



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

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

**FATTORI PROGNOSTICI
NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DI TIPO B**

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa PAOLA ZANOVELLO

Supervisore: Dott.ssa MONICA FACCO

Correlatore: Dott. LIVIO TRENTIN

Dottoranda: Dott.ssa ELISA BOSCARO

31 gennaio 2010

INDICE

ABBREVIAZIONI	Pag. 5
RIASSUNTO	Pag. 7
ABSTRACT	Pag. 11
1. INTRODUZIONE	Pag. 13
1.1 La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B).....	Pag. 13
<i>1.1.1 Epidemiologia ed eziologia</i>	Pag. 13
<i>1.1.2 Presentazione clinica</i>	Pag. 15
<i>1.1.3 Diagnosi</i>	Pag. 17
1.2 Patogenesi.....	Pag. 20
<i>1.2.1 Controllo dell'apoptosi</i>	Pag. 23
<i>1.2.2 Trasduzione del segnale mediata dal BCR</i>	Pag. 25
<i>1.2.3 Espressione della telomerasi</i>	Pag. 28
1.3 Prognosi.....	Pag. 29
<i>1.3.1 Fattori prognostici clinici</i>	Pag. 29
<i>1.3.2 Fattori prognostici biologici</i>	Pag. 30
1.4 Trattamento.....	Pag. 37
2. SCOPO DELLA TESI	Pag. 43
3. MATERIALI E METODI	Pag. 45
3.1 Popolazione studiata.....	Pag. 45
3.2 Analisi citofluorimetrica.....	Pag. 45
<i>3.2.1 Preparazione dei campioni di sangue periferico per la</i> <i>determinazione citofluorimetrica della tirosin chinasi ZAP-70</i>	Pag. 48
<i>3.2.2 Analisi citofluorimetrica di ZAP-70</i>	Pag. 51
<i>3.2.3 Analisi citofluorimetrica di CD38 e CD305</i>	Pag. 55
3.3 Separazione delle cellule mononucleate dal sangue periferico.....	Pag. 56
<i>3.3.1 Isolamento di linfociti B da sangue periferico</i>	Pag. 57
3.4 Analisi dell'espressione proteica.....	Pag. 59
<i>3.4.1 Preparazione dei lisati cellulari</i>	Pag. 59
<i>3.4.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS</i>	Pag. 59
<i>3.4.3 Western Blotting</i>	Pag. 60
3.5 Analisi dell'espressione delle regioni VH e determinazione delle SHM... ..	Pag. 62
<i>3.5.1 Estrazione dell'RNA messaggero</i>	Pag. 62
<i>3.5.2 Retrotrascrizione dell'RNA messaggero in cDNA e PCR</i>	Pag. 63
<i>3.5.3 Sequenziamento della regione variabile della catena pesante ...</i> <i>delle immunoglobuline</i>	Pag. 65
3.6 Analisi statistica.....	Pag. 66
4. RISULTATI	Pag. 69
4.1 Espressione della proteina ZAP-70.....	Pag. 69
4.2 Determinazione degli altri fattori prognostici.....	Pag. 75
4.3 Correlazione tra i fattori studiati.....	Pag. 79
4.4 Fattori Prognostici e sopravvivenza.....	Pag. 82
5. DISCUSSIONE	Pag. 85
6. BIBLIOGRAFIA	Pag. 89

ABBREVIAZIONI

AcMo	Anticorpo monoclonale
APC	Alloficocianina
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	Recettore per l'antigene delle cellule B
LLC-B	Leucemia linfatica cronica a cellule B
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementare
CDR	Regione determinante la complementarità
CG	Centro germinativo
CMV	Citomegalovirus
del	Delezione
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAB	French – American – British
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Isotiocianato di fluorescina
F/H	Ficoll – Hypaque
Hb	Emoglobina
HBV	Virus dell'epatite B
HCV	Virus dell'epatite C
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleuchina
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based activation motifs
LAIR-1	Leucocyte-associated Ig-like receptor-1
LPL	Linfoma a piccoli linfociti
MAP	Mitogen activated protein
MFI	Intensità media di fluorescenza
NFAT	Nuclear factor of activated T cell
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina cianina 5
PL	Prolinfocita
PLL	Leucemia prolinfocitica
PI3K	Fosfatidilinositolo-3-chinasi
PLC	Fosfolipasi C
PLTs	Piastrine
Rpm	Rivoluzioni per minuto
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SHM	Ipermutazioni somatiche
sIg	Immunoglobuline di superficie
Syk	Spleen tyrosine kinase
TFI	Intervallo libero da terapia
TK	Timidina chinasi
VH	Regione variabile della catena pesante delle Ig
VL	Regione variabile della catena leggera delle Ig
VZV	Virus varicella-zoster
WBC	Globuli bianchi
ZAP-70	Proteina associata alla catena ζ di 70 kDa

RIASSUNTO

La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B) è la forma più comune di leucemia dell'adulto ed è caratterizzata dall'accumulo nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici di piccoli linfociti B monoclonali esprimenti il marcatore CD5. È una patologia eterogenea, la cui evoluzione varia da un decorso clinico indolente, che non necessita di alcuna terapia, ad una rapida progressione che richiede un trattamento.

L'identificazione di fattori che permettano di stratificare pazienti a prognosi differente fin dalle fasi iniziali della malattia è uno dei principali obiettivi degli studi riguardanti la LLC-B. Negli anni sono stati definiti fattori di prognosi classici (il tempo di raddoppiamento linfocitario, l'infiltrazione del midollo osseo, la percentuale di prolinfociti, i livelli di $\beta 2$ microglobulina, di timidina chinasi e di CD23 solubile), e, più recentemente, fattori prognostici correlati a caratteristiche molecolari del clone leucemico, tra i quali la presenza di alterazioni citogenetiche, lo stato mutazionale dei geni della catena pesante delle immunoglobuline (SHM), l'espressione dell'enzima telomerasi e di molecole quali CD38 e ZAP-70. Un possibile fattore prognostico, ancora in fase di valutazione, è infine il *leucocyte-associated Ig-like receptor-1* (LAIR-1 o CD305), un recettore inibitorio, espresso sulla superficie delle cellule B, che può indurre la defosforilazione di diverse chinasi.

Il progetto di ricerca sviluppato nei tre anni di dottorato mirava a definire il valore di alcuni fattori prognostici di recente definizione (CD38, CD305, ZAP-70 e SHM) e le possibili correlazioni esistenti tra essi. In particolare, poiché le modalità di determinazione dell'espressione della chinasi ZAP-70 sono oggetto di discussione a livello internazionale, una parte rilevante del triennio di questo dottorato di ricerca è stata dedicata alla valutazione ed alla comparazione di diversi metodi sperimentali, al fine di identificare un procedimento affidabile e ripetibile per la quantificazione di questa proteina.

L'individuazione di un metodo affidabile e riproducibile per l'analisi di ZAP-70 mediante analisi citofluorimetrica ha portato alla scelta del metodo raziometrico, che valuta l'intensità media di fluorescenza di ZAP-70 nei linfociti B patologici in rapporto all'intensità media di fluorescenza della proteina nei linfociti T. Il metodo si è rivelato infatti più indipendente dall'operatore rispetto alle altre metodiche analizzate. Una volta stabilito il metodo più appropriato, abbiamo adeguato la metodica alla strumentazione del nostro laboratorio di Ematologia e Immunologia Clinica. Abbiamo quindi stabilito il valore soglia che meglio distingueva tra pazienti positivi e negativi e che ci permetteva di ottenere le maggiori specificità e sensibilità e abbiamo infine confrontato i dati ottenuti dall'utilizzo di diversi anticorpi monoclonali in grado di riconoscere la proteina ZAP-70 dimostrando che i due anticorpi che davano risultati maggiormente riproducibili e più simili tra loro erano l'anticorpo anti-ZAP70 Alexa Fluor 488, Caltag Laboratories e l'anticorpo anti-ZAP70 FITC, Upstate cell signaling solution.

Per quanto riguarda gli altri fattori prognostici esaminati, abbiamo innanzitutto confermato il ruolo prognostico delle SHM nei 247 pazienti da noi analizzati e afferenti all'Unità operativa di Ematologia e Immunologia Clinica. Infatti il valore medio di sopravvivenza globale per i pazienti con SHM \geq 2% rispetto alle sequenze *germline* è risultato pari a 260 mesi e 99 mesi rispettivamente ($p < 0,001$). La valutazione del repertorio VH ha evidenziato una prevalente espressione della famiglia VH3 (58% del campione). Le altre famiglie VH più rappresentate erano la famiglia VH1 (18% del campione) e VH4 (18%). L'espressione della famiglia VH1, era associata ad un'elevata probabilità di avere uno stato mutazionale $< 2\%$ delle IgVH (58%). L'espressione della famiglia VH4, invece, si associa ad uno stato mutato ($\geq 2\%$) delle IgVH (67%) e ad una sopravvivenza globale media di 220 mesi, significativamente superiore rispetto alla media dell'intero campione ($p < 0,001$). Anche CD38 e ZAP-70 hanno dimostrato un ruolo prognostico importante: la sopravvivenza globale media per i pazienti CD38 positivi e negativi era pari rispettivamente a 123 mesi e

250 mesi ($p=0,002$); la sopravvivenza globale media per i pazienti ZAP-70 positivi e negativi era pari a 135 e 220 mesi ($p=0,009$).

Lo studio dell'espressione di LAIR-1 ha dimostrato che questo recettore è espresso mediamente in quantità minore ($41\% \pm 32$) rispetto ai soggetti sani ($84\% \pm 1$), ed in particolare i pazienti ad alto rischio (stadio 3 e 4) avevano un'espressione minore della proteina rispetto al gruppo a minor rischio (stadio 0-2).

Abbiamo valutato l'esistenza di correlazioni tra i diversi fattori prognostici. Abbiamo così rilevato una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD38 e l'assenza di ipermutazioni somatiche ($p < 0,01$). Analogamente, abbiamo osservato una correlazione tra la positività di espressione di ZAP-70 e la mancanza di SHM ($p < 0,05$). Per quanto riguarda LAIR-1, il recettore risulta espresso in quantità minore sia nei pazienti con $SHM < 2\%$ sia in quelli CD38 positivi, mentre non è emersa alcuna differenza quando si sono considerati i pazienti per l'espressione di ZAP-70.

I risultati ottenuti confermano l'efficacia dei fattori prognostici innovativi nel predire fin dal momento della diagnosi il possibile decorso clinico della malattia. Lo stato mutazionale rimane il fattore prognostico di riferimento e attualmente non sostituibile. Per quanto riguarda la proteina ZAP-70, promettente per la praticità e la rapidità della metodica impiegata per la sua valutazione, va sottolineato che ogni laboratorio deve standardizzare la metodica adeguandola agli strumenti ed ai reagenti in dotazione.

ABSTRACT

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common leukemia in adults and it is characterized by the accumulation of monoclonal small CD5+ B lymphocytes, in peripheral blood, bone marrow and lymphoid organs. The clinical course encompasses indolent to aggressive disorders, the latter requiring intensive therapeutic intervention.

In the past, several clinical and biological prognostic factors have been proposed, including clinical stage, lymphocyte doubling time, bone marrow infiltration, percentage of prolymphocytes, serum $\beta 2$ microglobulin, thymidine kinase and soluble CD23 levels. Even if these factors correlate with the clinical outcome of the CLL, they were not able to predict the evolution of the disease in patients at the earliest stages of disease. For this reason novel prognostic factors able to predict at diagnosis the clinical evolution of the disease and stratifying patients into groups with a different risk degree have been recently identified.

During the three years of this project we collected peripheral blood samples from 247 patients affected by B-CLL referring to our Hematology and Clinical Immunology Unit and we evaluated the prognostic role of some new factors, including: somatic hypermutations of the Ig variable region genes (SHM), BCR VH repertoire, expression of CD38, CD305 and ZAP-70 in leukemic cells.

By flow cytometry, we compared two techniques for ZAP-70 analysis: the isotype control and the ratiometric method. Between the two methods we selected the second one because it was independent of the operator and more reproducible. Then we standardized this method for our laboratory instruments. We optimized threshold value for ZAP-70 expression and we selected the cut-off that had greatest sensitivity and specificity. Finally we compared the results obtained from 4 different monoclonal antibodies (MoAb) anti-ZAP-70, identifying two MoAb for the detection of ZAP-70: the anti-ZAP70 Alexa Fluor 488, Caltag Laboratories and anti-ZAP70 FITC, Upstate Cell Signaling Solution.

The analysis of LAIR-1 showed that it was reduced in CLL patients ($41\% \pm 32$) with respect to in healthy subjects ($84\% \pm 1$) and, in particular high-risk patients (stage 3 and 4) had less protein expression than lower-risk group (stage 0-2).

Our data confirmed the prognostic role of SHM in CLL: the median survival times for mutated and unmutated patients were 260 and 99 months, respectively ($p < 0,001$). The evaluation of the VH repertoire highlighted a prevalent expression of the gene families VH3 (58% of the patients), VH1 (18% of the sample) and VH4 (18%). The expression of VH1 genes was associated with an unmutated IgVH status (58% of CLL patients); the expression of VH4 family was associated to a mutated status ($\text{SHM} \geq 2\%$) and to a median global survival of 220 months, significantly higher when compared to the average of the whole sample ($p < 0,001$).

We also demonstrated a prognostic role for CD38 and ZAP-70 expression: the median overall survival for CD38 negative and positive patients was 123 and 250 months, respectively ($p < 0,01$); the median survival for the ZAP-70 positive and negative patients was 135 and 220 months ($p < 0,01$).

We analyzed the correlations between these prognostic factors. Statistical analysis showed a significant correlation between CD38 expression and the unmutated IgVH status ($p < 0,01$) and between ZAP-70 expression and the absence of hypersomatic mutation ($p < 0,05$). LAIR-1 was less expressed in both SHM negative patients and in CD38 positive patients.

Our data confirm the utility of new prognostic factors as far as they may predict the clinical evolution of the disease. However, the mutational status of variable heavy chain Ig genes at present represents the most reliable and mandatory prognostic factor. ZAP-70 evaluation by flow cytometry technology is promising but every laboratory should standardize appropriate methods according to the instruments and reagents available in their setting.

1. INTRODUZIONE

1.1 La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B)

1.1.1 Epidemiologia ed eziologia

La leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) è definita come un disordine linfoproliferativo monoclonale cronico acquisito, caratterizzato dall'accumulo nel sangue periferico, nel midollo osseo, negli organi linfatici (milza e linfonodi) e, più raramente, in sedi extralinfatiche, di piccoli linfociti apparentemente maturi. Nei casi, meno frequenti, in cui prevalga l'interessamento linfonodale rispetto a quello ematico, la malattia viene spesso identificata come linfoma a piccoli linfociti (LPL).

La LLC-B è la più comune forma leucemica nella popolazione adulta. Secondo i dati della Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT), nel periodo tra il 1998 e il 2002 i casi di LLC hanno rappresentato il 33,5% del totale delle leucemie diagnosticate in Italia. Nello stesso periodo sono stati diagnosticati in media 5,6 casi di LLC ogni 100.000 uomini e 4,3 casi ogni 100.000 donne all'anno. In Italia si può stimare un numero medio annuo di nuovi casi di circa 1.600 fra i maschi e 1.150 fra le femmine. La stima dell'incidenza nella regione Veneto è pari a 4,8 casi ogni 100.000 abitanti adulti, con circa 179 nuovi casi all'anno (Figura 1).

Il rischio di essere affetti da LLC cresce notevolmente con l'età; prima dei 60 anni, infatti, viene diagnosticato meno del 15% dei casi. Negli ultimi anni è stato documentato un aumento dell'incidenza della malattia nella popolazione al di sotto dei 55 anni, senza che questo modificasse però il tasso di incidenza globale (1). La LLC-B predilige il sesso maschile, con una *ratio* di incidenza maschi-femmine pari a 1,5-2:1.

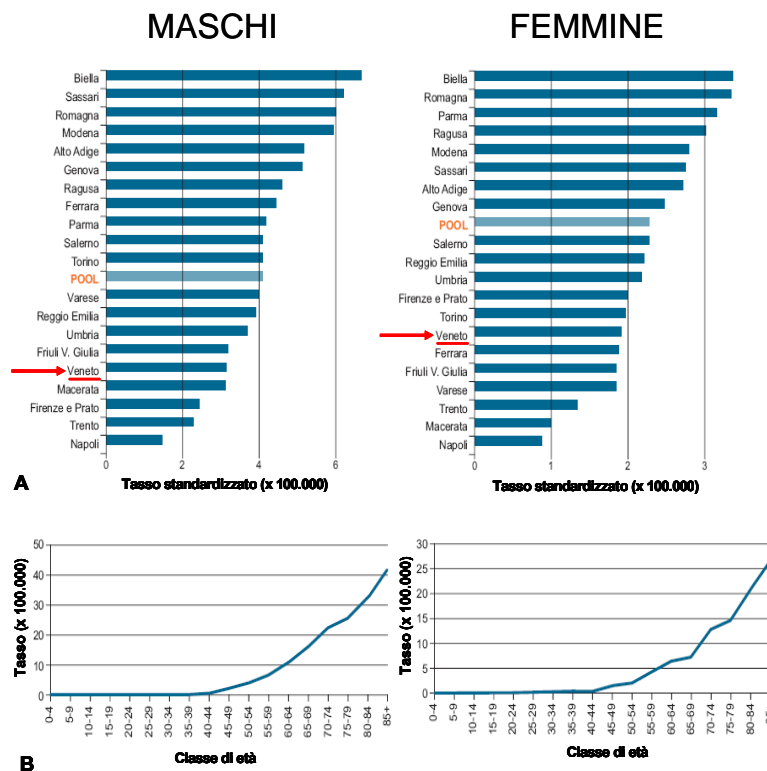


Figura 1. Tassi di incidenza della LLC nel periodo 1998-2002 nella popolazione maschile e femminile, riferiti ai diversi registri tumori italiani (A) e alle diverse classi di età (B). Fonte: Associazione Italiana Registri Tumori – Rapporto 2006.

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

È inoltre stato messo in evidenza come tra i casi familiari sussista il “fenomeno dell'anticipazione”, per cui con l'avanzare delle generazioni l'esordio della malattia tende ad essere più precoce e il decorso clinico più severo (2-6).

1.1.2 Presentazione clinica

La LLC-B è caratterizzata da un esordio e un decorso clinico estremamente variabili. La diagnosi viene spesso posta in pazienti asintomatici, attraverso esami di laboratorio effettuati per altri motivi. In altri casi, invece, il paziente si rivolge al medico per sintomi attribuibili all'infiltrazione, da parte delle cellule leucemiche, del midollo osseo o di altri organi. L'esordio tipico è caratterizzato da una linfadenomegalia localizzata in più sedi; i linfonodi ingranditi non sono dolenti, sono di consistenza elastica, mobili rispetto alla cute e ai piani sottostanti e si mantengono separati tra loro. Oltre ai linfonodi, anche la milza risulta spesso ingrandita (90% dei casi), mentre meno frequente è l'epatomegalia (50% dei casi). Possono essere presenti i sintomi tipici dei linfomi ("sintomi B"): calo ponderale, febbre, sudorazioni notturne. Altri organi possono risultare coinvolti dalla malattia; tra questi ricordiamo la cute, il sistema linfatico dell'apparato respiratorio, il tratto gastroenterico (anello del Waldeyer e placche del Peyer), le ghiandole salivari e lacrimali (sindrome di Mikulicz), il sistema nervoso centrale, i reni, gli occhi, gli organi genitali.

Il paziente con LLC è predisposto a contrarre infezioni a causa di uno stato di immunodeficienza a carico sia dell'immunità cellulo-mediata che di quella umorale (nel 50-70% dei casi è presente ipogammaglobulinemia), a cui può sovrapporsi la neutropenia da disfunzione midollare e/o legata a trattamenti citostatici. L'anemia (emoglobina <11g/dl) è presente all'esordio nel 20% dei casi, ed è generalmente normocromica normocitica; meno frequente è il riscontro di una piastrinopenia clinicamente rilevante. La presenza di una o entrambe queste condizioni, una volta escluse cause autoimmuni, testimonia un'invasione midollare di grado elevato.

Il 5% dei pazienti può presentare all'esordio una componente immunoglobulinica (Ig) monoclonale, più spesso di tipo IgM, più raramente IgG o IgA (variante paraproteinemica o secretoria).

Caratteristica della LLC-B è l'elevata incidenza di fenomeni autoimmunitari, in particolare di anemia emolitica (10-25%) e di piastrinopenia (2%) autoimmuni; quando le due condizioni sono associate si configura il quadro della sindrome di Evans. Un recente studio ha evidenziato come queste due complicanze siano più frequenti nei pazienti con malattia in stadio B o C secondo Binet e/o già multitrattata. Lo stesso studio ha inoltre rilevato una maggiore incidenza di complicanze autoimmunitarie non ematologiche in pazienti in stadio A, avanzando l'ipotesi di un diverso meccanismo patogenetico sottostante, dipendente dal grado di malignità dei linfociti B neoplastici (7).

La storia naturale della LLC-B rispecchia la variabilità della sintomatologia. In alcuni pazienti il decorso è estremamente indolente, con assenza di sintomi per anni; in altri, l'andamento clinico è più aggressivo, mal controllabile con la terapia, e il decesso può sopravvenire in pochi mesi. Sebbene le cause di morte dei pazienti con LLC siano spesso da attribuire a patologie concomitanti, vista l'età avanzata della maggior parte di essi, e soprattutto alle complicanze infettive, in alcuni casi possono svilupparsi sindromi evolutive che segnano un netto peggioramento della prognosi. Una di queste è la sindrome di Richter, che consiste nella trasformazione della malattia in un linfoma a grandi cellule che si manifesta con un aggravamento rapido delle condizioni cliniche, comparsa di sintomi B e vistosa linfadenomegalia (mediana di sopravvivenza: circa 6 mesi). L'altra sindrome evolutiva è la trasformazione in leucemia prolinfocitica, anch'essa contrassegnata da rapido decadimento fisico e prognosi infausta (mediana di sopravvivenza: circa 14 mesi). Molto rara è l'insorgenza di una leucemia acuta linfoblastica in corso di LLC, mentre la comparsa di una leucemia acuta mieloide, così come di altre neoplasie non ematologiche, costituisce un evento correlabile al deficit immunologico e ai trattamenti chemio-radioterapici.

1.1.3 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:

1. un numero di linfociti nel sangue periferico superiore a 5.000/ μ L. Fino ad alcuni anni fa le linee guida richiedevano che la linfocitosi venisse riconfermata per almeno quattro settimane consecutive; attualmente, le conoscenze e le capacità tecniche acquisite soprattutto in relazione allo studio dell'immunofenotipo rendono superfluo questo criterio temporale. Morfologicamente, i linfociti leucemici appaiono di piccole dimensioni, del tutto simili ai linfociti maturi (diametro: 6-12 μ 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 2).

