raccoglie il sovrantante in ciascun pozzetto e si effettua un lavaggio con PBS;
- 2) per rimuovere i linfociti B legati direttamente alle MSC i pozzetti vengono incubati per 10 secondi con tripsina/EDTA al 0,25%. La tripsina viene poi

inattivata con DMEM ed il sovrinatante aggiunto alle cellule precedentemente raccolte;

- 3) i campioni vengono centrifugati a 400 g per 5 minuti ed il sovrinatante viene eliminato. Si procede alla incubazione dei campioni con 5  $\mu$ l di annessina V FITC e 2  $\mu$ l di anti CD19 TC (Caltag Invitrogen, Paisley, UK). Si risospendono i campioni con 190  $\mu$ l di “binding buffer”, una soluzione ricca di calcio che ottimizza il legame dell’annessina alla fosfatidilserina. Dopo incubazione al buio per 10 minuti a temperatura ambiente ed un lavaggio con PBS 1X, le cellule vengono analizzate al citofluorimetro. Per ogni campione sono stati acquisiti 20.000 eventi, ed il numero di cellule apoptotiche è stato espresso come percentuale di cellule positive all’annessina V sul totale delle cellule analizzate CD19+.

### **3.9.2 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE) e western blotting**

L’apoptosi dei linfociti B nelle co-culture è stata valutata anche mediante western blotting.

#### *Preparazione dei lisati cellulari*

Per ogni campione aliquote da 800.000 linfociti B provenienti dalle co-culture sono state lisate in 50  $\mu$ l del seguente tampone:

- tris (idrossimetil) amminometano cloridrato (Tris-HCl) 50 mM pH 6,8;
- acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 5 mM;
- glicerolo 10%;
- SDS (sodio dodecil solfato) 2%;
- $\beta$ -mercaptoetanolo 1%;

- colorante (blu di bromofenolo o pironina) (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Successivamente i lisati sono stati agitati al vortex, portati a 100°C per 5 minuti e, quindi, sottoposti a SDS-PAGE.

### Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (Sodio Dodecil Solfato) 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 1,4 gr 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 migrare, contemporaneamente al campione, proteine standard di peso molecolare noto è possibile determinare il peso molecolare 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:

- 1) 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;
- 2) 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 8×10 cm, viene fissata nell'apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham



Biosciences, San Francisco, CA). L'intensità di corrente applicata è di 20 mA e la corsa elettroforetica ha una durata di 2 ore.

### 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 azione di un campo elettrico, ottenuto applicando all'apparecchio di trasferimento una corrente di 350 mA per 2 ore e 30 minuti. Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento è costituito da: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20% e SDS 0,1% con pH finale pari a 8,0 (tampone A). Al termine del trasferimento, la membrana viene lasciata per 30 minuti nel tampone di saturazione composto da Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 NaCl 150 mM, BSA 3% (tampone B), per saturare i siti aspecifici di legame anticorpale. Segue un'incubazione per tutta la notte a 4°C con l'Ac primario diluito nel seguente tampone: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA 1% (tampone C). Per il nostro studio abbiamo impiegato i seguenti anticorpi: anti- $\beta$ -actina monoclonale (Sigma Aldrich); anti-PARP-clivata policlonale (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA). L'actina è una proteina presente in tutte le cellule, ed è stata impiegata per la normalizzazione dei dati, mentre PARP (Poli-ADP Ribosio Polimerasi) è una proteina che viene clivata nel corso del processo apoptotico.

Sono stati successivamente eseguiti tre lavaggi, di 10 minuti ciascuno, a temperatura ambiente, utilizzando il tampone C addizionato di Tween 0,1%

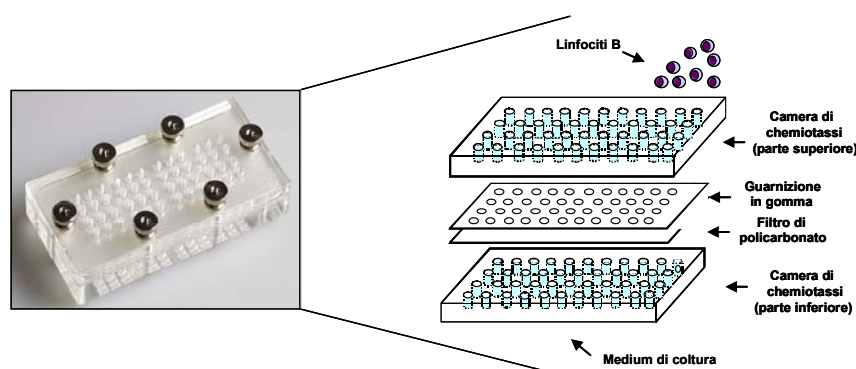
(tampone di lavaggio). La membrana è stata quindi incubata per 30 minuti con un anticorpo secondario anti-IgG, diretto contro l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario (Amersham International Biotechnology, Buckinghamshire, UK) è coniugato con l'enzima perossidasi e viene opportunamente diluito nel tampone C. Dopo aver effettuato tre ulteriori lavaggi la membrana è stata sottoposta alla rivelazione anticorpale con il sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL) (Amersham International Biotechnology). La membrana viene fatta incubare per 1 minuto con 1 ml di luminolo e 1 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che, a contatto con la perossidasi e, quindi, in corrispondenza del complesso antigene anticorpo, 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. Dopo che la lastra è stata sviluppata, viene acquisita tramite scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) e l'intensità delle bande viene quantificata mediante densitometria utilizzando il programma ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), che fornisce il valore relativo alla frazione di PARP clivata, normalizzato sulla  $\beta$ -actina.

### **3.10 Test di migrazione in camera di Boyden**

È stata valutata la capacità da parte delle MSC di produrre stimoli chemiotattici per i linfociti B, sia patologici che normali, utilizzando il test di chemiotassi in microcamera di Boyden con 48 pozzetti. L'impiego di un micro-metodo per valutare la risposta chemiotattica offre i vantaggi di utilizzare un piccolo numero di cellule (25x10<sup>4</sup> cellule/pozzetto) e di esaminare contemporaneamente un gran numero di stimoli o di pazienti. La microcamera è costituita da un blocchetto di plexiglass contenente 48 pozzetti della capacità di 25-30  $\mu$ l (parte inferiore) e da un coperchio di plexiglass contenente 48 fori che,

una volta montato e avvitato, forma i compartimenti superiori della capacità di 50  $\mu$ l. Il potenziale di migrazione viene valutato come capacità delle cellule di attraversare la membrana porosa che separa i due compartimenti. Nel compartimento superiore vengono seminate le cellule, mentre nel compartimento inferiore viene seminato l'agente chemiotattico (Figura 7).

In questo lavoro abbiamo utilizzato come stimolo funzionale il terreno delle diverse colture di MSC. Per il test di migrazione sono state utilizzate membrane porose di policarbonato prive di polivinilpirrolidone (pori 5  $\mu$ m) ed una soluzione di fibronectina alla concentrazione finale di 5 $\mu$ g/ml. Il filtro è stato appoggiato in questa soluzione ed incubato a 37°C per 45 minuti, poi è stato lavato con PBS 1X e bagnato con alcune gocce di terreno.



**Figura 7. Rappresentazione schematica del test di chemiotassi.** La microcamera è costituita da un blocchetto di plexiglass contenente 48 pozzetti della capacità di 25-30 $\mu$ l (parte inferiore) e da un coperchio di plexiglass contenente 48 fori che, una volta montato e avvitato, forma i compartimenti superiori della capacità di 50 $\mu$ l.

Nei pozzetti inferiori della microcamera di chemiotassi sono stati aggiunti:

- 1) 28  $\mu$ l di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Paisley, UK), per valutare la migrazione spontanea in assenza di stimoli;
- 2) 28  $\mu$ l di DMEM contenente CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (R&D System Inc.) alla concentrazione di 100 ng/ml;
- 3) 28  $\mu$ l del terreno di coltura di MSC isolate da paziente con LLC-B;

- 4) 28  $\mu$ l del terreno di coltura di MSC isolate da donatori sani
- 5) 28  $\mu$ l del medium di coltura di una linea di cellule stromali midollari umane (HS5; Promochem, Teddington, UK).

Il filtro è stato appoggiato sul lato interno della microcamera di chemiotassi, con il lato trattato con la fibronectina (lato F) rivolto verso l'alto. La cameretta è stata chiusa e ai pozzetti superiori sono stati aggiunti  $25 \times 10^4$  linfociti B ottenuti dal sangue periferico di pazienti con LLC-B o da donatore sano in terreno RPMI 1640 (Invitrogen; Paisley, UK) addizionato con 1% di PenStrep (Penicillina 5000 U/ml, Streptomicina 5000  $\mu$ g/ml; Invitrogen), senza FCS. Dopo incubazione per 2 ore a 37°C, in ambiente al 5% di CO<sub>2</sub>, il filtro è stato staccato dal supporto e il lato “non F” è stato lavato con PBS 1X in modo da eliminare le cellule non adese. Il lavaggio è stato ripetuto 2 volte ed in seguito il filtro è stato lasciato asciugare. Per la colorazione del filtro sono stati utilizzati le soluzioni: DiffQuick 1 per fissare le cellule (Fast Green in Metanolo 0,002 g/l), DiffQuick 2 per la colorazione del citoplasma (1,22 g/l Eosina G in Buffer fosfato pH 6,6) e DiffQuick 3 per la colorazione dei nuclei (1,1 g/l Tiazina-Farbstoff in Buffer fosfato pH 6,6) (Biomap, Milano, Italia). Il filtro è stato poi fissato su un vetrino e le cellule migrate sono state quindi contate al microscopio (ingrandimento 800X).

