

**“SAPIENZA”**

**Università di Roma**



Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia

Sezione di Ematologia

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE EMATOLOGICHE - XXII CICLO**

Coordinatore Prof. Robin Foà

**TESI DI DOTTORATO**

***“Caratterizzazione di Funzioni Cellulari nelle Leucemie”***

Relatore:

Prof.ssa Anna Guarini

Dottoranda:

Dott.ssa Nadia Peragine

Anno Accademico 2008/2009

# INDICE

<b>PREFAZIONE</b> .....	6
<b>La Leucemia Linfatica Cronica (LLC)</b> .....	6
<b>PARTE I - Studio delle conseguenze funzionali della stimolazione in vitro delle cellule B neoplastiche di pazienti affetti da Leucemia Linfatica Cronica (LLC)</b> .....	10
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	11
<b>1.1 Il complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B (BCR)</b> .....	11
1.1.1 <i>Composizione e ruolo del BCR nel processo di ontogenesi B cellulare</i> .....	11
<b>1.2 Ruolo del BCR nella patogenesi della LLC</b> .....	14
1.2.1 <i>Caratteristiche strutturali del BCR delle cellule B di LLC</i> .....	14
1.2.2 <i>Stato maturativo e d'attivazione delle cellule B di LLC</i> .....	19
1.2.3 <i>Natura degli antigeni implicati nella patogenesi ed evoluzione della LLC</i> .....	25
1.2.4 <i>Segnali mediati dal BCR nelle cellule B di LLC</i> .....	27
<b>1.3 Scopo del progetto di ricerca</b> .....	33
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	35
<b>2.1 Pazienti</b> .....	35
<b>2.2 Isolamento e coltura delle cellule mononucleate dei pazienti affetti da LLC</b> .....	35
<b>2.3 Separazione immunomagnetica delle cellule B leucemiche CD19<sup>+</sup> dei pazienti affetti da LLC</b> .....	35
<b>2.4 Stimolazione delle cellule B leucemiche CD19<sup>+</sup></b> .....	36
<b>2.5 Estrazione dell'RNA e analisi del profilo di espressione genica</b> .....	36
<b>2.6 Analisi del ciclo cellulare</b> .....	37
<b>2.7 Saggio di proliferazione</b> .....	37
<b>2.8 Analisi del tasso apoptotico</b> .....	37
<b>2.9 Analisi statistica per gli studi di proliferazione e apoptosi</b> .....	38
<b>2.10 Visualizzazione dell'actina intracitoplasmatica</b> .....	38
<b>3. RISULTATI</b> .....	40

<b>3.1 Analisi del profilo di espressione genica delle cellule B neoplastiche di pazienti affetti da LLC dopo stimolazione del BCR</b> .....	40
<b>3.2 Effetti della stimolazione del BCR delle cellule B neoplastiche di LLC sulla modulazione del ciclo cellulare</b> .....	42
<b>3.3 Studio dell'attività proliferativa delle cellule B neoplastiche di LLC dopo stimolazione del BCR</b> .....	45
<b>3.4 Valutazione degli effetti della stimolazione del BCR delle cellule B neoplastiche di LLC sulla modulazione del processo apoptotico</b> .....	50
<b>3.5 Analisi dei cambiamenti citoscheletrici delle cellule B neoplastiche di LLC dopo stimolazione del BCR</b> .....	56
<b>4. DISCUSSIONE</b> .....	60
<b>5. REFERENZE</b> .....	73

<b>PARTE II - Studio della funzionalità della proteina p53 in campioni primari di cellule neoplastiche di pazienti affetti da Leucemia Linfatica Cronica (LLC)</b> .....	83
--	----

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	84
<b>1.1 La proteina p53</b> .....	84
1.1.1 Cenni introduttivi .....	84
1.1.2 Struttura della proteina p53.....	85
1.1.3 Regolazione dei meccanismi di attivazione della proteina p53 .....	88
1.1.4 Ruolo della proteina p53 nella soppressione tumorale .....	96
1.1.5 Funzioni citoplasmatiche della proteina p53.....	99
1.1.6 Ruolo dei microRNA nel controllo dell'attività della proteina p53.....	102
<b>1.2 Meccanismi di deregolazione a carico del gene TP53 e carcinogenesi</b> .....	104
1.2.1 Mutazioni del gene TP53 .....	104
1.2.2 Impatto dello stato del gene TP53 sulla prognosi tumorale .....	109
1.2.3 Ripristino della funzionalità della proteina p53 nei tumori umani.....	111
<b>1.3 Meccanismi di deregolazione della via di p53 in pazienti affetti da LLC</b> .....	114
<b>1.4 Scopo del progetto di ricerca</b> .....	120

<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	121
<b>2.1 Pazienti e Controlli</b> .....	121
<b>2.2 Induzione dell'attivazione della proteina oncosoppressoria p53</b> .....	121
<b>2.3 Valutazione dell'attivazione della proteina oncosoppressoria p53</b> .....	122
<b>2.4 Analisi del tasso apoptotico</b> .....	123
<b>2.5 Analisi statistica per gli studi di apoptosi</b> .....	124
<b>3. RISULTATI</b> .....	125
<b>3.1 Analisi della funzionalità della proteina p53 in campioni primari di cellule neoplastiche di pazienti affetti da LLC a differente stadio di malattia</b> .....	125
<b>3.2 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con lo stato del gene TP53</b> .....	135
<b>3.3 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con i principali fattori prognostici caratteristici della LLC</b> .....	138
<b>3.4 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con la capacità di induzione del processo apoptotico</b> .....	141
<b>4. DISCUSSIONE</b> .....	146
<b>5. REFERENZE</b> .....	158
<b>PARTE III - Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule T regolatorie di pazienti affetti da neoplasie ematologiche sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche</b> .....	167
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	168
<b>1.1 Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (TCSE)</b> .....	168
<i>1.1.1 Tipologie di TCSE e principi relativi all'impiego del TCSE in pazienti affetti da neoplasie ematologiche</i> .....	168
<i>1.1.2 Scelta della fonte di CSE</i> .....	171
<i>1.1.3 Il Condizionamento pre-TSCE</i> .....	175
<i>1.1.4 Attecchimento e ricostituzione del sistema emopoietico post-TCSE</i> .....	175
<i>1.1.5 Allorreattività post-TCSE: il rigetto, la GvHD e la GvL</i> .....	181
<b>1.2. Le cellule T regolatorie “naturali”</b> .....	181

1.2.1 Ontogenesi e caratterizzazione delle cellule T regolatorie “naturali” .....	181
1.2.2 Peculiarità intrinseche delle cellule T regolatorie “naturali” in vitro e in vivo.....	188
1.2.3 Meccanismi di soppressione della risposta immune mediati dalle cellule T regolatorie “naturali” .....	190
1.2.4 Ruolo delle cellule T regolatorie “naturali” nel TCSE.....	196
<b>1.3 Scopo del progetto di ricerca .....</b>	<b>200</b>
<b>2. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>201</b>
<b>2.1 Pazienti e Controlli .....</b>	<b>201</b>
<b>2.2 Purificazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> .....</b>	<b>201</b>
<b>2.3 Espansione dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolati .....</b>	<b>202</b>
<b>2.4 Analisi Immunofenotipica delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse.....</b>	<b>202</b>
<b>2.5 Valutazione delle capacità soppressive delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse .....</b>	<b>203</b>
<b>2.6 Valutazione della produzione di IL-10 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse.....</b>	<b>203</b>
<b>3. RISULTATI .....</b>	<b>205</b>
<b>3.1 Capacità di espansione e caratteristiche immunofenotipiche delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate.....</b>	<b>205</b>
<b>3.2 Capacità soppressoria delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse.....</b>	<b>209</b>
<b>3.3 Produzione di citochine immunosoppressive da parte delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse .....</b>	<b>212</b>
<b>4. DISCUSSIONE .....</b>	<b>214</b>
<b>5. REFERENZE.....</b>	<b>222</b>

## **PREFAZIONE**

### **La Leucemia Linfatica Cronica (LLC)**

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è un disordine ematologico, di natura monoclonale, caratterizzato dall'espansione e accumulo di piccoli linfociti B nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici secondari, quali linfonodi e milza [1]. E' la forma di leucemia di più frequente riscontro nell'emisfero occidentale [2]. Viene tipicamente considerata una malattia dell'adulto, in quanto la maggior parte dei pazienti ha più di 55 anni e l'età media alla diagnosi è intorno ai 65 anni, mentre solo il 15% dei pazienti ha un'età inferiore a 50 anni. E', inoltre, più frequente tra gli individui di sesso maschile essendo il rapporto maschio/femmina affetti di 2:1. È una delle poche neoplasie ematologiche a non essere stata mai associata all'esposizione a radiazioni ionizzanti o ad altri fattori eziologici ambientali, occupazionali, infettivi [3-4]. Una predisposizione genetica appare invece rilevante nella patogenesi della LLC, come sembra indicare l'evidenza epidemiologica secondo cui nel 5-10% dei casi esiste una suscettibilità alla LLC di tipo familiare, per cui si ammalano due o più componenti di una stessa famiglia [5].

Nella maggior parte dei casi la LLC è asintomatica, mentre nei pazienti sintomatici si presenta principalmente attraverso l'aumento delle dimensioni delle ghiandole linfatiche (linfadenomegalia), della milza (splenomegalia) e del fegato (epatomegalia) [6]. La diagnosi di LLC è un processo a più stadi che richiede: un'analisi emocromocitometrica, morfologica, immunofenotipica, citogenetica e molecolare. L'esame dell'emocromo normalmente rivela la presenza nel sangue periferico di una linfocitosi, vale a dire un numero di linfociti superiore a 5000/ $\mu$ l ed è utile per diagnosticare la malattia nel caso di pazienti asintomatici. La valutazione dell'aspirato midollare e della biopsia osteomidollare non sono generalmente richiesti per la diagnosi. Tuttavia possono essere utili, qualora la conta linfocitaria risulti inferiore a 5000/ $\mu$ l, per una conferma della diagnosi di LLC e per una valutazione diagnostica differenziale nei confronti di altri disordini linfoproliferativi [7]. Secondo quanto riportato dal French-American-British (FAB) Cooperative Group è possibile distinguere due principali varianti morfologiche di LLC: la forma tipica e atipica. Nella forma tipica, l'analisi morfologica di uno striscio di sangue periferico mostra un prevalente accumulo di piccoli linfociti maturi con scarso citoplasma e cromatina nucleare parzialmente aggregata [8]. Quadri citomorfologici rappresentati da più del 10% di linfociti con aspetto diverso dal piccolo linfocita, definiscono invece la forma atipica della malattia, frequentemente associata ad un decorso clinico più aggressivo e una prognosi più sfavorevole.

Da un punto di vista immunofenotipico la cellula B di LLC esprime sulla sua superficie antigeni di membrana propri della linea differenziativa B come il CD19, il CD20 e il CD23. Inoltre, i linfociti B leucemici esprimono caratteristicamente sulla loro membrana un antigene comunemente espresso dai linfociti T, il CD5 [9]. Un altro aspetto importante che contraddistingue le cellule neoplastiche è la bassa densità di espressione delle Immunoglobuline (Ig) di superficie, componenti del recettore della cellula B (BCR), e la restrizione kappa o lambda delle catene leggere delle Ig, indice della clonalità della popolazione neoplastica. L'analisi immunofenotipica mostra anche negatività o debole espressione degli antigeni CD22, FMC7 e CD79b [10].

Lo studio citogenetico e l'analisi molecolare hanno essenzialmente una finalità prognostica [11]. Attraverso "fluorescence in situ hybridization" (FISH) è possibile determinare anomalie del cariotipo in più dell'80% dei casi di LLC, anche se nessuna di queste anomalie può essere considerata specifica della patologia. A differenza degli altri disordini linfoproliferativi, le traslocazioni sono eventi meno frequenti; al contrario, prevalgono le aberrazioni cromosomiche caratterizzate da acquisto o perdita di materiale genico. Le principali sono: la delezione del braccio lungo del cromosoma 13 (del13q14, in più del 50% dei casi), la trisomia del cromosoma 12 (nel 10-20% dei casi), la delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (del11q23, nel 10-20% dei casi) e la delezione del braccio corto del cromosoma 17 (del17p13, nel 5-10% dei casi) [12]. Inoltre le cellule di LLC possono presentare, al momento della diagnosi, anche alterazioni di natura genica, sebbene si tratti di un evento raro. Tra queste le più consuete sono rappresentate da mutazioni puntiformi e microdelezioni dei geni *TP53* e *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) che mappano rispettivamente sui cromosomi 17 e 11.