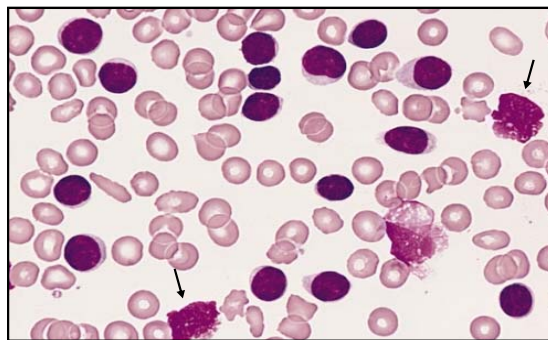


Figura 2. Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC. Le frecce indicano le ombre di Gumprecht, patognomoniche della LLC.

Il *French-American-British Group* (FAB) ha stabilito che il numero di linfociti atipici (prolinfociti, immunoblasti, linfoblasti) non debba superare il 10% nella formula leucocitaria (LLC tipica). La presenza di un numero di questi

elementi compreso tra il 10 e il 55% configura il quadro di LLC atipica, ed 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 (PLL).

2. un'infiltrazione linfocitaria a livello midollare superiore al 30% delle cellule nucleate. Questo criterio non è essenziale per la diagnosi, a parte i rari casi di forme di LLC midollari pure, in cui la conta dei linfociti nel sangue periferico risulti $<5.000/\mu\text{L}$. Tuttavia, lo studio del midollo osseo, sia attraverso l'analisi morfologica dell'aspirato, sia attraverso i reperti dell'osteobiopsia, fornisce preziose informazioni per la definizione della prognosi e dello stadio, oltre a permettere un'accurata diagnosi differenziale dell'eventuale citopenia (Figura 3). L'infiltrazione del midollo osseo può avvenire secondo quattro configurazioni: nodulare, diffuso, interstiziale e misto. Il *pattern* nodulare suggerisce uno stadio precoce della malattia, mentre quello diffuso ed interstiziale sono tipici degli stadi più avanzati. Inoltre, solo dimostrando l'assenza di cellule leucemiche dal midollo è possibile definire uno stato di remissione completa.

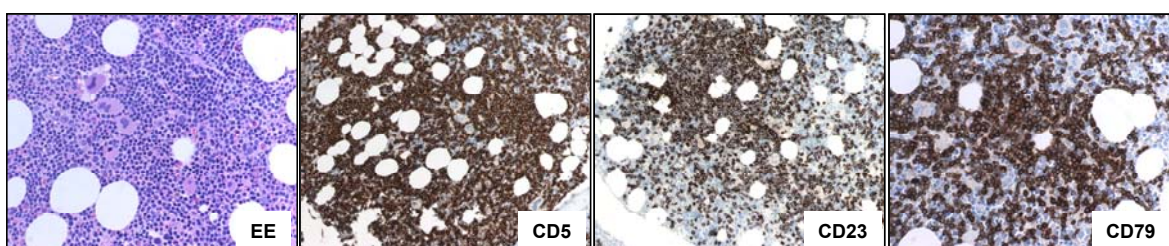


Figura 3. Biopsia osteomidollare di un paziente affetto da LLC. EE: preparato colorato con ematossilina-eosina, e tre immagini immunohistologiche che evidenziano l'espressione di marcatori diagnostici CD5, CD23 e CD79.

3. l'analisi dell'immunofenotipo dei linfociti è indispensabile per differenziare la LLC-B da altre condizioni linfoproliferative quali la PLL, la leucemia a cellule capellute, il linfoma mantellare e altre forme di linfomi. Tre sono gli elementi caratterizzanti il fenotipo di membrana delle cellule della LLC-B:

- a) l'espressione dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD23) assieme ad un unico marcatore normalmente espresso sulle cellule T (CD5); il CD23 riveste particolare importanza nella diagnosi differenziale con il linfoma mantellare (CD5+ ma CD23-);
- b) l'espressione di un unico tipo di catena leggera delle immunoglobuline (κ o λ);
- c) la bassa espressione di CD79b e delle immunoglobuline di superficie (sIg), diversamente della B-PLL che esprime sIg ad alta intensità; nella LLC-B esse risultano prevalentemente IgM, seguite da IgD, IgG e IgA; non è rara la coespressione di IgM e IgD. Le cellule della variante paraproteinica della LLC presentano Ig citoplasmatiche (cIg) (Figura 4).

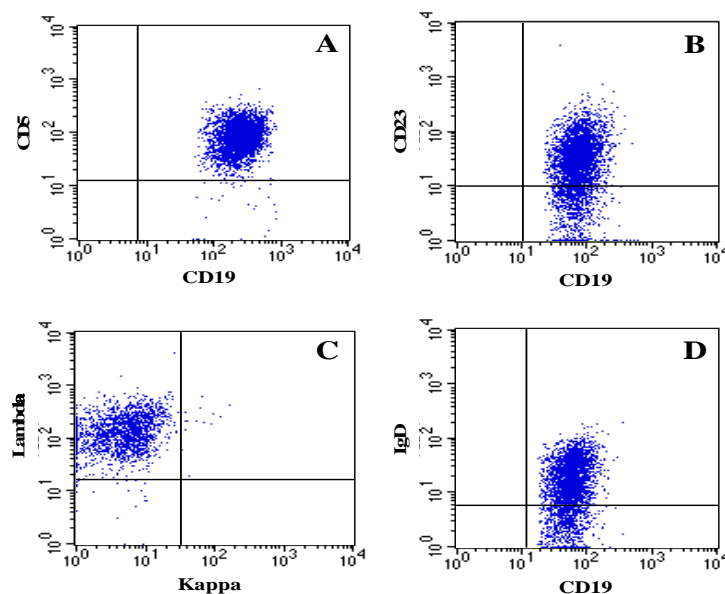


Figura 4. Citogrammi relativi ad un caso rappresentativo di LLC. La popolazione di linfociti B (CD19+) esaminata nell'esempio risulta positiva per CD5 (pannello A) e per CD23 (pannello B), esprime un unico tipo di catena leggera (λ , pannello C) ed esprime IgD di superficie a bassa intensità (pannello D).

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

Altri esami di laboratorio sono generalmente eseguiti per confermare la diagnosi, definire l'estensione della malattia e prevenirne le complicanze: elettroforesi delle proteine sieriche e dosaggio delle Ig, test di Coombs, studio della funzionalità renale ed epatica. Inoltre prima di iniziare una terapia immunosoppressiva, è necessario accertarsi che non vi sia evidenza di infezioni da parte dei comuni agenti virali in atto quali citomegalovirus (CMV), e i virus dell'epatite B e C (HBV e HCV) (8).

1.2 Patogenesi

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

I linfociti B sono le cellule del sistema immunitario che gestiscono la risposta di tipo umorale. Essi, opportunamente stimolati, sono in grado di differenziarsi da linfociti "vergini" in cellule secernenti anticorpi diretti contro uno specifico antigene (plasmacellule), o, in alternativa, in linfociti B detti "della memoria", cioè cellule che non secernono anticorpi, ma che circolano nel sangue e che sono in grado di riconoscere uno specifico antigene e di attivarsi in risposta ad esso per dare inizio ad una risposta immunitaria più rapida ed efficace. Il riconoscimento dell'antigene avviene per mezzo del recettore delle cellule B (BCR), un complesso multimerico di membrana composto da un'immunoglobulina di superficie legata alla membrana plasmatica per mezzo della sua regione costante (Frammento cristallizzabile, Fc) e che rivolge all'esterno la sua regione legante l'antigene (Fab), a cui si associa per mezzo di un legame non covalente l'eterodimero $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b), deputato alla trasduzione intracellulare del segnale. La regione Fab

comprende le regioni variabili (V) delle catene pesanti e leggere delle Ig, che sono le regioni che conferiscono al BCR la specificità per un antigene. Le regioni V a loro volta comprendono tre regioni ipervariabili, dette anche “regioni determinanti la complementarità” (CDR), in quanto rappresentano il sito che consente un legame ad alta affinità con l’antigene (Figura 5).

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

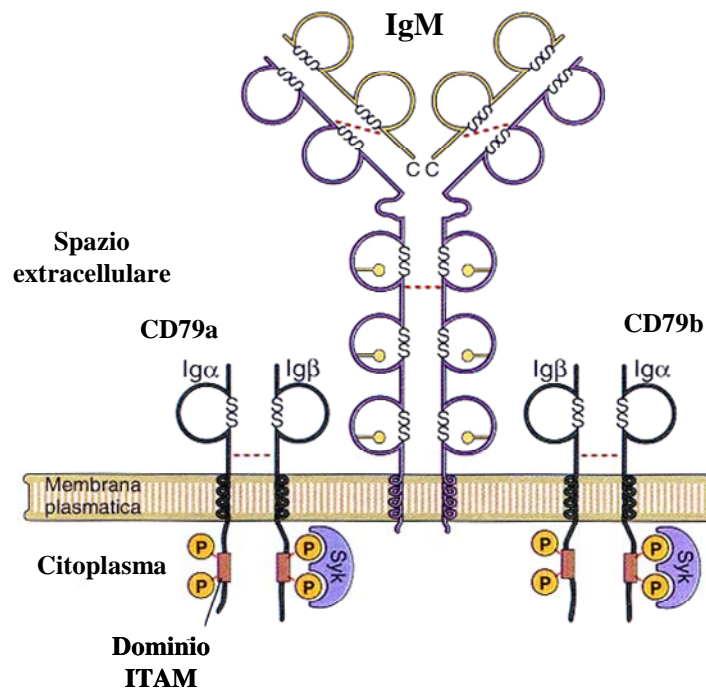


Figura 5. Rappresentazione schematica del BCR. Il BCR è costituito dal complesso formato da Ig di superficie e dalle molecole CD79a e b che trasducono il segnale dopo il legame dell’Ig con l’antigene.

Il linfocita B “vergine”, infatti, quando incontra l’antigene specifico per il suo BCR, si attiva e comincia a proliferare. Ciò avviene all’interno degli organi linfatici e richiede che vi sia la co-attivazione da parte dei linfociti T helper specifici per lo stesso antigene. Una parte di questa progenie entra nei follicoli linfoidi e forma il centro germinativo (CG), dove ha luogo un’intensa proliferazione. Qui, i geni delle Ig subiscono una serie di mutazioni puntiformi (all’incirca 1 ogni 1.000 paia di basi per ogni ciclo mitotico), che porta alla formazione di numerosissimi cloni con una diversa affinità per l’antigene. Questi vengono selezionati attraverso il contatto con le cellule follicolari dendritiche che esprimono l’antigene sulla loro membrana; i linfociti che legano con maggiore affinità l’antigene sopravvivono, mentre gli altri vanno incontro ad apoptosi. Il repertorio linfocitario che così si sviluppa è dotato di recettori altamente affini per l’antigene e quindi in grado di attivare una risposta immunitaria più efficace e rapida.

Inizialmente si è riteneva che la LLC-B in realtà non fosse un’unica malattia, ma potesse essere divisa in due entità diverse, aventi origine da cellule ad un diverso stadio di maturazione, pre o post-CG. In realtà, lo studio dell’espressione genica condotto con la tecnica del DNA-microarray e l’analisi dell’immunofenotipo dei due sottotipi di LLC (SHM \geq 2% e *germline*), hanno evidenziato come le cellule leucemiche derivino in ogni caso da linfociti B della memoria (9), ossia da cellule mature e differenziate, la cui espressione genica presenta una larga, ma non totale, sovrapposibilità, e il cui fenotipo è tipico dei linfociti che hanno incontrato l’antigene (CD23+, CD25+, CD27+). L’ipotesi oggi ritenuta più plausibile afferma che la differenza tra i due sottotipi di LLC-B sia legata al tipo di antigene incontrato e alla modalità di attivazione. Nel sottotipo non mutato, l’attivazione avverrebbe da parte di antigeni “a bassa avidità”, ad esempio superantigeni, indipendentemente dai linfociti T helper e quindi senza che si formi il CG e avvenga il processo di ipermutazione somatica; nel sottotipo mutato, invece, l’attivazione sarebbe legata all’incontro con antigeni “ad alta avidità”, con la partecipazione dei linfociti T helper

e formazione del CG, con conseguente mutazione nelle regioni variabili. La trasformazione neoplastica avverrebbe a carico di un linfocita reduce da uno di questi due processi (10-11). Questa teoria rende conto dell'origine delle cellule leucemiche, ma non spiega il differente comportamento biologico dei due sottotipi, che è alla base del diverso comportamento clinico. Le forme di LLC "mutate", infatti, hanno un andamento estremamente indolente e possono rimanere asintomatiche per anni; quelle "non mutate", invece, sono più aggressive, richiedono un intervento terapeutico e possono essere causa di morte in breve tempo.

I numerosi sforzi volti a cercare dei criteri per definire la prognosi della malattia si incrociano con la ricerca dei meccanismi patogenetici che ne stanno alla base. Accanto alla valutazione delle SHM, infatti, sono emersi altri marcatori prognostici con un valore indipendente rispetto allo stato mutazionale delle Ig. Ciascuno di essi sembra associarsi ad un particolare *pattern* di espressione genica che condiziona la biologia delle cellule affette. In particolare, i meccanismi cellulari che appaiono variamente alterati a seconda della combinazione di questi marcatori sono il controllo dell'apoptosi e la trasmissione intracellulare del segnale del BCR.

1.2.1 Controllo dell'apoptosi

La disregolazione del processo di morte cellulare programmata (apoptosi) è ormai largamente riconosciuta come uno dei meccanismi principali nella patogenesi di numerosi tumori. Nella LLC essa assume un ruolo particolarmente importante. Le cellule di LLC-B, infatti, non possiedono una elevata capacità replicativa e sono per lo più bloccate nelle fasi G₀/G₁ del ciclo cellulare; il loro accumulo è legato al fatto che hanno perduto la capacità di andare incontro a morte cellulare programata, per cui viene a mancare il meccanismo omeostatico che normalmente limita il numero di cellule circolanti. Paradossalmente una volta messe in coltura, queste cellule vanno rapidamente incontro ad apoptosi. Va quindi compreso se la resistenza all'apoptosi dei linfociti leucemici sia legata a fattori intrinseci alla

cellula o dipenda da messaggi esterni che arrivano alla cellula dal microambiente in cui vive (12-13). Soltanto recentemente si è cominciato a comprendere il ruolo del microambiente e delle cellule che lo compongono (cellule stromali e cellule “*nurse-like*”), mentre il ruolo dei fattori intrinseci è già studiato da tempo. Tra questi fattori va ricordato il ruolo delle proteine della famiglia Bcl-2, un gruppo di molecole con attività antiapoptotica (Bcl-2, Mcl-1) o proapoptotica (Bax, Bak, Bok). La normale attività di queste proteine è alterata nella LLC-B; in particolare, Bcl-2 risulta espressa in maniera anomala, anche se non omogenea in tutti i pazienti e con un ruolo meno definito rispetto al linfoma follicolare, in cui Bcl-2 è il marcatore patognomonico di malattia.

Di recente, anche Mcl-1, un'altra proteina antiapoptotica, è risultata sovraespressa nella LLC, specialmente in alcuni casi a rapida progressione e con una scarsa risposta alla terapia citoriduttiva (14-15). In particolare, uno studio condotto su 58 pazienti affetti da LLC ha evidenziato come in circa un terzo di essi fosse presente un'inserzione di 6-18 paia di basi a livello del promotore del gene di Mcl-1; tale inserzione, assente in tutti i soggetti di controllo, si associava ad una aumentata espressione della proteina a livello cellulare, mentre sul piano clinico si osservava una riduzione della risposta alla chemioterapia e della sopravvivenza (16).

Altri due fattori intrinseci critici per il controllo dell'apoptosi, che svolgono un importante ruolo oncosoppressore e la cui funzionalità risulta spesso alterata nella LLC sono le proteine p53 e ATM (17-18). p53, una delle molecole coinvolte nello sviluppo dei tumori umani; gioca un ruolo fondamentale nella sorveglianza del genoma ed è in grado di bloccare il ciclo cellulare in presenza di danni al DNA o di indurre l'apoptosi se questi sono particolarmente ingenti. Non è espressa nelle forme di LLC-B caratterizzate dalla delezione del braccio corto del cromosoma 17 (17p13) e la sua assenza si associa a resistenza ai farmaci e a cattiva prognosi (19). ATM è una proteina che segnala a p53 la presenza di danni al DNA; un suo deficit comporta una carente risposta apoptotica. La delezione a carico delle

bande cromosomiche 11q22-q23 si associa ad una sua ridotta espressione e comporta una prognosi sfavorevole (19).

1.2.2 Trasduzione del segnale mediata dal BCR

Il legame dell'antigene al BCR attiva una serie di reazioni che coinvolgono diverse molecole di membrana e citoplasmatiche; in questo modo avviene la regolazione dell'espressione dei geni deputati all'attuazione di funzioni cellulari quali l'attivazione, la differenziazione, la sopravvivenza e la proliferazione. Normalmente quando l'antigene lega il BCR, la protein-chinasi Lyn fosforila determinati residui tirosinici, denominati ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), localizzati a livello della porzione intracitoplasmatica delle subunità $Ig\alpha/Ig\beta$ del recettore; questo determina il reclutamento e l'attivazione, sempre attraverso tirosin-fosforilazione, di una serie di molecole tra cui la chinasi Syk, molecola chiave nel propagare il segnale attivatorio lungo diverse vie di trasduzione che conducono al rilascio di secondi messaggeri; tra queste ricordiamo quella della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) che genera il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato, che a sua volta conduce all'attivazione della chinasi Akt, e quella della fosfolipasi C (PLC) che induce il rilascio del Ca^{2+} intracellulare che va ad attivare la protein-chinasi C (20). Questa articolata cascata culmina nell'attivazione delle MAP chinasi, tra cui ERK, e di fattori di trascrizione nucleari come NF- κ B e NFAT (21). Le risposte a questa complessa catena dipendono dall'interazione di tutte queste molecole e possono consistere nell'induzione della proliferazione, della sopravvivenza, della differenziazione o della morte cellulare (Figura 6).

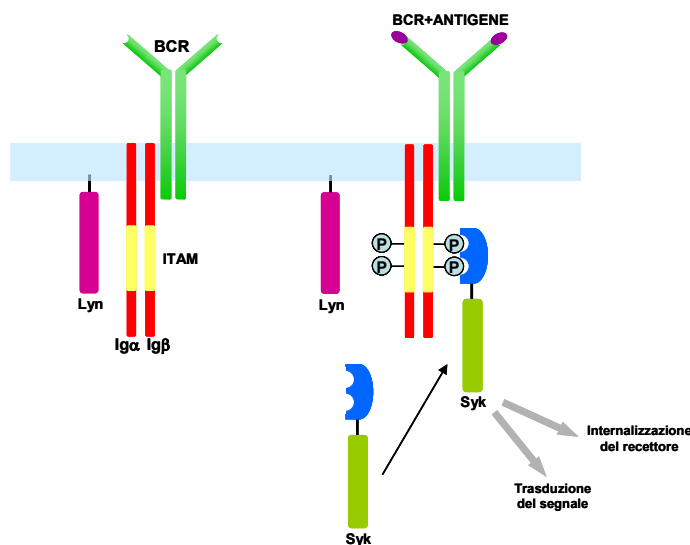


Figura 6. Trasduzione del segnale mediata dal BCR. Quando l'Ag lega il BCR, la tirosin chinasi Lyn fosforila le sequenze ITAMs dei domini citoplasmatici di Ig α e Ig β , creando così siti di legame per i domini SH2 di proteine quali la chinasi Syk; seguono diverse reazioni biochimiche che culminano nell'attivazione, differenziazione o proliferazione del linfocita B.

Recentemente sono state effettuate numerose osservazioni che correlano alterazioni di questi passaggi con il comportamento clinico della LLC-B, ad indicare che probabilmente l'interazione con l'antigene svolge un ruolo importante nella patogenesi della malattia.

Con riferimento allo stato mutazionale delle regioni VH delle Ig, è stato osservato che le cellule "non mutate" sono in grado di trasdurre il segnale del BCR, mentre quelle "mutate" appaiono sostanzialmente anergiche (22). Ciò è stato attribuito al fatto che le cellule "non mutate" esprimono ad un livello maggiore la protein chinasi ZAP-70. ZAP-70 è una molecola chiave nella trasduzione del segnale del recettore per l'antigene nei linfociti T ed è strutturalmente correlata a Syk; esperimenti condotti su cellule di linfoma B di uccello che non esprimevano Syk hanno dimostrato che ZAP-70 è in grado di vicariarne alcune funzioni (23). Recentemente è stato dimostrato che nelle cellule di LLC-B ZAP-70 può aumentare la trasduzione del segnale del BCR promuovendo la crescita e la sopravvivenza del clone maligno, anche se il meccanismo esatto per cui ciò avviene non è stato ancora definito (24). Un'ipotesi prevede che nelle cellule ZAP-70+ la soglia per la trasduzione del segnale del BCR sia ridotta grazie alla capacità della proteina di promuovere la fosforilazione dei motivi tirosinici del BCR (ITAMs) in grado di attivare a loro volta Syk.

Quest'ultima risulta infatti attivata ad un livello maggiore e più a lungo rispetto ai casi ZAP-70 negativi, così come risultano più attivate le chinasi Akt e ERK. Un'altra teoria trae origine dall'osservazione che ZAP-70 nei linfociti B presenta un livello di fosforilazione minore rispetto a quello che raggiunge nei linfociti T. Di conseguenza, la sua modalità d'azione non si limita alla semplice facilitazione delle consuete vie di trasduzione del segnale, ma sarebbe più complessa e comprenderebbe effetti di blocco su normali meccanismi di *feedback* negativo messi in atto dai linfociti per regolare la risposta all'antigene. Un esempio di ciò è la iporegolazione del meccanismo di internalizzazione del BCR mediata dal ligando (25).

Oltre a ZAP-70, anche la chinasi Lyn, molecola chiave nei passaggi precoci della cascata di trasduzione del segnale del BCR, riveste un ruolo patogenetico nella malattia; è stato infatti dimostrato come essa abbia, nelle cellule di LLC-B, una attività basale aumentata rispetto ai linfociti B normali, determinando un aumento della fosforilazione tirosinica basale a valle del recettore. In questo modo Lyn conferisce alla cellula uno stato di attivazione indipendente dal legame dell'antigene al BCR, a cui consegue un maggior potenziale replicativo e di resistenza all'apoptosi (26).

L'attivazione del BCR comporta l'attivazione di processi coinvolti nella proliferazione dei linfociti B. È stato dimostrato che nelle cellule di LLC-B, chinasi come JNK e p38/MAPK, coinvolte nella progressione del ciclo cellulare e quindi nella proliferazione, sono costitutivamente attive indicando per la mancanza di un regolatore negativo in grado di spegnere il segnale dopo la loro attivazione. Uno studio recente (27) ha dimostrato che LAIR-1 (*leukocyte-associated Ig-like receptor 1*), recettore con attività inibitoria che promuove la defosforilazione di p38 e JNK e blocca l'attivazione di Akt e NF-κB, impedendo così la proliferazione delle cellule B, manca in una parte dei pazienti con LLC-B e la sua mancanza può contribuire ulteriormente all'accumulo delle cellule leucemiche in circolo.

Lo studio degli effetti patogenetici attribuibili alle più frequenti alterazioni cromosomiche rilevate nella LLC-B ha messo in evidenza come queste possano alterare anche la trasduzione del segnale del BCR. In particolare la delezione di 13q si associa ad un'aumentata espressione della chinasi Akt che è una molecola chiave nella catena di trasmissione al nucleo del segnale proveniente dal recettore per l'antigene (19).