Il risultato del test di chemiotassi viene espresso come indice di migrazione (IM) dato dal:

*n. di cellule migrate in presenza di stimolo/n. cellule migrate senza stimolo*

### **3.11 Analisi statistica**

L'analisi statistica dell'apoptosi nei pazienti analizzati è stata eseguita utilizzando il test t di Student. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione

standard della media e abbiamo considerato statisticamente significativi i valori con  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ .



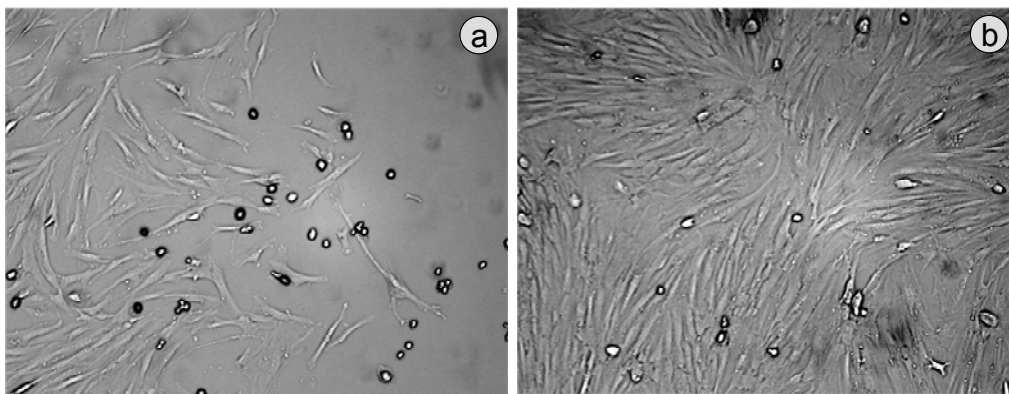
## 4. RISULTATI

### 4.1 Isolamento delle MSC dal midollo osseo

Nel corso di questo studio sono stati processati 63 campioni di sangue midollare ottenuti da soggetti affetti da LLC-B. Siamo riusciti ad isolare le MSC da 47 dei 63 campioni, con una percentuale di successo pari al 75%. Sulla base del riuscito isolamento delle MSC, abbiamo suddiviso i pazienti in due gruppi e ne abbiamo analizzato separatamente le caratteristiche cliniche, allo scopo di evidenziare se uno di questi parametri in particolare potesse aver influenzato la resa nella selezione delle MSC. Nel gruppo in cui l'isolamento delle MSC ha dato un esito positivo, il rapporto maschi/femmine era di 2:1, con una media d'età di 60 anni. Il 53% dei pazienti era in stadio 0 secondo Rai, il 27,6% in stadio 1, il 15% in stadio 2, il 4,2% in stadio 3 e lo 0% in stadio 4. I pazienti in terapia al momento del prelievo erano l'11%, inoltre il 62% presentava uno stato mutazionale alterato. In particolare la terapia utilizzata comprendeva i farmaci Cloranbucile, da solo o in associazione a Prednisone e Rituximab in associazione a Fludarabina e Cloranbucile. Nel gruppo di pazienti, invece, in cui l'isolamento delle MSC ha avuto un esito negativo, il rapporto maschi/femmine era di 2:1, con una media d'età di 65 anni. Il 50% dei pazienti era in stadio 0, il 25% in stadio 1, il 12,5% in stadio 2, il 6,25% in stadio 3 e il 6,25% in stadio 4. I pazienti in terapia al momento del prelievo erano il 12%, inoltre il 73% presentava ipermutazioni somatiche. I farmaci utilizzati in questo gruppo di pazienti sono stati la Fludaramina, in associazione alla Ciclofosfamide, e il Desametasone, in associazione al Rituximab.

Per ogni campione le cellule mononucleate midollari sono state seminate in fiaschetta alla densità di circa 1.000 cellule/cm<sup>2</sup>. Nei campioni da cui sono state

isolate le MSC già dopo 48 ore dalla semina si osservava l'adesione alla fiaschetta di alcune cellule con morfologia tondeggiante, mentre al primo cambio di terreno, dopo 7 giorni (Figura 8a), esse hanno assunto una morfologia allungata, simil fibroblastica. Dopo 14 giorni le cellule formavano aggregati altamente proliferanti tendenti alla confluenza reciproca, condizione che hanno raggiunto dopo 30/40 giorni (Figura 8b). Tutte le colture hanno mantenuto una morfologia omogenea ed uno stato indifferenziato nel corso dei vari passaggi.



**Figura 8. Colture di MSC dopo 14 (a) e dopo 30 (b) giorni di cultura.** (Ingrandimento 10x, con microscopio Olympus BX60). Le cellule mononucleate ottenute dal sangue midollare vengono seminate in fiaschette di coltura in terreno tipo Dulbecco's Modified Eagle Medium. Con il primo cambio di terreno, dopo 7 giorni, alcune cellule con forma fusata aderiscono alla plastica mentre le cellule in sospensione vengono eliminate. I primi foci di proliferazione si osservano dopo 14 giorni e la coltura raggiunge la confluenza dopo circa 30-40 giorni.

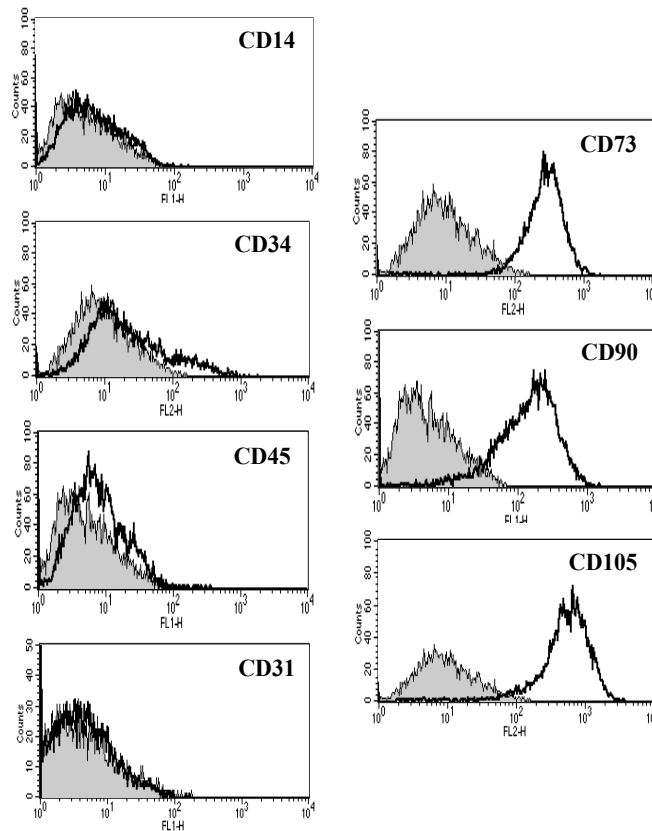
## 4.2 Caratterizzazione fenotipica

Allo scopo di accertare la natura e l'omogeneità della popolazione cellulare espansa, abbiamo valutato l'immunofenotipo delle MSC tra la terza e la quarta subcoltura. Poiché attualmente non esiste un marcatore unico in grado di identificare da solo le MSC, la loro caratterizzazione fenotipica si basa sull'espressione di una combinazione di antigeni non specifici, tra cui CD105, CD73 e CD90 e sulla negatività per antigeni della linea emopoietica quali CD14, CD34, CD45 e della linea endoteliale come CD31.

Le colture di MSC da noi ottenute mostrano fenotipo analogo a quello descritto in letteratura per le MSC ottenute da soggetti sani, confermando la



selezione di una popolazione cellulare omogenea e di derivazione non emopoietica (Figura 9).



**Figura 9. Caratterizzazione fenotipica delle MSC di LLC.** Caso rappresentativo di analisi citofluorimetrica per la valutazione immunofenotipica delle MSC di LLC. Area scura: controllo negativo. Area chiara: espressione del marcatore esaminato.

### 4.3 Caratterizzazione funzionale

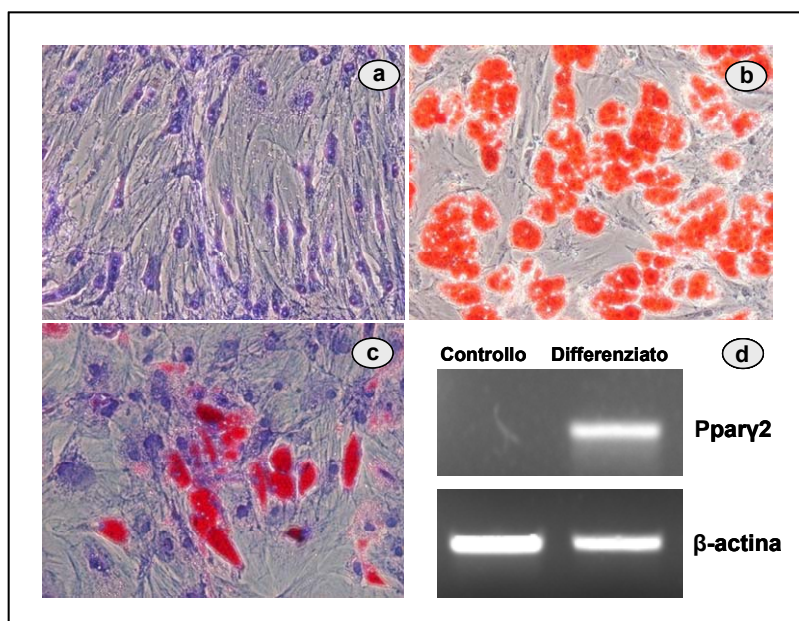
Per caratterizzare le MSC è necessario dimostrarne anche la capacità di differenziare in tipi cellulari di derivazione mesodermica. A tale scopo, tra il quarto e il quinto passaggio abbiamo indotto la differenziazione delle nostre colture in adipociti ed osteociti utilizzando opportuni terreni condizionati.