A prescindere dalla presentazione clinica iniziale, l'evoluzione della LLC è molto eterogenea; la sopravvivenza varia da mesi a decine di anni, con una mediana di circa 7,5 anni. Diventa quindi di fondamentale importanza essere a conoscenza già alla diagnosi di fattori prognostici che possano predire l'evoluzione nel tempo della malattia. I fattori prognostici tradizionali, di natura clinica, sono rappresentati dalla stadiazione secondo Rai o Binet; dal tempo di raddoppiamento della conta linfocitaria (LDT) e dal dosaggio di una serie di parametri sierologici quali: la beta2microglobulina ( $\beta$ 2M), la timidina chinasi (TK), la lattico deidrogenasi (LDH) e l'antigene CD23 in forma solubile (sCD23). I livelli di TK correlano con la massa tumorale e l'attività proliferativa delle cellule di LLC e predicono la progressione di malattia; livelli elevati di  $\beta$ 2M e sCD23 sono direttamente correlati a una prognosi negativa [13]. I suddetti criteri però, nonostante siano utili a definire l'estensione della malattia e a determinarne la progressione durante il follow-up clinico, non risultano

sufficienti a predire l'evoluzione della malattia nella fase iniziale di diagnosi. Al fine di stabilire meglio la prognosi, sono stati quindi identificati nuovi parametri prognostici di natura biologica, indipendenti da quelli clinici convenzionali. Attualmente lo "stato mutazionale" ovvero la frequenza delle mutazioni nei geni che codificano per la regione variabile delle catene pesanti delle Immunoglobuline (IgHV) è considerato il parametro più affidabile per definire la prognosi dei pazienti di LLC, data la sua stabilità durante il corso della malattia [14]. In relazione allo stato mutazionale della regione IgHV sono stati caratterizzati 2 gruppi di pazienti: uno a configurazione IgHV non mutata e uno a configurazione IgHV mutata, ciascuno caratterizzato da un andamento clinico diverso [15-17]. Recentemente, è stata inoltre segnalata l'importanza prognostica dell'espressione di due proteine, quali il CD38, glicoproteina di membrana mediatrice dell'interazione cellula-cellula, e ZAP-70, proteina tirosin-chinasica comunemente espressa dalle cellule T e cellule NK, ma non dai linfociti B normali circolanti. Pazienti che mostrano, allo studio immunofenotipico, una positività per entrambe le molecole, considerando un cut-off del 30% per il CD38 e del 20% per ZAP-70, appaiono avere una prognosi meno favorevole [18-21]. Entrambe le molecole sembrerebbero agire potenziando il segnale del BCR nelle cellule B di LLC. Il CD38, quando legato al suo ligando, il CD31, induce una cascata del segnale che porta la cellula B di LLC a proliferare e ad incrementare la propria sopravvivenza [22-24]. L'espressione di ZAP-70 è invece associata non solo ad un aumento del segnale attraverso il complesso del BCR ma esercita anche un ruolo nel modulare la lunghezza di tale segnale. Le cellule ZAP-70 positive (ZAP-70<sup>+</sup>) sembrerebbero più responsive rispetto alle cellule ZAP-70 negative (ZAP-70<sup>-</sup>), perché in grado di ricevere maggiori stimoli proliferativi e segnali di sopravvivenza [25-26]. Tali eventi potrebbero contribuire ad una progressione clinica rapida verso gli stadi più avanzati della malattia con tempi di sopravvivenza minori.

La LLC rimane ancora oggi una malattia difficilmente curabile. Nella decisione terapeutica assume sempre più importanza la presenza o assenza di alcuni fattori di natura biologica come lo stato mutazionale dei geni delle Immunoglobuline, l'espressione di ZAP-70, del CD38 e la presenza di specifiche alterazioni citogenetiche [27]. Per diversi decenni le terapie a base di agenti alchilanti hanno costituito il trattamento standard di prima linea nei pazienti affetti da LLC, come agenti singoli o in combinazione. Dalla metà degli anni '80 si è passati all'utilizzo di analoghi delle purine (es: Fludarabina) da soli o in combinazione con anticorpi monoclonali quali l'Alemtuzumab, una proteina diretta contro l'antigene CD52, e il Rituximab, un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD20 [28].



I progressi compiuti negli ultimi anni nell'ambito della ricerca scientifica hanno permesso di modificare la gestione terapeutica della LLC. La tendenza attuale va verso una terapia biologicamente-orientata, in cui la scelta del momento in cui iniziare la terapia e la strategia terapeutica sono basati sull'integrazione delle caratteristiche cliniche e biologiche della malattia. Gli studi clinici in corso sono, infatti, volti proprio alla stratificazione dei pazienti e quindi alla valutazione dell'efficacia di una strategia terapeutica basata sulle caratteristiche individuali di rischio.

## **PARTE I**

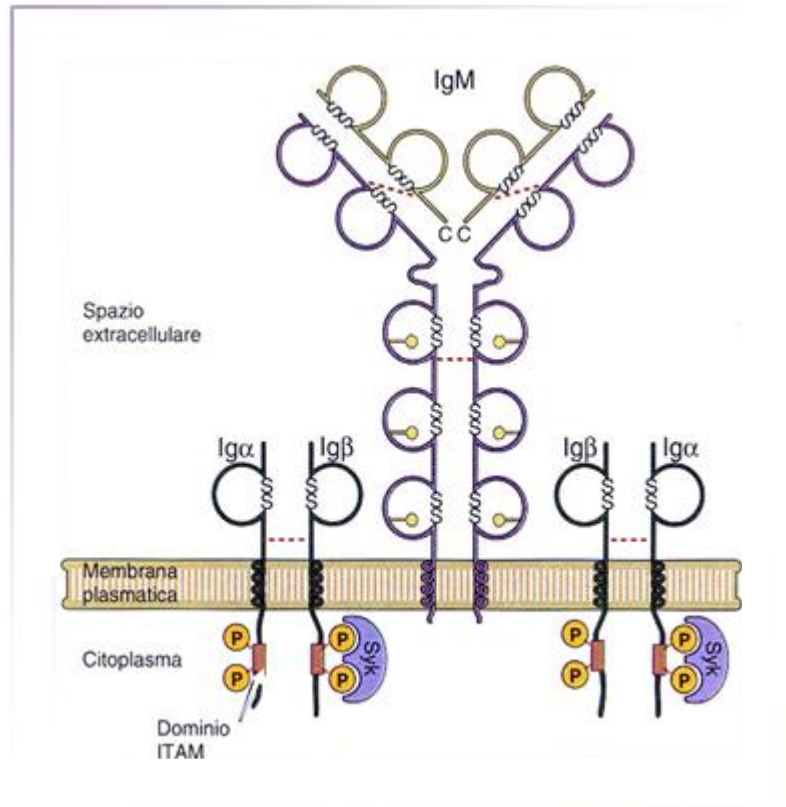
*Studio delle conseguenze funzionali della  
stimolazione in vitro delle cellule B neoplastiche di  
pazienti affetti da Leucemia Linfatica Cronica  
(LLC)*

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B (BCR)

### *1.1.1 Composizione e ruolo del BCR nel processo di ontogenesi B cellulare*

Il BCR è un complesso multimerico prodotto dall'assemblaggio non covalente di una molecola immunoglobulinica di membrana (sIg), coinvolta nel riconoscimento antigenico, e un eterodimero  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79a/CD79b), la cui funzione è di avviare la cascata di trasduzione del segnale in seguito alla stimolazione antigenica [Figura 1] [29]. Ciascuna cellula B matura esprime sulla sua superficie un recettore unico, selezionato da un ampio repertorio. La diversità del repertorio B recettoriale è il risultato di un processo di riarrangiamento, regolato dal prodotto dei geni attivanti la ricombinazione RAG1 e RAG2, a carico di multipli segmenti genici presenti all'interno dei loci delle Immunoglobuline. Nell'uomo, tali loci sono distinti in un locus codificante per tutti i differenti isotipi di catena pesante (locus H) e due loci codificanti per le catene leggere (loci  $\kappa$  e  $\lambda$ ), ciascuno situato su un cromosoma diverso. Il locus della catena pesante consiste dei tratti  $V_H$ , D,  $J_H$  e della porzione costante C. Quello della catena leggera è organizzato in modo simile ma manca del tratto D [2]. Il riarrangiamento dei suddetti segmenti genici si verifica durante il processo di ontogenesi B cellulare all'interno del midollo osseo e comporta la sintesi di una cellula B matura attraverso il differenziamento del progenitore staminale ematopoietico pluripotente, prima in cellula pro-B quindi pre-B. Una volta completato il processo di riarrangiamento del locus H, il gene riarrangiato viene trascritto e il relativo RNA messaggero (mRNA) primario va incontro ad un processo di splicing alternativo, consentito grazie alla presenza di sequenze ripetute di switch (S) situate a monte di ciascun esone, in seguito al quale il segmento  $V_HDJ_H$  è collegato al primo dominio della regione C, che determina l'isotipo anticorpale. Esistono complessivamente 5 isotipi anticorpali, M, G, A, D ed E, codificati ciascuno da uno dei rispettivi domini della regione  $C_H$ , quali  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  [30]. Il completamento della transizione da cellula pro-B a pre-B richiede, a questo punto, che l'mRNA maturo neosintetizzato sia tradotto nella catena pesante delle Immunoglobuline di cui viene, in un primo momento, verificata l'idoneità in base alla capacità di associarsi, all'interno del reticolo endoplasmatico (RE), ad un surrogato della catena leggera (SCL) composto da due polipeptidi omologhi ai domini  $V_L$  e  $C_L$ , denominati rispettivamente VpreB e  $\lambda 5$ . L'eterodimero  $Ig\alpha/Ig\beta$  rappresenta quindi la componente finale nell'assemblaggio del recettore della cellula pre-B (pre-BCR), consentendone inoltre il trasporto attraverso l'apparato di Golgi verso la superficie cellulare [31].



**Figura 1. Struttura del complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B (BCR).** Il BCR è formato dall'assemblaggio di Immunoglobuline di membrana (sIg) e l'eterodimero Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  provvisto, nella coda intracitoplasmatica, di alcuni motivi ricchi in residui di tirosina chiamati domini ITAM, indispensabili per la trasduzione del segnale.