1.2.3 Espressione della telomerasi

Il DNA telomerasico è localizzato alle estremità di ciascun cromosoma delle cellule eucariotiche. Esso è composto da brevi sequenze di nucleotidi ripetute migliaia di volte, senza alcuna funzione codificante. Poiché ad ogni ciclo di duplicazione cellulare la parte terminale dei telomeri non viene completamente replicata, essi si accorciano progressivamente fino ad esaurirsi. Questo processo viene considerato come uno dei fattori responsabili della senescenza e della morte cellulare. L'enzima telomerasi (hTERT) è 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. La hTERT è normalmente espressa solo durante alcune fasi dello sviluppo dell'organismo e nelle cellule germinali; tuttavia la sua attivazione è un importante fattore nella tumorigenesi di numerose neoplasie umane (28). I telomeri dei cromosomi dei linfociti neoplastici di LLC-B sono stati recentemente oggetto di studio, e hanno fornito nuove informazioni sulla patogenesi della malattia. La loro lunghezza è stata messa in relazione con l'origine di queste cellule, intesa come pre o post CG, e di conseguenza con lo stato mutazionale delle regioni VH delle Ig. Le cellule "non mutate" presentano telomeri significativamente più corti di quelle "mutate" (29). Ciò è probabilmente legato al fatto che le cellule "non mutate" sono soggette a cicli replicativi più numerosi, che comportano un maggior consumo dei telomeri. A questo fatto si aggiunge l'osservazione che le cellule non mutate esprimono anche maggiori livelli di

telomerasi rispetto a quelle “mutate” (30-31). Questo dato potrebbe essere interpretato come un meccanismo finalisticamente teso a proteggere la cellula bilanciando l’eccessiva attività replicativa che di per sé tenderebbe a condurre la stessa ad uno stato di senescenza e quindi di morte (32).

1.3 Prognosi

Data l’estrema eterogeneità della malattia, la definizione della prognosi nella gestione di un paziente affetto da LLC-B riveste un ruolo decisivo e pone le maggiori difficoltà soprattutto per la valutazione di una corretta terapia (33). Negli anni sono stati proposti diversi fattori prognostici allo scopo di consentire al medico di definire il decorso clinico di ciascun paziente e, grazie alle progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia, è stato possibile definire nuovi marcatori utilizzabili fin dalla diagnosi ed in grado di delineare il decorso clinico della malattia.

I fattori prognostici sono di 2 tipi:

- A. Clinico
- B. Biologico.

1.3.1 Fattori prognostici clinici

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

- stadio 0: linfocitosi assoluta $>15.000/\mu\text{L}$ più linfocitosi midollare $>40\%$
- stadio 1: linfocitosi e linfadenomegalie
- stadio 2: linfocitosi ed epato/splenomegalia, con o senza linfadenomegalia

- stadio 3: linfocitosi con anemia (Hb <11g/dL)
- stadio 4: linfocitosi con piastrinopenia (Plts <100.000/ μ 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 (33-34).

Il sistema secondo Binet individua solamente tre stadi:

- stadio A: linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfoidi coinvolte (comprendendo sia i linfonodi che la milza e il fegato)
- stadio B: linfocitosi periferica e midollare con più di tre aree linfoidi coinvolte
- stadio C: anemia con Hb <10 g/dL e/o piastrinopenia con Plts <100.000/ μ L, indipendentemente dal numero di aree linfoidi coinvolte (35).

2. Tempo di raddoppiamento dei linfociti: inferiore ai 12 mesi, si associa ad un peggior decorso clinico.
3. Modalità di infiltrazione del midollo osseo: un *pattern* di infiltrazione diffuso si associa a una cattiva prognosi (36-37).

1.3.2 Fattori prognostici biologici

I fattori prognostici meno recenti di questi parametri, detti fattori prognostici biologici “classici”, sono correlati all’espansione del clone leucemico, per cui sono indicativi solo quando la malattia è 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 PL è decisamente scarsa; se invece la percentuale di prolinfociti è compresa tra 10% e 55% (LLC-B/PL) la probabilità che si verifichi un progressivo aumento dei prolinfociti nel sangue periferico è pari ad un terzo, mentre nel 18% dei casi può verificarsi l'evoluzione in PL conclamata (38).
- 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, poichè correlato al tempo di raddoppiamento linfocitario, e ad una imminente progressione della malattia (39).
- 3) *Il valore di timidina chinasi (TK)*. I livelli sierici di questo enzima sono in grado di identificare i pazienti affetti da una malattia indolente rispetto a quelli con un'elevata probabilità di progressione a breve termine. In particolare, livelli di TK <7,1U/L si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari a 49 mesi, mentre livelli di TK >7,1 U/L si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari soltanto a 8 mesi (40).
- 4) *Il valore di CD23 solubile*. La molecola CD23 è normalmente presente sulla membrana dei linfociti B dove media diverse funzioni: previene l'apoptosi delle cellule del CG ed è coinvolta nella costimolazione della produzione dell'IFN- γ da parte dei linfociti T. I frammenti di clivaggio della molecola (sCD23), i cui livelli possono essere determinati nel siero del paziente, risultano più elevati nei pazienti affetti da LLC-B ed è stato dimostrato come essi siano correlati allo stadio clinico secondo Rai e al numero di linfociti B circolanti. L'aumento del sCD23 anticipa di circa 48 mesi la progressione della malattia ed è un indice affidabile del rischio di morte del paziente (41-42).

Negli ultimi anni le progressive acquisizioni in merito alla patogenesi della malattia hanno consentito di definire nuovi marcatori prognostici utilizzabili fin dal momento della diagnosi, ed in grado di definire in modo accurato il decorso clinico della malattia. Essi

individuano alcune delle caratteristiche biologiche del clone leucemico cruciali nel delineare la sua capacità di proliferazione e di invasione dei vari tessuti. Lo studio di questi marcatori si avvale di tecniche di immunocitofluorimetria, citogenetica e biologia molecolare. I fattori prognostici principali e maggiormente valutati 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 (SHM non mutati o SHM-) a prognosi negativa, con una mediana di sopravvivenza dopo la diagnosi di circa 8 anni, mentre una percentuale di mutazione uguale o superiore al 2% (SHM mutati o SHM+) identifica un gruppo con mediana di sopravvivenza di circa 25 anni. Questo fattore prognostico, identificato nel 1999 da due distinti gruppi di ricercatori, ha assunto un importante significato per il suo elevato valore predittivo (43-44). Il principale limite di questo marcatore è legato al fatto che la sua analisi è complessa e richiede l'impiego di metodiche costose (sequenziamento) e non sempre disponibili di *routine* in tutti i laboratori. L'analisi del repertorio del BCR dei linfociti B leucemici, in particolare la distribuzione delle diverse famiglie di geni per le regioni V delle catene pesanti delle Ig espresse, ha evidenziato una elevata frequenza del gene VH3.21 che, indipendentemente dal suo stato mutazionale, si associa ad un andamento clinico più rapido ed aggressivo. Questo dato, tuttavia, è stato evidenziato soprattutto tra i pazienti che vivono nei paesi del Nord Europa, mentre non è stato confermato nei paesi dell'area mediterranea (45-47).

- 2) *L'espressione di membrana di CD38.*

I casi di LLC-B con una quota di cellule CD38 positive superiore al 30% sono caratterizzati da una prognosi negativa. In realtà, il valore del cut-off per cui separare i casi CD38+ da quelli CD38- non è unanimemente definito in letteratura, tanto che alcuni autori che lo hanno ridotto al 20% (48), altri al 7% (49). Rispetto alle SHM,

CD38 ha un valore prognostico indipendente. Dapprima, si riteneva che la sua espressione correlasse strettamente con lo stato non mutato delle regioni VH delle Ig, ma studi approfonditi hanno ridimensionato questa affermazione, che risulta non vera in circa un terzo dei casi. Questi presentano una mediana di sopravvivenza di circa 15 anni, un valore intermedio tra i casi SHM-/CD38+ e quelli SHM+/CD38-. Inoltre, un limite di questo marcatore è la sua variabilità nel corso della malattia, in particolare dopo trattamento farmacologico. Sembra infatti che la chemioterapia colpisca prevalentemente le cellule CD38-, determinando, alla ripresa, un aumento delle cellule CD38+. Sono stati identificati casi in cui l'espressione di CD38 varia anche in assenza di trattamento: ciò limita la sua utilità nel definire la prognosi, tanto che negli ultimi anni ad esso vengono preferiti marcatori più attendibili e stabili nel tempo(50-51).

3) *L'espressione intracitoplasmatica della protein chinasi associata alla catena ζ del TCR di 70 kDa (ZAP-70).*

L'identificazione di questo nuovo fattore prognostico si deve alle indagini condotte con la tecnica del DNA microarray sulle cellule di LLC-B SHM+ o SHM- per determinare se vi fossero differenze nell'espressione genica (52). Il gene codificante ZAP-70 è risultato quello che meglio correla con lo stato mutazionale delle Ig, essendo per lo più espresso nei casi non mutati e non espresso nei casi mutati (53). Il grado di correlazione, in realtà, non è concorde in tutti gli studi condotti a tal proposito, e varia da un valore minimo del 77% (54) ad uno massimo del 95% (55). Queste differenze sono state attribuite alla presenza di altri fattori prognostici indipendenti, in particolare ad alcune alterazioni cromosomiche (del 17p e del 11q) (56). 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" (57). L'analisi

dell'espressione di ZAP-70 può essere effettuata per mezzo di diverse metodiche: la citofluorimetria, l'immunoistochimica, il *western-blotting*, la quantificazione dell'mRNA per mezzo di *real time-PCR*. Tra queste, quella che appare come la più vantaggiosa soprattutto per la sua ampia diffusione e la semplicità di applicazione è la citofluorimetria.

4) *La presenza di alterazioni cromosomiche.*

Le più frequenti sono alcune delezioni (11q22-23, 17p13, 13q14, 6q21) e la trisomia del cromosoma 12. Per mezzo della metodica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) effettuata sui nuclei in interfase dei linfociti leucemici, è possibile identificare la presenza di aberrazioni cromosomiche nell'80% circa dei casi. La prevalenza delle alterazioni più comuni è stata così stimata da uno studio multicentrico condotto in Germania: 13q- 55%; 11q- 18%; +12 16%; 17p- 7%; 6q- 7% (58). 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 ed a 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. A questo proposito, *l'US Intergroup Phase III Trial* ha recentemente dimostrato, con uno studio prospettico, che rispetto agli altri marcatori prognostici, solo l'indagine citogenetica ha rilevanza nel predire l'intervallo libero da progressione della malattia dopo terapia con Fludarabina. La presenza di alterazioni cromosomiche ad alto rischio giustifica dunque il ricorso a trattamenti più aggressivi (59) (Figura 7). Le alterazioni cromosomiche sono indipendenti dallo stato mutazionale, anche se appare evidente una maggiore frequenza di 11q- e 17p- tra i casi non mutati e di 13q- tra i casi mutati. Tuttavia, circa i due terzi

dei casi non mutati non mostra alcuna alterazione cromosomica con un riconosciuto valore prognostico negativo. La citogenetica costituisce comunque un ulteriore strumento di stratificazione del rischio da affiancare agli altri marcatori prognostici (60-61).

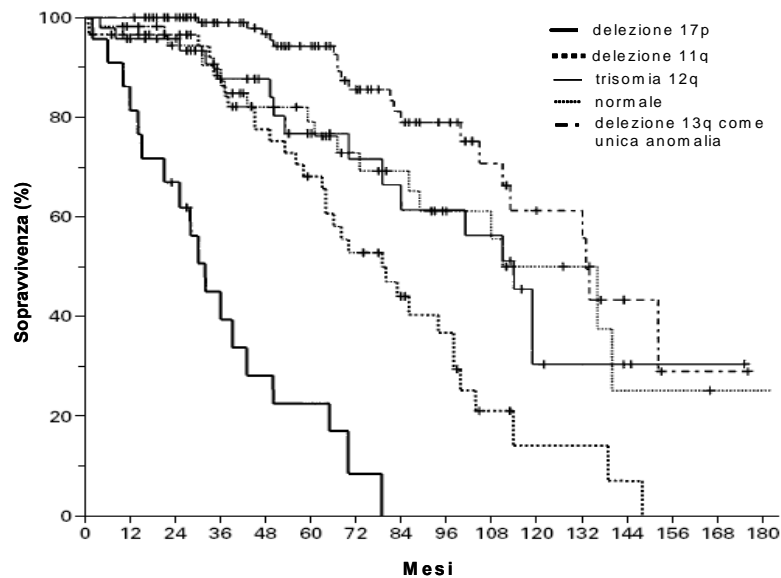


Figura 7. Curve di sopravvivenza relative alle più comuni alterazioni cromosomiche in pazienti con LLC-B. I tempi di sopravvivenza media per i gruppi con del(17p), del(11q), 12+, cariotipo normale e del(13q) sono pari rispettivamente a 32, 79, 114, 111, 133 mesi (58).

5) *L'espressione dell'enzima telomerasi e la lunghezza dei telomeri nelle cellule leucemiche di LLC-B.*

L'analisi dell'attività telomerasica si è dimostrata altamente predittiva riguardo alla probabilità di sopravvivenza dei pazienti, poiché è stata rilevata una significativa differenza tra soggetti con alti livelli di hTERT, a prognosi peggiore, rispetto a quelli con bassi o indeterminabili livelli di hTERT. Un analogo significato è stato attribuito all'analisi della lunghezza dei frammenti di restrizione dei telomeri. Inoltre, approfondendo la loro associazione con lo stato mutazionale delle IgVH, entrambi questi fattori si sono dimostrati in grado di differenziare, all'interno dei due gruppi caratterizzati da una percentuale di mutazioni maggiore o minore del 2%, due sottogruppi con prognosi significativamente diversa. In particolare, il livello di hTERT si è rivelato efficace nello stratificare con maggior precisione il rischio di progressione

tra i pazienti con IgVH mutate, mentre la lunghezza dei frammenti di restrizione telomerici assume un maggior valore predittivo tra i pazienti con SHM inferiori al 2% (62-63) (Figura 8).

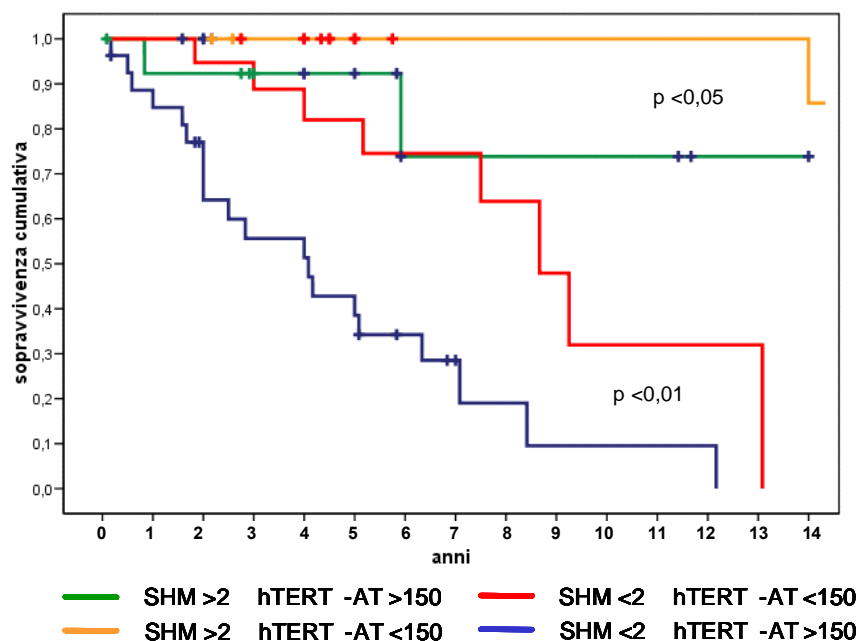


Figura 8. Curve di sopravvivenza relative ai gruppi di pazienti mutati e non mutati, differenziati secondo il livello di espressione di tutti i trascritti della telomerasi (hTERT-AT)(62).

6) *Espressione del leukocyte-associated Ig-like receptor 1 (LAIR-1 o CD305).*

Nei linfociti B è differenzialmente espresso in funzione del grado di maturazione della cellula: è particolarmente espresso dalle cellule B *early*, e viene perso dalla metà delle cellule B memoria. È assente in tutte le cellule B del centro germinativo e nelle plasmacellule (27). Un lavoro recente (64) ha dimostrato che nei pazienti con LLC-B ad alto rischio LAIR-1 non viene espresso.

Pur essendosi dimostrati tutti dotati di un sicuro potere predittivo, i fattori prognostici biologici più recenti richiedono ulteriori studi clinici controllati per standardizzarli e per rendere unanime la loro identificazione e interpretazione, al fine di poter definire con maggior sicurezza la capacità di indicare il miglior atteggiamento terapeutico (65). A questo

scopo sono in corso numerosi studi prospettici, sia su pazienti in stadi precoci di malattia, sia su pazienti in stadi più avanzati.

1.4 Trattamento

La decisione su quando iniziare un trattamento nella LLC-B dipende dallo stadio della malattia, dai sintomi clinici 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 linfoadenopatie, 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*” (8).

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

La scelta della terapia è legata all'età e allo stato generale del paziente. Nei pazienti più anziani (>65), il farmaco di prima scelta è l'alchilante Clorambucile (10 mg/die per 1-4 settimane), associato o meno al Prednisone (25 mg/die per 1-4 settimane). La constatazione che il trattamento con Clorambucile è in grado di indurre una risposta in almeno il 70% dei casi, ma che solo nel 10% si tratta di una risposta completa e che non ha effetti sulla sopravvivenza, lo rende attualmente adatto ad una terapia prevalentemente palliativa, con somministrazioni giornaliere fino al raggiungimento di una risposta massima o al sopraggiungere di effetti tossici. Gli steroidi non hanno dimostrato un effetto rilevante sulla sopravvivenza mentre sono ben noti i loro effetti avversi, in particolare nel favorire le

infezioni opportunistiche. Tuttavia, essi sono utilizzati per contenere le complicanze autoimmuni della malattia (66).

Negli anni passati, sulla base delle esperienze nel campo dei linfomi a basso grado, si è tentato di utilizzare combinazioni di chemioterapici quali CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina, Prednisone) o COP (Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone); sebbene essi diano con elevata frequenza risposte complete, non hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza a fronte, peraltro, di una maggiore tossicità. Attualmente rappresentano un'opzione utilizzabile nei pazienti ad alto rischio che richiedono un'azione terapeutica energica (67-68).

Dalla metà degli anni ottanta il trattamento di prima scelta per gran parte dei casi di LLC-B è rappresentato dall'uso degli analoghi delle purine. In questa classe di farmaci sono annoverati la Pentostatina, la 2-cloro-desossi-adenosina (Cladribina) e la Fludarabina; il primo è un inibitore della adenosina deaminasi, mentre gli altri due agiscono come inibitori della DNA-polimerasi. Tra questi, quello che si è dimostrato più efficace nella LLC-B è la Fludarabina (25-30 mg/m² per 5 giorni al mese, per 3-6 mesi). Essa, utilizzata singolarmente, è in grado di dare una risposta globale nell'80% dei casi e una risposta completa nel 30% dei casi; inoltre, rispetto al Clorambucile più Prednisone, la durata delle remissioni raggiunte è maggiore. Gli effetti collaterali sono prevalentemente dovuti alla mielosoppressione (69). Nonostante i positivi effetti in termini di risposta globale, la Fludarabina e gli altri analoghi delle purine non si sono dimostrate altrettanto efficaci nel migliorare il tasso di sopravvivenza rispetto al Clorambucile o agli agenti alchilanti (70-73). Attualmente si ritiene che gli analoghi delle purine possano avere un'azione sinergica con gli alchilanti, impedendo la riparazione dei danni da questi inflitti al DNA delle cellule leucemiche (74). Sulla base di questo presupposto sono stati condotti alcuni trial 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%) e un aumento della sopravvivenza libera da malattia (31,6 vs 19,2 mesi). Di contro, la combinazione dei due farmaci ha comportato una maggiore tossicità midollare, con maggior incidenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia, senza che questo determinasse un aumento di complicanze infettive (75).

Un ulteriore passo in avanti è stato compiuto con l'introduzione della immunoterapia, cioè l'uso di anticorpi monoclonali (AcMo) diretti contro antigeni di superficie delle cellule leucemiche. Il Rituximab è un AcMo chimerico diretto contro il CD20, un antigene espresso su tutti i linfociti B, ma che nella LLC-B è caratteristicamente espresso a bassa intensità. Per questo motivo il Rituximab possiede solo una modesta attività se utilizzato singolarmente. Tuttavia, studi preclinici hanno evidenziato la capacità del Rituximab di aumentare l'efficacia di farmaci citotossici in linee cellulari resistenti, alterando la trasmissione dei segnali antiapoptotici; un esempio di come ciò avvenga è il blocco da parte del farmaco del recettore per IL-10 che inibisce l'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 (76-77). Inoltre si è osservato che la Fludarabina è in grado di aumentare l'efficacia del Rituximab nell'indurre la lisi cellulare mediata dal complemento, attraverso la "down-regulation" cellulare delle proteine regolatorie del complemento CD55 e CD59 (78). L'associazione del Rituximab alla Fludarabina e alla Ciclofosfamida è stata valutata in alcuni studi sia come terapia iniziale sia nei casi recidivanti o refrattari a terapie precedenti. In entrambe le situazioni, essa ha dimostrato un miglioramento del tasso di risposte globali e complete, queste ultime documentate anche a livello molecolare. Nei pazienti mai trattati precedentemente, la sopravvivenza libera da malattia si è rivelata superiore a quattro anni in circa i due terzi dei pazienti (79-80). Gli effetti avversi del Rituximab sono essenzialmente correlati all'infusione endovenosa, a causa del rilascio di citochine (febbre, brividi, ipotensione, nausea); essendo più comuni alla prima infusione, si possono contenere adottando inizialmente dosi ridotte, per poi aumentarle gradualmente.

Il Campath-1H (alemtuzumab) è un AcMo diretto contro il CD52, espresso nel 95% dei linfociti umani, nei monociti e nei macrofagi. Può essere somministrato per via sottocutanea. Si è dimostrato molto efficace nell'indurre remissione nei pazienti con LLC-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 (81). Tuttavia, esso può provocare una immunosoppressione marcata, per cui è necessaria una terapia di profilassi per l'infezione da *Pneumocystis carinii* e virus zoster della varicella, oltre al monitoraggio della riattivazione del citomegalovirus. L'associazione con Fludarabina e Ciclofosfamide è gravata da importante tossicità midollare, evento che comporta una particolare precauzione in termini di tempistica e durata di somministrazione dell'alemtuzumab. (82).