#### Differenziazione adipogenica

Le MSC poste in coltura con terreno di induzione adipogenica si distinguono dalle tipiche cellule simil fibroblastiche perché accumulano progressivamente vacuoli citoplasmatici, il cui numero e dimensione aumenta nel

corso del processo differenziativo (Figura 10a). Mediante colorazione specifica con Oil Red O questi vacuoli si colorano di rosso, a conferma dell'avvenuto accumulo di trigliceridi (Figura 10b). Grazie alla combinazione della colorazione con Oil Red O e la controcolorazione di Wright Giemsa modificata è possibile inoltre definire al meglio la struttura citoplasmatica di queste cellule (Figura 10c).

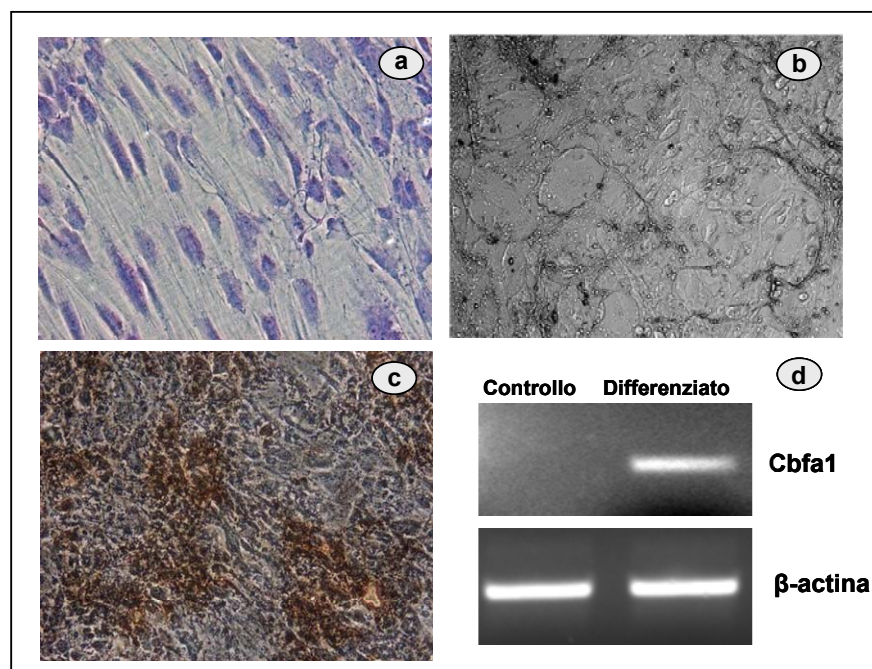
La differenziazione in adipociti è stata confermata anche mediante analisi molecolari, valutando l'espressione del gene *Ppar $\gamma$ 2*, la cui trascrizione viene attivata durante la fase precoce di differenziazione adipogenica: al termine del periodo di induzione si riscontra un aumento del messaggero *Ppar $\gamma$ 2* rispetto alle cellule non differenziate (Figura 10d). Come controllo è stato utilizzato il gene *house keeping*  $\beta$ -actina.



**Figura 10. Colture di differenziazione adipogenica di MSC.** a) controcolorazione con Wright Giemsa modificata di un controllo non differenziato per adipociti; b) colorazione degli adipociti con Oil red O (ingrandimento 10X, con microscopio Olympus IX81); c) colorazione con Oil Red O e controcolorazione con Wright Giemsa degli adipociti (ingrandimento 10X, con microscopio Olympus BX60) d) elettroforesi del gene *Ppar $\gamma$ 2*, attivato nel corso della differenziazione adipogenica e del gene *house-keeping*  $\beta$ -actina, ottenuti dopo retrotrascrizione dell'RNA estratto da MSC differenziate e dalle MSC di controllo non differenziate.

## Differenziazione osteogenica

Le MSC poste in coltura con terreno di induzione osteogenica iniziano a perdere la loro forma fusata già dopo 7 giorni, assumendo una morfologia poligonale e depositando nello spazio circostante una matrice mineralizzata rifrangente la luce al microscopio ottico (Figura 11a, 11b), che si colora intensamente mediante colorazione di Von Kossa, specifica per il calcio (Figura 11c). L'analisi molecolare dell'espressione del gene *Cbfa1*, fattore di trascrizione implicato nella regolazione della differenziazione degli osteoblasti, ha fornito un'ulteriore conferma dell'avvenuta differenziazione osteogenica: terminato il periodo di induzione, aumenta l'espressione di *Cbfa1* rispetto alle cellule non differenziate (Figura 17d). Anche in questo caso il gene *house keeping*  $\beta$ -actina è stato impiegato come controllo.



**Figura 11. Colture di differenziazione osteogenica di MSC. a)** controcolorazione con Wright Giemsa modificata di un controllo non differenziato per osteociti; **b)** osteociti (ingrandimento 10X, con microscopio Olympus BX60); **c)** colorazione degli osteociti con Von Kossa (ingrandimento 10X, con microscopio Olympus IX81); **d)** elettroforesi del gene *Cbfa1*, attivato nel corso della differenziazione osteogenica e del gene *house-keeping*  $\beta$ -actina, ottenuti dopo retrotrascrizione dell'RNA estratto da MSC differenziate e dalle MSC di controllo non differenziate.

Tutte le MSC da noi ottenute hanno dimostrato di possedere capacità differenziativa sia in senso osteogenico che in senso adipogenico.

#### **4.4 Effetto delle MSC sull'apoptosi dei linfociti B di LLC e linfociti B normali**

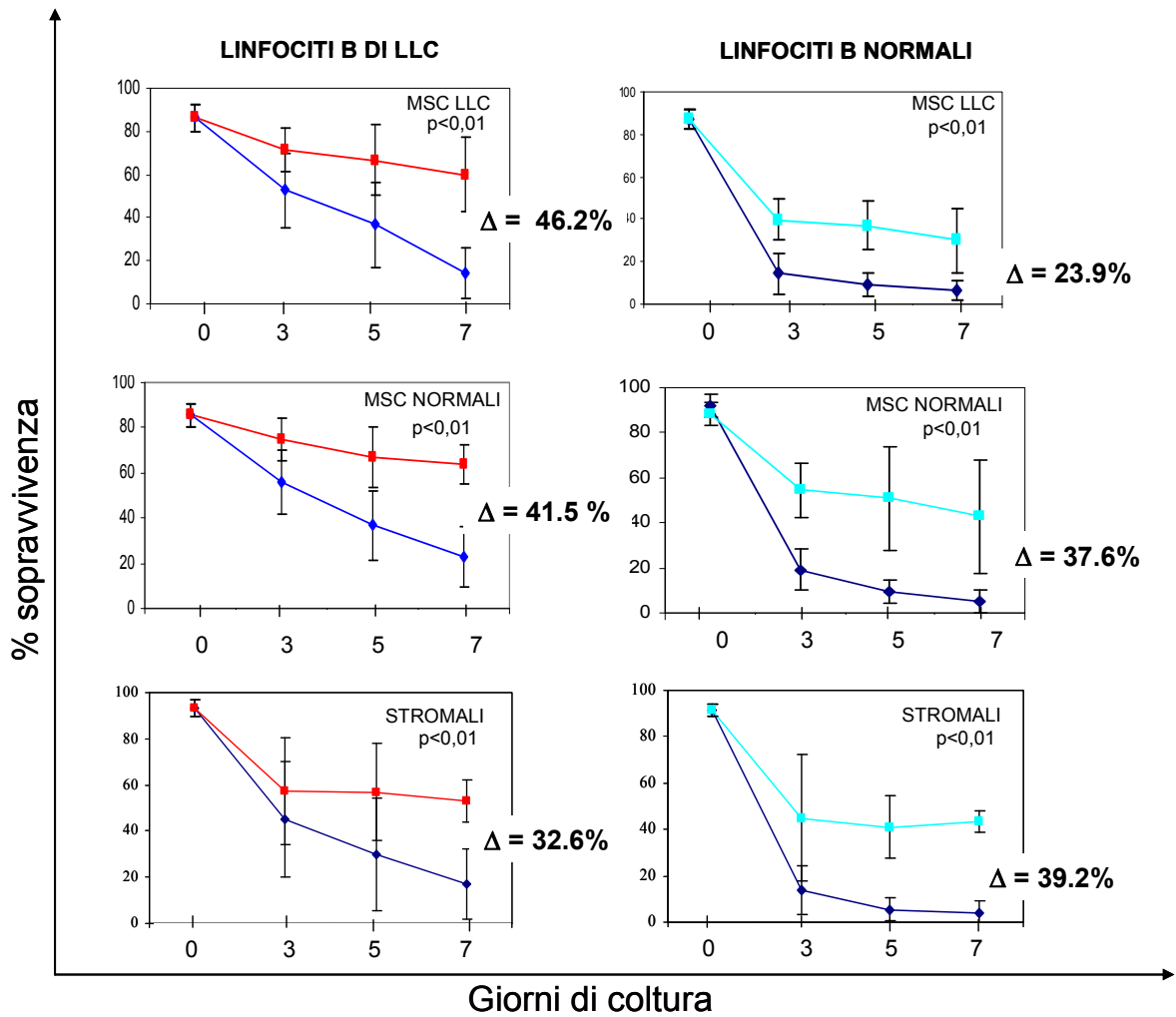
##### ***4.4.1 Valutazione dell'apoptosi spontanea mediante Annessina V***

Studi precedenti hanno dimostrato che colture di cellule stromali midollari sono in grado di inibire l'apoptosi nei linfociti B leucemici CD5+ [102]. Poiché le MSC sono una delle popolazioni dello stroma midollare con cui il clone neoplastico si interfaccia ed interagisce, abbiamo indagato se tali cellule fossero implicate nella sopravvivenza del clone maligno.