Lo stadio pre-B costituisce la fase più precoce dello sviluppo B linfoide durante cui è richiesta la segnalazione attraverso il BCR [32]. Mutazioni target a carico dei geni codificanti i componenti del pre-BCR comportano, infatti, l'arresto del processo di differenziamento durante la transizione pre-B/pro-B. Si ritiene che la segnalazione attraverso il pre-BCR permetta il verificarsi del fenomeno dell'esclusione allelica, un meccanismo grazie al quale il linfocita esprime i geni riarrangiati della catena pesante e leggera appartenenti a uno solo dei due cromosomi omologhi, preservando in questo modo la specificità della risposta immunitaria. Conseguentemente alla formazione del pre-BCR la cellula blocca, inoltre, la sintesi delle proteine implicate nella ricombinazione somatica e le proteine surrogato della catena leggera e, dopo una serie di cicli proliferativi, perde la sua responsività all'IL-7 [33]. Non è chiaro quale sia il meccanismo alla base della trasduzione dei primi segnali attraverso il pre-BCR, sebbene sia stato supposto che lo stesso assemblaggio di questa forma recettoriale

sarebbe sufficiente a tale scopo. In realtà, probabilmente, la presenza stessa del pre-BCR sulla superficie cellulare potrebbe favorire dei processi di aggregazione recettoriale spontanei, come accade nel caso del BCR maturo, o mediati dalla localizzazione in microdomini ricchi in colesterolo e sfingolipidi noti come “zattere lipidiche”. Alcuni autori hanno invece postulato l’esistenza di un ligando midollare stromale, come ad esempio la galectina, potenzialmente coinvolto nel mediare l’aggregazione dei recettori della cellula pre-B, sebbene il contributo di tale ligando rimanga tuttora controverso [34]. Ad ogni modo, il pre-BCR è espresso solo transientemente sulla superficie della cellula pre-B, e la sua downregolazione richiede il riarrangiamento dei segmenti genici  $V_L$  e  $J_L$  del locus della catena leggera delle Immunoglobuline, evento che si verifica, attraverso un meccanismo simile a quello impiegato per la produzione della catena pesante, durante la transizione del linfocita B dallo stadio pre-B a quello di cellula B immatura. Tale riarrangiamento viene in realtà indotto grazie ad un meccanismo di feedback negativo, mediato dallo stesso pre-BCR, basato sull’inibizione della sintesi delle proteine surrogato della catena leggera, che impedisce l’ulteriore espressione del recettore della cellula pre-B. Una volta sintetizzata, la catena leggera si sostituisce al surrogato nell’appaiamento con la catena pesante e, a questo punto, viene espresso sulla superficie del linfocita B immaturo, un complesso recettoriale maturo antigene-specifico unico [35]. Tale unicità è, in primo luogo, frutto del vasto numero di eventi combinatoriali tra i segmenti genici V, D e J di ciascuna catena immunoglobulinica, che rappresentano il primo stadio nella generazione della diversità anticorpale caratteristica del sistema immune. In secondo luogo, a garantire ulteriormente l’unicità del BCR, il processo di diversificazione giunzionale, contraddistinto da eventi di aggiunta o rimozione casuale di sequenze nucleotidiche in corrispondenza dei punti di giunzione dei tratti V, D e J. La generazione della diversità del repertorio B recettoriale risulta indispensabile per la difesa dell’organismo dalla molteplicità di agenti patogeni cui è continuamente esposto. Di conseguenza è stato calcolato che, considerando unicamente il numero di ciascuno dei segmenti genici H e L, vi sarebbero potenzialmente oltre 1.6 milioni di combinazioni possibili, una cifra che rende comprensibilmente insignificante la probabilità di osservare due complessi B recettoriali identici, non solo nello stesso soggetto ma anche tra soggetti diversi.

Questo presupposto diventa interessante quando si esaminano le caratteristiche del BCR delle cellule neoplastiche di pazienti affetti da LLC, il cui studio, come vedremo, ha condotto all’ipotesi della stimolazione antigenica come meccanismo patogenetico.

## **1.2 Ruolo del BCR nella patogenesi della LLC**

### *1.2.1 Caratteristiche strutturali del BCR delle cellule B di LLC*

La LLC è stata a lungo considerata una patologia derivante dalla trasformazione neoplastica di linfociti B immaturi, immunologicamente incompetenti e scarsamente proliferanti, caratterizzati da resistenza all'apoptosi e conseguente tendenza ad accumularsi nel paziente. I progressi nello studio dei geni IgV, del loro assemblaggio e delle modifiche che subiscono durante il differenziamento e la stimolazione antigenica B cellulare hanno permesso di analizzare il livello di competenza, esperienza e stato di maturazione delle cellule B, rivelandosi utili a migliorare la comprensione della LLC e a ridefinire il concetto della sua patogenesi. Diversamente dal passato, oggi la LLC viene, infatti, considerata una neoplasia derivante dall'espansione clonale di cellule B mature, antigenicamente esperte, la cui tendenza ad accumularsi rappresenta, in realtà, il risultato di una condizione dinamica caratterizzata da uno squilibrio tra morte e proliferazione [36].

Le prime evidenze ad aver favorito un avanzamento nella comprensione della patogenesi della LLC sono derivate dallo studio delle caratteristiche dei geni IgHV e LV delle cellule B neoplastiche. Tali studi sono stati incentivati dall'osservazione dell'eterogeneità del decorso clinico dei pazienti affetti da LLC, una peculiarità caratteristica di questa malattia nonostante la presenza di un profilo morfologico, immunofenotipico e genomico pressoché omogeneo, ed hanno evidenziato la presenza di una correlazione tra la suddetta variabilità e le caratteristiche strutturali e funzionali del BCR delle cellule B patologiche. In primo luogo, il sequenziamento genico ha consentito di identificare lo stato mutazionale del locus IgHV come il parametro più affidabile per definire la prognosi dei pazienti di LLC. I pazienti caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata sono, infatti, associati a un andamento aggressivo della malattia e, quindi, a una prognosi più sfavorevole; mentre i pazienti caratterizzati da una configurazione IgHV mutata presentano solitamente decorso indolente, lenta progressione della malattia e lungo tempo di sopravvivenza. Questo dato ha fornito le basi per sostenere l'ipotesi che le due sottoclassi prognostiche potessero differire primariamente in relazione alla reattività del BCR dei linfociti B neoplastici; ipotesi successivamente avvalorata dagli studi relativi alle caratteristiche del repertorio di geni IgHV e LV impiegato da tali cellule [37]. All'interno del locus IgH sono presenti 51 geni HV funzionali, raggruppati in 7 famiglie sulla base di una omologia di sequenza pari almeno all'80%. Nella LLC, un impiego non casuale dei componenti delle suddette famiglie geniche, è stato innanzitutto riportato in seguito all'osservazione di un riscontro più frequente di alcuni

geni, di quanto atteso probabilisticamente. Le cellule B neoplastiche utilizzano, infatti, preferenzialmente i geni delle famiglie IgHV1, HV3 e HV4 secondo una distribuzione differente rispetto alla controparte B normale, rappresentata convenzionalmente dalle cellule B CD5<sup>+</sup>, sebbene, considerando la possibilità che il CD5 venga acquisito dopo la stimolazione antigenica, qualsiasi popolazione B linfoide potrebbe costituire il precursore della LLC. Le cellule B neoplastiche mostrano, inoltre, anche all'interno di queste famiglie, una preferenza per alcuni geni quali IgHV1-69, HV3-07, HV3-21, HV3-23 e HV4-34 [38]. Di questi, il gene IgHV1-69, come dimostrato da una serie di studi condotti a partire dalla fine degli anni '80, risulta nel complesso il gene IgHV maggiormente impiegato dalle cellule B di LLC; a seguire il gene IgHV3-21. E' possibile che le percentuali relative all'uso ristretto di specifici geni IgHV subiscano leggere variazioni all'interno delle diverse coorti di pazienti esaminate, ad ogni modo, questo comportamento può essere spiegato considerando l'impatto della distribuzione geografica e, quindi, il possibile effetto di un agente ambientale di origine regionale nella selezione del clone leucemico dotato di una peculiare specificità recettoriale. Nei pazienti affetti da LLC è stata anche rilevata un'associazione specifica di alcuni tratti HV al riarrangiamento preferenziale di determinati tratti HJ e HD. Ad esempio l'impiego del gene IgHV1-69 è risultato caratteristicamente associato a quello dei segmenti genici J6 e D3-3 o D2-2. Analogamente la maggior parte dei casi esprimono il gene IgHV3-07 utilizza i segmenti genici delle famiglie J4 (90% dei casi) e D3 [39]. Sorprendentemente, anche la presenza o assenza di ipermutazioni somatiche appare associata all'uso di specifici e ricorrenti geni IgHV e segue una precisa gerarchia basata sia sulla famiglia che sul singolo segmento genico selezionato. Sono, infatti, maggiormente inclini all'acquisto di mutazioni somatiche i geni della famiglia IgHV3, a seguire IgHV4 e IgHV1. Inoltre, all'interno di tali famiglie, i geni IgHV4-34 sono quelli preferibilmente espressi nelle forme mutate di LLC, mentre i geni IgHV1-69 e HV4-39 nelle forme non mutate [40]. Fa eccezione il gene IgHV3-21, distribuito più equamente tra riarrangiamenti mutati e non mutati, e caratterizzato dalla peculiarità di essere associato a cattiva prognosi indipendentemente dallo stato mutazionale [41]. Le mutazioni osservate all'interno dei tratti genici HV sono di natura missenso, cambiano quindi la composizione aminoacidica della molecola immunoglobulinica, e manifestano una localizzazione preferenziale all'interno di sei domini noti con il termine di "Regioni Determinate Complementarità" (CDR). Le regioni CDR, tre in ciascun riarrangiamento immunoglobulinico, sono regioni ipervariabili coinvolte nella formazione del sito di riconoscimento antigenico del BCR. La più variabile delle suddette regioni è la CDR3 della catena pesante (HCDR3) che si estende a livello del sito di giunzione dei segmenti genici VDJ

e, di conseguenza, rappresenta il principale determinante della specificità del sito di legame per l'antigene [42]. A tale proposito è importante sottolineare come anche le regioni HCDR3 mostrino delle caratteristiche peculiari nei pazienti affetti da LLC. È stato osservato che l'impiego di specifici geni IGHV condiziona sia la lunghezza sia la composizione aminoacidica all'interno della regione HCDR3. Ad esempio, i casi caratterizzati dal riarrangiamento HV1-69 presentano una regione HCDR3 molto lunga; al contrario, i casi caratterizzati dal riarrangiamento HV3-07 hanno una regione HCDR3 piuttosto corta. Vi sono poi tratti genici associati a molteplici tipologie di regioni HCDR3. In base alla lunghezza di tali regioni, i pazienti IgHV4-34<sup>+</sup> segregano, ad esempio, in 2 sottogruppi: i casi HV4-34<sup>+</sup> non mutati hanno HCDR3 più lunghi, contenenti solitamente i segmenti J6 o J5, mentre quelli HV4-34<sup>+</sup> mutati hanno HCDR3 più corti in associazione al segmento J4 [43]. Ad ogni modo, in tutti i casi la lunghezza delle regioni HCDR3 appare significativamente differente nelle cellule B neoplastiche di LLC rispetto alle cellule B normali. Una caratteristica peculiare delle cellule di LLC che utilizzano la famiglia genica IgHV1 è inoltre la presenza di code tirosiniche a livello della regione 3', codificate parzialmente dal segmento genico J6. Infine, la carica del segmento HCDR3 definita in termini di punto isoelettrico (pI), rappresenta un'altra distinzione che caratterizza le cellule di LLC relativamente all'uso dei geni IGHV. Le cellule leucemiche che esprimono i geni della famiglia IgHV1 hanno, ad esempio, il pI minore mentre le cellule IgHV3<sup>+</sup> hanno il pI molto più alto. I casi IgHV4<sup>+</sup> mostrano valori intermedi. Complessivamente, quindi, la lunghezza, la composizione aminoacidica e la carica della regione HCDR3 delle cellule leucemiche tendono a variare dipendentemente dal gene IGHV espresso [44].