Gli studi sulla patogenesi della LLC-B hanno offerto altri bersagli terapeutici; uno di questi è la proteina antiapoptotica Bcl-2, che, nei pazienti in cui risulta espressa, si associa alla resistenza ai farmaci comunemente utilizzati. Un recente trial clinico randomizzato di fase III ha valutato l'efficacia dell'Oblimersen, un oligonucleotide antisense che, legandosi all'mRNA di Bcl-2, ne inibisce la traduzione, associato a Fludarabina e Ciclofosfamide. Esso si è dimostrato efficace nel migliorare la percentuale di risposte globali e complete nei pazienti refrattari o recidivanti esaminati, rispetto alla sola associazione di Fludarabina e Ciclofosfamide (83).

Il trapianto di cellule staminali è un'opzione possibile ma ancora non ben definita. Il trapianto autologo ha un alto tasso di risposte complete, ma è gravato da un'elevata probabilità di recidiva e sono necessari ulteriori studi che ne confrontino il rapporto rischio-beneficio rispetto alla chemioterapia. L'allogtrapianto è indicato nei pazienti refrattari in stadio avanzato ma, pur essendo l'unica strategia potenzialmente in grado di guarire dalla malattia, è fortemente limitato dall'età del paziente, che non può essere superiore ai 45 anni (84-85) (Figura 9).

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

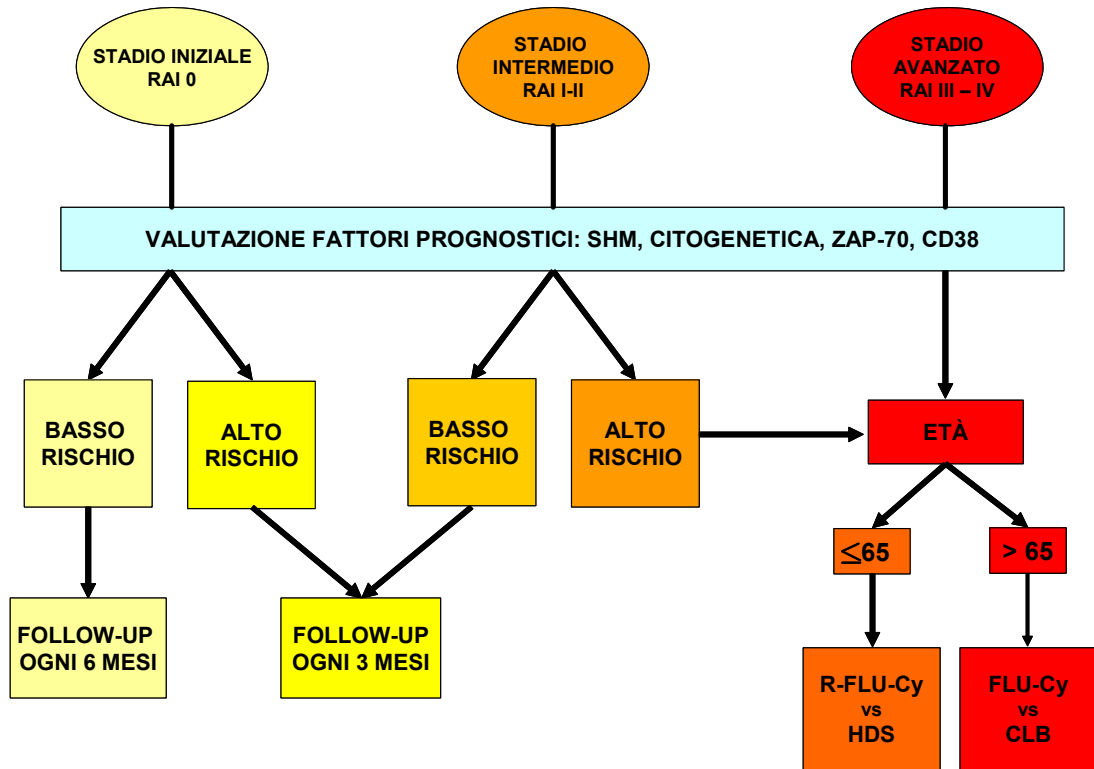


Figura 9. Possibile schema decisionale per il trattamento della LLC.

R-FLU-Cy: Rituximab, Fludarabina, Ciclofosfamide

HDS: chemioterapia ad alte dosi

CLB: Clorambucile

2. SCOPO DELLA TESI

Sebbene la leucemia linfatica cronica a cellule B sia generalmente considerata una neoplasia indolente a prognosi favorevole, l'esperienza clinica ha dimostrato che in realtà una parte dei pazienti presenta un andamento clinico aggressivo e difficilmente controllabile con le usuali opzioni terapeutiche. Per questo motivo, poter fornire al paziente ed al medico una stima attendibile del futuro andamento della malattia è importante al fine di pianificare l'approccio terapeutico più efficace. In questi ultimi anni sono stati sviluppati fattori prognostici "innovativi", legati alla biologia delle cellule leucemiche: lo stato mutazionale delle catene pesanti delle immunoglobuline, le alterazioni cromosomiche, l'espressione di proteine quali CD38, CD305 e ZAP-70. In particolare, la proteina ZAP-70 è uno dei fattori prognostici più recenti e non ancora chiaramente definiti.

In questa tesi di dottorato ci siamo proposti di:

- identificare e standardizzare un metodo citofluorimetrico adatto alla corretta valutazione dell'espressione della tirosin chinasi ZAP-70. A questo proposito sono stati considerati:
 - a) il metodo di analisi;
 - b) il problema del valore soglia;
 - c) la metodica di marcatura (uso di anticorpi diversi);
- valutare l'espressione del nuovo fattore prognostico CD305.
- studiare, su un campione di 247 pazienti afferenti al nostro centro di Ematologia e Immunologia Clinica, il valore prognostico di alcuni di questi nuovi fattori tra cui SHM, CD305, CD38, ZAP-70 e di stabilire l'esistenza di eventuali correlazioni tra di essi al fine di comprendere se le informazioni che forniscono siano sovrapponibili o, al contrario, mantengano un valore indipendente.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione studiata

In questa tesi sono stati analizzati 247 pazienti affetti da LLC-B, afferenti all'Unità Operativa di Ematologia e Immunologia Clinica (dir.: Prof. G. Semenzato) del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Padova. Di questi pazienti, 143 (58%) erano maschi e 104 (42%) femmine. Il 5% dei pazienti presentava sintomi di tipo B alla diagnosi.

Tutti i pazienti studiati presentavano una leucocitosi con un numero di globuli bianchi compreso tra 6.400 e 189.000/ μL ed una percentuale di linfociti compresa tra il 9% ed il 94%. La percentuale di cellule leucemiche caratterizzata dalla coespressione dei marcatori CD5 e CD19 era compresa tra il 9% ed il 98%.

Oltre ai pazienti, sono stati analizzati 37 soggetti sani (12 maschi e 25 femmine), con un'età compresa tra i 22 ed i 54 anni, un numero di globuli bianchi compreso tra 4.500 e 8.300/ μL .

3.2 Analisi citofluorimetrica

La determinazione dell'espressione dei marcatori antigenici, ed in particolare della proteina ZAP-70, nei linfociti ottenuti dal sangue periferico dei pazienti e dei soggetti sani, è stata eseguita tramite analisi citofluorimetrica.

La citometria a flusso è una tecnica che consente la valutazione multiparametrica delle caratteristiche antigeniche di singole cellule in sospensione, attraverso misure di tipo ottico e sfruttando fenomeni di diffusione della luce e di fluorescenza. I dati che si ricavano sono sia di tipo qualitativo che quantitativo. Lo strumento impiegato è stato un analizzatore FACSCalibur e i dati sono stati processati usando il programma CellQuest (BD Biosciences, Milano, IT).

Il sistema FACSCalibur è un citometro automatizzato con cella a flusso, che per svolgere le sue funzioni necessita di:

- un sistema fluidico che convoglia le cellule al punto di misura;
- un sistema ottico che genera e raccoglie i segnali luminosi;
- un sistema elettronico che converte i segnali ottici in segnali elettrici (impulsi di voltaggio) per digitalizzarli ed analizzarli per mezzo di un computer.

Il numero di parametri che possono essere valutati contemporaneamente dipende dal numero di sensori disponibili, consistenti in un fotodiodo per *forward scatter* (FSC o diffusione frontale della luce, proporzionale alle dimensioni cellulari) ed in fotomoltiplicatori per *side scatter* (SSC o diffusione laterale della luce, che è proporzionale alla complessità cellulare) e per i segnali di fluorescenza. Le cellule in sospensione, marcate con sostanze fluorescenti, vengono fatte passare attraverso un capillare. All'interno del capillare le cellule scorrono in flusso laminare e vengono illuminate da una sorgente luminosa che consiste in un laser ad argon a bassa potenza, raffreddato ad aria, che emette a $\lambda=488\text{nm}$ ed un secondo laser ad elio che emette a $\lambda=635\text{nm}$. Le cellule così eccitate emettono segnali nella luce visibile e segnali di fluorescenza, che sono convertiti in impulsi elettrici rappresentati graficamente in computer (Figura 10).

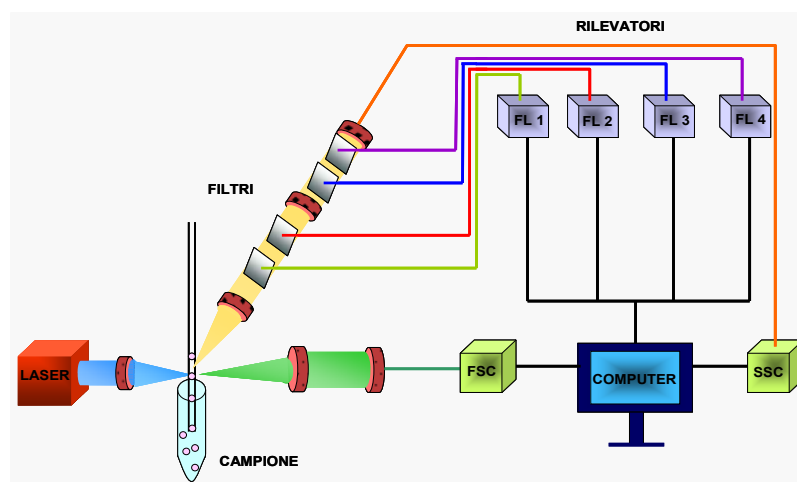


Figura 10. Schema dei componenti principali del citofluorimetro. I linfociti del sangue periferico sono stati sottoposti ad analisi immunofenotipica tramite l'utilizzo di un citofluorimetro. Le cellule, disposte in flusso laminare, vengono colpite singolarmente dal raggio laser. Ciò dà origine ad un segnale fluorescente captato dal sensore, filtrato e convertito in un valore digitale elaborato in modo da ottenere informazioni su volume, complessità cellulare e marcatore esaminato. FSC: forward scatter; SSC: side-scatter; FL: fluorescenza

Le tecniche di fluorescenza sono basate sull'impiego di uno o più fluorocromi, legati in modo covalente agli anticorpi monoclonali (AcMo), utilizzati per riconoscere strutture antigeniche sulla superficie o all'interno delle cellule. La presenza di uno specifico antigene viene perciò rilevata ed utilizzata come indicatore dell'appartenenza di una cellula ad una data linea cellulare, nonché del suo livello maturativo.

I segnali di fluorescenza originano dall'eccitazione dei fluorocromi. Per questa tesi abbiamo impiegato l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) che emette un segnale di fluorescenza a 530nm (verde), Alexa Fluor 488 che emette a 415nm (verde), il fluorocromo ficoeritrina (PE) che emette a 585nm (rosso), il fluorocromo ficoeritrina cianina 5 (PE-Cy5) che emette a 670nm (rosso intenso) ed il fluorocromo alloficocianina (APC) che, a differenza delle altre fluorescenze, viene eccitato da un secondo laser ad Elio con $\lambda=635\text{nm}$, ed emette a 660nm.

Oltre agli AcMo specifici per il marcatore ricercato, l'analisi citofluorimetrica non può essere correttamente condotta senza l'utilizzo di un controllo isotipico. Il controllo isotipico è un AcMo della stessa sottoclasse dell'AcMo specifico per il marcatore ricercato, e si lega in maniera aspecifica a tutta una serie di siti di legame presenti nel campione. Rappresenta la quota di fluorescenza corrispondente ai legami aspecifici che deve essere sottratta ai dati di fluorescenza ottenuti dagli AcMo specifici per il marcatore ricercato. Il campione in cui viene utilizzato il controllo isotipico deve essere processato allo stesso modo del campione utilizzato per la ricerca del marcatore di interesse.

I linfociti periferici sono stati caratterizzati utilizzando un pannello di AcMo rivolti verso gli Ag CD3, CD5, CD19 e CD38 (BD Biosciences).

Per l'analisi dell'espressione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 sono stati utilizzati i seguenti AcMo: anti-ZAP70 Alexa Fluor 488, IgG1 Alexa Fluor 488 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-ZAP70 PE, IgG1 PE (Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA), anti-ZAP70 FITC (Upstate cell signaling solution, Lake Placido, NY, USA),

IgG2a FITC, anti-CD5 FITC, anti-CD5 PE, anti-CD3 PE-Cy5 ed anti-CD19 APC (BD Biosciences).

3.2.1 Preparazione dei campioni di sangue periferico per la determinazione citofluorimetrica della tirosin chinasi ZAP-70

La processazione dei campioni di sangue periferico dei pazienti affetti da LLC-B e dei soggetti sani da sottoporre ad analisi citofluorimetrica avviene tramite un'iniziale incubazione con AcMo rivolti verso gli Ag di superficie che permettono di riconoscere la popolazione di linfociti B patologici (CD19+/CD5+) ed i linfociti T (CD3+). Il processo che permette la determinazione della tirosin chinasi ZAP-70 ("marcatura"), proteina intracitoplasmatica, avviene tramite un'iniziale fissazione e permeabilizzazione dei linfociti periferici alle quali segue un'incubazione con AcMo rivolti verso la proteina ZAP-70. Al fine di individuare l'AcMo con maggior efficienza nella rilevazione della tirosin chinasi ZAP-70, per l'analisi citofluorimetrica sono stati utilizzati quattro diversi AcMo anti-ZAP70:

- i. clone 1E7.2, rivolto verso un epitopo interno al dominio tirosinchinasico di ZAP-70 (amminoacidi 282-307) prodotto da Caltag Laboratories e denominato AcMo IgG1 anti-ZAP70 Alexa Fluor 488, per il quale è stato utilizzato come controllo isotipico l'AcMo IgG1 Alexa Fluor 488 prodotto dalla stessa ditta;
- ii. clone 2F3.2, rivolto verso i due domini SH2 di ZAP-70 (amminoacidi 1-254) prodotto da Upstate Cell Signaling Solution e denominato AcMo IgG2a anti-ZAP70 FITC, per il quale è stato utilizzato come controllo isotipico l'AcMo IgG2a FITC (BD Biosciences);
- iii. clone SBZAP, rivolto verso l'interdominio A (amminoacidi 280-309) prodotto da Beckman Coulter e denominato AcMo IgG1 anti-ZAP70 PE-BC, per il quale è stato utilizzato come controllo isotipico l'AcMo IgG1 PE della stessa ditta.

- iv. clone 1E7.2, rivolto verso l'interdominio A (amminoacidi 282-307) prodotto da BD Bioscience e denominato AcMo IgG1 anti-ZAP70 PE-BD, per il quale è stato utilizzato come controllo isotipico l'AcMo IgG1 PE della stessa ditta

Per ogni campione sono state allestite due provette da 5mL: una per la marcatura con AcMo anti-ZAP70 e una per il controllo isotipico. Per la marcatura di superficie dei linfociti periferici è stata preparata, in entrambe le provette, una miscela di:

- 5µL di AcMo anti-CD5 (l'AcMo era coniugato al fluorocromo PE in caso di utilizzo degli AcMo anti-ZAP70 clone 1E7.2 e clone 2F3.2 mentre era coniugato al fluorocromo FITC in caso di utilizzo dell'AcMo anti-ZAP70 clone SBZAP);
- 5µL di AcMo anti-CD3 PE-Cy5
- 5µL di AcMo anti-CD19 APC.

Alla miscela sono stati aggiunti 50µL di sangue periferico (od un'aliquota di campione corrispondente a 5×10^5 cellule). A questa fase è seguita un'incubazione a temperatura ambiente al buio per 15 minuti al termine della quale i campioni sono stati lavati con *phosphate buffer saline* (PBS) e centrifugati a 500g per 10 minuti. Eliminato il surnatante, i campioni sono stati trattati con 100µL di soluzione fissante (soluzione A, kit FIX&PERM, Caltag Laboratories) e messi ad incubare a temperatura ambiente al buio per 10 minuti. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati lavati in PBS e centrifugati a 500g per 10 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, i campioni sono stati trattati con 100µL di soluzione permeabilizzante (soluzione B, kit FIX&PERM, Caltag Laboratories).

1 Protocollo AcMo anti-ZAP70 clone 1E7.2

Per la determinazione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 sono stati aggiunti 5µL di AcMo anti-ZAP70 Alexa Fluor 488 clone 1E7.2 e 5µL di AcMo IgG1 Alexa Fluor 488 nelle rispettive provette (una per la marcatura con AcMo anti-ZAP70 e una per il controllo isotipico) e i campioni sono stati vorticati. L'incubazione è avvenuta a

temperatura ambiente al buio per 20 minuti a seguito della quale i campioni sono stati trattati con soluzione NH_4Cl 0,15M per la lisi dei globuli rossi. I campioni sono stati poi centrifugati a 500g per 10 minuti e risospesi in PBS previa eliminazione del surnatante. Il campione è pronto per essere esaminato al citofluorimetro.

2 Protocollo AcMo anti-ZAP70 clone 2F3.2

Per la determinazione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 sono stati aggiunti $1\mu\text{L}$ di AcMo anti-ZAP70 FITC clone 2F3.2 e $5\mu\text{L}$ di AcMo IgG2a FITC nelle rispettive provette (una per la marcatura con AcMo anti-ZAP70 e una per il controllo isotipico) e i campioni sono stati vorticati. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente al buio per 20 minuti a seguito della quale i campioni sono stati trattati con soluzione NH_4Cl 0,15M per la lisi dei globuli rossi. I campioni sono stati poi centrifugati a 500g per 10 minuti e risospesi in PBS previa eliminazione del surnatante. A questo punto il campione è così pronto per essere esaminato al citofluorimetro.

3 Protocollo AcMo clone SBZAP

Per la determinazione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 sono stati aggiunti $5\mu\text{L}$ di AcMo anti-ZAP70 PE clone SBZAP e $5\mu\text{L}$ di AcMo IgG1 PE nelle rispettive provette (una per la marcatura con AcMo anti-ZAP70 e una per il controllo isotipico) e i campioni sono stati vorticati. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente al buio per 20 minuti a seguito della quale i campioni sono stati trattati con soluzione NH_4Cl 0,15M per la lisi dei globuli rossi. I campioni sono stati poi centrifugati a 500g per 10 minuti e risospesi in PBS previa eliminazione del surnatante. A questo punto il campione è pronto per essere analizzato al citofluorimetro.

4 Protocollo AcMo clone 1E7.2

Per la determinazione intracitoplasmatica della proteina ZAP-70 sono stati aggiunti 10 μ L di AcMo anti-ZAP70 PE clone 1E7.2 e 5 μ L di AcMo IgG1 PE nelle rispettive provette (una per la marcatura con AcMo anti-ZAP70 e una per il controllo isotipico) e i campioni sono stati vorticati. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente al buio per 20 minuti a seguito della quale i campioni sono stati trattati con soluzione NH₄Cl 0,15M per la lisi dei globuli rossi. I campioni sono stati poi centrifugati a 500g per 10 minuti e risospesi in PBS previa eliminazione del surnatante. A questo punto il campione è pronto per essere analizzato al citofluorimetro.

3.2.2 Analisi citofluorimetrica di ZAP-70

Per l'analisi sono stati acquisiti 30.000 eventi per ogni campione. Le intensità di fluorescenza dei singoli eventi ottenute dall'acquisizione vengono visualizzate graficamente, tramite il programma CellQuest (BD Biosciences), sotto forma di citogrammi nei quali sono rappresentate le caratteristiche fisiche (FSC e SSC) e le caratteristiche antigeniche (intensità di fluorescenza relative agli AcMo utilizzati) delle cellule analizzate.

Tramite l'utilizzo dei citogrammi l'analisi dell'espressione della tirosin chinasi ZAP-70 è stata effettuata sfruttando due differenti criteri di *gating* a seconda che il campione fosse di un paziente affetto da LLC-B o di un soggetto sano:

- l'analisi dell'espressione della proteina ZAP-70 nei campioni dei soggetti malati è stata effettuata tramite la creazione di un *gate immunologico* che focalizza l'analisi sulle cellule coesprimenti gli Ag di superficie CD19 e CD5, corrispondenti alla popolazione B patologica (Figura 11);

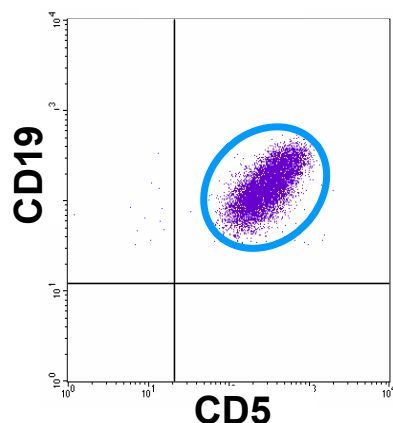


Figura 11. Popolazione leucemica CD5+/CD19+. Le cellule leucemiche, coesprimenti le molecole CD5 e CD19, sono state selezionate tramite la creazione di un *gate immunologico*

- nei campioni dei soggetti sani l'analisi è stata eseguita tramite la creazione di un *gate immunologico* ristretto alle cellule esprimenti l'Ag di superficie CD19, corrispondenti alla popolazione B normale (Figura 12).

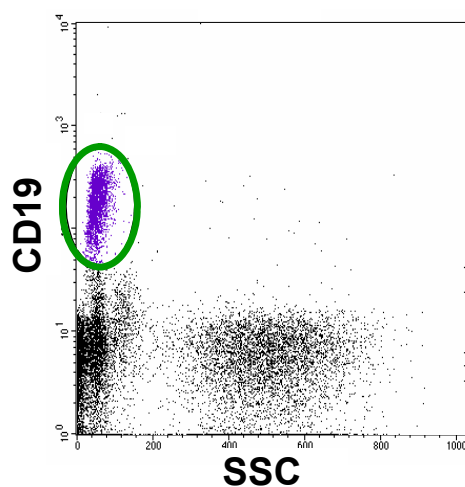


Figura 12. Popolazione di linfociti CD19+. I linfociti B dei soggetti sani sono stati selezionati tramite la creazione di un *gate immunologico* sulle cellule esprimenti CD19.

Raccolti i dati grezzi di espressione, l'analisi per la quantificazione definitiva della proteina ZAP-70 è stata elaborata attraverso 2 metodi: il metodo del controllo isotopico ed il metodo raziometrico.