A tal fine, dopo aver posto in coltura linfociti B di LLC e linfociti B normali in presenza di solo terreno, in presenza di MSC e di cellule stromali, sono stati valutati i livelli di apoptosi esprimendo i risultati in termini di sopravvivenza (percentuale di cellule Annessina V negative) (Figura 12). Dopo 7 giorni di coltura, la sopravvivenza dei linfociti neoplastici in presenza delle MSC allogene di LLC è pari al  $60\% \pm 17,3$  contro un  $14\% \pm 11,7$  in presenza di solo terreno ( $\Delta=46\%$ ;  $p<0,01$ ). Si osserva un effetto analogo anche in presenza di MSC normali.

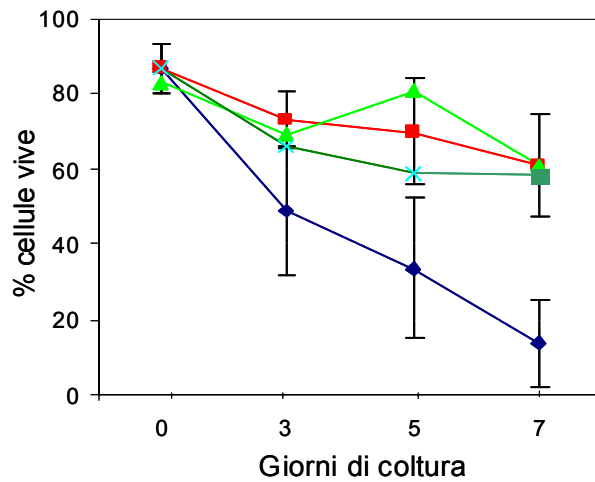
Per quanto riguarda invece i linfociti B normali, la presenza di MSC determina una riduzione del processo apoptotico inferiore rispetto a quella riscontrata nei linfociti leucemici. Dopo 7 giorni infatti la percentuale di cellule Annessina V negative passa dal  $30,20\% \pm 15$  in presenza di MSC di LLC ad un  $6,20\% \pm 5$  in presenza di solo terreno ( $\Delta=24,00\%$ ;  $p<0,01$ ). La sopravvivenza dei

linfociti B normali in presenza di cellule stromali midollari si dimostra invece analoga a quella delle cellule B patologiche.



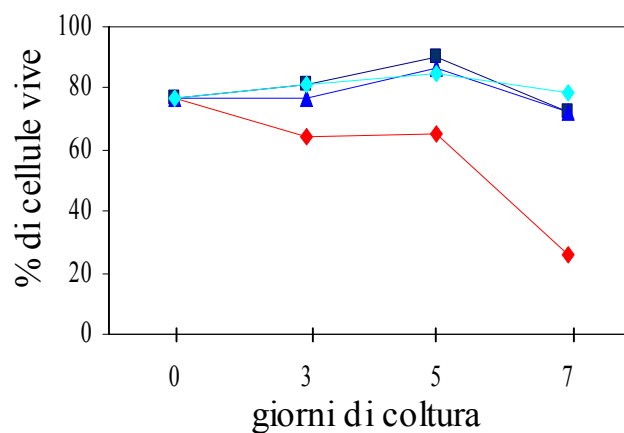
**Figura 12.** Sopravvivenza dei linfociti B di LLC e linfociti B normali dopo 3, 5 e 7 giorni di coltura. In blu scuro è riportata la sopravvivenza dei linfociti in presenza di solo terreno; in rosso la sopravvivenza relativa ai linfociti B di LLC ed in azzurro quella dei linfociti B normali in presenza di MSC allogeneiche di LLC, di MSC normali e di cellule stromali midollari.

L'effetto antiapoptotico osservato in presenza di MSC allogeneiche risulta inoltre analogo a quello osservato in presenza di MSC autologhe con una percentuale di sopravvivenza identica dopo 7 giorni (Figura 13).



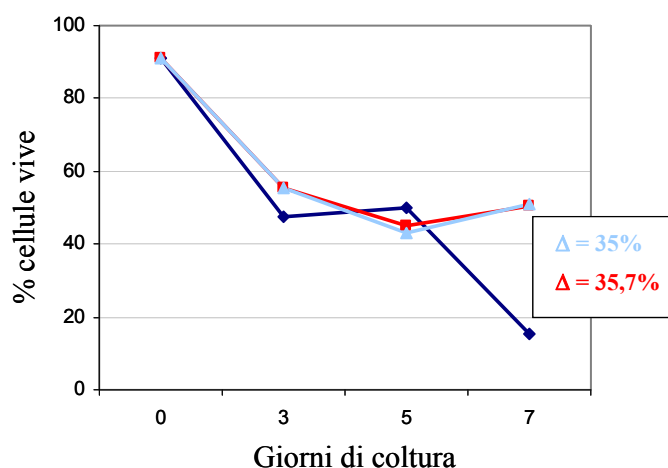
**Figura 13. Sopravvivenza dei linfociti B di LLC in presenza di MSC autologhe ed allogeneiche dopo 3, 5 e 7 giorni di coltura.** In blu scuro è riportata la sopravvivenza dei linfociti B di LLC in presenza di solo terreno; in rosso la sopravvivenza in presenza di MSC autologhe e in verde la sopravvivenza in presenza di MSC allogeneiche isolate da due diversi pazienti.

Abbiamo inoltre verificato se MSC isolate da pazienti diversi avessero lo stesso effetto sui linfociti B patologici, allestendo contemporaneamente più coculture. I dati ottenuti mostrano che MSC diverse esercitano lo stesso effetto protettivo sui medesimi linfociti B. Infatti tali linfociti, in presenza di solo terreno, dopo 7 giorni mostrano una sopravvivenza pari al 36%, mentre in presenza delle MSC di tre pazienti diversi presentano una sopravvivenza rispettivamente del 62% con le MSC del paziente numero 6 e del 72% con le MSC dei pazienti numero 7 e 11 (Figura 13)



**Figura 13. Sopravvivenza dei linfociti B in presenza di MSC allogeneiche isolate da diversi pazienti, dopo 3, 5 e 7 giorni di coltura.** In rosso la sopravvivenza dei linfociti B di LLC in presenza di solo terreno, in azzurro la sopravvivenza in presenza di MSC di LLC isolate dai pazienti numero 6, 7 e 11.

Per appurare se l'effetto delle MSC sul clone neoplastico fosse dovuto al contatto cellula-cellula, come dimostrato per le cellule stromali, o a fattori solubili rilasciati dalle MSC, abbiamo allestito delle co-culture con il sistema *Transwell*. Questo sistema in piastra utilizza un supporto poroso di policarbonato con pori di 3  $\mu\text{m}$ , che consente di separare fisicamente le due popolazioni cellulari, ma allo stesso tempo permette il passaggio dei fattori solubili rilasciati dalle cellule. I risultati ottenuti mostrano che dopo 7 giorni di coltura la percentuale di cellule Annessina V negative sale dal 15,3% $\pm$  in presenza di solo terreno al 50,3% $\pm$  in presenza di MSC di LLC sia in sistema *Transwell* sia in assenza di sistema *Transwell* con un  $\Delta$  pari a circa il 35% in entrambi i sistemi (Figura 14).