Al di là delle differenze nelle regioni HCDR3 proprie delle cellule di LLC rispetto alla controparte B normale, è di grande interesse l'osservazione che cloni B leucemici appartenenti a differenti pazienti, possano presentare un utilizzo di regioni HCDR3 molto simili tra loro. Tale considerazione ha condotto al concetto del cosiddetto "recettore stereotipato". La somiglianza nella composizione del BCR rilevata in pazienti affetti da LLC appartenenti anche ad aree geograficamente lontane, costituisce una peculiarità unica di questa malattia, con un tasso medio del 20% circa. Si ritiene comunque che tale percentuale sia sottostimata in quanto, in molti casi, l'ipermutazione somatica comporta la sostituzione di un aminoacido presente nella regione HCDR3 del recettore con un altro, dotato di caratteristiche fisiche e chimiche analoghe, che conseguentemente dà origine a un sito di legame antigenico molto simile in termini di specificità. Questa osservazione supporterebbe l'ipotesi relativa all'esistenza di un insieme di antigeni o classi di epitopi strutturalmente



simili con un ruolo primario nella selezione del clone B leucemico [45]. L'espressione di BCR stereotipati è più frequente in pazienti di LLC con geni IgHV non mutati, dove può raggiungere valori intorno al 40%, rispetto ai casi IgHV mutati, dove si attesta a valori pari al 10% [46]. Inoltre, i pazienti con stato IgHV non mutato contraddistinti da BCR stereotipati presentano un pattern distintivo di mutazioni somatiche rispetto ai pazienti con riarrangiamenti casuali del BCR. Alcuni geni IgHV sono poi maggiormente associati a regioni HCDR3 stereotipate. E' il caso dei geni IgHV3-21; HV1-69, HV1-2, HV1-3 e HV4-39; al contrario i geni IgHV3-7, HV3-74 e HV2-5 hanno una bassa probabilità di mostrare HCDR3 stereotipati. In alcuni casi, l'assenza di HCDR3 omologhi si correla alla comparsa di omologie strutturali a livello delle cosiddette "regioni cornice" (FWR). Le regioni FWR separano le regioni CDR e sono altamente conservate tra i vari membri delle famiglie geniche. In passato si riteneva che la loro funzione fosse il mantenimento della struttura terziaria delle Immunoglobuline, ma negli ultimi anni sono state identificate alcune proteine di natura microbica ed endogena in grado di interagire direttamente, in qualità di superantigeni, con tali regioni, rivelando l'esistenza di ipotetici siti di legame ad esse associati. Di conseguenza, la bassa frequenza di HCDR3 stereotipati potrebbe indicare una forma di riconoscimento antigenico, da parte del BCR, di natura non convenzionale, ovvero al di fuori dei siti caratteristici del legame classico, rappresentati appunto dalle regioni HCDR3 [47]. La presenza di un'omologia strutturale a carico del BCR influenza solitamente in modo negativo l'andamento prognostico della malattia, associandosi a caratteristiche fenotipiche, molecolari e cliniche aggressive. Il primo studio finalizzato alla valutazione dell'impatto clinico della stereotipia risale al 2004 e mostra in una serie di 5 pazienti con composizione simile dei rispettivi BCR, un decorso aggressivo della malattia, complicato da ricorrenti infezioni, trasformazione in sindrome di Richter e formazione di tumori solidi [48]. In seguito, è stato anche dimostrato come l'influenza prognostica della stereotipia possa avere importanti implicazioni prognostiche addizionali e/o indipendenti dallo stato mutazionale. E' il caso dei pazienti IgHV3-21<sup>+</sup> [45].

Diversamente dalle catene pesanti, meno note sono le peculiarità del repertorio dei geni LV e LJ caratteristico delle cellule B di LLC. Sembrerebbe che tale repertorio non differisca sostanzialmente da quello impiegato dalla controparte B normale, sebbene alcune differenze nei riarrangiamenti IgLV-J siano state osservate, maggiormente a carico dei geni del locus k. Ad ogni modo, i dati disponibili indicano, nel complesso, non solo un impiego peculiare di specifici tratti IgLV nella LLC, ma anche la presenza di un appaiamento non stocastico delle catene leggere alle catene pesanti del BCR, a sostegno del ruolo complementare delle catene

leggere nel riconoscimento antigenico del recettore clonotipico. Per quanto riguarda l'uso di un ristretto repertorio di geni IgLV nella LLC, è stato osservato, in un recente studio effettuato su un totale di 276 pazienti, l'impiego preferenziale nei casi  $k^+$  dei geni IgkV3-20, IgkV1-39, IgkV1-5, IgkV4-1 e IgkV2-30 e nei casi  $\lambda^+$  dei geni Ig $\lambda$ V3-21, Ig $\lambda$ V2-8 e Ig $\lambda$ V2-14. La restrizione del repertorio IgLV è stata primariamente osservata nei casi di BCR stereotipati, dove anche i motivi Lcdr3 appaiono omologhi laddove viene impiegato lo stesso gene  $k$  o  $\lambda$ . La presenza di mutazioni somatiche è risultata invece caratteristica del 50.3% dei pazienti  $k^+$  e del 45.4% dei pazienti  $\lambda^+$ , con l'osservazione che, similmente a quello che accade nel caso delle catene pesanti, l'accumulo delle mutazioni avviene in modo differenziale all'interno delle famiglie e dei segmenti genici e che alcuni cambiamenti aminoacidici sono preferiti e quindi ricorrono rispetto ad altri [49]. In questo studio, come in una serie di studi paralleli, è stata inoltre rivelata un'associazione specifica tra domini IgkV-J/Ig $\lambda$ V-J e domini IgHV-D-J impiegati all'interno delle cellule B neoplastiche. L'utilizzo del gene IgkV1-39 è risultato ad esempio frequente nei casi IgHV1-69<sup>+</sup>, mentre quello dei geni Igk2-30 e Ig $\lambda$ 3-21 è apparso rispettivamente in associazione ai riarrangiamenti IgHV4-34 e IgHV3-21 [40]. Recentemente il concetto dell'implicazione delle catene leggere nel riconoscimento antigenico delle cellule B di LLC, è stato anche rafforzato grazie alla considerazione che una proporzione di pazienti con espressione monotipica del locus IgL risulta caratterizzata da riarrangiamenti IgL funzionali multipli, alludendo alla possibilità che riarrangiamenti secondari del locus IgL possano verificarsi nel contesto del processo di editing recettoriale indotto dall'esposizione ad un (auto)antigene [50]. In conformità a tali dati, è possibile sostenere l'ipotesi secondo cui la reattività nei confronti dell'antigene coinvolto nella selezione del clone B patologico non dipenda esclusivamente dalle caratteristiche delle componenti IgHV e Hcdr3, ma dalla struttura complessiva del BCR stereotipato. Di conseguenza, la formazione di un distintivo sito di riconoscimento antigenico richiederebbe sia il contributo delle catene pesanti che di quelle leggere e il riarrangiamento dei loci IgH e IgL potrebbe riflettere l'ancestore della LLC e la storia dell'esposizione antigenica di ciascun paziente.

Accanto alle peculiarità dei riarrangiamenti a carico dei loci IgH e IgL, sono spesso osservate nelle cellule B di LLC, alterazioni strutturali della componente immunoglobulinica del recettore così come delle componenti Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , coinvolte nella trasduzione del segnale. Queste alterazioni sono in parte responsabili della bassa espressione superficiale del BCR, sebbene il meccanismo attraverso cui vengano indotte non sia stato ancora chiarito [51]. E' stato ipotizzato che alla base vi sia un'alterazione dei processi di folding dei singoli elementi che

costituiscono il complesso recettoriale. Recentemente è stato, infatti, dimostrato che la catena pesante  $\mu$  delle IgM di superficie e la catena Ig $\alpha$  sono trattenute nel reticolo endoplasmatico delle cellule B di LLC. Questo fenomeno è associato a un difetto nella glicosilazione di entrambe le molecole e determina una loro ridotta traslocazione sulla membrana cellulare, cui consegue una diminuzione della densità di superficie del BCR [52]. In molti casi di LLC è stata anche identificata una variante tronca della catena Ig $\beta$ , prodotta come conseguenza della delezione dell'esone 3, codificante per il dominio extracellulare di tale molecola [53]. Questo dato suggerisce come, oltre al processo di folding proteico, anche il meccanismo di splicing alternativo possa essere implicato nel causare ridotti livelli di espressione del BCR sulla superficie delle cellule neoplastiche, una caratteristica solitamente presente in cellule B linfoidi anergizzate, che non necessariamente si associa ad una difettiva o assente segnalazione attraverso il BCR.

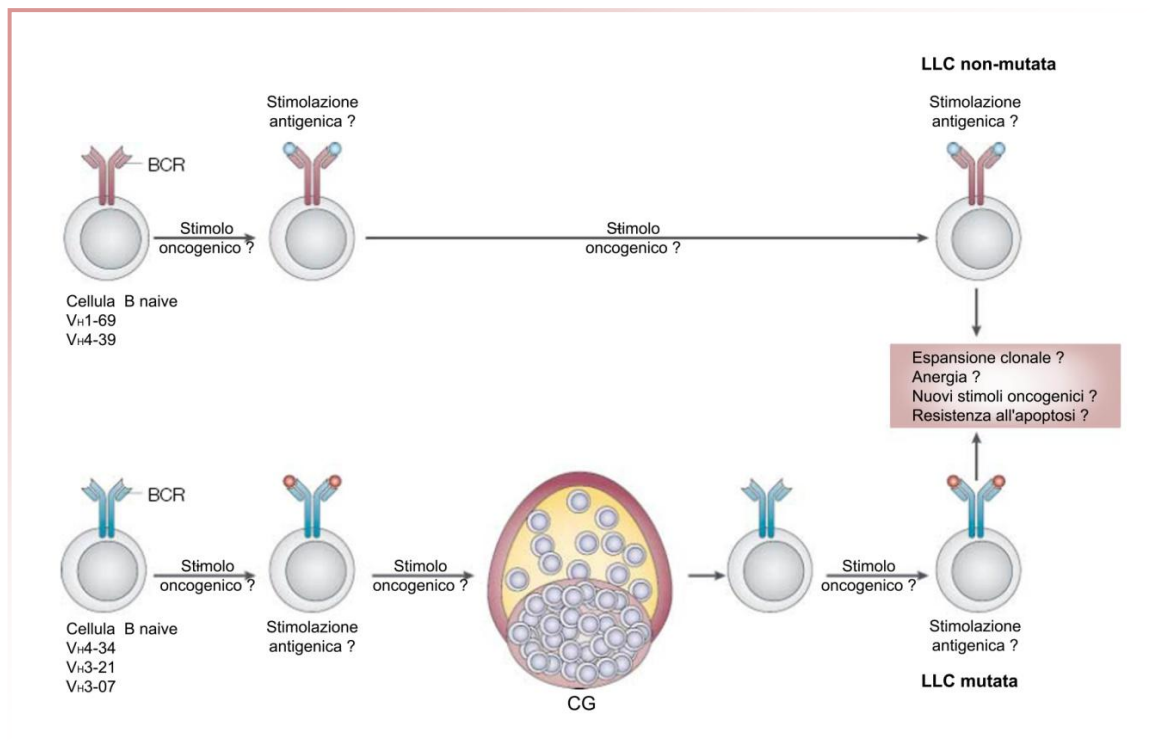
Il BCR espresso dalle cellule B di LLC presenta, quindi, una serie di caratteristiche strutturali peculiari. L'insieme di tali caratteristiche supporta la tesi del ruolo fondamentale dell'interazione con l'antigene nella patogenesi della leucemia e nella selezione del clone leucemico. Conseguentemente, la comprensione del loro impatto sulla funzionalità del BCR diventa di grande importanza per la comprensione della modalità mediante la quale il BCR possa influenzare il destino della popolazione B neoplastica.

### *1.2.2 Stato maturativo e d'attivazione delle cellule B di LLC*

Le osservazioni relative alle caratteristiche del BCR delle cellule B leucemiche hanno condotto ad avvalorare la tesi secondo la quale la stimolazione antigenica abbia un ruolo fondamentale nella patogenesi della LLC. In realtà, considerando che il processo di diversificazione del repertorio immunoglobulinico richiede la stimolazione del BCR mediata dalla presenza dell'antigene, si potrebbe erroneamente dedurre che i casi di LLC caratterizzati da una configurazione IgHV mutata derivino da cellule antigenicamente esperte e, al contrario, che i casi di LLC con configurazione IgHV non mutata originino da cellule B naive. Questa apparente contraddizione può essere risolta tenendo presente che l'assenza di mutazioni somatiche a carico delle regioni variabili delle catene pesanti delle Immunoglobuline non necessariamente equivale all'assenza di una precedente stimolazione antigenica e che tali casi potrebbero derivare da cellule B che, pur avendo incontrato l'antigene, non hanno accumulato mutazioni. A sua volta, il mancato accumulo di mutazioni potrebbe dipendere dal tipo di stimolazione antigenica che la cellula ha ricevuto o essere il risultato del momento in cui si è verificato l'evento trasformante. Sebbene il meccanismo alla

base di tale diversificazione non sia tuttora chiaro, oltre agli studi relativi alla struttura del BCR, anche i dati ottenuti analizzando lo stato maturativo e d'attivazione delle cellule B leucemiche, supportano la tesi dell'origine comune di entrambi i sottotipi di LLC dalla trasformazione neoplastica di una cellula B esposta alla stimolazione antigenica, definendo la presenza dell'antigene il prerequisito per l'evoluzione clonale della malattia, anche in quei casi che non esibiscono mutazioni nella regione IgHV [Figura 2].