1 Il metodo del controllo isotipico

Il metodo del controllo isotipico è stato utilizzato per la prima volta nel 2004 da JA Orchard e collaboratori (86) che hanno effettuato l'analisi della tirosin chinasi ZAP-70 tramite la sovrapposizione di istogrammi. L'istogramma ottenuto dai segnali di fluorescenza dell'AcMo anti-ZAP70, provenienti dalla popolazione selezionata (Figura 13A) viene sovrapposto all'istogramma prodotto dai segnali di fluorescenza dell'AcMo del controllo isotipico. A seguito della sovrapposizione grafica l'operatore fissa un *marker* (M1) nel punto di intersezione dei due istogrammi (Figura 13B). Si possono così valutare le aree sottese dai due istogrammi a destra del *marker*: la differenza tra l'area sottesa dalla curva relativa all'AcMo anti-ZAP70 e l'area sottesa dalla curva relativa all'AcMo del controllo isotipico corrisponde alla percentuale di espressione di ZAP-70 (rispetto al controllo isotipico, Figura 13C).

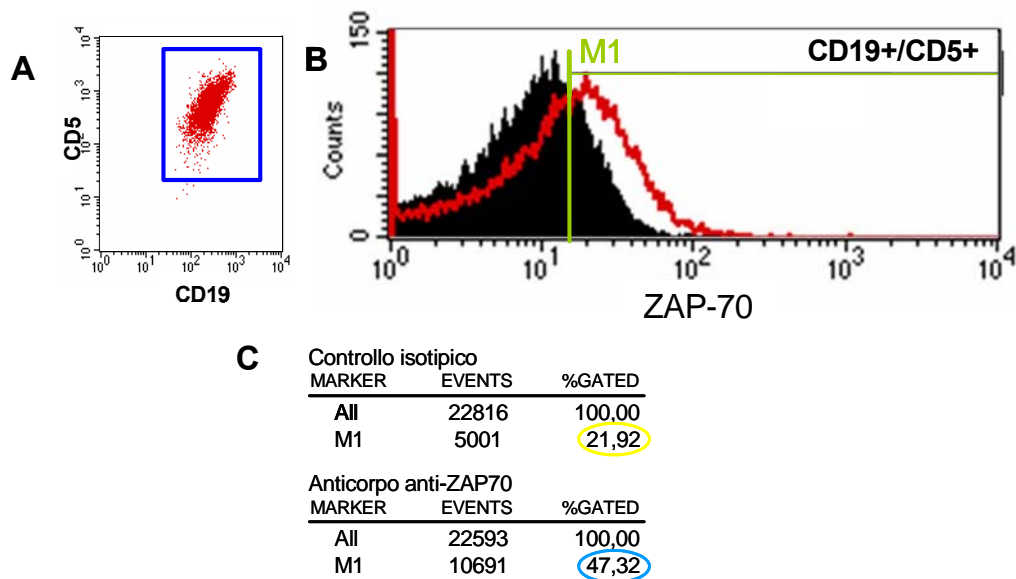


Figura 13. Metodo del controllo isotipico. **A.** Le cellule leucemiche, coesprimenti CD19 e CD5, sono state evidenziate tramite la creazione di un *gate immunologico*. **B.** L'operatore pone un marcatore a livello dell'intersezione tra l'istogramma rappresentante le intensità di fluorescenza del controllo isotipico (in nero) e l'istogramma rappresentante le intensità di fluorescenza dell'AcMo anti-ZAP70 (in rosso). **C.** La percentuale di espressione di ZAP-70 rispetto al controllo isotipico (pari a 25,40 nell'esempio) è rappresentata dalla differenza tra l'area sottesa da M1 per l'istogramma dell'AcMo anti-ZAP70 (47,32 nell'esempio) e l'area sottesa da M1 per l'istogramma del controllo isotipico (21,92 nell'esempio).

Il valore soglia indicato per il metodo del controllo isotipico (86) è pari al 30%: si definiscono quindi ZAP-70 positivi i linfociti B con un livello di espressione della proteina $\geq 30\%$ e ZAP-70 negativi quelli con un livello di espressione $< 30\%$.

2 Il metodo raziometrico

Questo metodo per la determinazione della tirosin chinasi ZAP-70 è stato proposto per la prima volta nel 2006 da AC Bakke e collaboratori (87). Il metodo raziometrico si basa sul confronto del livello di espressione della tirosin chinasi ZAP-70 nelle cellule B leucemiche, coesprimenti CD5 e CD19, rispetto al livello di espressione nelle cellule T CD3+ dello stesso soggetto, nelle quali la proteina ZAP-70 è normalmente espressa ad alti livelli (Figura 14A). Il confronto viene effettuato con l'utilizzo degli istogrammi ottenuti dai segnali di fluorescenza dell'AcMo anti-ZAP 70 (Figura 14B). In questo caso, l'intensità media di fluorescenza (MFI) relativa al segnale ottenuto dalle cellule B leucemiche (o dalle cellule B dei soggetti sani), identificate in seguito alla definizione di un *gate immunologico* viene rapportata all'MFI del segnale ottenuto dalle cellule T, identificate in seguito alla definizione di un *gate immunologico* che individua le cellule CD3+. Il rapporto tra la MFI ottenuta dalle cellule B e la MFI ottenuta dalle cellule T (*MFI ratio*) corrisponde all'intensità di espressione della tirosin chinasi ZAP-70 rispetto alle cellule T (Figura 14C). Il *cut-off* proposto in letteratura per il metodo del controllo raziometrico (87) è pari a 0,30: si definiscono quindi ZAP-70 positivi i campioni con una *MFI ratio* $\geq 0,30$ e ZAP-70 negativi i campioni con una *MFI ratio* $< 0,30$.

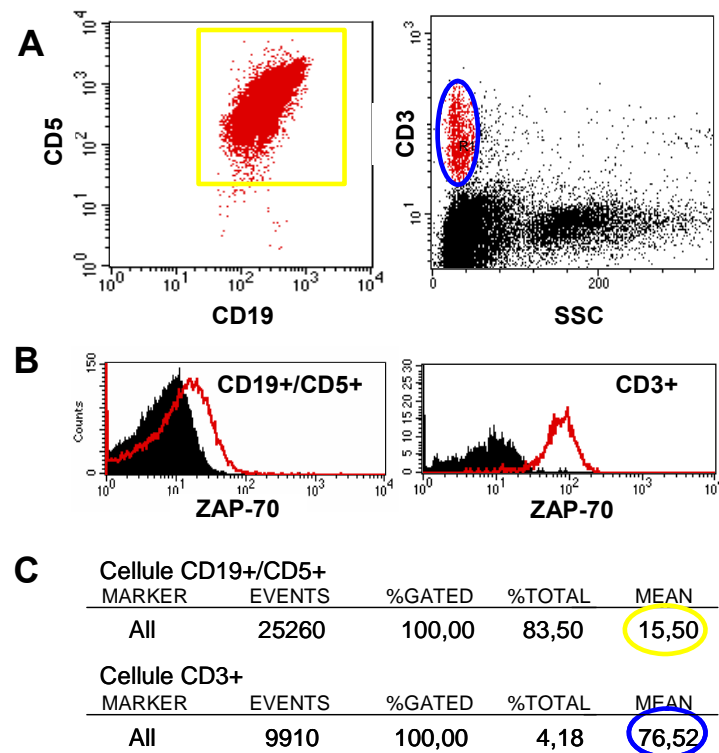


Figura 14. Metodo raziometrico. **A.** Le cellule leucemiche sono state evidenziate tramite la creazione di un *gate immunologico* sulle cellule CD19+/CD5+ (in giallo), le cellule T tramite la creazione di un *gate immunologico* sulle cellule CD3+ (in blu). **B.** Istogrammi relativi all'espressione della proteina ZAP-70 (in rosso) rispetto al controllo isotipico (in nero) nelle cellule B leucemiche e nelle cellule T residue del paziente. **C.** L'intensità di espressione della proteina ZAP-70 nelle cellule leucemiche rispetto all'intensità di espressione nelle cellule T pari a 0,20, è ottenuta dal rapporto tra la MFI ottenuta dalle cellule leucemiche (15,50 nell'esempio) e la MFI ottenuta dalle cellule T (76,52 nell'esempio).

3.2.3 Analisi citofluorimetrica di CD38 e CD305

Gli AcMo utilizzati per l'analisi citofluorimetrica di CD38 sono stati anti-CD38 PE e anti-CD19 APC (Becton Dickinson). Per l'analisi del CD305 sono stati usati anti-CD305 PE, anti-CD5 FITC e anti-CD19 APC (Becton Dickinson). Per entrambi l'analisi viene condotta con gate immunologico sulle cellule CD19+/CD5+, che permette di individuare i linfociti B patologici sui quali si valuterà l'espressione di CD38 (Figura 15 I) e del CD305 (Figura 15 II).

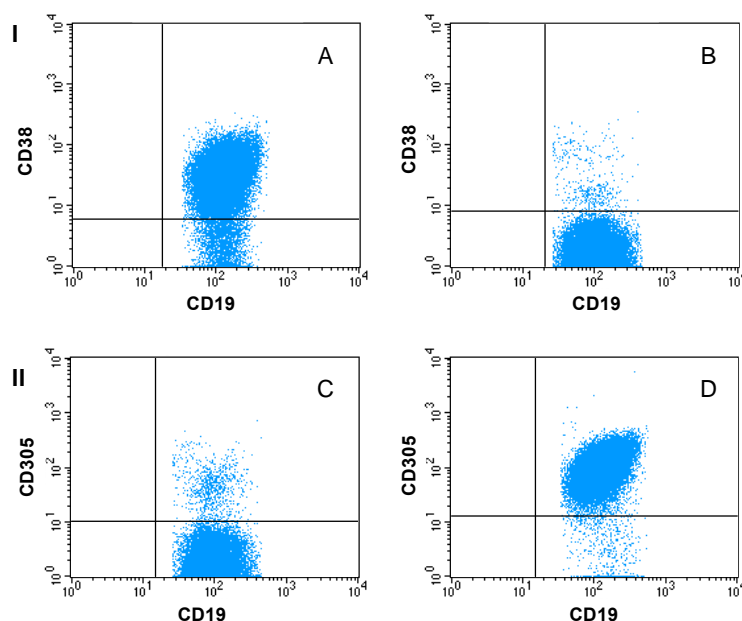


Figura 15. Pannelli di espressione di CD38 e di CD305. I Citogrammi relativi all'analisi di CD38; sono rappresentati un caso di LLC positivo (pannello A) ed uno negativo (pannello B). II Citogrammi relativi all'analisi di CD305; sono rappresentati un caso di LLC negativo (pannello C) ed uno positivo (pannello D).

3.3 Separazione delle cellule mononucleate dal sangue periferico

I linfociti dei pazienti affetti da LLC-B sono stati isolati da sangue periferico. La separazione delle cellule mononucleate avviene mediante diluizione del sangue in rapporto 1:3 con soluzione di NaCl allo 0,9% e stratificazione su Ficoll-Hypaque (F/H; Amersham GE, Healthcare Bio Science, Uppsala Svezia); successivamente si centrifuga a 2.200 rpm, a 20°C, per 20 minuti, senza freno, e si ottiene la separazione delle cellule mononucleate e delle piastrine, che si dispongono sopra lo strato di F/H, mentre granulociti e globuli rossi si depositano sul fondo del provettone. L'anello di cellule mononucleate così ottenuto viene prelevato e lavato due volte con soluzione di NaCl allo 0,9% mediante centrifugazione a 1600 rpm, a 20°C, per 10 minuti, con freno. Il sovrantante viene eliminato, il fondello viene sottoposto a lavaggi successivi e risospeso infine nel terreno di coltura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), con l'aggiunta di 20 mM di HEPES e di L-glutamina, 100 U/ml di penicillina, 100 g/ml di streptomina e 10% di siero fetale di vitello (FCS) (ICN Flow, Costa Mesa, CA, USA). Per l'esecuzione delle analisi molecolari le cellule

ottenute sono state risospese nel buffer RLT dell'RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) addizionato di β -mercaptoetanol, necessario per la successiva estrazione dell'RNA totale. Il campione così ottenuto è stato conservato a -80°C .

3.3.1 Isolamento dei linfociti B da sangue periferico

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

Il sangue periferico è stato prima diluito in rapporto 1:6 con sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente, a causa dell'elevato numero di linfociti caratteristico di questo tipo di patologia, ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si è proceduto con una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C , senza freno. Quindi l'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia con il F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica per eliminare gli elementi contaminanti. La sospensione di cellule mononucleate è stata centrifugata a 400g per 10 minuti a 20°C con freno, ed il fondello è stato risospeso in una quantità adeguata di soluzione fisiologica. Le cellule sono state contate nella camera di Burker.

Nella maggioranza dei casi di LLC da noi analizzati la percentuale di cellule B leucemiche era superiore all'85% delle *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC); nei casi in cui la popolazione cellulare presentava una percentuale di linfociti T superiore al 15%,

abbiamo proceduto alla purificazione dei linfociti B tramite rosettazione con globuli rossi di montone (SRBC) trattati con neuroaminidasi. La rosettazione permette di rimuovere i linfociti T dalle altre cellule mononucleate, utilizzando la loro peculiare capacità di legarsi e formare rosette con i SRBC. I globuli rossi di montone, infatti, presentano sulla loro superficie il recettore specifico per il marcatore CD2 presente sulla superficie dei linfociti T; il trattamento con neuroaminidasi degli SRBC rende più accessibile il recettore al legame con il CD2.

Aliquote da 2×10^7 di cellule mononucleate sono state trasferite in un tubo da centrifuga da 10ml. Sono stati aggiunti 1ml di SRBC trattati con neuroaminidasi e, cellule e globuli, sono stati incubati per 25 minuti a 37°C . Sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti a 200g senza freno ed è seguita poi un'incubazione per 30 minuti a 4°C . Dopo questa incubazione è stato aspirato il sovrantante ed è stato aggiunto terreno di coltura RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, UK). La miscela è stata risospesa delicatamente, successivamente stratificata sopra la soluzione di F/H e centrifugata a 4°C per 20 minuti a 900g senza freno: i linfociti T circondati dai globuli rossi di montone, definiti "rosette", si collocano sul fondo della provetta, avendo una densità superiore a quella dello strato di F/H, mentre le cellule mononucleate non-T (monociti e linfociti B) si concentrano al di sopra dello strato di F/H. Lo strato presente all'interfaccia, che contiene cellule non-T, è stato trasferito in una provetta da 10ml. Sono stati eseguiti due lavaggi con soluzione fisiologica a 400g per 10 minuti a 20°C con freno e, al termine, le cellule sono state risospese in fisiologica e contate nella camera di Burker.

Un ulteriore arricchimento dei linfociti B è stato ottenuto rimuovendo le cellule mononucleate esprimenti CD14 e CD16 tramite microbiglie coniugate ad AcMo anti-CD14 e anti-CD16 umani e colonne di separazione magnetiche (Miltenyi Biotechnology, Bergisch Gladbach, Germany). Dopo questa procedura di selezione, più del 98% della popolazione cellulare è risultata composta da linfociti B CD19+.

3.4 Analisi dell'espressione proteica

3.4.1 Preparazione dei lisati cellulari

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

- Tris-HCl 50mM pH 6,8;
- EDTA 5mM;
- Glicerolo 10%;
- Sodio dodecil solfato (SDS) 2%;
- β -mercaptoetanolo 1%;
- colorante (blu di bromofenolo o pironina).

Successivamente tali lisati sono stati agitati al vortex, fatti bollire per 5 minuti e sottoposti a SDS/PAGE (Sodio Dodecil Solfato/Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide).

3.4.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

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

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

- gel superiore o impaccatore (*stacking gel*) a pH 6,8, che serve a concentrare le proteine del campione in modo che siano tutte allineate quando comincia la corsa elettroforetica;
- gel inferiore o di separazione (*running gel*) a pH 8,8, nel quale avviene la vera e propria separazione delle proteine.

Questa piastra, delle dimensioni di 8×10cm, viene fissata nell'apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham Biosciences, San Francisco, CA). La durata della corsa elettroforetica è di 2 ore a 20mA.

3.4.3 Western blotting

Il *western blotting* è un saggio immunologico in grado di rivelare tracce di una specifica proteina in una miscela eterogenea. In questo saggio le proteine antigeniche di una miscela, dopo essere state separate mediante elettroforesi monodimensionale su gel denaturante (SDS/PAGE), vengono trasferite su un filtro di nitrocellulosa in presenza di un adeguato campo elettrico, in modo da rendere più accessibile la proteina di interesse alla reazione con Ac specifico.

In dettaglio: dopo la corsa elettroforetica il gel di poliacrilammide viene fatto aderire ad una membrana di nitrocellulosa. Applicando all'apposito apparecchio una corrente di 350mA per 2 ore e 30 minuti le proteine sono state trasferite dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa. Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento era costituito da: Tris 25mM, glicina 192mM, metanolo 20% e SDS 0,1% con pH finale pari a 8,0 (tampone A). Al termine del *blotting* la membrana è stata lasciata per 30 minuti nel tampone di saturazione composto da Tris-HCl 50mM, pH 7,5 NaCl 150mM, BSA 3% (tampone B), per saturare i siti aspecifici. È stata poi incubata tutta la notte a 4°C con l'Ac primario diluito nel seguente tampone: Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM, BSA 1% (tampone C). L'AcMo

utilizzato è il clone 2F3.2 (Upstate Cell Signaling) . 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).

A questo punto la membrana è stata incubata per 30 minuti con un Ac secondario anti-IgG ottenuto contro la specie animale immunizzata per avere l'Ac primario, coniugato all'enzima perossidasi, diluito opportunamente nel tampone C (Amersham International Biotechnology, Buckinghamshire, England). Sono stati effettuati altri 3 lavaggi e successivamente la membrana è stata sottoposta alla rivelazione anticorpale con il sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL), (Amersham International Biotechnology). I reagenti (luminolo e H_2O_2) a contatto con la membrana, nella posizione dove si è legata la perossidasi e quindi in corrispondenza del complesso Ag-Ac, danno origine ad una reazione di ossidazione con emissione di luce. Sopra la membrana viene infine posta, una lastra autoradiografica, che viene impressionata dalla luce emessa. Una volta rivelata, la membrana può andare incontro ad estrazione anticorpale, una tecnica che permette la completa eliminazione degli Ac legati alle proteine nella membrana di nitrocellulosa. Per far questo la membrana è stata posta a $57^\circ C$ per 30 minuti, nell'apposito tampone di "stripping" costituito da:

- Tris-HCl 62,5mM, pH 6,7;
- SDS 2%;
- β -mercaptoetanolo 100mM.

Si è proceduto quindi come se la membrana fosse stata appena sottoposta al *blotting*: sono stati fatti tre lavaggi per allontanare completamente tutte le tracce del tampone e si è proceduto ad incubazione con un ulteriore Ac primario, dopo una saturazione di almeno un'ora.

3.5 Analisi dell'espressione delle regioni VH e determinazione delle SHM

3.5.1 Estrazione dell'RNA messaggero

L'RNA totale è stato estratto da 4×10^6 linfociti secondo il protocollo "Rneasy Mini Kit Protocol" (Qiagen), così articolato:

- 1) i linfociti vengono lisati utilizzando una soluzione contenente 350 μ l di tampone di lisi RLT e 10 μ l di β -mercaptoetanolio 14,5 M per ogni ml di RLT;
- 2) l'omogenato così ottenuto viene ulteriormente processato tramite ripetute aspirazioni con un ago da 20-G (0,9 mm di diametro); il tampone contiene guanidino isotiocianato che inattiva le ribonucleasi (Rnasi), enzimi che degradano l'RNA, assicurando così l'estrazione di RNA intatto;
- 3) si aggiungono 350 μ l di etanolo al 70% e si miscela il campione. L'etanolo determina condizioni che permettono il legame selettivo dell'RNA alle membrane delle colonnine fornite dal kit;
- 4) 700 μ l di campione vengono trasferiti in una colonnina di purificazione (fornita dal kit) e centrifugati, con successiva eliminazione dell'eluato; l'RNA presente nel campione si lega alla membrana della colonnina;
- 5) viene effettuato un lavaggio con 700 μ l di tampone RW1 e i campioni vengono nuovamente centrifugati;
- 6) si aggiungono quindi, per un secondo lavaggio, e per due volte consecutive, 500 μ l di tampone RPE, con successiva centrifugazione ed eliminazione dell'eluato;
- 7) per eluire l'RNA, si aggiungono alla colonnina, trasferita in una provetta sterile da 1,5 ml, 30 μ l di H₂O priva di Rnasi e si centrifuga per 1 minuto a 11.000 rpm.

La qualità dell'RNA estratto viene valutata caricando 2 µl di campione in un gel di agarosio all'1%, in tampone tris-acetato 1X, con bromuro di etidio al 5% e sottoponendolo per 20 minuti ad una elettroforesi a 60 V.

La quantificazione dell'acido nucleico estratto viene effettuata mediante lettura spettrofotometrica calcolando le assorbanze alle lunghezze d'onda di 260 nm, propria dei nucleotidi, e di 280 nm, propria invece delle proteine; quando il loro rapporto è inferiore a 2, significa che il campione è contaminato e non è adeguato; la concentrazione di RNA, espressa in µg/ml, è stata calcolata infine con la seguente formula:

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

dove il valore 40 corrisponde alla concentrazione di RNA in µg/ml alla quale si ottiene un'assorbanza a 260 nm pari a 1.

3.5.2 Retrotrascrizione dell'RNA messaggero in cDNA e PCR

La reazione polimerasica a catena (PCR) è una tecnica ideata da K.B. Mullis, nel 1983, che consente la sintesi di specifici tratti di DNA in un numero elevato di copie, a partire da una singola molecola di acido nucleico. Tale reazione richiede la sintesi di un filamento di DNA complementare all'RNA messaggero (cDNA), mediante retrotrascrizione: ciò avviene ad opera di una DNA polimerasi RNA-dipendente, dotata anche di attività RNAsica, ed ottenuta da AMV (Avian Myeloblastoma Virus) (Promega Corporation, Madison, NJ, USA). La miscela di reazione è così costituita:

- magnesio cloruro 25 mM,
- tampone 10X,
- miscela di desossinucleotidi trifosfati 10 mM,
- enzima inibitore dell'RNAsi 40 U/µl,
- la retrotrascrittasi 25 U/µl,

- primer Oligo-dT complementare alla catena poli-A tipica dell'estremità 3' dell'RNA messaggero eucariotico,

- acqua priva di nucleasi,

a cui si aggiunge 1 µg di RNA.

La miscela di reazione completa dell'RNA viene posta a 42°C per 15 minuti, a 99°C per 3 minuti ed infine in ghiaccio; il cDNA così ottenuto è conservato a -80°C.

La sequenza da amplificare è individuata in modo univoco da due oligonucleotidi sintetici (primer), ciascuno complementare ad una delle estremità della regione d'interesse. La reazione di PCR è articolata in tre fasi ripetute ciclicamente: la denaturazione a 94°C, in cui si separano i filamenti di DNA che fungono da stampo; l'ibridazione, a temperatura variabile, durante la quale si appaiano i primer; l'estensione, a 72°C, in cui è sintetizzata la catena dell'acido nucleico. La miscela di reazione comprende:

- i desossinucleotidi 10 mM,

- il magnesio cloruro 25 mM,

- una DNA-polimerasi termoresistente – AmpliTaq (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) – 5 U/µl,

- il tampone, che garantisce condizioni ioniche adeguate al funzionamento dell'enzima, 10x,

- i primer specifici 10 pM/L.