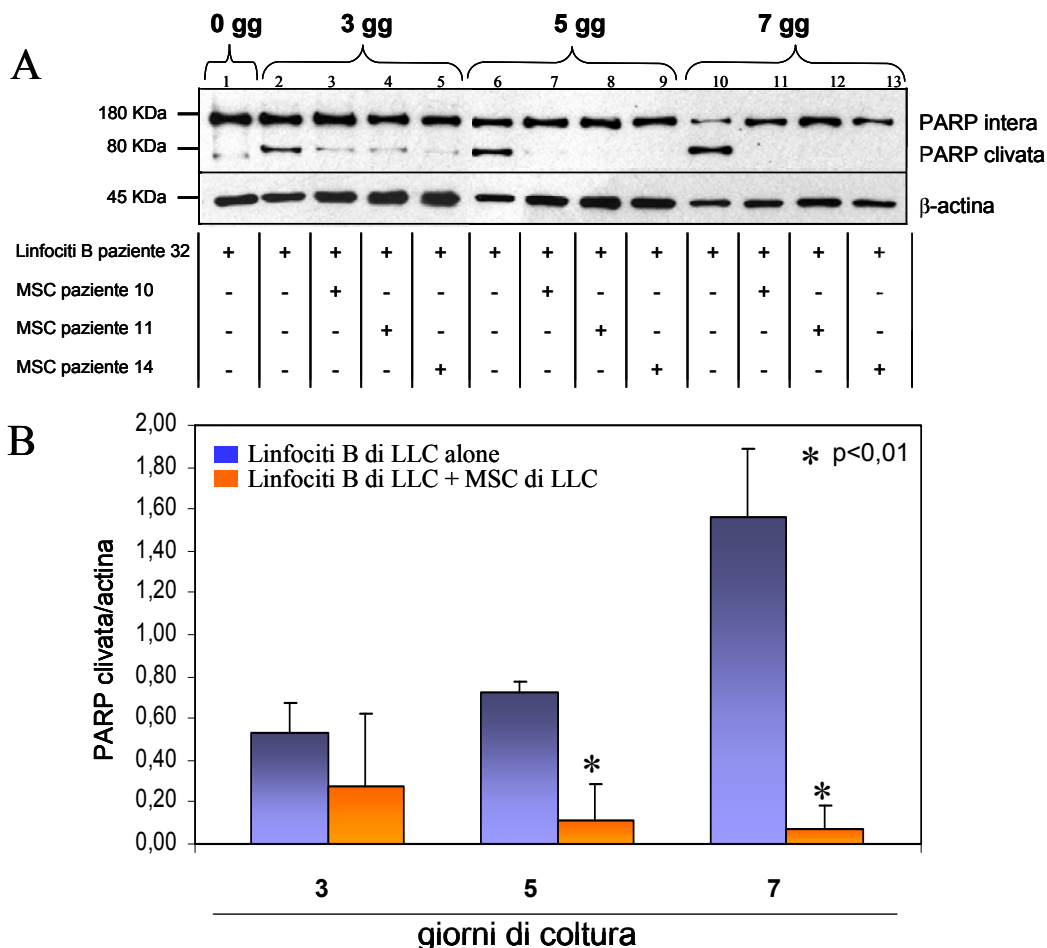


**Figura 14. Sopravvivenza dei linfociti B di LLC in sistema *Transwell* e in assenza di *Transwell* dopo 3,5 e 7 giorni di coltura.** In blu la sopravvivenza dei linfociti B di LLC in presenza di solo terreno, in azzurro la sopravvivenza in presenza di MSC di LLC in sistema *Transwell* e in rosso la sopravvivenza in assenza di *Transwell*.

#### 4.4.2 Valutazione dell'apoptosi spontanea mediante western blotting

Abbiamo valutato i livelli di apoptosi dei linfociti B, sia normali che neoplastici, in presenza di MSC anche mediante western blotting (Figura 15). Nei linfociti B di LLC in assenza di MSC i nostri dati mostrano la comparsa della banda corrispondente alla forma clivata di 89 KDa della PARP (Poli-ADP Ribosio Polimerasi), già dopo 3 giorni di coltura. Essa diventa progressivamente

più intensa dopo 5 e 7 giorni e si accompagna alla scomparsa progressiva della banda di 116 KDa, corrispondente alla forma intera della proteina. Ciò indica che in tali cellule si è innescato il processo apoptotico.



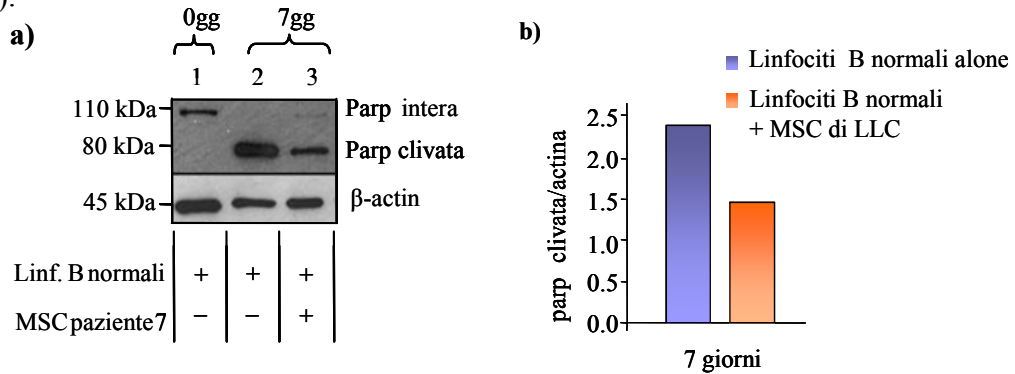
**Figura 15. Clivaggio della proteina PARP nelle cellule B di LLC-B in apoptosi.** A) Cellule B di paziente con LLC-B sono state poste in co-cultura con MSC precedentemente isolate da 3 differenti pazienti affetti da LLC. Dopo 3, 5, 7 giorni il lisato totale di cellule B è stato sottoposto a SDS-PAGE, trasferito su membrana di nitrocellulosa e rivelato in successione con l'anticorpo anti-PARP policlonale, che riconosce la forma intera e la forma clivata della proteina e con l'anticorpo anti  $\beta$ -actina. B) Il grafico riporta l'analisi densitometrica del rapporto Parp clivata/ $\beta$ -actina dei dati ottenuti da *western blotting* di 3 esperimenti. Per i linfociti B isolati da ciascun paziente abbiamo allestito co-culture con MSC derivate da almeno 2 pazienti diversi. (Le colonne in blu rappresentano i linfociti B in presenza di solo terreno; le colonne in arancione rappresentano i linfociti B in co-cultura con MSC di LLC-B).

Al contrario, nei linfociti in coltura con MSC di paziente si osserva una riduzione della quantità di Parp clivata rispetto ai linfociti in presenza di solo terreno, che risulta statisticamente significativa a 5 e 7 giorni.

Nei linfociti B normali dopo 7 giorni il rescue dall'apoptosi risulta essere minore rispetto a quello osservato nei B leucemici. Gli esperimenti di western

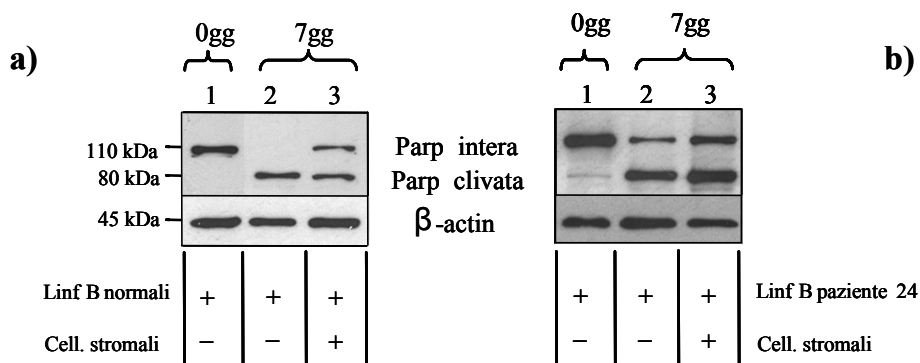


blotting mostrano che non c'è un completo recupero della sopravvivenza, come si verifica invece nei B di LLC. Si osserva infatti la presenza di una banda intensa relativa alla forma clivata della Parp e solo di una leggera banda relativa alla forma intera, indice che le cellule sono per la maggior parte apoptotiche (Figura 16).



**Figura 16. Clivaggio della proteina PARP nelle cellule B normali in presenza di MSC di paziente.**  
**a)** Cellule B normali poste in coltura con MSC di LLC dopo 7 giorni. Si osserva la banda relativa alla forma clivata della Parp sia nei linfociti in solo terreno, sia nella co-coltura con MSC di paziente. **B)** Il grafico riporta l'analisi densitometrica del rapporto Parp clivata/ $\beta$ -actina (La colonna in blu rappresenta i linfociti B in presenza di solo terreno; la colonna in arancione rappresenta i linfociti B in co-coltura con MSC di paziente).

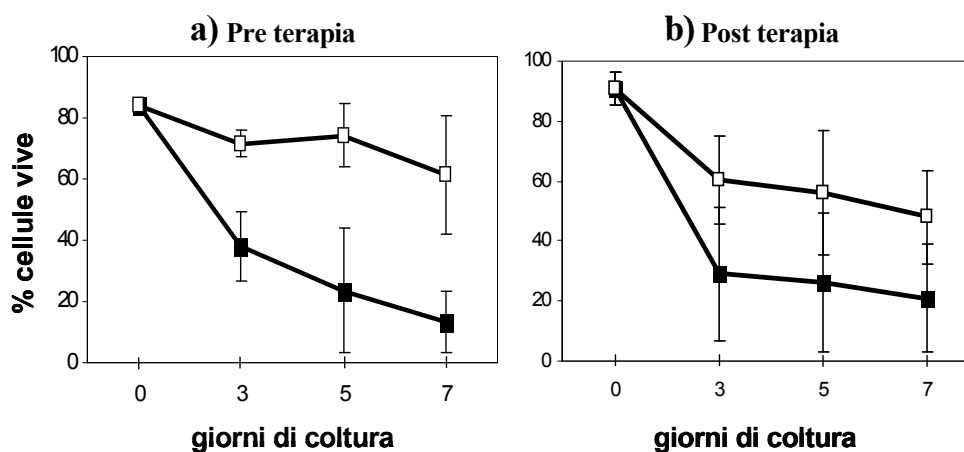
La presenza in coltura di una linea stabilizzata di cellule stromali midollari determina una riduzione del processo apoptotico sia nei linfociti B normali che nei linfociti neoplastici. Il rescue dell'apoptosi risulta essere però solo parziale in entrambi i casi, data la presenza della banda relativa sia alla forma intera che clivata della Parp (Figura 17)



**Figura 17. Clivaggio della proteina PARP nelle cellule B normali e di LLC in presenza di una linea stabilizzata di cellule stromali.** a) Cellule B normali e b) cellule B di LLC poste in coltura con cellule stromali midollari dopo 7 giorni. Si osserva la presenza sia della banda relativa alla Parp clivata, sia relativa alla forma intera.