In primo luogo, diversi studi immunofenotipici hanno evidenziato nelle cellule di LLC, non solo l'espressione di una serie di marcatori caratteristici di cellule B attivate a seguito della stimolazione antigenica, ma anche uno stato d'attivazione più avanzato rispetto a quello di cellule B normali. Quando confrontate con linfociti B normali CD5<sup>+</sup>, le cellule B neoplastiche mostrano, infatti, un'iperespressione dei marcatori di attivazione CD23, CD25, CD39, CD40, CD69 e CD71, affiancata ad un'elevata e omogenea densità di espressione del CD27, un marcatore tipico delle cellule B memoria. Allo stesso tempo, tali cellule sono caratterizzate da una riduzione dell'espressione del CD22, del CD79b, del CD32 (FCγBIIb) e dell'isotipo D delle Immunoglobuline, evento consistente con la tesi dell'attivazione *in vivo* dei linfociti B patologici, in quanto le suddette molecole sono normalmente sottoposte ad un controllo negativo in seguito alla stimolazione antigenica [54]. È stato, infatti, osservato che le cellule B stimulate attraverso il BCR sono in grado di downmodulare l'espressione del CD79b, attraverso la modulazione sia della trascrizione che del processo di splicing dell'mRNA [55]. Allo stesso modo, il ridotto rapporto tra le IgM e le IgD di superficie, riportato a carico delle cellule B di LLC, potrebbe essere il risultato di una modulazione indotta dall'incontro con l'antigene, dal momento che le cellule B mature che co-esprimono molecole immunoglobuliniche di entrambi gli isotipi, downregolano l'espressione delle sIgD come conseguenza della segnalazione attraverso il BCR [56]. Questo spiegherebbe il motivo della ridotta densità superficiale delle Immunoglobuline, caratteristico delle cellule neoplastiche della maggior parte dei pazienti affetti da LLC [57]. Anche la bassa espressione del CD22 e del CD32, molecole entrambe coinvolte nella regolazione negativa delle risposte B cellulari indotte sia attraverso il BCR che il CD38, rafforza il concetto secondo cui le cellule B di LLC siano in grado di rispondere all'antigene andando incontro, di conseguenza, alla perdita di fattori di natura regolatoria [58]. Le suddette caratteristiche fenotipiche sono le stesse sia nei casi di LLC IgHV mutata che non mutata. I due sottogruppi differiscono unicamente nella percentuale di cellule neoplastiche positive per l'espressione degli specifici marcatori di superficie.



**Figura 2. La LLC come un disordine della cellula antigenicamente esperta.** I due principali sottotipi di LLC sono distinti in base alla presenza o assenza di mutazioni nella regione IgHV. Poiché lo sviluppo di mutazioni nella regione IgHV richiede la stimolazione dell'antigene e quindi l'attivazione del BCR, molto probabilmente i casi di LLC mutata derivano da cellule B stimulate che passano attraverso il centro germinativo (CG) e subiscono il processo di ipermutazione somatica. Per questa stessa ragione i casi di LLC non-mutata dovrebbero derivare da cellule B naive, ma poiché la mancanza di mutazioni nella regione IgHV non necessariamente significa assenza di stimolazione antigenica, questi casi potrebbero trarre origine da cellule B stimulate dall'antigene che non hanno ricevuto stimoli sufficienti per formare il CG e accumulare mutazioni. Di conseguenza, in entrambi i casi di LLC la stimolazione antigenica sembra essere un prerequisito essenziale per l'evoluzione della leucemia e la continua e prolungata esposizione all'antigene può fornire stimoli proliferativi, resistenza all'apoptosi o anergia, a seconda delle caratteristiche delle cellule B neoplastiche.

Infatti, i casi non mutati presentano sovente, una percentuale maggiore di cellule CD38<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>, mentre i casi mutati mostrano una maggiore espressione dei marcatori CD39 e CD71. L'intervallo temporale tra l'attivazione cellulare e la modulazione di questi marcatori varia notevolmente all'interno della popolazione B normale; ad esempio, l'upregolazione del CD69 si verifica anticipatamente rispetto a quella del CD71 [59]. Di conseguenza, considerando la relazione inversa tra l'espressione del CD69 e del CD71 nell'ambito dei due sottogruppi di LLC, si potrebbe ipotizzare che i casi non mutati ricordino delle cellule B

temporalmente più prossime allo stimolo antigenico e quindi ad uno stadio più precoce di attivazione rispetto ai casi mutati.

La presenza di un fenotipo attivato indipendentemente dallo stato mutazionale, consente di confermare la tesi secondo cui entrambe le forme di LLC abbiano origine da una cellula B antigenicamente esperta. Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare l'assenza di mutazioni somatiche a carico dei geni IgHV, caratteristica di una percentuale di pazienti affetti da LLC. E' stato ad esempio supposto che le cellule B neoplastiche possano non aver accumulato mutazioni come conseguenza della mancata attivazione del macchinario mutazionale. In alternativa, si potrebbe pensare che tali cellule siano state esposte a un antigene non in grado di indurre il meccanismo di ipermutazione somatica e/o le reazioni del centro germinativo, come nel caso di antigeni T-indipendenti, o che siano state attivate da un antigene T-dipendente, ma trasformate prima dell'ingresso nel centro germinativo. Ancora, dopo la trasformazione maligna, si potrebbe essere verificata un'esclusione dei linfociti patologici dal centro germinativo stesso o semplicemente le cellule IgHV non mutate potrebbero aver avuto origine da linfociti specifici per antigeni maggiormente reattivi in presenza di geni IgHV non mutati [60]. Ciononostante, non è possibile escludere la possibilità che i dati relativi al fenotipo attivato delle cellule B di LLC siano una conseguenza degli effetti della trasformazione neoplastica sulla deregolazione dell'espressione dei geni codificanti molecole attivatorie. Ad ogni modo, la tesi dell'attivazione *in vivo* delle cellule B di LLC, viene anche supportata dall'osservazione, all'interno di tali cellule, dell'overespressione della ciclina D2, coinvolta nella progressione del ciclo cellulare; della traslocazione costitutiva del fattore nucleare delle cellule attivate (NF-ATp); della fosforilazione dei fattori STAT-1 e STAT-3, mediatori della trasduzione del segnale e dell'attivazione trascrizionale a valle del BCR, e della sintesi di numerose citochine immunomodulatorie tra cui l'interleuchina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, l'interferone (IFN)- $\gamma$ , il fattore di necrosi tumorale (TNF), il fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF) e il fattore di crescita tumorale (TGF)- $\beta$ 1 [61-62]. Tali citochine, normalmente prodotte da cellule B attivate, sono non solo sintetizzate ma anche secrete dalle cellule B neoplastiche. Il loro ruolo nello sviluppo e nella progressione della LLC non è del tutto chiaro; è stato ipotizzato che alcune citochine come il TNF- $\alpha$  e l'IL-8, possano promuovere la crescita cellulare in modo autocrino, altre in modo paracrino.

La valutazione, all'interno delle cellule B neoplastiche, della lunghezza dei telomeri fornisce informazioni aggiuntive per la comprensione della storia proliferativa della LLC. I telomeri sono strutture nucleotidiche esameriche ripetute (TTAGGG) presenti all'estremità di ciascun

cromosoma, la cui lunghezza si riduce ad ogni divisione cellulare come conseguenza di un normale processo di senescenza. Durante la reazione del centro germinativo, le cellule B normali dimostrano un elevato livello di attività della telomerasi, enzima deputato al processo di allungamento dei telomeri, che non si osserva in nessun altro tipo cellulare. E' stato dimostrato che le cellule B dei pazienti di LLC sono caratterizzate da telomeri di lunghezza ridotta rispetto a quelli di cellule B normali isolate da soggetti aventi la stessa età. Questo dimostra, contrariamente a quanto si pensava decenni fa, non solo che le cellule di LLC si dividono, ma che lo fanno con frequenza maggiore rispetto alla controparte normale. Inoltre, quando si confrontano i due sottogruppi di LLC distinti in base allo stato mutazionale dei geni IGHV, si osserva che le cellule B a configurazione non mutata hanno telomeri più corti rispetto alle cellule B a configurazione mutata, un dato indicativo di una storia replicativa più lunga, in linea con la prognosi più sfavorevole di tale gruppo [63]. Ciononostante, il grado di accorciamento telomerico è lo stesso in entrambi i casi per cui, con molta probabilità, i maggiori cambiamenti si verificano prima della trasformazione neoplastica. In apparente contraddizione con quanto riportato, l'attività enzimatica della telomerasi è più elevata nelle cellule non mutate, ovvero con telomeri più corti. Considerando che la telomerasi viene attivata quando i telomeri raggiungono una lunghezza tale da minacciare la sopravvivenza cellulare, è stato ipotizzato, nel caso della LLC IgHV non mutata, che l'induzione della telomerasi sia utile a compensare l'eccessiva perdita di lunghezza dei telomeri che si verifica durante la fase preleucemica e leucemica e che risulta proporzionale al numero di divisioni cellulari [64].

Un'idea più precisa del tasso proliferativo delle cellule B di LLC e, quindi, del loro turnover di crescita è stata fornita attraverso una misurazione *in vivo* basata sull'impiego del deuterio, un isotopo non radioattivo dell'idrogeno. La somministrazione di D<sub>2</sub>O a soggetti affetti da LLC, allo scopo di marcare il DNA cellulare, ha consentito di valutare non solo la quota di cellule di nuova generazione, ma anche la crescita in termini esponenziali. Attraverso l'impiego di questo approccio, è stato possibile rilevare un tasso di nuova generazione di un intero clone di LLC pari allo 0.1-1.75% al giorno, equivalente a 10<sup>9</sup>-10<sup>12</sup> cellule, e un tasso di crescita tra -1.052% e +0.712% al giorno [2]. Ovviamente i livelli di cellule B neoplastiche circolanti in ciascun paziente di LLC sono proporzionali alle dinamiche di nascita e morte cellulare, quest'ultima calcolata sottraendo al tasso di crescita quello di nuova generazione. In base a tale presupposto è stato osservato che nelle forme più aggressive di LLC la nascita supera la morte cellulare, contrariamente a quanto si verifica nei casi più stabili, dove i due valori sono pressoché uguali. Inoltre, la rilevazione dell'espansione del clone B neoplastico

richiede almeno 2 settimane, un dato interessante che supporta la tesi secondo la quale le cellule B leucemiche siano prodotte all'interno di compartimenti solidi come il midollo osseo, la milza, i linfonodi, e in seguito rilasciate a livello ematico. Complessivamente, i dati riportati confermano la tesi secondo la quale la LLC sarebbe una patologia dinamica in cui l'accumulo delle cellule B tumorali rappresenta il risultato dello squilibrio tra eventi proliferativi e apoptotici che, a sua volta, appare strettamente correlato alle interazioni tra il BCR neoplastico e lo specifico stimolo antigenico.