Tra i fattori che possono condizionare la specificità della reazione vi sono la temperatura di ibridazione dei primer, il numero di cicli, la concentrazione di ioni magnesio e di enzima.

In questa tesi sono stati utilizzati 7 primers specifici per le sette famiglie geniche della regione variabile (V_H) della catena pesante delle immunoglobuline ed un primer comune complementare alla regione costante (C_H). La PCR della regione espressa è stata ripetuta almeno 2 volte per verificare che le eventuali mutazioni, evidenziate successivamente con il

sequenziamento, non fossero la conseguenza di errori di incorporazione nucleotidica casualmente introdotti dalla Taq polimerasi.

3.5.3 Sequenziamento della regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline

Prima che i campioni ottenuti dalla PCR siano sequenziati, gli amplificati devono essere purificati dai nucleotidi non incorporati e dagli altri reagenti presenti nella miscela di reazione, attraverso la purificazione del prodotto di PCR mediante eluizione su colonnine (protocollo “QIAquick PCR purification kit” - Qiagen).

In seguito il campione viene sottoposto alle reazioni di sequenza (“cycle sequencing”), in presenza di 4 diversi didesossinucleotidi, o terminatori, marcati con altrettanti fluorocromi diversi, che in posizione 3' hanno un atomo di idrogeno anziché un gruppo ossidrilico; tale sostituzione impedisce la fase di allungamento ad opera della DNA-polimerasi: ne risulta un insieme di prodotti di polimerizzazione di varia lunghezza, che dipende dal momento in cui vengono incorporati i nucleotidi terminatori; la miscela di reazione utilizzata in questa tesi è “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” V. 1,1 (Applied Biosystems). Per ciascun campione vengono allestite due reazioni, una contenente il primer per la regione V_H ed una contenente il primer per la regione C_H. I didesossinucleotidi marcati non incorporati e gli altri reagenti delle miscele di reazione vengono allontanati mediante eluizione del prodotto attraverso le colonnine “DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator Removal” (Qiagen), secondo il protocollo fornito dal produttore. Infine il prodotto di cycle sequencing è così trattato:

- a 10 µl del campione vengono aggiunti 12 µl di Template Suppression Reagent (Applied Biosystems), che ha la funzione di mantenere denaturati i filamenti di DNA;

- la miscela viene portata a 95°C per 2 minuti, perché avvenga la denaturazione, ed infine posta in ghiaccio fino all'uso.

Il sequenziamento è stato eseguito mediante il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems); il principio di funzionamento è quello dell'elettroforesi capillare: i frammenti di DNA migrano in un polimero contenuto nel capillare, separandosi in base al peso; lo stesso capillare è fornito di una finestra ottica in corrispondenza della quale passa un raggio laser, che colpisce i fluorocromi associati ai dideossinucleotidi, inducendo fluorescenza; le radiazioni luminose vengono captate e tradotte in impulsi elettrici elaborati sottoforma di elettroferogramma.

I dati ottenuti in questa tesi sono stati elaborati con il programma DNA sequencing analysis (Applied Biosystems) ed il database (<http://joinsolver.niams.nih.gov/>) per il confronto con le sequenze germinali ed il calcolo della percentuale di mutazione.

3.6 Analisi statistica

Per valutare un parametro biologico è necessario stabilire dei valori di riferimento tramite i quali sia possibile discriminare se i dati ottenuti siano da definirsi patologici o meno. In questa tesi il *cut-off* utilizzato per l'analisi di espressione della PTK ZAP-70 è stato individuato tramite l'utilizzo di tabelle di contingenza. Le tabelle di contingenza vengono utilizzate per valutare la sensibilità e la specificità diagnostica di un test in funzione dei risultati ottenuti e dei valori soglia proposti per il test (Figura 16).

Per sensibilità diagnostica di un test si intende la capacità del metodo di individuare solo i soggetti affetti da patologia, ovvero l'incidenza di risposte positive che si ottengono applicando il test ai pazienti malati. I pazienti malati vengono precedentemente individuati in modo non equivoco con l'applicazione di un test di sicura affidabilità (*gold standard test*). La sensibilità viene indicata come la percentuale di veri positivi (VP, soggetti affetti da patologia

identificati come positivi dal test) in rapporto alla somma dei VP con i falsi negativi (FN, soggetti affetti da patologia identificati come negativi dal test), ovvero:

$$\text{Sensibilità} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

Per specificità diagnostica di un test si intende la capacità del metodo di individuare solo i soggetti sani (non affetti da patologia), ovvero l'incidenza di risposte negative che si ottengono applicando il test ai soggetti sani. Questo valore viene indicato come la percentuale di veri negativi (VN, soggetti sani identificati come negativi dal test) in rapporto alla somma dei VN con i falsi positivi (FP, soggetti sani identificati come positivi dal test), ovvero:

$$\text{Specificità} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

Sensibilità e specificità sono due caratteristiche interdipendenti, ovvero al variare dell'una cambia di conseguenza anche l'altra, in base al valore soglia stabilito.

	Soggetto affetto da PATOLOGIA	Soggetto SANO
Test POSITIVO	Veri Positivi	Falsi Positivi
Test NEGATIVO	Falsi Negativi	Veri Negativi

Figura 16. Tabella di contingenza. I dati ottenuti vengono classificati in rapporto al valore soglia utilizzato come VP, VN, FP o FN. Vengono poi calcolate la sensibilità e la specificità relative al valore soglia e vengono messe a confronto per i vari *cut-off* studiati

4. RISULTATI

4.1 Espressione della proteina ZAP-70

A) Metodo del controllo isotipico

L'espressione della proteina ZAP-70 è stata valutata in 247 pazienti affetti da LLC-B impiegando il metodo del controllo isotipico e l'AcMo anti-ZAP70 clone 1E7.2.

Utilizzando il *cut-off* di positività $\geq 30\%$ (86), 110/247 pazienti (pari al 45% dei casi esaminati) sono risultati ZAP-70 negativi; i restanti 137 pazienti (pari al 55% dei casi esaminati) sono risultati ZAP-70 positivi (Figura 17A). Impiegando questa metodica, la maggior parte dei soggetti sani (controllo) è risultata negativa per l'espressione della tirosin chinasi ZAP-70 (33/37 soggetti, pari all'89% dei controlli esaminati) mentre una minima parte esprimeva la proteina in percentuale superiore al valore soglia (4/37 soggetti, pari al 11% dei controlli esaminati, Figura 17B).

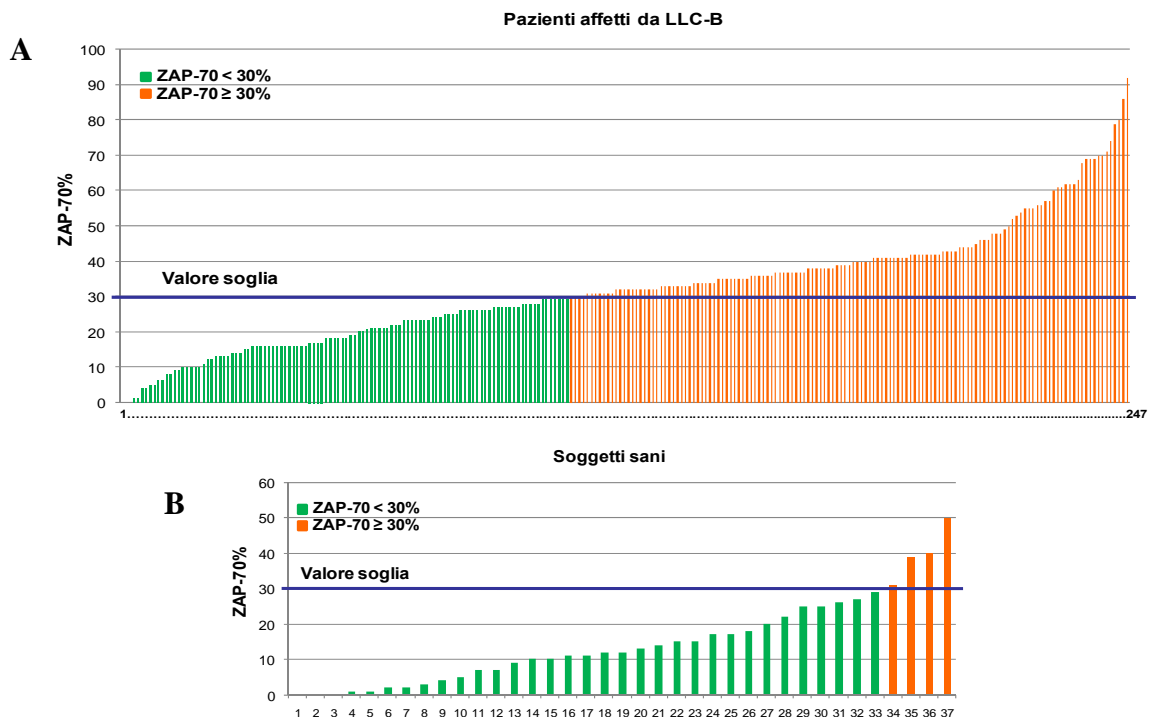


Figura 17. Metodo del controllo isotipico. A. Pazienti affetti da LLC-B. L'espressione della proteina ZAP-70 è stata valutata con l'utilizzo di un *cut-off* $\geq 30\%$. Il 45% dei pazienti è risultato ZAP-70 negativo (in verde) e il restante 55% dei pazienti è risultato ZAP-70 positivo (in arancio). **B. Soggetti sani.** Nei 37 controlli l'89% è risultato ZAP-70 negativo (in verde) mentre il 11% è risultato ZAP-70 positivo (in arancio).

Durante l'analisi dei casi con il metodo del controllo isotipico, abbiamo notato che questa metodica presentava una sensibile dipendenza dall'operatore. Tale dipendenza si manifestava in occasione dell'apposizione del *marker* in corrispondenza dell'intersezione degli istogrammi (Figura 13): questa operazione veniva condotta manualmente dall'operatore ed anche minimi spostamenti nell'apposizione del *marker* producevano risultati sensibilmente diversi, rendendo la valutazione dell'espressione della tirosin chinasi ZAP-70 particolarmente problematica nei casi in cui i valori di espressione fossero vicini al valore soglia.

B) Metodo raziometrico

L'espressione della proteina ZAP-70 è stata valutata in 247 pazienti affetti da LLC-B impiegando il metodo raziometrico e l'AcMo anti-ZAP70 clone 1E7.2. Utilizzando il *cut-off* di 0,30 proposto dalla letteratura (87) per questo metodo ed il contemporaneo impiego dell'AcMo clone 1E7.2, 46/247 pazienti (pari al 18% dei casi esaminati) sono risultati ZAP-70 negativi; i restanti 206 pazienti (pari all'82% dei casi esaminati) sono risultati positivi per l'espressione della proteina ZAP-70 (Figura 18A). Per quanto riguarda i 37 controlli sani esaminati, 12/32 soggetti (pari al 32% dei controlli esaminati) non esprimevano la PTK ZAP-70, mentre i restanti 25 soggetti (pari al 68% dei controlli esaminati) sono risultati positivi per la tirosin chinasi ZAP-70 (Figura 18B).

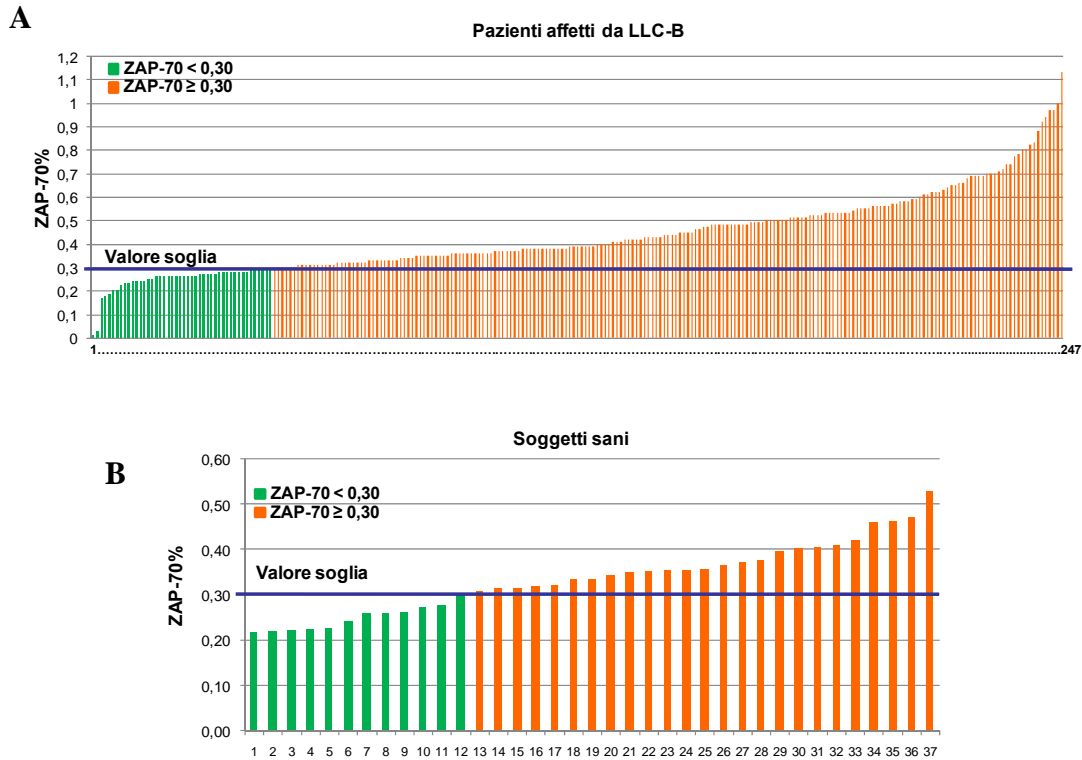


Figura 18. Metodo ratiometrico (valore soglia 0,30). A. Pazienti affetti da LLC-B. Il 18% dei pazienti è risultato ZAP-70 negativo (in verde) e il restante 82% dei pazienti è risultato ZAP-70 positivo (in arancio). **B. Soggetti sani.** Nei 37 controlli negativi il 32% è risultato ZAP-70 negativo (in verde) mentre il 68% presentava un'espressione superiore allo 0,30 (in arancio).

Il confronto dei risultati relativi all'espressione della proteina ZAP-70, ottenuti con i due metodi di analisi ha immediatamente evidenziato la presenza di dati contrastanti: alcuni pazienti positivi per l'espressione della proteina con un metodo, risultavano ZAP-70 negativi se valutati con il metodo alternativo. In particolare, l'utilizzo della soglia discriminante la positività di espressione di 0,30 del metodo raziometrico, produceva un numero elevato di pazienti ZAP-70 positivi, e tale eccesso di positività si ripresentava anche nei linfociti B dei soggetti normali da noi analizzati, i quali dovrebbero rappresentare un controllo negativo di espressione della proteina. L'inadeguatezza del valore soglia indicato dalla letteratura (87) ci ha indotto a ricercare un nuovo *cut-off*, adeguato alla nostra strumentazione ed ai reagenti da noi impiegati.

Tramite il confronto con il *western blotting*, metodica *gold standard* di riferimento, e mediante la costruzione di tabelle di contingenza, abbiamo valutato 3 possibili valori soglia

(0,30, 0,35 e 0,40) al fine di stabilire il limite più corretto. Per fare questo ci siamo basati su una ricerca pubblicata lo scorso anno (88) che ha definito tre diversi gruppi di soggetti in base all'espressione della PTK ZAP-70 valutata in *western blotting*:

- i. pazienti TIPO 0, che non esprimono la tirosin chinasi ZAP-70 (nessuna banda visibile al *western blotting*);
- ii. pazienti TIPO 1, che presentano una bassa espressione della proteina ZAP-70, considerata comunque negativa (banda debolmente visibile al *western blotting*);
- iii. pazienti TIPO 2, caratterizzati da un'alta espressione della tirosin chinasi ZAP-70 (banda chiaramente visibile al *western blotting*, Figura 19).

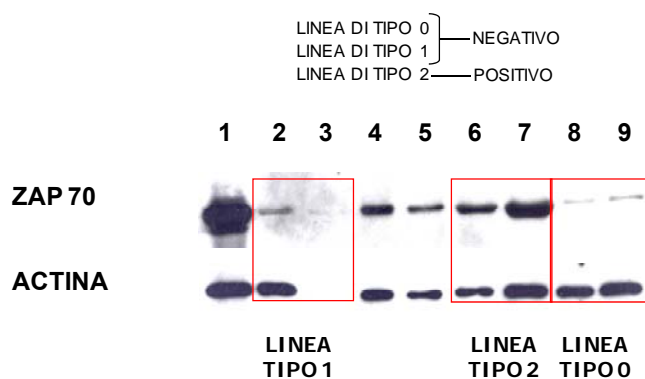


Figura 19. Espressione della proteina ZAP-70 in western blotting. In seguito alla rivelazione dell'AcMo anti-ZAP70 è possibile classificare i soggetti esaminati in TIPO 0, TIPO 1 e TIPO 2, in base all'espressione della PTK ZAP-70.

Tramite l'utilizzo di questa classificazione, i 56 pazienti da noi analizzati in *western blotting*, oltre che in citofluorimetria, sono stati suddivisi in due gruppi, i pazienti negativi per l'espressione della proteina ZAP-70 (TIPO 0 e TIPO 1) e quelli positivi (TIPO 2) e, attraverso l'uso di tabelle di contingenza, abbiamo valutato la sensibilità e la specificità di tre valori soglia (0,35, 0,40 e 0,45, Figura 20).

	WB=2	WB=0-1		WB=2	WB=0-1		WB=2	WB=0-1
> 0,35	21	9	> 0,40	15	5	> 0,45	13	4
< 0,35	8	18	< 0,40	14	22	< 0,45	16	23
Specificità = 67% Sensibilità = 72%			Specificità = 81% Sensibilità = 52%			Specificità = 85% Sensibilità = 44%		

Figura 20. Tabelle di contingenza per l'analisi di specificità e sensibilità dei valori soglia 0,35, 0,40 e 0,45.

In base ai risultati ottenuti, abbiamo scelto il valore soglia 0,35 perché era quello che determinava un miglior equilibrio tra sensibilità (72%) e specificità (67%). L'applicazione di questo nuovo limite ha determinato di conseguenza nuovi risultati: 82/247 pazienti (pari al 33% dei casi esaminati) sono risultati negativi per l'espressione di ZAP-70 mentre 165 pazienti (pari al 67% dei casi esaminati) sono risultati positivi (Figura 21). Per quanto riguarda i controlli, l'espressione media della PTK ZAP-70 nei linfociti B è risultata pari a $0,320 \pm 0,08$.

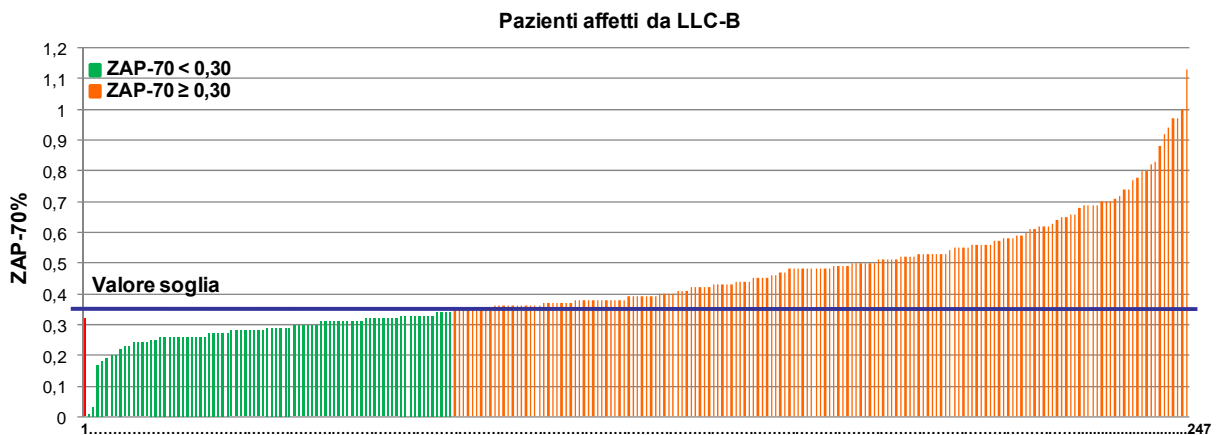


Figura 21. Metodo raziometrico (valore soglia 0,35). Pazienti affetti da LLC-B. L'espressione della proteina ZAP-70 è stata valutata con l'utilizzo di un *cut-off* $\geq 0,35$. Il 33% dei pazienti è risultato ZAP-70 negativo (in verde) e il restante 67% dei pazienti è risultato ZAP-70 positivo (in arancio). In rosso è rappresentata la media di espressione di ZAP-70 dei linfociti B dei soggetti sani.

C) Impiego di diversi AcMo per la determinazione della proteina ZAP-70

L'espressione della proteina ZAP-70 è stata determinata con tre diversi cloni di AcMo anti-ZAP70 (clone 1E7.2 Alexa Fluor 488, Caltag, clone 2F3.2, Upstate, clone 1E7.2 PE, BD Bioscience e clone SBZAP, Beckman coulter) al fine di verificare i valori di espressione della

proteina ZAP-70 in relazione agli AcMo impiegati. L'analisi è stata condotta su 56 pazienti affetti da LLC-B e 17 soggetti sani. L'anticorpo della ditta BD Bioscience è stato escluso fin dalle prime analisi perché non evidenziava l'espressione di ZAP-70 neppure nelle cellule T CD3+, che costituiscono il controllo positivo di espressione della proteina. Per gli altri anticorpi abbiamo ottenuto i seguenti valori medi: I) clone 1E7.2 Alexa Fluor 488 e metodo raziometrico. L'espressione della proteina ZAP-70 è risultata pari a $0,46\pm 0,19$ nei pazienti affetti da LLC-B, mentre nei soggetti sani era pari a $0,32\pm 0,08$. Per quanto riguarda l'AcMo clone 2F3.2, il valore medio di espressione della tirosin chinasi ZAP-70 è risultato $0,62\pm 0,22$ nei soggetti affetti da LLC-B e $0,50\pm 0,10$ nei soggetti sani (Tabella 1). Infine, la determinazione della PTK ZAP-70 eseguita con il clone SBZAP ha evidenziato un valore di espressione medio pari a $0,32\pm 0,27$ nei soggetti affetti da LLC-B e un valore medio pari a $0,30\pm 0,16$ nei soggetti sani (Figura 22 e Tabella 1).

PAZIENTI	Ac UPSTATE	Ac CALTAG	Ac BECKMAN
RANGE	0,20-1,16	0,01-0,8	0,04-0,77
MEDIA \pm DS	$0,62\pm 0,22$	$0,46\pm 0,19$	$0,32\pm 0,27$
POSITIVI	32	32	24
NORMALI			
RANGE	0,32-0,60	0,22-0,47	0,01-0,73
MEDIA \pm DS	$0,50\pm 0,10$	$0,32\pm 0,08$	$0,30\pm 0,16$
POSITIVI	3	8	11

Tabella 1. Dati relativi al range di espressione, alla media di espressione e ai casi positivi per ZAP-70 con l'utilizzo di tre cloni di AcMo anti-ZAP-70 nei pazienti e nei soggetti sani.