#### 4.4.3 Analisi dell'effetto anti-apoptotico delle MSC di LLC dopo trattamento chemioterapico *in vivo*

Nel trattamento della LLC-B vengono impiegati farmaci citotossici, con lo scopo di rendere il clone maligno più suscettibile all'apoptosi. Abbiamo quindi analizzato l'apoptosi dei linfociti B isolati da 3 pazienti, dopo essere stati sottoposti a terapia con Fludarabina associata a Ciclofosfamide *in vivo*. La presenza in coltura di MSC di LLC determina ancora una volta un aumento della sopravvivenza delle cellule patologiche chemio trattate dopo 5 e 7 giorni di coltura rispetto alle cellule in presenza di solo terreno (il 26,0%  $\pm$  23,0 contro il 56,0%  $\pm$  20,0 in presenza di MSC dopo 5 giorni; il 20,8%  $\pm$  18,0 contro il 48%  $\pm$  15 dopo 7 giorni, con  $p < 0,05$ ). Tuttavia l'effetto anti-apoptotico esercitato dalle MSC risulta più spiccato prima della terapia e ridotto, ma ancora efficace, nei linfociti dei pazienti dopo la terapia farmacologica (Figura 22).



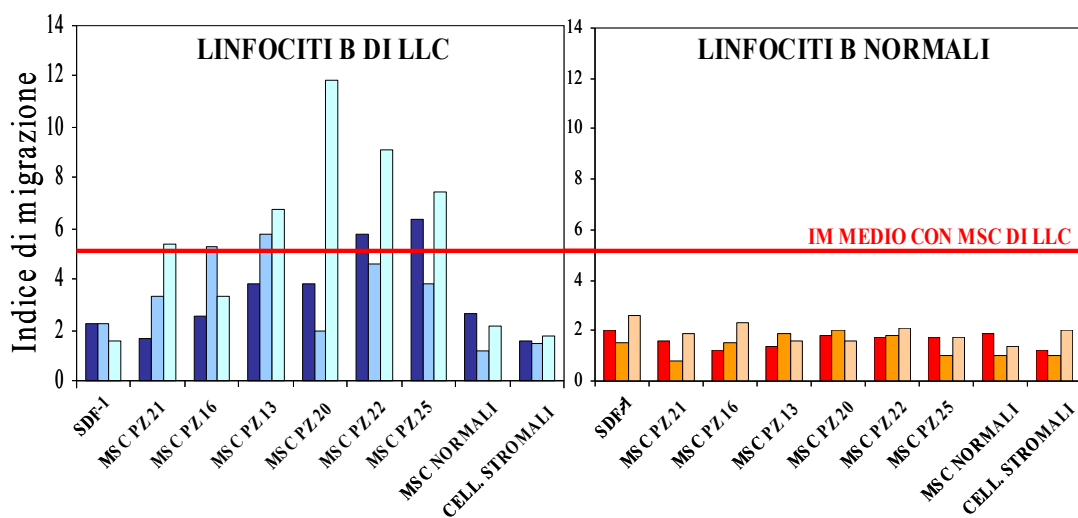
**Figura 22. Valutazione della sopravvivenza dei linfociti B leucemici prima e dopo terapia.** Sopravvivenza dei linfociti B di LLC prima del trattamento farmacologico (a) e dopo il trattamento farmacologico (b) in presenza di solo terreno (■) o in presenza di MSC di LLC (□). I valori si riferiscono alle cellule Annessina negative.

## 4.5 Effetto chemiotattico esercitato dalle MSC sui linfociti B

### patologici

Dopo aver osservato l'effettivo ruolo delle MSC di LLC sulla sopravvivenza dei linfociti B patologici, abbiamo indagato se le stesse MSC fossero in grado di richiamare i linfociti circolanti ai siti di accumulo.

A tale scopo è stata analizzata la capacità migratoria delle cellule patologiche utilizzando come stimolo il terreno derivante dalle colture primarie di MSC di LLC, di donatori sani e da colture stabilizzate di cellule stromali midollari. Come controllo interno è stato utilizzato terreno a cui è stata aggiunta la chemiochina CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , in grado di stimolare la migrazione dei linfociti B. Abbiamo pertanto analizzato i linfociti B di 3 pazienti con LLC e di 3 soggetti sani ed è stato preso in esame l'indice di migrazione (IM) nelle diverse condizioni (Figura 23).



**Figura 23. Indice di migrazione di linfociti B neoplastici e di linfociti B normali in presenza di terreno di coltura derivante da MSC di LLC, MSC normali e cellule stromali midollari.** Sia i linfociti B normali (arancio) sia i linfociti patologici (blu) migrano in risposta al CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , utilizzato alla concentrazione di 100 ng/mL. L'indice di migrazione aumenta nelle cellule neoplastiche in presenza del mezzo di coltura derivante dalle colture primarie di MSC di LLC, mentre rimane invariato nei B normali. IM: indice di migrazione.

Sia le cellule normali sia quelle patologiche migrano in risposta alla chemiochina CXCL12/SDF-1 $\alpha$ . L'IM dei linfociti neoplastici in presenza del mezzo di coltura derivante da colture primarie di MSC isolate da pazienti con LLC risulta significativamente più alto rispetto a quello osservato: nel controllo con terreno addizionato con SDF ( $p < 0.05$ ), in presenza di terreno derivante da colture di cellule stromali midollari ( $p < 0,01$ ), in presenza di terreno di MSC normali ( $p < 0,05$ ) e alla risposta chemiotattica dei linfociti B normali ( $p < 0,01$ ). Per quanto riguarda i linfociti B non patologici, l'IM medio è significativamente inferiore all'IM medio dei linfociti B di LLC e la differenza fra l'IM in presenza di MSC di paziente ed in presenza di MSC normali non risulta invece statisticamente significativa. Dai dati ottenuti inoltre si evidenzia una variabilità di IM dipendente prevalentemente dal clone di linfociti B patologici e solo in minima parte dipendente dalle diverse colture di MSC di LLC. Al contrario i linfociti B normali mostrano una sostanziale omogeneità di risposta chemiotattica.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La leucemia linfatica cronica di tipo B è un disordine linfoproliferativo caratterizzato dall'accumulo nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfoidei di piccoli linfociti B maturi, dovuto ad un difetto nei meccanismi di morte cellulare programmata [116, 117]. Tale difetto è imputabile a fattori intrinseci nel linfocita stesso, quali un'alterata trasduzione del segnale mediata dal recettore per l'antigene (BCR) ed un'alterata risposta apoptotica, dovuta all'aumentata espressione di fattori anti-apoptotici (Bcl-2 e Mcl-1)[95, 118], ma anche a fattori esterni legati all'ambiente in cui il linfocita risiede. Diversi studi hanno evidenziato che l'adesione delle cellule B neoplastiche alle cellule stromali midollari di donatori sani [102] e alle cellule *nurse-like*, isolate dal sangue periferico di soggetti affetti da LLC-B [103], è in grado di prevenirne l'apoptosi e prolungarne la sopravvivenza *in vitro*.

In questo lavoro abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule mesenchimali staminali (MSC), elementi cruciali del sistema stromale midollare e funzionalmente alterate in alcuni disordini oncoematologici, suggerendone un possibile coinvolgimento nella patogenesi di tali patologie [119, 120]. In particolare, abbiamo voluto valutare il ruolo peculiare delle MSC di pazienti affetti da LLC nel creare un microambiente favorevole al clone B leucemico, mantenendo come confronto MSC di donatori sani e cellule stromali.

L'età determina sia una riduzione progressiva del numero di MSC nel midollo osseo, che una perdita in termini di capacità proliferativa e differenziativa delle MSC: risultati ottenuti tramite *microarray* evidenziano infatti numerose differenze nei profili di espressione genica tra MSC adulte e fetali [121].

Per quanto riguarda l'isolamento delle MSC da pazienti chemioterattati, studi recenti hanno dimostrato la possibilità di isolare cellule, in numero

sufficiente per allestire delle colture primarie, da soggetti sottoposti a terapia standard o ad alte dosi [122]. Alla luce di queste osservazioni, abbiamo suddiviso i nostri pazienti in due gruppi, sulla base dell'esito positivo o negativo nell'ottenimento di MSC dal sangue midollare. Lo studio delle principali caratteristiche cliniche dei pazienti non ha permesso di identificare alcun parametro clinico quale diretto responsabile del fallimento nell'allestimento di colture primarie di MSC: infatti in entrambi i gruppi l'età media è di circa 60 anni, la percentuale di pazienti già sottoposti a trattamento farmacologico al momento del prelievo è pari all'11%-12% in entrambi i gruppi e il 62%-73% presenta ipermutazioni somatiche della catena pesante delle Ig  $\geq 2\%$ , fattore prognostico importante in questa patologia.

L'analisi delle caratteristiche immunofenotipiche delle MSC da noi ottenute, ha dimostrato la positività per i marcatori che tipicamente caratterizzano le MSC isolate da soggetti sani, quali CD73, CD90 e CD105 e la negatività per marcatori della linea emopoietica, CD34, CD14 e CD45 e della linea endoteliale, CD31. Tali cellule inoltre hanno mostrato una normale capacità differenziativa in senso osteogenico ed adipogenico, a conferma della loro multipotenzialità.