Anche gli studi di espressione genica dei linfociti B neoplastici supportano la tesi della stimolazione antigenica nella patogenesi della LLC. E' stato, infatti, dimostrato che tali cellule manifestano, indipendentemente dallo stato mutazionale, un pattern di espressione uniforme, tipico di cellule B memoria e, allo stesso tempo, distinto da quello caratteristico di altre neoplasie di natura B cellulare. Delle migliaia di geni caratteristicamente espressi dalle cellule di LLC, solo un numero esiguo che può variare, a seconda degli studi, tra 20 e 200, mostra un'espressione differenziale tra casi IgHV mutati e non [65-66]. Quest'osservazione suggerisce che entrambi i gruppi possano derivare da un precursore comune attraverso lo stesso meccanismo patogenetico, che implica l'attivazione funzionale della cellula B leucemica e si verifica probabilmente allo stadio di cellula B memoria. I risultati ottenuti dagli studi di espressione genica sono supportati dal fatto che la LLC è l'unica tra le malattie neoplastiche linfoidi a non presentare le traslocazioni reciproche bilanciate. Questo tipo di aberrazioni si verifica durante la ricombinazione VDJ nelle prime fasi di sviluppo delle cellule B, o all'interno dei centri germinativi durante il processo di ipermutazione somatica e lo scambio di classe. Quindi, se il processo neoplastico ha inizio nelle cellule B memoria non può implicare le traslocazioni cromosomiche, visto che tale processo nelle cellule B memoria è stato già inattivato. Tale dato è consistente con la predominante presenza, nelle cellule di LLC, di alterazioni genetiche come le delezioni o le amplificazioni, peculiari di neoplasie che colpiscono tessuti non esposti ai processi di ipermutazione somatica. Inoltre, l'acquisizione di tali anomalie citogenetiche supporta ulteriormente il concetto dell'evoluzione clonale della LLC dal momento che la maggior parte di queste alterazioni si manifesta in fase tardiva di malattia, non essendo presente all'inizio del processo di tumorigenesi. Molto probabilmente, la continua e ripetuta stimolazione delle cellule neoplastiche da parte dell'antigene, contribuisce all'accumulo delle aberrazioni cromosomiche, con conseguente influenza sulla progressione tumorale.



### *1.2.3 Natura degli antigeni implicati nella patogenesi ed evoluzione della LLC*

Data la moltitudine di dati a favore dell'implicazione della stimolazione antigenica nello sviluppo della LLC, uno degli aspetti di maggior interesse è rappresentato dal tentativo di comprendere quale sia la natura dell'antigene coinvolto nella selezione tumorale. Quest'ultima, non può essere definitivamente dedotta dalle sequenze dei geni delle Immunoglobuline espressi dalle cellule B neoplastiche ma, allo stesso tempo, può fornire alcune importanti informazioni avvalendosi della conoscenza di anticorpi con specificità nota. Le sequenze codificanti dei geni IgHV e IgLV espressi nella LLC sono state usate per generare dei "trasfettomi" produttori anticorpi allo scopo di studiarne l'attività di legame. Attraverso questo approccio, è stata osservata una reattività delle cellule B leucemiche nei confronti di autoantigeni, antigeni microbici e apteni. In particolare, una forte omologia di sequenza tra le componenti immunoglobuliniche del BCR delle cellule B neoplastiche e anticorpi diretti contro antigeni self, come ssDNA, tireoglobulina, actina, mioglobina e cardiolipina è risultata peculiare della maggior parte dei casi di LLC in cui il clone leucemico presenta regioni CDR3 stereotipate [67]. Recenti studi basati sull'impiego di anticorpi ricombinanti espressi da pazienti di LLC, hanno poi rivelato che l'80% e il 15% degli anticorpi di LLC rispettivamente IgHV non mutata e mutata, reagisce con antigeni self e non secondo una modalità polireattiva. Sebbene in modelli murini transgenici l'espressione di recettori polireattivi non porta di per se allo sviluppo della leucemia, il basso livello di stimolazione continua di tali recettori solitamente a bassa affinità, potrebbe potenzialmente aumentare il rischio di LLC. E' stato inoltre osservato che anticorpi ottenuti da casi di LLC IgHV mutata non polireattivi, possono acquisire una polireattività dopo reversione della loro sequenza genica da mutata a germline. Questo suggerisce che entrambi i sottogruppi di LLC possano derivare da cellule B poli/self-reattive e che le caratteristiche del BCR potrebbero essere rilevanti nel condurre all'anergia cellulare in un caso e a una prominente espansione nell'altro [68]. L'omologia della catena pesante e leggera del BCR neoplastico ad autoanticorpi "naturali" polireattivi ha condotto a paragonare la LLC a un disordine di natura autoimmune. La considerazione della LLC come un modello di patologia a cavallo tra neoplasia e autoimmunità è stata rafforzata anche dall'osservazione della positività dei linfociti patologici per il CD5, un antigene spesso caratteristico di popolazioni B cellulari implicate nella reattività al self, e dal riscontro di manifestazioni autoimmuni nella maggior parte dei pazienti. Le cellule CD5<sup>+</sup>, note anche come B1, sono deputate alla produzione di anticorpi, prevalentemente di isotipo IgM, a bassa affinità per componenti batteriche. Ciononostante, in alcune circostanze, tali anticorpi naturali sono in grado di reagire in modo

polireattivo con antigeni self con tendenza a mostrare crossreattività nei confronti di antigeni batterici, un dato che ha condotto all'ipotesi della derivazione della LLC dalla trasformazione neoplastica di cellule B CD5<sup>+</sup> presenti, nell'uomo, all'interno della zona marginale extrafollicolare [69]. In realtà la possibilità che il CD5 sia un marcatore d'attivazione piuttosto che di linea, ha ridirezionato l'opinione scientifica nel considerare l'origine della LLC in un precursore B ancora non identificato, seppur attivato dall'antigene. Per quanto riguarda la presenza di fenomeni di natura autoimmune, nei pazienti di LLC è stata riportata una reattività virtualmente esclusiva nei confronti delle componenti del sistema ematopoietico; al contrario, non è stata rilevata alcuna associazione con disordini autoimmuni sistemici o a livello di altri organi. L'anemia emolitica autoimmune si verifica nel 10-25% dei casi, la trombocitopenia immune nel 2%, mentre più rare sono la neutropenia autoimmune e l'aplasia eritroide [70]. Non ci sono tuttora spiegazioni conclusive riguardo le forme di autoreattività policlonale osservate nella LLC, è stato comunque ipotizzato che possano derivare da difetti nel compartimento B e T normale, indotti dallo stesso clone neoplastico [71]. La reattività delle cellule B di LLC è comunque indirizzata verso strutture cellulari di natura self intracitoplasmatiche piuttosto che nucleari, diversamente da quanto accade nei disordini autoimmuni come la SLE, dove gli antigeni riconosciuti sono quasi esclusivamente di natura nucleare [72]. Alcuni linfociti patologici reagiscono con autoantigeni esposti sulla membrana citoplasmatica o strutture chimiche prodotte in seguito all'apoptosi o ad altri processi catabolici. Si tratta di proteine o lipoproteine non riconosciute nel loro stato nativo ma solamente dopo modifiche, ad esempio, di natura ossidativa [73]. Dall'altro lato, però, le stesse cellule autoreattive possono crossreagire con antigeni batterici, di conseguenza, come anticipato, non è possibile escludere il contributo di antigeni esogeni nella patogenesi della LLC. Essi sembrano, infatti, essere implicati nella selezione del clone leucemico soprattutto nei casi di LLC in cui raramente si identificano recettori stereotipati. Questo potrebbe verificarsi sia attraverso l'azione di superantigeni, come la proteina A dello *Stafilococco*, riconosciuti da siti antigenici esterni a quelli convenzionali, sia attraverso l'azione di antigeni esogeni riconosciuti secondo la modalità classica CDR3-dipendente. A tale proposito, è interessante notare la correlazione inversa tra lo sviluppo della LLC e la malattia cardiaca cronica reumatica. I soggetti affetti da questa patologia sono protetti dalla leucemogenesi probabilmente come conseguenza dell'uso a lungo termine di antibiotici, un dato a sostegno della tesi degli antigeni batterici nella patogenesi della LLC [74].

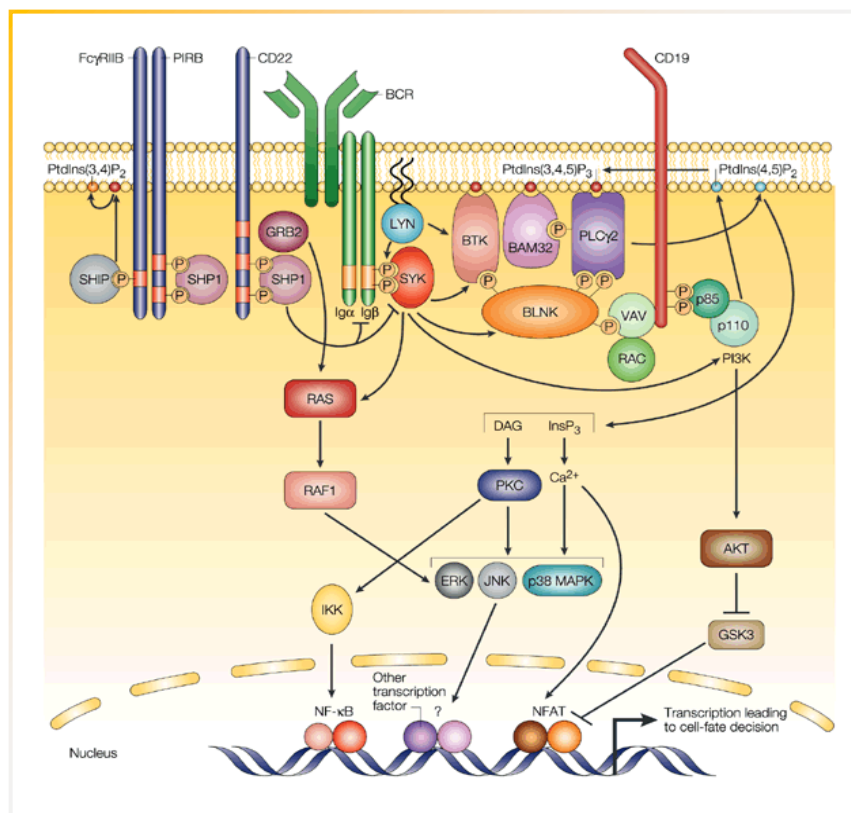
Secondo quanto riportato, si potrebbe ipotizzare che la LLC abbia inizio come patologia monoclonale delle cellule B poli/auto-reattive. L'antigene self sarebbe necessario per

selezionare le cellule B suscettibili alla trasformazione neoplastica dal repertorio B linfoide normale e la sua azione potrebbe essere facilitata e rafforzata dall'intermittente, seppur meno frequente, stimolazione esogena di natura microbica. Nella maggior parte dei cloni IgHV non mutati, la persistenza di ripetute interazioni tra il BCR polireattivo e l'autoantigene, potrebbe impedire l'acquisto di mutazioni somatiche, permettendo a tali cellule di mantenere la loro poli/auto-reattività [75]. Al contrario, nei cloni IgHV mutati, l'acquisto di mutazioni somatiche comporterebbe la perdita della polireattività a favore o di una maggiore specificità per l'autoantigene o di una perdita di affinità nei suoi confronti. In quest'ultimo caso, le mutazioni, privando il BCR del suo potenziale autoreattivo potrebbero indurre uno stato di anergia cellulare. In quei casi che mantengono la poli/auto-reattività, preferenzialmente IgHV non mutati ma talvolta, seppur in misura minore, anche IgHV mutati, la stimolazione del BCR continuerebbe invece a fornire segnali più o meno positivi a seconda delle caratteristiche di affinità e avidità del BCR e della valenza, forma e concentrazione dell'antigene. I segnali positivi di sopravvivenza o espansione cellulare potrebbero essere maggiormente caratteristici delle forme IgHV non mutate, quelli negativi delle forme IgHV mutate, in linea con la prognosi più infausta del primo sottogruppo di LLC [76]. L'identificazione della natura dell'antigene coinvolto nella patogenesi della LLC è di grande interesse anche per la comprensione del sito anatomico all'interno del quale si verifica l'incontro con il precursore leucemico. Risulta infatti più plausibile che l'incontro con un autoantigene polivalente ed immobilizzato abbia luogo nei tessuti linfoidi solidi piuttosto che nel sangue periferico, dove la maggior parte degli antigeni è monovalente e solubile.