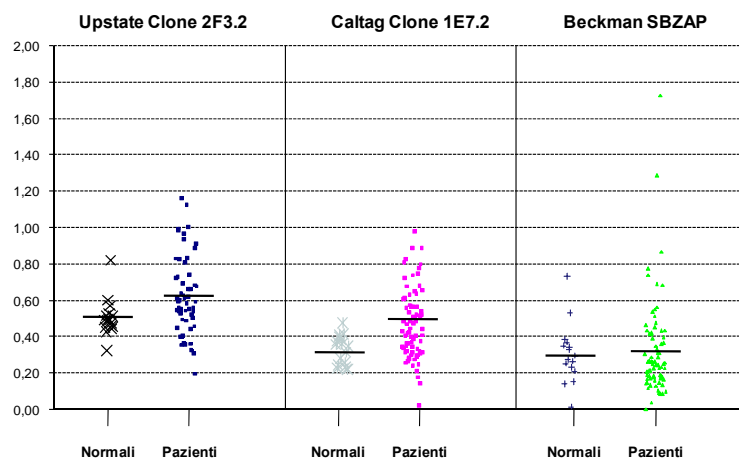


Figura 22. Dati relativi all'espressione di ZAP-70 con l'utilizzo di tre cloni di AcMo anti-ZAP70. Per ogni anticorpo è riportata la distribuzione di ZAP-70 sia per i soggetti sani che per i pazienti. I valori medi di espressione della proteina ZAP-70 sono indicati dalla barra nera.

In base ai nostri risultati, gli anticorpi anti-ZAP70 Alexa Fluor 488 (Caltag Laboratories) e anti-ZAP70 FITC (Upstate cell signaling solution) hanno prodotto risultati simili, caratterizzati da una significativa differenza tra i valori dei pazienti e quelli dei soggetti sani.

4.2 Determinazione degli altri fattori prognostici

A) Analisi dello stato mutazionale e del repertorio VH del BCR

L' 81% dei pazienti (200 soggetti su 247) è stato caratterizzato lo stato mutazionale dei geni delle regioni VH delle Ig. Per 24 pazienti (10%) non è stato possibile determinare lo stato mutazionale in quanto la famiglia VH espressa non presentava ancora una sequenza clonale, 6 pazienti erano caratterizzati dalla proliferazione di 2 popolazioni clonali differenti e 2 pazienti presentavano una LLC in cui i cloni B proliferanti erano tre.

Il 64% dei pazienti analizzati presentava una percentuale di omologia rispetto alla sequenza "germline" inferiore o uguale al 98% (casi mutati, SHM+), mentre nel 38% dei casi l'omologia risultava superiore al 98% (casi non mutati, SHM-).

La Figura 23 mostra la distribuzione delle 7 famiglie di geni per le regioni VH e la correlazione con lo stato mutazionale è riportata nella Figure 24.

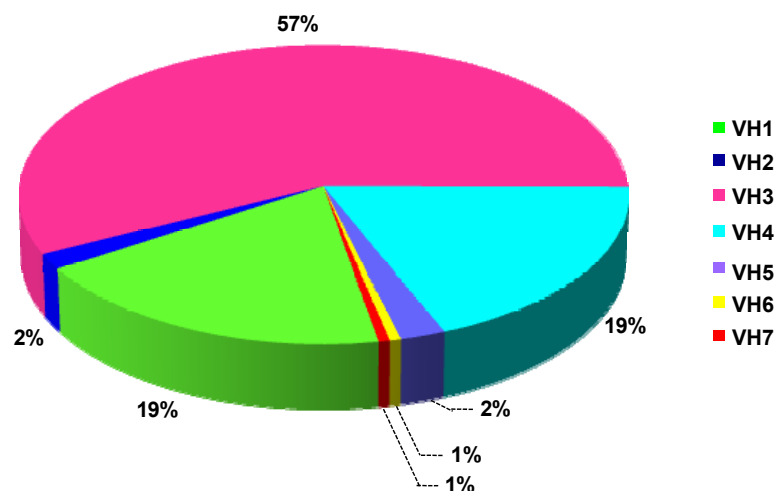


Figura 23 Distribuzione delle famiglie dei geni VH in pazienti con LLC

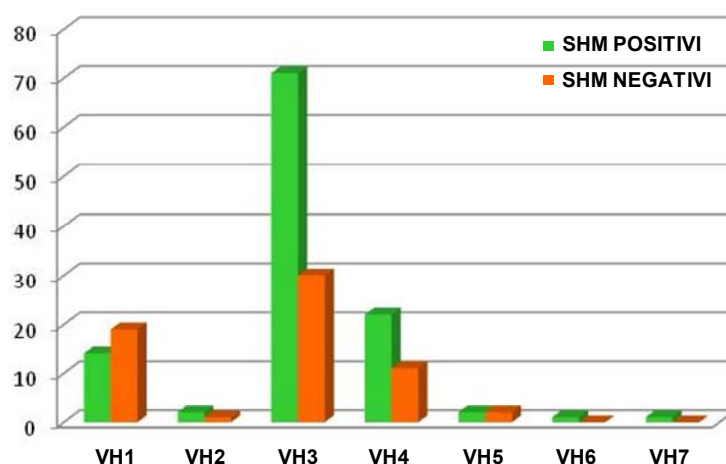


Figura 24. Relazione tra famiglie dei geni VH e stato mutazionale.

La famiglia VH3 è risultata quella più rappresentata (58% dei casi) e al suo interno i casi mutati (70%) erano più numerosi rispetto ai casi non mutati (30%); la famiglia VH1 era espressa nel 18% dei casi, di questi i non mutati rappresentavano il 58%; il 18% dei pazienti esprimeva invece la famiglia VH4, di questi il 67% erano mutati, il 33% non mutati. I cloni che esprimevano i geni delle famiglie VH 2, 5, 6 e 7 erano in numero decisamente inferiore rispetto alle prime tre famiglie (Figura 23). I cloni mutati esprimevano preferenzialmente VH3 e VH4, mentre VH1 era espresso prevalentemente dai cloni non mutati.

B) Analisi del CD38

L'analisi citofluorimetrica di CD38 è stata effettuata in 205 pazienti. Sono stati considerati positivi i casi in cui le cellule leucemiche esprimevano positività per CD38 maggiori o uguali al 30%; al contrario, sono stati considerati negativi i casi in cui le cellule esprimenti CD38 erano inferiori al 30%. Il 73% dei pazienti analizzati si è risultato CD38 negativo, il 27% esprimeva la molecola CD38. (Figura 25).

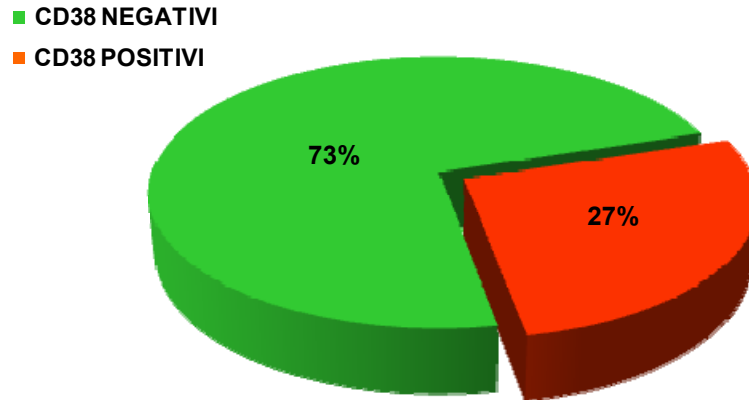


Figura 25. Distribuzione dei pazienti tra casi positivi e negativi per CD38.

C) Analisi del cariotipo

Il cariotipo è stato analizzato in 107 pazienti. Il 30% dei pazienti presentava un cariotipo normale. I pazienti restanti mostravano un cariotipo alterato e, in particolare, il 56% di questi presentava una singola alterazione cromosomica mentre il 14% avevano un cariotipo complesso, con una o più alterazioni. In base al cariotipo, i pazienti sono stati distinti in 2 gruppi: 74 pazienti con cariotipo normale o con delezione 13q14, a prognosi favorevole, 33 pazienti con cariotipo correlato a cattiva prognosi (del 17p, del 11q, trisomia 12 o carotipo complesso) (Figura 26).

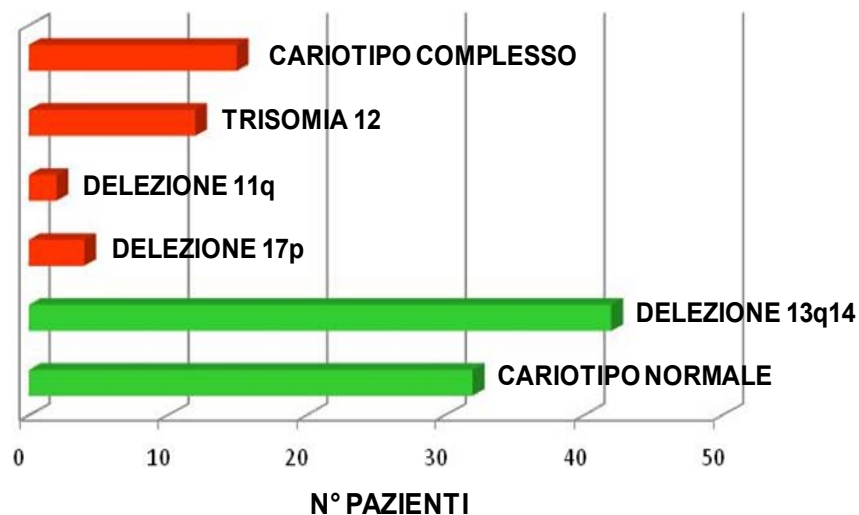


Figura 26. Distribuzione delle alterazioni genetiche in pazienti con LLC.

D) Analisi del CD305

La determinazione dell'espressione del recettore LAIR-1 è iniziata negli ultimi mesi del dottorato e i dati qui presentati sono da considerarsi preliminari. LAIR-1 è stato valutato in 74 pazienti affetti da LLC-B, che hanno presentato un'ampia variabilità di espressione, con un range che variava da 0 al 100% delle cellule esaminate (media: $41\% \pm 32$). Questa proteina è risultata sempre espressa nei linfociti B maturi dei 10 soggetti normali da noi esaminati.

In base alla variabilità di espressione di LAIR-1 rilevata nei pazienti, li abbiamo divisi in 2 gruppi sulla base dello stadio della malattia: il gruppo a basso rischio (pazienti in stadio 0-2) ed il gruppo ad alto rischio (pazienti in stadio 3-4). Questa suddivisione ci ha permesso di notare una differenza nell'espressione del marcatore CD305: in particolare, il gruppo ad alto rischio aveva una espressione minore della proteina (21%) rispetto al gruppo con minor rischio (37%) (Figura 27).

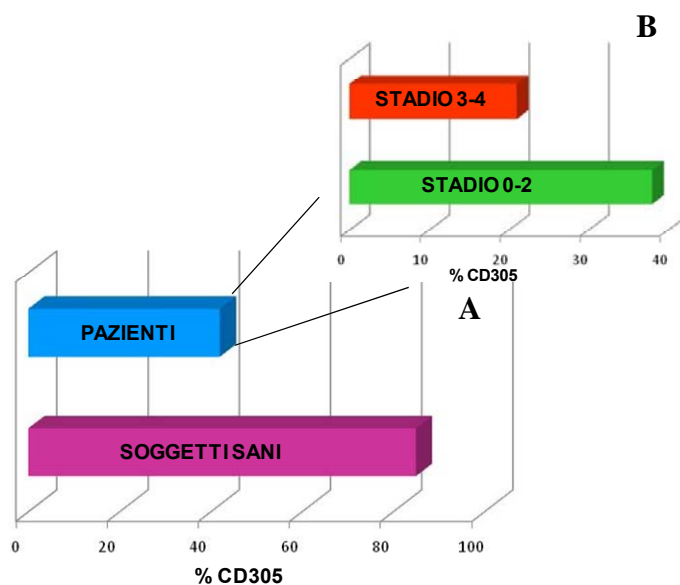


Figura 27. Espressione del CD305 nei soggetti sani e nei pazienti affetti da LLC (A). I pazienti esprimono mediamente una quantità minore di CD305, ed in particolare i pazienti allo stadio 3 e 4 hanno una espressione inferiore di questa proteina rispetto ai pazienti con uno stadio minore della malattia (B).

4.3 Correlazione tra i fattori studiati

In 146 pazienti è stato possibile confrontare l'espressione di CD38 con lo stato mutazionale delle immunoglobuline, evidenziando una maggior prevalenza di casi esprimenti il CD38 nel gruppo dei pazienti con SHM < 2% e, una maggior prevalenza di casi CD38 negativi nel gruppo con SHM \geq 2% ($p < 0,01$) (Figura 28A).

Analogamente, abbiamo confrontato l'espressione delle ipermutazioni somatiche con l'espressione della proteina ZAP-70. L'analisi eseguita in 175 casi ha evidenziato come l'espressione di ZAP-70 nelle cellule leucemiche fosse principalmente correlata all'assenza di ipermutazioni somatiche ($p < 0,01$) (Figura 28B).

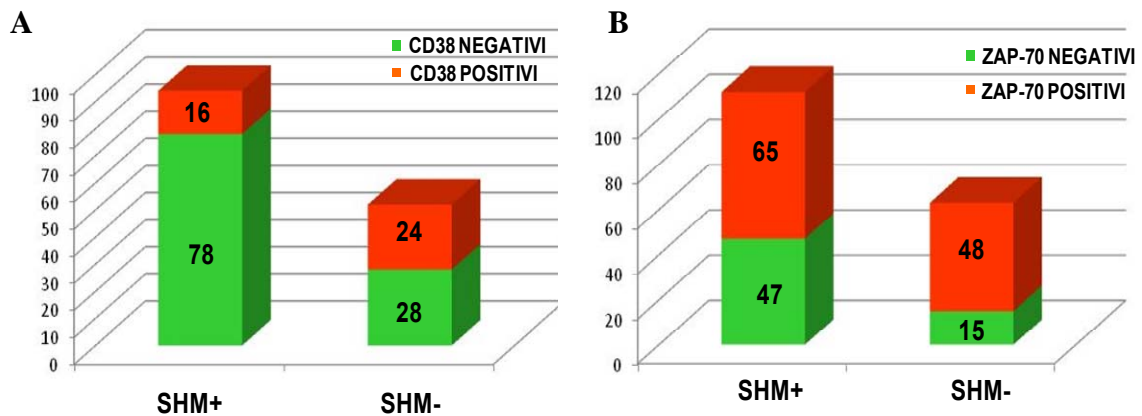


Figura 28. Relazione tra SHM ed espressione di CD38 (A) e di ZAP-70 (B) in pazienti con LLC. I pazienti negativi per le ipermutazioni somatiche presentano positivamente una maggiore positività sia per il CD38 che per ZAP-70.

Intercorre inoltre una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD38 e quella della proteina ZAP-70: generalmente, i soggetti positivi per ZAP-70 presentano anche positività alla molecola CD38 ($p < 0,01$).

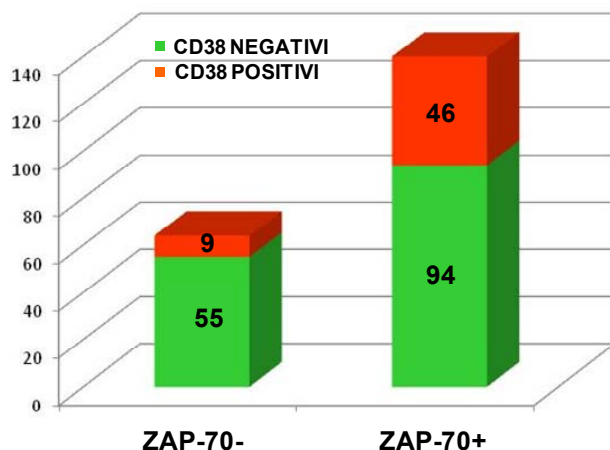


Figura 29. Relazione tra CD38 ed espressione di ZAP-70 in pazienti con LLC. I pazienti ZAP-70 positivi sono in maniera maggiore anche CD38 positivi.

Per quanto riguarda l'assetto citogenetico, abbiamo suddiviso i pazienti in 2 gruppi: I) pazienti a prognosi favorevole (cariotipo normale e del 13q14) e II) pazienti a prognosi sfavorevole (del17p, 11q e trisomia 12). Il confronto tra i due gruppi per l'espressione media della proteina ZAP-70, ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa. È stato comunque possibile rilevare che i pazienti con trisomia 12 e quelli che presentano la delezione 17p o 11q sono tutti caratterizzati da una elevata espressione di ZAP-70.

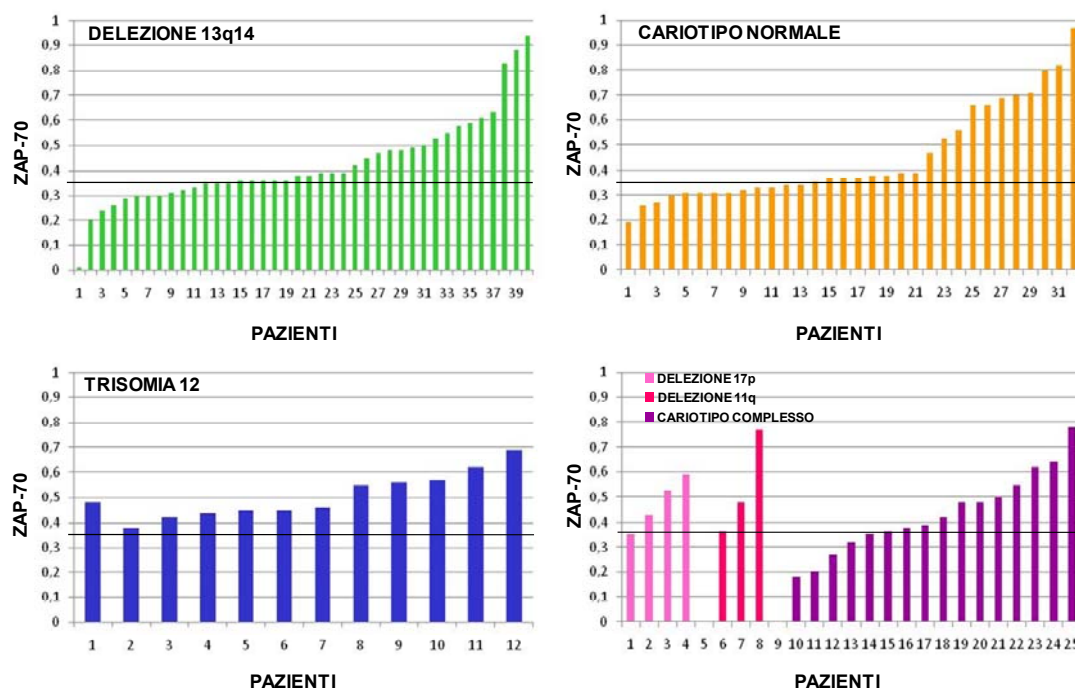


Figura 30. Distribuzione dell'espressione di ZAP-70 in base al tipo di alterazione citogenetica.

Pur avendo solo dati preliminari per quel che riguarda l'espressione del CD305, abbiamo effettuato delle analisi relative alla possibile associazione con alcuni fattori prognostici. I risultati hanno evidenziato che LAIR-1 viene espresso sia da pazienti ZAP-70 positivi che negativi. Per quanto riguarda la possibile associazione con lo stato mutazionale, i dati ottenuti sono al limite della significatività: i pazienti non mutati presentano un'espressione di CD305 inferiore a quella dei pazienti mutati ($p=0,05$). Analogamente, i pazienti CD38 positivi esprimono una quantità minore di LAIR-1 rispetto ai pazienti negativi, ma il trend non ha raggiunto la significatività statistica.

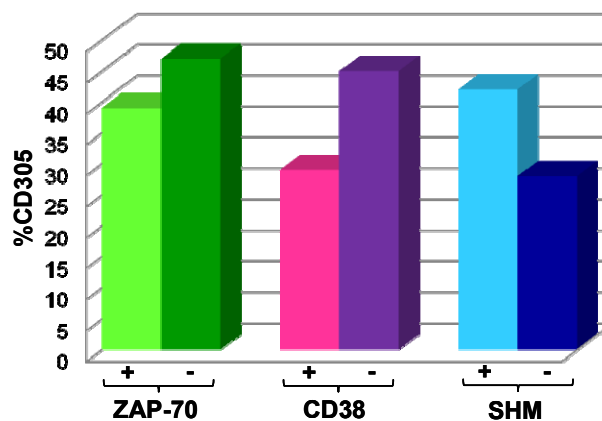


Figura 31. Espressione del CD305 in funzione della positività o negatività per ZAP-70 (verde), CD38 (viola) e SHM (blu). L'espressione del CD305 è inferiore nei gruppi positivi per ZAP-70 e CD38 e negativi per SHM.

4.4 Fattori prognostici e sopravvivenza

Il campione è stato suddiviso in due gruppi, uno che presenta SHM $\geq 2\%$ (mutati) e uno che presenta SHM $< 2\%$ (non mutati); la sopravvivenza media è risultata pari a 260 mesi per il gruppo dei mutati e a 99 mesi per il gruppo dei non mutati ($p < 0,001$) (Figura 32). Tra i pazienti mutati, il 30% ha iniziato una terapia citoriduttiva in corso di *follow-up*, in media dopo 62 mesi dalla diagnosi. Tra i pazienti non mutati, invece, il 76% è stato sottoposto a terapia, in media dopo 19 mesi dalla diagnosi.

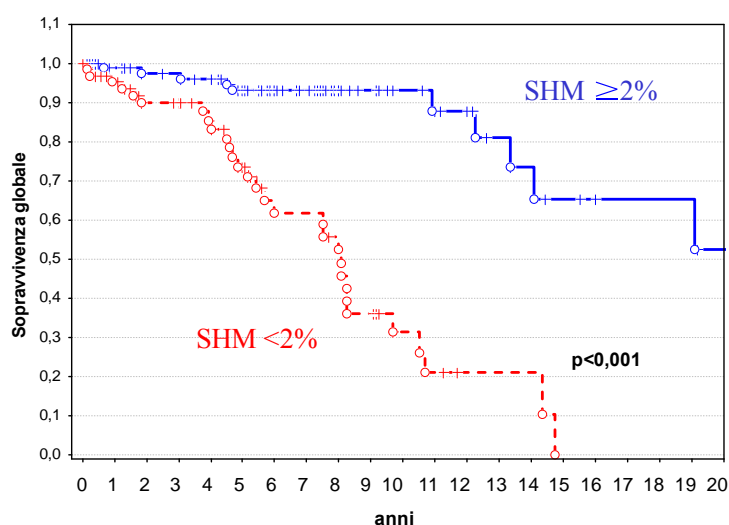


Figura 32. Sopravvivenza cumulativa dei pazienti affetti da LLC, mutati e non mutati.

Una suddivisione analoga è stata eseguita per valutare l'impatto di CD38 e ZAP-70 sulla sopravvivenza. Il gruppo di pazienti CD38 negativi mostrava una sopravvivenza media di 250 mesi, mentre in quello dei pazienti CD38 positivi essa è pari a 123 mesi ($p = 0,002$) (Figura 33).