Allo scopo di analizzare un possibile ruolo delle MSC nella patogenesi della LLC, sono state indagate le interazioni tra le MSC ed i linfociti B di LLC dimostrando che le MSC sia di pazienti con LLC che, in maniera analoga, di donatori sani esercitano un significativo effetto anti-apoptotico nei confronti del clone neoplastico, superiore a quanto riportato per le cellule stromali midollari. Infatti, mentre la presenza di MSC di LLC ha determinato un *rescue* dall'apoptosi quasi completo dopo 7 giorni di coltura, la presenza di cellule stromali ha portato ad un recupero solo parziale di tale processo. Le MSC di donatori sani e le cellule stromali hanno mostrato una sostanziale omogeneità di comportamento con i

linfociti B normali e patologici. Al contrario le MSC da LLC hanno mostrato un'attività anti-apoptotica decisamente più marcata coi i linfociti B patologici, suggerendo quindi l'innescò di meccanismi di sopravvivenza e di interazione specifici tra i due compartimenti e la creazione di un *milieu* caratteristico della patologia stessa. Tale interazione risulta peculiare della patologia ma non del singolo paziente, non essendoci differenze di comportamento tra MSC di LLC allogeniche ed autologhe.

L'effetto anti-apoptotico esercitato dalle cellule stromali è imputabile prevalentemente ad interazioni dirette cellula-cellula, mediate dalle integrine di superficie  $\beta 1$  (CD29) e  $\beta 2$  (CD18), legami che da un lato prolungano la sopravvivenza delle cellule B di LLC, ma che potrebbero anche essere coinvolti nell'anomalo riarrangiamento citoscheletrico riscontrato nelle cellule neoplastiche [107]. La natura delle interazioni tra il clone linfocitario maligno e MSC ad oggi non è ancora stata chiarita, tuttavia i nostri dati derivanti dal confronto tra le co-culture in presenza o meno di un sistema *Transwell*, ci permettono di attribuire un ruolo importante per la sopravvivenza del clone leucemico soprattutto al contatto cellulare diretto.

L'effetto anti-apoptotico esercitato dalle MSC di LLC rivolto selettivamente alle cellule neoplastiche, non ai linfociti B normali, indicherebbe la presenza di un assetto recettoriale sul clone linfocitario maligno in grado di rispondere agli stimoli anti-apoptotici derivanti dalle MSC. È noto infatti che le cellule di LLC esprimono specifici recettori chemiochinici e rispondono selettivamente alle chemiochine prodotte dagli elementi del microambiente in cui esse si localizzano [123]. In particolar modo sembra che il recettore CXCR4, overespresso nelle cellule di LLC, interagendo con il suo ligando CXCL12/SDF-

1 $\alpha$ , prodotto dalle cellule stromali, sia in grado di prolungare la sopravvivenza delle cellule neoplastiche e di favorirne l'infiltrazione midollare [124].

Le MSC possiedono quindi un ruolo attivo diretto nel favorire la sopravvivenza della cellula neoplastica, ma è possibile avanzare l'ipotesi che le MSC rivestano anche un ruolo indiretto, mediato dall'interazione con altre cellule accessorie presenti nel midollo osseo. In particolar modo, considerando che i linfociti T nella LLC-B giocano un ruolo importante nel creare un microambiente in grado di supportare la proliferazione delle cellule patologiche [125], potrebbe essere interessante analizzare il tipo di interazione che intercorre tra le MSC e i linfociti T in tale sede.

Se da un lato il microambiente midollare favorisce la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione dei normali precursori emopoietici, esso costituisce un luogo ideale anche per le cellule maligne, le quali trovano qui protezione dagli agenti chemioterapici. I fattori solubili prodotti dalle cellule stromali, CXCL12/SDF-1 $\alpha$  e IL-6, mediano la migrazione e la proliferazione delle cellule tumorali, mentre l'adesione mediata da integrine di superficie sequestra queste cellule a livello midollare [126, 127]. Questi meccanismi favoriscono l'insorgenza della farmacoresistenza *de novo*, forma in cui le cellule tumorali sono transitoriamente e reversibilmente protette dall'azione citotossica dei farmaci chemioterapici, consentendo la persistenza di malattia minima residua e aumentando la probabilità che il clone maligno sviluppi una forma acquisita di farmacoresistenza.

Al fine di chiarire se le MSC siano coinvolte anche nella regolazione dell'apoptosi indotta da farmaci, abbiamo analizzato l'apoptosi dei linfociti B di LLC isolati da pazienti sottoposti a trattamento farmacologico con Fludarabina e Ciclofosfamide. I nostri esperimenti hanno dimostrato che la presenza delle MSC



in coltura determina un aumento della sopravvivenza dei linfociti patologici anche dopo il trattamento farmacologico, suggerendo un possibile coinvolgimento delle MSC nei meccanismi responsabili della chemio-resistenza.

Uno studio recente riguardante la leucemia linfoblastica acuta supporta la nostra ipotesi, dimostrando la capacità delle MSC di ridurre la risposta all'asparaginasi nelle cellule leucemiche. Le cellule di LLA possiedono infatti una bassa attività dell'enzima asparagina sintetasi e la loro sintesi proteica dipende dalla presenza di asparagina esogena. Le MSC, disponendo di livelli dell'enzima asparagina sintetasi molto maggiori rispetto a quelli delle cellule leucemiche, contrastano l'azione del farmaco [128].

Nei pazienti affetti da LLC il clone maligno mostra una naturale propensione ad infiltrare il midollo osseo ed entità e tipo di infiltrato correlano con lo stadio clinico e la prognosi della leucemia. Allo scopo di studiare il possibile ruolo delle MSC nella compartimentalizzazione del clone neoplastico, è stata analizzata l'attività chemiotattica verso le cellule neoplastiche di terreno condizionato derivante da colture di MSC. Gli esperimenti di migrazione cellulare indicano che le MSC rilasciano fattori solubili capaci di attrarre selettivamente i linfociti B neoplastici e non i linfociti B normali. Tali dati risultano innovativi in quanto a tutt'oggi le proprietà chemiotattiche delle MSC sono state indagate solo nei linfociti B normali, dove il recettore CXCR4 riveste un ruolo chiave nel richiamo e nell'accumulo di tali cellule a livello midollare [47]. I nostri dati dimostrano una capacità chemiotattica delle MSC da LLC selettiva per il clone neoplastico, tale attività è significativamente superiore per le MSC da pazienti di LLC rispetto a MSC di donatori sani e cellule stromali ed inoltre non sembra essere condizionata dalla derivazione autologa o allogenica di tali cellule. Tali dati suggeriscono un interazione *in vivo* tra MSC e clone neoplastico in grado di creare

un microambiente adatto alla sopravvivenza, alla proliferazione e alle chemioresistenza dei linfociti B patologici. La chemochina SDF è considerata a tutt'oggi il principale mediatore della chemiotassi dei linfociti B. Tuttavia, la capacità chemiotattica delle MSC di LLC è risultata superiore a quella esercitata del terreno supplementato con SDF, indicando l'azione di altri mediatori di chemiotassi. Ulteriori studi sono necessari per comprendere tutti i fattori implicati in tale processo.

Chiarire le relazioni che intercorrono tra la cellula neoplastica e le cellule del microambiente in cui essa si localizza può portare all'individuazione di nuove strategie terapeutiche in grado di rendere le cellule maligne maggiormente sensibili all'apoptosi e migliorare così la risposta alla terapia da parte dei pazienti. Approcci terapeutici basati sull'utilizzo di composti analoghi delle purine [86] o anticorpi monoclonali, come il Camapth 1H, che colpiscono sia le cellule B che le cellule T, interrompendo l'interazione tra il clone maligno e le cellule accessorie non tumorali, hanno portato a risultati incoraggianti.

Concludendo, possiamo affermare che le MSC nei pazienti affetti da LLC-B, anche se apparentemente normali dal punto di vista fenotipico e funzionale, svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi di questa malattia. Le MSC presentano infatti un ruolo attivo, a livello midollare, nel favorire la sopravvivenza e la compartimentalizzazione delle cellule B neoplastiche e sembrano coinvolte anche nei meccanismi di resistenza ad alcuni dei principali chemioterapici utilizzati nel trattamento della LLC-B.

## BIBLIOGRAFIA

1. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976. 4(5): p. 267-74.
2. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. 16(3): p. 381-90.
3. Pittenger MF, M.A., Beck SC, Human mesenchymal stem cells can be directed into chondrocytes, adypocytes and osteocytes. *Mol Biol Cell*, 1996. 7: p. 1772.
4. Wakitani, S., T. Saito, and A.I. Caplan, Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995. 18(12): p. 1417-26.
5. Haynesworth, S.E., et al., Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 1992. 13(1): p. 81-8.
6. Horwitz, E.M., et al., Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005. 7(5): p. 393-5.
7. Katz, A.J., et al., Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*, 2005. 23(3): p. 412-23.
8. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000. 109(1): p. 235-42.
9. In 't Anker, P.S., et al., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 2004. 22(7): p. 1338-45.
10. Trubiani, O., et al., Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2005. 18(2): p. 213-21.
11. Lazarus, H.M., et al., Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother*, 1997. 6(5): p. 447-55.
12. Wexler, S.A., et al., Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003. 121(2): p. 368-74.

13. Zvaifler, N.J., et al., Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000. 2(6): p. 477-88.
14. Kassis, I., et al., Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*, 2006. 37(10): p. 967-76.
15. Reyes, M., et al., Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001. 98(9): p. 2615-25.
16. Dennis, J.E. and P. Charbord, Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 2002. 20(3): p. 205-14.
17. Majumdar, M.K., et al., Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 1998. 176(1): p. 57-66.
18. Smith, J.R., et al., Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*, 2004. 22(5): p. 823-31.
19. Barry, F.P., et al., The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 265(1): p. 134-9.
20. Barry, F., et al., The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 289(2): p. 519-24.
21. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 1991. 78(1): p. 55-62.
22. Jiang, Y., et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002. 418(6893): p. 41-9.
23. Woodbury, D., et al., Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000. 61(4): p. 364-70.
24. Kotton, D.N., et al., Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, 2001. 128(24): p. 5181-8.
25. Sato, Y., et al., Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 2005. 106(2): p. 756-63.