#### *1.2.4 Segnali mediati dal BCR nelle cellule B di LLC*

I segnali mediati dal complesso del BCR possono avere svariate conseguenze sulla cellula B linfoide in base al suo stato maturativo e alla sua attivazione. Uno stesso segnale può ad esempio indurre il processo apoptotico in una cellula caratterizzata da uno stadio maturativo precoce, viceversa stimolare la proliferazione se la cellula è in uno stadio maturativo avanzato [Figura 3]. I dati relativi alle caratteristiche del BCR delle cellule B di LLC hanno avvalorato nel tempo l'ipotesi che l'eterogeneità del decorso clinico peculiare di tale malattia, possa dipendere primariamente dalla reattività del suddetto complesso recettoriale. Questo presupposto ha condotto a numerosi studi finalizzati alla valutazione della funzionalità del BCR patologico in seguito alla stimolazione *in vitro* delle cellule B leucemiche con anticorpi anti-IgM e/o anti-IgD, in grado di mimare ciò che accade *in vivo* in presenza dell'antigene. L'obiettivo è rappresentato dalla possibilità di comprendere i meccanismi patogenetici della

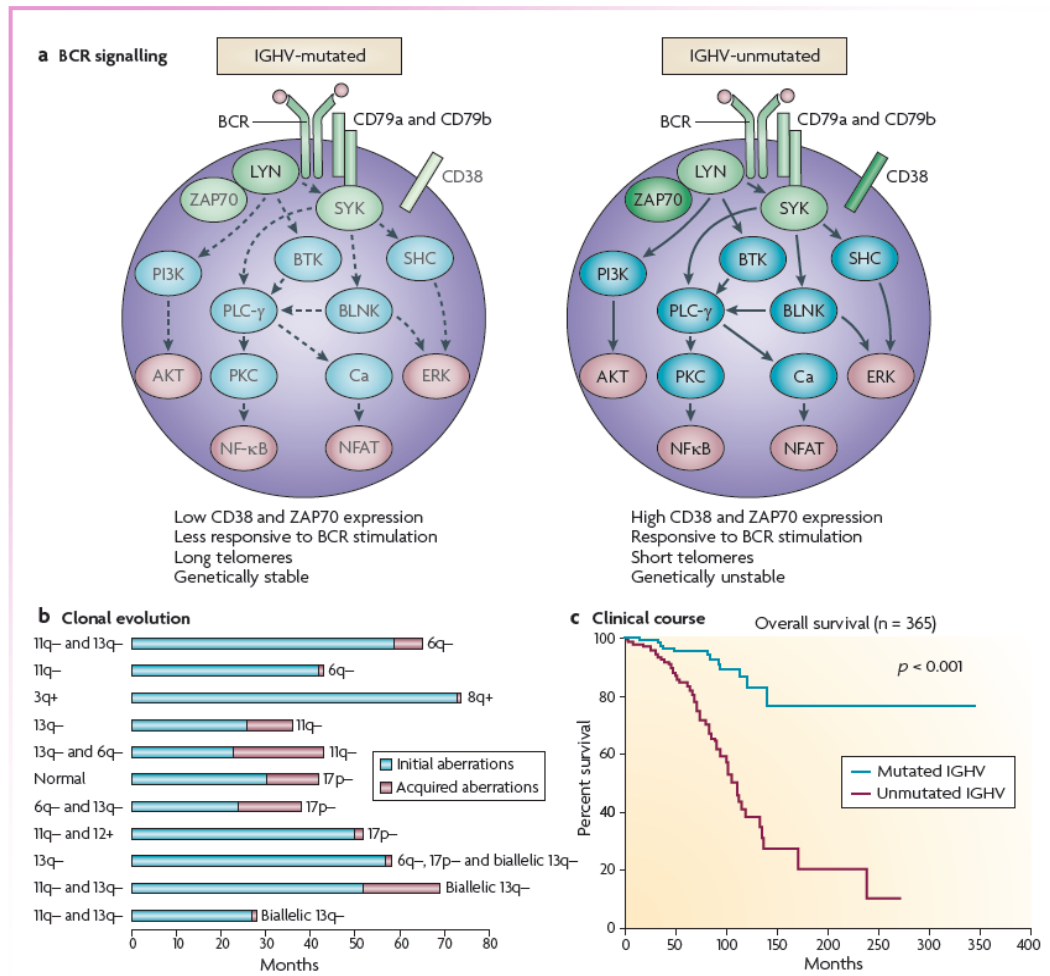
LLC legati alla stimolazione antigenica e, quindi, le basi molecolari della prevalenza dei segnali di sopravvivenza, proliferazione o anergia cellulare, con il fine ultimo di correlare tale risposta all'andamento prognostico della malattia. Una delle caratteristiche prominenti delle cellule B leucemiche è rappresentata dalla bassa espressione superficiale delle componenti immunoglobuliniche del BCR. A causa di questa osservazione, è stato per lungo tempo ritenuto che i linfociti B neoplastici dei pazienti di LLC fossero indistintamente caratterizzati da una bassa responsività alla stimolazione del BCR [77]. Tale proprietà risultava anche causata dall'espressione di una variante tronca o mutata della componente Ig $\beta$  del recettore o, in alternativa, da disfunzioni o inadeguati livelli della tirosin-chinasi SYK [51]. Studi successivi hanno poi dimostrato che, indipendentemente da questi fattori, i livelli di fosforilazione della tirosin-chinasi SYK così come il rilascio intracellulare di Ca<sup>2+</sup>, variano sostanzialmente in rapporto alla stimolazione recettoriale. In primo luogo, pur esprimendo livelli normali di SYK, le cellule B leucemiche di circa la metà dei pazienti affetti da LLC mancano dell'abilità di indurre la sua fosforilazione dopo crosslinking del BCR [78].



*H Niino. Nat Immunol 2, 2002*

**Figura 3.** Vie di trasduzione del segnale indotte nelle cellule B linfoidi dal legame dell'antigene al BCR.

In secondo luogo, pazienti caratterizzati da un basso rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  presentano un pattern complessivo di fosforilazione notevolmente ridotto dopo stimolazione dell'isotipo IgM [79]. Dall'altro lato, nonostante la relativa bassa espressione delle Immunoglobuline di superficie, è possibile osservare in una buona percentuale di casi una risposta alla stimolazione recettoriale, talvolta simile a quella di linfociti B normali. Questi dati hanno rafforzato la tesi dell'eterogeneità della risposta dei linfociti B di LLC, almeno in termini di eventi di segnalazione prossimali, alla stimolazione del BCR neoplastico, incoraggiando la valutazione dell'associazione di tali differenze molecolari e funzionali alla presenza di fattori indicatori di prognosi, come lo stato mutazionale della regione IgHV, l'espressione di ZAP-70, del CD38 e la presenza di anomalie citogenetiche [Figura 4]. I primi studi in tal senso risalgono alla fine degli anni '90. Il CD38 è stato il primo fattore prognostico ad essere associato alla tipologia di risposta del BCR delle cellule B leucemiche. E' stato dimostrato che l'espressione del CD38 sulla superficie dei linfociti B di LLC correla con una rapida mobilitazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, seguita dall'attivazione del processo apoptotico, in seguito alla stimolazione con anticorpi anti-IgM. Al contrario, tale risposta non si osserva nei casi di LLC CD38<sup>-</sup>, nonostante una densità delle sIgM paragonabile in entrambi i sottogruppi, indicando una risposta difettiva al crosslinking del BCR in termini di segnalazione intracellulare [80]. La mobilitazione di  $\text{Ca}^{2+}$  non è indotta direttamente dal CD38, dal momento che l'esposizione ad anticorpi anti-CD38 non influenza la concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , piuttosto l'espressione del CD38 sembra identificare un sottogruppo di cellule B di LLC con peculiari proprietà funzionali del BCR. E' stato in seguito dimostrato come anche il crosslinking del BCR mediante anticorpi anti-IgD suscita una risposta esclusivamente in cellule B CD38<sup>+</sup>, sebbene secondo una cinetica differente rispetto all'isotipo IgM. In questo caso però i segnali trasdotti sono essenzialmente di sopravvivenza e pro-differenziativi [81]. Questi dati hanno rappresentato le prime evidenze non solo della presenza di un'eterogeneità comportamentale delle cellule B di LLC, probabilmente legata ad uno stadio maturativo diverso, ma anche della possibilità che isotipi immunoglobulinici differenti possano trasdurre segnali opposti e contribuire alla fine regolazione della risposta cellulare. La risposta delle cellule B neoplastiche ad anticorpi anti-IgM, si è in realtà rivelata caratterizzata da una dicotomia. Alcuni casi di LLC mostrano a seguito della stimolazione induzione del processo apoptotico, altri della proliferazione cellulare. La spiegazione della suddetta dicotomia risiede nell'attivazione differenziale di una serie di chinasi intracellulari; la MAPK p38 sembra essere un prerequisito per lo stimolo apoptotico mentre la MAPK ERK per la proliferazione.



T Zenz. Nat Rev Cancer 10, 2010

**Figura 4.** Le cellule di LLC manifestano comportamenti biologici e clinici marcatamente differenti in relazione alla configurazione mutata o non mutata delle regioni IgHV. **a)** Le cellule IgHV non mutate sono caratterizzate da livelli più elevati della tirosin-chinasi ZAP-70 e dell'antigene CD38; inducono, inoltre, vie di trasduzione del segnale chiave in risposta all'attivazione del BCR, coinvolgenti LYN, SYK, ERK e AKT; **b)** Le cellule IgHV non mutate hanno una maggiore probabilità di acquisire lesioni genetiche (es: del17p13 e dell1q23) rispetto alle forme IgHV mutate; **c)** Le suddette differenze biologiche potrebbero essere alla base del differente decorso clinico delle due sottoforme di LLC.

Una spiegazione alternativa presuppone invece che la presenza di risposte contraddittorie sia il risultato della tipologia di stimolazione effettuata *in vitro*. In alcuni studi si è, infatti, ricorso all'impiego di anticorpi anti-IgM solubili, in altri casi sono stati impiegati anticorpi anti-IgM immobilizzati. E' possibile che l'uso di anticorpi solubili non rappresenti accuratamente quello che accade *in vivo* in relazione alla stimolazione recettoriale, in quanto tali anticorpi sono rapidamente internalizzati come conseguenza dell'endocitosi recettoriale; al contrario le

forme immobilizzate sono trattenute sulla superficie cellulare per oltre 24 h [82]. Per di più, la stimolazione con anticorpi immobilizzati induce un'efficiente degradazione di I $\kappa$ B e una prolungata attivazione di AKT ed ERK, con aumento dell'attività metabolica delle cellule B leucemiche, induzione dell'ingresso nel ciclo cellulare e acquisizione di una resistenza all'apoptosi indotta dai chemioterapici [83]. Queste osservazioni aiuterebbero a superare l'apparente contraddizione insita nell'associazione tra la risposta apoptotica che si verifica dopo crosslinking delle IgM e i fattori prognostici sfavorevoli caratteristici delle cellule B di LLC responsive alla stimolazione.