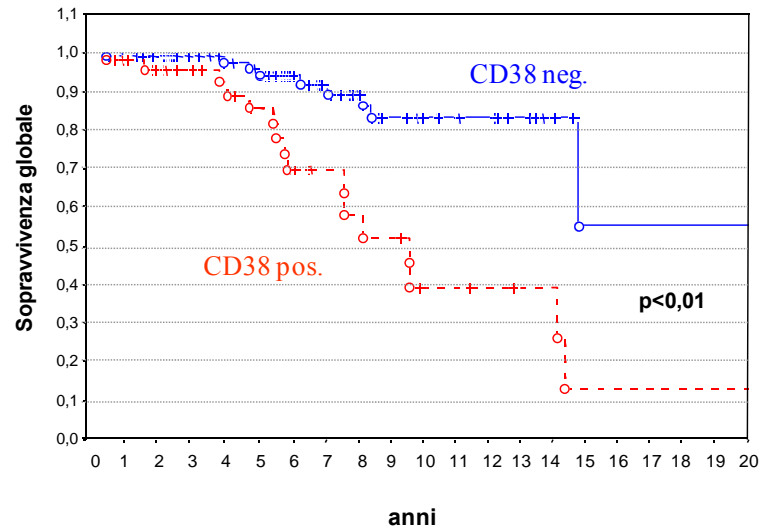


Figura 33. Sopravvivenza cumulativa dei pazienti affetti da LLC, CD38 positivi e CD38 negativi.

Per quanto riguarda ZAP-70 la sopravvivenza media variava da 220 mesi per i pazienti negativi a 135 mesi per quelli positivi ($p = 0,009$) (Figura 34).

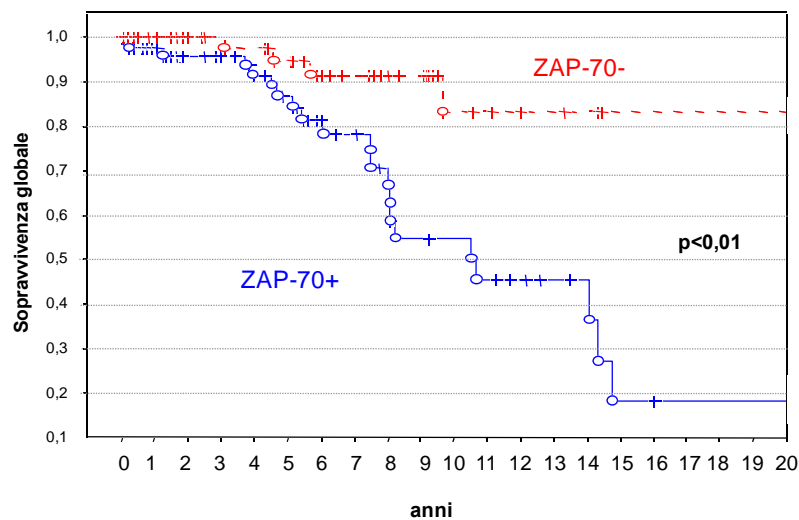


Figura 34. Sopravvivenza cumulativa dei pazienti affetti da LLC, ZAP-70 positivi e ZAP-70 negativi.

Tra i pazienti ZAP-70 positivi, il 56% ha iniziato una terapia in corso di *follow-up*, con un intervallo medio libero da terapia pari a 21 mesi; la probabilità, per un paziente ZAP-70 negativo di iniziare una terapia era pari al 42%, con un intervallo medio libero da terapia di 52 mesi. L'impatto prognostico di ZAP-70 è stato valutato separatamente nei casi mutati e non mutati; in entrambi i gruppi la positività o la negatività per l'espressione della proteina

non hanno prodotto una differenza statisticamente significativa in termini di sopravvivenza (p non significativa)

Abbiamo inoltre valutato l'impatto dell'espressione delle diverse famiglie VH sulla sopravvivenza. La famiglia dei geni VH4 è risultata associata a una sopravvivenza media di 220 mesi ($p < 0,001$), significativamente maggiore rispetto alle altre famiglie che, al contrario, non presentano differenze statisticamente rilevanti tra loro (Figura 35). Analizzando solamente i casi non mutati, non sono emerse differenze significative in termini di sopravvivenza tra le diverse famiglie VH. Invece, per quanto riguarda i casi mutati, quelli esprimenti i geni della famiglia VH3 sono caratterizzati da una sopravvivenza ridotta rispetto alle altre.

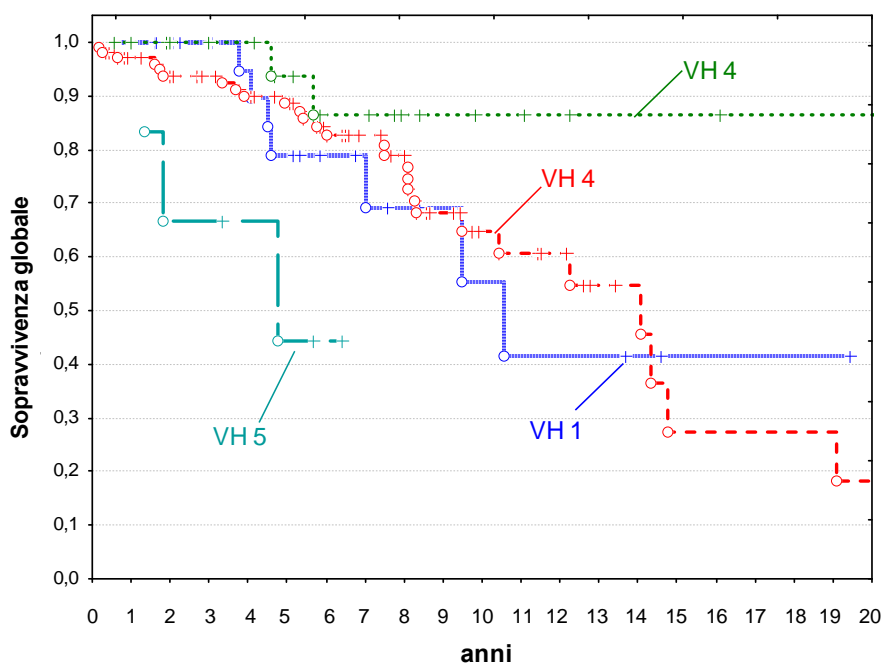


Figura 35: Curve di sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC suddivisi in base alla famiglia VH espressa.

5. DISCUSSIONE

Durante il triennio di questo dottorato alcuni fattori di recente introduzione, importanti per la prognosi della leucemia linfatica cronica sono stati analizzati: la presenza di ipermutazioni somatiche delle regioni variabili delle Ig (SHM), l'espressione dei marcatori CD38 e CD305, l'espressione intracitoplasmatica di ZAP-70.

Una parte importante del progetto di ricerca ha riguardato la proteina ZAP-70 e i vari metodi per valutarne l'espressione sia a livello genico che proteico. L'importanza di quantificare questa tirosin chinasi deriva dal fatto che ZAP-70 è uno dei nuovi e promettenti marcatori prognostici della leucemia linfatica cronica B, che si accompagna alle ipermutazioni somatiche ed alla valutazione del cariotipo. In particolare, l'espressione della proteina ZAP-70 da parte del clone leucemico è considerata un fattore prognostico negativo. Infatti, nel clone B neoplastico la proteina ZAP-70 viene fosforilata assieme alla tirosin chinasi Syk, normalmente presente nelle cellule B, aumentando la capacità di trasduzione del segnale da parte del BCR (89). Questi segnali sono deputati all'attivazione di potenti stimoli di proliferazione e sopravvivenza (90) che contribuiscono a spiegare la maggior aggressività delle forme di LLC-B caratterizzate da un'alta espressione della tirosin chinasi ZAP-70 (91). Oltre alla LLC-B si conoscono altre neoplasie nelle quali la proteina ZAP-70 agisce come fattore di aggressività, quali la leucemia linfoblastica acuta, dove la tirosin chinasi ZAP-70 è implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule pre-B leucemiche (92), e la leucemia mieloide acuta, dove la proteina ZAP-70 viene attivata dalla proteina RhoH ed attiva potenti segnali di resistenza all'apoptosi (93).

Considerate le sue funzioni, la proteina ZAP-70 è diventata, seppur recentemente, un "soggetto" di notevole interesse in ambito oncoematologico. Di conseguenza, è nata l'esigenza di avere metodi rapidi e riproducibili per quantificarla. Per questo motivo si sta diffondendo l'utilizzo della tecnica citofluorimetrica per la valutazione della proteina ZAP-

70: infatti, la citofluorimetria, attraverso l'impiego di AcMo, ben si presta ad un'analisi rapida e riproducibile. Sono state così rapidamente sviluppate numerose metodiche citofluorimetriche che hanno introdotto però variabili legate all'AcMo utilizzato, ai valori soglia impiegati, al trattamento del campione prima dell'analisi (86-88), che di fatto producono risultati non confrontabili tra i diversi laboratori, sia a livello nazionale che internazionale.

Inizialmente il nostro lavoro è stato quindi volto ad individuare un metodo affidabile e riproducibile per l'analisi di ZAP-70 in citofluorimetria. Abbiamo confrontato 2 metodiche di analisi: il metodo che sfrutta il controllo isotipico come riferimento ed il metodo raziometrico, che rapporta l'intensità media di fluorescenza dei linfociti B patologici all'intensità media di fluorescenza dei linfociti T. Abbiamo verificato l'esistenza di una sensibile discordanza tra i valori di espressione di ZAP-70 ottenuti con le due metodiche. Allo stesso tempo, abbiamo osservato come il metodo del controllo isotipico fosse operatore-dipendente. Poiché tale dipendenza risultava critica per la determinazione della proteina ZAP-70 quando i valori di espressione si trovavano vicini al valore soglia, abbiamo abbandonato il metodo del controllo isotipico a favore di quello raziometrico. Una volta stabilito il metodo più affidabile, abbiamo standardizzato la metodica sulla base della strumentazione presente nel nostro laboratorio. Innanzitutto abbiamo stabilito il valore soglia discriminante positività e negatività di espressione, utilizzando a questo scopo come metodica di riferimento il *western blotting* e, mediante analisi di contingenza, abbiamo individuato che il valore soglia nel valore di 0,35 che permetteva di ottenere le maggiori specificità e sensibilità.

Definito metodo e valore soglia più adeguati, abbiamo valutato quale anticorpo riconoscesse con maggiore specificità la proteina. Esistono diversi AcMo in commercio in grado di riconoscere ZAP-70. Nel corso del nostro studio abbiamo utilizzato: anti-ZAP70 Alexa Fluor 488 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-ZAP70 PE (Beckman

Coulter, Fulerton, CA, USA), anti-ZAP70 FITC (Upstate cell signaling solution, Lake Placido, NY, USA), anti-ZAP70 PE (BD Biosciences). I vari anticorpi hanno prodotto risultati differenti. In particolare, due hanno dato risultati più riproducibili e simili tra loro (anti-ZAP70 Alexa Fluor 488, Caltag Laboratories e anti-ZAP70 FITC, Upstate cell signaling solution).

Come conclusione di questo lavoro di standardizzazione nel nostro laboratorio attualmente si utilizza il metodo raziometrico per l'analisi citofluorimetrica di ZAP-70, con un valore soglia di 0,35 e con l'anticorpo anti-ZAP70 Alexa Fluor 488 Caltag.

Per quanto riguarda gli altri fattori prognostici esaminati, abbiamo rilevato innanzitutto che la famiglia VH4 del B cell receptor risulta associata ad una prognosi migliore rispetto a tutte le altre famiglie espresse dal clone leucemico.

I dati da noi ottenuti confermano il ruolo prognostico dello stato mutazionale: il valore medio di sopravvivenza globale per i pazienti mutati e non mutati è risultato pari a 260 mesi e 99 mesi rispettivamente ($p < 0,001$). Anche CD38 e ZAP-70 hanno dimostrato un impatto prognostico significativo: la sopravvivenza globale media per i pazienti CD38 positivi e negativi era pari rispettivamente a 123 e 250 mesi ($p = 0,002$); la sopravvivenza globale media per i pazienti ZAP-70 positivi e negativi era pari a 135 e 220 mesi ($p = 0,009$).

Abbiamo valutato se era possibile evidenziare alcune correlazioni tra i vari fattori prognostici analizzati. Abbiamo rilevato una correlazione statisticamente significativa tra la positività di espressione di CD38 e l'assenza di ipermutazioni somatiche ($p < 0,01$). Analogamente, abbiamo osservato una correlazione tra la positività di espressione per ZAP-70 e la mancanza di SHM ($p < 0,05$). Per quanto riguarda LAIR-1, il recettore risulta espresso in quantità minore sia nei pazienti SHM negativi sia in quelli CD38 positivi, mentre non è emersa alcuna differenza quando si sono suddivisi i pazienti in base all'espressione di ZAP-70. Inoltre intercorre una correlazione statisticamente significativa tra la positività di espressione di CD38 e la positività per la proteina ZAP-70 ($p < 0,01$).

Certamente, come testimoniano i risultati ottenuti in questa ricerca, le difficoltà e le contraddizioni nel definire gruppi di rischio differenti nella LLC-B sono ancora molte. Appare tuttavia evidente come il percorso intrapreso sia molto promettente. Le caratteristiche di ciascun fattore prognostico sono probabilmente più complesse di quanto ci si potesse aspettare, a tal punto che ognuno sembra mantenere una sua indipendenza e nel contempo si dimostra in grado di influire sugli altri. Sarà necessario valutare questi nuovi marcatori su gruppi di pazienti molto più numerosi e all'interno di studi prospettici. In questo modo sarà possibile capire se nei pazienti che presentano un numero sufficiente di fattori prognostici negativi, giudicati quindi ad alto rischio di progressione di malattia, sia utile intraprendere una strategia terapeutica precoce ed aggressiva.

Concludendo, i risultati ottenuti confermano l'efficacia dei fattori prognostici innovativi nel predire fin dal momento della diagnosi il possibile decorso clinico della malattia. Lo stato mutazionale rimane il fattore prognostico più affidabile e attualmente non sostituibile. Per quanto riguarda la proteina ZAP-70, promettente per la praticità e rapidità della metodica impiegata per la sua valutazione, va sottolineato che ogni laboratorio deve sia individuare una metodica adeguata agli strumenti ed ai reagenti in dotazione sia interagire con altri laboratori per definire il procedimento che permetterà di confrontare risultati ottenuti in laboratori diversi. A questo proposito i nostri studi continuano in collaborazione con tutte le strutture di Ematologia della nostra regione.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Herrinton LJ. Epidemiology of the Revised European-American Lymphoma Classification subtypes. *Epidemiol Rev* 1998;20:187-203.
2. Weiss NS. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr* 1979;139-142.
3. Boggs DR, Chen SC, Zhang ZN, Zhang A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol* 1987;25:349-354.
4. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000;109:794-799.
5. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. 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;65:114-117.
6. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113:407-414.
7. Barcellini W, Capalbo S, Agostinelli RM, Mauro FR, Ambrosetti A, Calori R, Cortelezzi A, Laurenti L, Pogliani EM, Pedotti P, Liso V, Girelli G, Mandelli F, Zanella A. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91:1689-1692.
8. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-4997.

9. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-1638.
10. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003;21:841-894.
11. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004;103:4389-4395.
12. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 2000;79:157-173.
13. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989;71:343-350.
14. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005;114:441-449.
15. Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. 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;75:22-33.
16. Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:673-682.
17. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 2001;98:814-822.

18. Stankovic T, Hubank M, Cronin D, Stewart GS, Fletcher D, Bignell CR, Alvi AJ, Austen B, Weston VJ, Fegan C, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood* 2004;103:291-300.
19. Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, Krober A, Jager U, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005;23:3780-3792.
20. Reth M, Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1997;15:453-479.
21. Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2002;2:945-956.
22. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:1087-1093.
23. Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 1995;2:485-492.
24. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609-4614.
25. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007;109:2032-2039.

26. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest* 2005;115:369-378.
27. van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T, Meyaard L. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol.* 1999;29:3160-7.
28. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999;5:1164-1170.
29. Ladetto M, Compagno M, Ricca I, Pagano M, Rocci A, Astolfi M, Drandi D, di Celle PF, Dell'Aquila M, Mantoan B, Vallet S, Pagliano G, De Marco F, Francese R, Santo L, Cuttica A, Marinone C, Boccadoro M, Tarella C. Telomere length correlates with histopathogenesis according to the germinal center in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 2004;103:4644-4649.
30. Trentin L, Ballon G, Ometto L, Perin A, Basso U, Chieco-Bianchi L, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase activity in chronic lymphoproliferative disorders of B-cell lineage. *Br J Haematol* 1999;106:662-668.
31. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK, Chiorazzi N. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004;103:375-382.
32. Walsh SH, Grabowski P, Berglund M, Thunberg U, Thorselius M, Tobin G, Aleskog A, Karlsson K, Sundstrom C, Laurell A, Enblad G, Rosenquist R, Roos G. Telomere

- length and correlation with histopathogenesis in B-cell leukemias/lymphomas. *Eur J Haematol* 2007;78:283-289.
33. Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4:447-456.
 34. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
 35. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
 36. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, Caruso R, Giannarelli D, Monarca B, Romani C, Baroni CD, Mandelli F. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica* 1994;79:334-341.
 37. Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J* 2002;3:7-9.
 38. Melo JV, Catovsky D, Gregory WM, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br J Haematol* 1987;65:23-29.
 39. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1999;26:107-114.
 40. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:1732-1737.

41. Vinante F, Vassanelli A, Zanotti R, Nadali G, Krampera M, Vincenzi C, Morosato L, Chilosi M, Pizzolo G. Circulating levels of soluble CD23 reflect clinical and biological features of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Int J Clin Lab Res* 1995;25:189-194.
42. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996;88:4259-4264.
43. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
44. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
45. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sallstrom J, Sundstrom C, Roos G, Rosenquist R. Somatic mutation of Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2262-2264.
46. Falt S, Merup M, Tobin G, Thunberg U, Gahrton G, Rosenquist R, Wennborg A. Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:681-689.
47. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, Michel A, Crespo M, Laoutaris N, Montserrat E, Anagnostopoulos A, Dighiero G, Fassas A, Caligaris-Cappio F, Davi F. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678-1685.

48. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):181-6.
49. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, Scielzo C, Caligaris-Cappio F. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003;101:1262-1269.
50. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023-1029.
51. Ghia P, Guida G, Scielzo C, Geuna M, Caligaris-Cappio F. CD38 modifications in chronic lymphocytic leukemia: are they relevant? *Leukemia* 2004;18:1733-1735.
52. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-1647.
53. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-4951.
54. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70

compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.

55. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-1775.
56. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, Buhler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk RF, Benner A, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24:969-975.
57. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, Maravelaki S, Owusu-Ankomah K, Swansbury J, A'Hern R, Brito-Babapulle V, Catovsky D. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2005;104:2124-2132.
58. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.
59. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, Flinn IW, Tallman MS, Appelbaum FR, Larson RA, Pajetta E, Jelinek DF, Gribben JG, Byrd JC. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007;25:799-804.

60. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410-1416.
61. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-1184.
62. Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia* 2007;21:965-972.
63. Ricca I, Rocci A, Drandi D, Francese R, Compagno M, Lobetti Bodoni C, De Marco F, Astolfi M, Monitillo L, Vallet S, Calvi R, Ficara F, Omede P, Rosato R, Gallamini A, Marinone C, Bergui L, Boccadoro M, Tarella C, Ladetto M. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2007;21:697-705.
64. Poggi A, Catellani S, Bruzzone A, Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Zocchi MR. Lack of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 expression in high-risk chronic lymphocytic leukaemia results in the absence of a negative signal regulating kinase activation and cell division. *Leukemia*. 2008 May;22(5):980-8. Epub 2008 Feb 21.
65. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Dohner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai K. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:859-861.

66. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:1506-1514.
67. Jaksic B, Brugiattelli M, Krc I, Losonczi H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kusec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer* 1997;79:2107-2114.
68. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1990;75:1422-1425.
69. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998;92:1165-1171.
70. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1750-1757.
71. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001;98:2319-2325.

72. Dillman RO, Mick R, McIntyre OR. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *J Clin Oncol* 1989;7:433-438.
73. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Gora-Tybor I, Dwilewicz-Trojaczek J, Boguradzki P, Konopka L, Ceglarek B, Sulek J, Kuliczowski K, Wolowiec D, Stella-Holowiecka B, Skotnicki AB, Nowak W, Moskwa-Sroka B, Dmoszynska A, Calbecka M. Cladribine combined with cyclophosphamide and mitoxantrone as front-line therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2001;15:1510-1516.
74. Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res* 2001;7:3580-3589.
75. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Paietta EM, Hussein MA, Appelbaum FR, Larson RA, Moore DF, Jr., Tallman MS. 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;25:793-798.
76. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001;7:709-723.
77. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm* 1997;12:177-186.
78. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 2001;114:800-809.

79. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4079-4088.
80. Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lerner S, Albitar M, Kantarjian H, Keating M. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4070-4078.
81. Montillo M, Cafro AM, Tedeschi A, Brando B, Oreste P, Veronese S, Rossi V, Cairoli R, Pungolino E, Morra E. Safety and efficacy of subcutaneous Campath-1H for treating residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia responding to fludarabine. *Haematologica* 2002;87:695-700.
82. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002;347:452-453.
83. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Bociek RG, Pavletic S, Rai KR. 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;25:1114-1120.
84. Dreger P, Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:985-992.
85. Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Martino R, Nomdedeu J, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Sierra J, Montserrat E. Allogeneic stem-cell

- transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3433-3438.
86. Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P.W., Hamblin, T.J., Staudt, L.M., Oscier, D.G. (2004) ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 363, 105-11.
87. Bakke, A.C., Purtzer, Z., Leis, J., Huang, J. (2006) A robust ratio metric method for analysis of Zap-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cytometry B Clin Cytom.* 70, 227-34.
88. Slack, G.W., Wizniak, J., Dabbagh, L., Shi, X., Gelebart, P., Lai, R. (2007) Flow cytometric detection of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: correlation with immunocytochemistry and Western blot analysis. *Arch Pathol Lab Med.* 131, 50-6.
89. Bene, M.C. (2006) What is ZAP-70? *Cytometry B Clin Cytom.* 70, 204-8.
90. Caligaris-Cappio, F., Ghia, P. (2007) The normal counterpart to the chronic lymphocytic leukemia B cell. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20, 385-97.
91. Bosch, F., Muntanola, A., Gine, E., Carrio, A., Villamor, N., Moreno, C., Crespo, M., Montserrat, E. (2006) Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 70, 214-7.
92. Wandroo, F., Bell, A., Darbyshire, P., Pratt, G., Stankovic, T., Gordon, J., Lawson, S., Moss, P. (2008) ZAP-70 is highly expressed in most cases of childhood pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol.* 30, 149-57.
93. Iwasaki, T., Katsumi, A., Kiyoi, H., Tanizaki, R., Ishikawa, Y., Ozeki, K., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., Amano, M., Kojima, T., Kaibuchi, K., Naoe, T. (2008) Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.*