26. Morigi, M., et al., Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(7): p. 1794-804.
27. Zhao, L.R., et al., Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 2002. 174(1): p. 11-20.
28. Dexter, T.M., T.D. Allen, and L.G. Lajtha, Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*, 1977. 91(3): p. 335-44.
29. Noort, W.A., et al., Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 2002. 30(8): p. 870-8.
30. Campagnoli, C., et al., Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 2001. 98(8): p. 2396-402.
31. Mendes, S.C., C. Robin, and E. Dzierzak, Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, 2005. 132(5): p. 1127-36.
32. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*, 1996. 166(3): p. 585-92.
33. Ruster, B., et al., Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 2006. 108(12): p. 3938-44.
34. Le Blanc, K. and O. Ringden, Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*, 2007. 262(5): p. 509-25.
35. Rasmusson, I., et al., Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*, 2005. 305(1): p. 33-41.
36. Devine, S.M., et al., Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 2003. 101(8): p. 2999-3001.
37. Nauta, A.J., et al., Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2006. 177(4): p. 2080-7.

38. Di Nicola, M., et al., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3838-43.
39. Krampera, M., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003. 101(9): p. 3722-9.
40. Glennie, S., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 2005. 105(7): p. 2821-7.
41. Meisel, R., et al., Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 2004. 103(12): p. 4619-21.
42. Di Ianni, M., et al., Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*, 2008. 36(3): p. 309-18.
43. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1815-22.
44. Maccario, R., et al., Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 2005. 90(4): p. 516-25.
45. Potian, J.A., et al., Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*, 2003. 171(7): p. 3426-34.
46. Corcione, A., et al., Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006. 107(1): p. 367-72.
47. Palmesino, E., et al., Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells. *Immunobiology*, 2006. 211(5): p. 377-89.
48. Sotiropoulou, P.A., et al., Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 2006. 24(1): p. 74-85.
49. Spaggiari, G.M., et al., Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 2006. 107(4): p. 1484-90.

50. Jiang, X.X., et al., Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2005. 105(10): p. 4120-6.
51. Zhang, W., et al., Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, 2004. 13(3): p. 263-71.
52. Beyth, S., et al., Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 2005. 105(5): p. 2214-9.
53. Ramasamy, R., et al., Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 2007. 83(1): p. 71-6.
54. Raffaghello, L., et al., Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 2008. 26(1): p. 151-62.
55. Lama, V.N., et al., Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest*, 2007. 117(4): p. 989-96.
56. Boggs, D.R., et al., Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol*, 1987. 25(3): p. 349-54.
57. Weiss, N.S., Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1979(53): p. 139-42.
58. Yuille, M.R., et al., Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol*, 2000. 109(4): p. 794-9.
59. Capalbo, S., et al., Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol*, 2000. 65(2): p. 114-7.
60. Wiernik, P.H., et al., Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2001. 113(2): p. 407-14.
61. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*, 1999. 17(1): p. 399-408.
62. Ward, J.H., Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*, 2001. 2(3): p. 253-7.

63. Hallek, M., et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5446-56.
64. Rai, K.R., et al., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975. 46(2): p. 219-34.
65. Binet, J.L., et al., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981. 48(1): p. 198-206.
66. Molica, S., et al., Prognostic features and therapeutical approaches in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Haematologica*, 1995. 80(2): p. 176-93.
67. Rigolin, G.M., et al., Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. *Blood*, 2006. 107(6): p. 2531-5.
68. Montserrat, E., Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J*, 2002. 3(1): p. 7-9.
69. Melo, J.V., et al., The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br J Haematol*, 1987. 65(1): p. 23-9.
70. Keating, M.J., Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 1999. 26(5 Suppl 14): p. 107-14.
71. Hallek, M., et al., Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999. 93(5): p. 1732-7.
72. Sarfati, M., et al., Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1996. 88(11): p. 4259-64.
73. Vinante, F., et al., Circulating levels of soluble CD23 reflect clinical and biological features of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Int J Clin Lab Res*, 1995. 25(4): p. 189-94.
74. Damle, R.N., et al., CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, 2007. 110(9): p. 3352-9.



75. Tobin, G., et al., Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002. 99(6): p. 2262-4.
76. Dohner, H., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2000. 343(26): p. 1910-6.
77. Ibrahim, S., et al., CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2001. 98(1): p. 181-6.
78. Ghia, P., et al., The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1262-9.
79. Ghia, P., et al., CD38 modifications in chronic lymphocytic leukemia: are they relevant? *Leukemia*, 2004. 18(10): p. 1733-5.
80. Poulain, S., et al., Is ZAP-70 expression stable over time in B chronic lymphocytic leukaemia? *Leuk Lymphoma*, 2007. 48(6): p. 1219-21.
81. Del Giudice, I., et al., Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2005. 104(10): p. 2124-32.
82. Terrin, L., et al., 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*, 2007. 21(5): p. 965-72.
83. Ricca, I., et al., Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*, 2007. 21(4): p. 697-705.
84. Cheson, B.D., et al., National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 1996. 87(12): p. 4990-7.
85. Keating, M.J., et al., Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*, 1998. 92(4): p. 1165-71.
86. Yamauchi, T., et al., DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(11): p. 3580-9.

87. Flinn, I.W., et al., 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*, 2007. 25(7): p. 793-8.
88. Demidem, A., et al., Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm*, 1997. 12(3): p. 177-86.
89. Alas, S., C. Emmanouilides, and B. Bonavida, 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*, 2001. 7(3): p. 709-23.
90. Montillo, M., et al., Safety and efficacy of subcutaneous Campath-1H for treating residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia responding to fludarabine. *Haematologica*, 2002. 87(7): p. 695-700; discussion 700.
91. Pathan, N.I., et al., Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines. *Blood*, 2008. 111(3): p. 1594-602.
92. O'Brien, S., et al., 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*, 2007. 25(9): p. 1114-20.
93. Ghia, P. and F. Caligaris-Cappio, The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*, 2000. 79: p. 157-73.
94. Sanz, L., et al., Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(3): p. 562-7.
95. Saxena, A., et al., 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*, 2004. 75(1): p. 22-33.
96. Panayiotidis, P., et al., Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia*, 1995. 9(7): p. 1227-32.

97. Reth, M. and J. Wienands, Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 453-79.
98. Alfarano, A., et al., An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999. 93(7): p. 2327-35.
99. Cragg, M.S., et al., The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood*, 2002. 100(9): p. 3068-76.
100. DeFranco, A.L., V.W. Chan, and C.A. Lowell, Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Semin Immunol*, 1998. 10(4): p. 299-307.
101. Contri, A., et al., Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*, 2005. 115(2): p. 369-78.
102. Lagneaux, L., et al., Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, 1998. 91(7): p. 2387-96.
103. Burger, J.A., et al., Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 2000. 96(8): p. 2655-63.
104. Fluckiger, A.C., et al., Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood*, 1992. 80(12): p. 3173-81.
105. Ghia, P., et al., Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*, 2002. 32(5): p. 1403-13.
106. Trentin, L., et al., B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res*, 1997. 57(21): p. 4940-7.
107. Caligaris-Cappio, F., et al., Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood*, 1986. 67(1): p. 233-9.

108. Granziero, L., et al., CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood*, 2003. 101(5): p. 1962-9.
109. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(6): p. 2305-9.
110. Bleul, C.C., et al., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996. 184(3): p. 1101-9.
111. Pedersen, I.M., et al., Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*, 2002. 100(5): p. 1795-801.
112. Trentin, L., et al., Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 2004. 104(2): p. 502-8.
113. Trentin, L., et al., Expression and functional role of tumor necrosis factor receptors on leukemic cells from patients with type B chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 1993. 81(3): p. 752-8.
114. Trentin, L., et al., The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest*, 1999. 104(1): p. 115-21.
115. Richardson, S.J., et al., ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 2006. 107(9): p. 3584-92.
116. Kay, N.E., et al., Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002: p. 193-213.
117. Hamblin, T.J. and D.G. Oscier, Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev*, 1997. 11(3): p. 119-28.
118. Packham, G. and F.K. Stevenson, Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 2005. 114(4): p. 441-9.
119. Flores-Figueroa, E., et al., Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*, 2005. 29(2): p. 215-24.

120. Corre, J., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*, 2007. 21(5): p. 1079-88.
121. Gotherstrom, C., et al., Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*, 2005. 90(8): p. 1017-26.
122. Mueller, L.P., et al., Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells*, 2006. 24(12): p. 2753-65.
123. Dazzi, F., et al., The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*, 2006. 20(3): p. 161-71.
124. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 1999. 94(11): p. 3658-67.
125. Mellstedt, H. and A. Choudhury, T and B cells in B-chronic lymphocytic leukaemia: Faust, Mephistopheles and the pact with the Devil. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. 55(2): p. 210-20.
126. Burger, J.A. and T.J. Kipps, CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 2006. 107(5): p. 1761-7.
127. Frassanito, M.A., et al., Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*, 2001. 97(2): p. 483-9.
128. Iwamoto, S., et al., Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*, 2007. 117(4): p. 1049-57.