Studi più recenti hanno inoltre dimostrato come i casi responsivi allo stimolo del BCR appaiono prevalentemente associati a fattori di cattiva prognosi, rappresentati non solo dal CD38 ma anche dalla positività per l'espressione della proteina ZAP-70 e dalla configurazione IgHV non mutata, un dato che implica una correlazione tra l'aggressività della LLC e la funzionalità del BCR neoplastico [84]. ZAP-70 è una molecola segnale caratteristica dei linfociti T ma espressa anche in una porzione di casi di LLC. E' strutturalmente omologa a SYK e si associa al BCR delle cellule B leucemiche stimulate dall'antigene, indicando una sua possibile funzione nella modulazione dei segnali a valle [85]. A supporto di questa tesi, è stato osservato che cellule B di LLC ZAP-70<sup>+</sup>, stimulate con anticorpi anti-IgM, sono caratterizzate da una massiva induzione di eventi di fosforilazione a carico di proteine citosoliche tra cui SYK, BLNK e PLC $\gamma$ , con conseguente mobilizzazione di Ca<sup>2+</sup> intracellulare. La stessa ZAP-70 viene fosforilata e si associa alla componente Ig $\beta$  del recettore, un evento indicativo del suo contributo alla segnalazione del BCR [86]. In realtà tale contributo sembrerebbe indipendente dalla fosforilazione di ZAP-70 e quindi dalla sua attività chinastica, dal momento che esperimenti di trasfezione di linfociti B leucemici con vettori codificanti una forma normale della proteina e una priva del dominio chinastico, hanno mostrato risultati sovrapponibili in termini di modulazione dell'attività dei target intracellulari [87]. E' stato anche provato che la cellula B neoplastica utilizza prevalentemente la tirosin-chinasi SYK, in quanto, la sua espressione aumenta nei casi responsivi alla stimolazione del BCR, contrariamente a quanto accade a ZAP-70, i cui livelli si mantengono pressoché costanti [22]. Questo dato ha condotto a ipotizzare che il ruolo di ZAP-70 sia principalmente riconducibile a quello di adattatore molecolare di proteine segnale richieste per i successivi eventi citoplasmatici legati al crosslinking del BCR. La sua funzione consisterebbe quindi nell'accelerazione dell'attivazione e nell'aumento della durata dello stimolo. Per quanto riguarda la correlazione tra lo stato mutazionale della regione IgHV e la risposta allo stimolo del BCR neoplastico, è stato dimostrato che i casi IgHV non mutati non solo rispondono al

crosslinking delle IgM con l'aumento intracellulare di  $Ca^{2+}$  ma anche con la traslocazione del recettore a livello delle zattere lipidiche presenti nella membrana cellulare grazie ad una serie di interazioni SRC-mediate tra l'actina citoscheletrica e il BCR stesso [88]. Questi eventi si traducono nella proliferazione dei linfociti patologici, contribuendo alla cattiva prognosi dei pazienti IgHV non mutati. Al contrario, l'iporesponsività dei cloni IgHV mutati presuppone che si siano probabilmente sviluppati a uno stadio in cui l'esposizione cronica all'antigene li ha resi relativamente tolleranti alla stimolazione, di conseguenza, la mancata traslocazione del BCR a livello delle zattere lipidiche, un evento normalmente tipico di cellule B anergiche, rappresenterebbe un meccanismo utile al controllo negativo della segnalazione a valle del recettore. Recentemente, è emerso che l'anergia funzionale di tale porzione di cellule B leucemiche presenta un pattern molecolare uniforme, contraddistinto dall'attivazione costitutiva delle MAPK ERK1/2 e MEK1/2 e dall'incrementata transattivazione di NF-AT, in assenza dell'induzione di AKT [89]. La tesi dell'anergizzazione dei linfociti B di LLC irresponsivi alla stimolazione recettoriale viene supportata dal fatto che nei sistemi murini lo stato anergico è caratterizzato dalla non responsività alla stimolazione mediante anticorpi anti-IgM mentre la segnalazione via  $Ig\alpha/Ig\beta$  rimane intatta ed è, inoltre, in accordo con l'osservazione che questo stato di basso vigore metabolico può essere revertito dopo coltura *in vitro*, evento che suggerisce la possibilità *in vivo* di una persistente interazione antigene-BCR [84]. Alcuni recenti lavori hanno inoltre evidenziato come l'anergia sia isotipo-dipendente nelle cellule B di LLC, in quanto tali cellule appaiono, nella quasi totalità dei casi, responsive alla stimolazione dell'isotipo IgD [37]. In realtà, a causa del numero tuttora limitato di studi relativi al crosslinking dell'isotipo IgD, non è ancora chiaro se i segnali specifici trasdotti da ciascuna forma recettoriale siano indipendenti tra loro o, almeno *in vivo*, sia presente una forma di "crosstalk". Infine, oltre alla trasduzione di segnali mediati dalla presenza dell'antigene, il BCR delle cellule B di LLC risulta anche in grado di fornire stimoli di sopravvivenza attraverso il cosiddetto segnale tonico antigene-indipendente, secondo un meccanismo paragonabile a quello che si verifica nelle cellule B mature normali. Questo spiegherebbe l'assenza di varianti isotipo-negative di LLC così come il motivo per il quale le traslocazioni a carico dei loci delle Immunoglobuline coinvolgano quasi sempre l'allele non produttivo [90].

In relazione a quanto riportato, il perfezionamento delle conoscenze relative ai meccanismi molecolari e funzionali alla base della stimolazione del BCR delle cellule B leucemiche, oggi ancora preliminari, diventa di grande importanza per la comprensione del comportamento dei processi alla base della patogenesi ed evoluzione della malattia.



### 1.3 Scopo del progetto di ricerca

Diversamente da altri disordini linfoproliferativi, la patogenesi e la logica di alcune caratteristiche biologiche peculiari della LLC hanno eluso per anni una definizione precisa. Questo è dipeso non solo dall'assenza, in tale leucemia, di un'alterazione cromosomica patogenetica, ma anche dalla relativa incertezza riguardo le sue origini cellulari e dal differente grado di immunocompetenza delle cellule B leucemiche e dei loro progenitori. Le conoscenze acquisite nel tempo relativamente alle caratteristiche del BCR neoplastico hanno fornito informazioni utili a migliorare la comprensione sia dell'origine cellulare della LLC che dei meccanismi di natura patogenetica alla base dell'insorgenza di tale malattia. Dal momento che l'eterogeneità del decorso clinico della LLC appare altamente dipendente dall'acquisizione di mutazioni somatiche a carico dei geni IgV delle componenti immunoglobuliniche recettoriali, una delle ipotesi più accreditate identifica la stimolazione antigenica come il presupposto imprescindibile per lo sviluppo e l'evoluzione clonale della LLC. Ciò ha reso lo studio delle proprietà funzionali del BCR neoplastico di grande interesse per la comprensione del modo attraverso il quale le differenze nella composizione e struttura del recettore possano influenzare il comportamento delle cellule B leucemiche a seguito dell'incontro con l'antigene e, di conseguenza, la variabilità dell'andamento prognostico della malattia.

In tale contesto si inserisce il presente progetto di ricerca incentrato sullo studio degli effetti della stimolazione *in vitro* del BCR delle cellule B di LLC, nel tentativo sia di rilevare la presenza di differenze funzionali a carico del recettore, che di correlare tali differenze alle caratteristiche biologiche e cliniche di natura prognostica dei pazienti in esame. Sono stati inclusi nello studio pazienti affetti da LLC a diversa prognosi, non precedentemente esposti ad alcuna terapia antitumorale. La funzionalità del BCR è stata esaminata mediante stimolazione delle cellule B leucemiche con anticorpi anti-IgM e anti-IgD, diretti contro la porzione costante della catena pesante delle molecole immunoglobuliniche a isotipo  $\mu$  e  $\delta$ , componenti del complesso recettoriale B linfoide. Quindi, i campioni stimolati e non, sono stati analizzati e confrontati in termini di modulazione del profilo di espressione genica, variazione dell'attività proliferativa e apoptotica e, infine, alterazione delle proprietà citoscheletriche.

L'obiettivo finale del suddetto studio è rappresentato dall'opportunità di esaminare l'influenza della reattività del BCR neoplastico sull'andamento clinico eterogeneo della malattia e identificare quei pazienti affetti da LLC che potrebbero beneficiare di un approccio

terapeutico innovativo basato sull'inibizione farmacologica della segnalazione del BCR. Si potrebbe così ottenere un doppio beneficio garantendo l'interruzione sia delle vie antigene-dipendenti che indipendenti indispensabili per la sopravvivenza e crescita del clone maligno.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Pazienti**

Nel nostro studio sono stati inclusi 48 pazienti affetti da LLC, seguiti presso la Sezione di Ematologia del Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia dell'Università degli studi di Roma "Sapienza". I pazienti in esame non sono stati sottoposti ad alcuna terapia antileucemica al momento e durante il corso dello studio e il prelievo dei campioni di sangue periferico e le analisi biologiche sono state eseguite previo consenso informato fornito da ciascuno di loro in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. La diagnosi di LLC è stata effettuata attraverso l'identificazione, nel sangue venoso periferico di ciascun paziente, di una quantità di linfociti superiore a  $5 \times 10^9/L$  con una morfologia e immunofenotipo caratteristici di LLC ( $CD5^+CD20^+CD23^+CD22^+sIg^+CD10^-$ ). Sono state eseguite nei pazienti studiati analisi di routine quali: la valutazione dello stato mutazionale dei geni IgHV [16]; l'analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina ZAP-70 [26] e dell'antigene CD38 [24]; l'analisi FISH (ibridazione in situ fluorescente) per l'identificazione delle aberrazioni citogenetiche coinvolgenti le regioni 11q22-23, 13q14, 6q21, 17p13 e la trisomia 12, e il sequenziamento del gene *TP53* [16].

### **2.2 Isolamento e coltura delle cellule mononucleate dei pazienti affetti da LLC**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti affetti da LLC sono state ottenute mediante separazione su gradiente di densità (Lymphoprep; Nycomed Pharma, Oslo, Norway) e coltivate a 37°C in atmosfera umidificata con un tasso di CO<sub>2</sub> pari al 5%, in terreno colturale RPMI 1640 (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS, HyClone, South Logan, UT), 1% di L-glutamina (EuroClone, Europe) e 1% di Pen-Strepto (EuroClone, Europe). La vitalità cellulare di ciascun campione è stata determinata attraverso l'impiego del Trypan Blue (Sigma-Aldrich CO. St. Louis, USA) ed è risultata essere superiore al 95% in tutti i casi esaminati.

### **2.3 Separazione magnetica delle cellule B leucemiche CD19<sup>+</sup> dei pazienti affetti da LLC**

Le cellule B leucemiche dei pazienti affetti da LLC sono state isolate dal resto delle PBMC mediante Separazione Cellulare Magnetica (MACS; Miltenyi Biotec), una metodica basata sull'impiego di un kit di Isolamento Immunomagnetico che permette di separare cellule

altamente purificate sfruttando l'espressione di marcatori antigenici specifici, presenti sulla superficie cellulare. Nel caso dei linfociti B, la separazione al MACS è stata effettuata attraverso una selezione positiva delle cellule B neoplastiche CD19<sup>+</sup> mediante l'uso di specifici anticorpi anti-CD19 coniugati a biglie magnetiche (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Successivamente all'isolamento immunomagnetico, la purezza delle cellule ottenute è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule CD19<sup>+</sup> isolate sono state marcate per 20 min a 4°C in PBS privo di ioni Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (DPBS, Cambrex Bio Science Verviers, Belgium), con i seguenti mAbs: CD20FITC, CD5PE, CD3PerCP (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), al fine di distinguere la popolazione d'interesse, CD20<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, e identificare l'eventuale presenza di linfociti T contaminanti CD20<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+/-</sup>. In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati isotipi aspecifici di Immunoglobuline (IgG1, IgG2), coniugati con FITC, PE e PerCP, come controllo negativo. L'acquisizione dei dati è avvenuta mediante l'utilizzo di un citofluorimetro FACScan e la loro analisi è stata realizzata utilizzando il programma CellQuest (Becton Dickinson).

#### **2.4 Stimolazione delle cellule B leucemiche CD19<sup>+</sup>**

Per la stimolazione, le cellule B leucemiche purificate sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti a fondo ad U. Prima di allestire la coltura, le piastre impiegate per la stimolazione sono state preparate in modo da formare sul fondo di ciascun pozzetto, un monostrato di anticorpi anti-IgG su cui far successivamente adsorbire le cellule. A tale scopo una soluzione di PBS e di anticorpi anti-IgG (Sigma-Aldrich CO, St Louis, MS) ad una concentrazione finale pari a 50 µg/ml è stata aggiunta ad ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a +4°C per tutta la notte. Il giorno successivo, il PBS è stato rimosso accuratamente, evitando di intaccare il monostrato di anticorpi anti-IgG e le cellule B CD19<sup>+</sup> sono state piastrate ad una concentrazione di 5×10<sup>5</sup> per pozzetto in RPMI completo. La stimolazione del BCR è stata indotta aggiungendo a ciascun pozzetto della piastra anticorpi anti-IgM o anti-IgD (Sigma-Aldrich), diretti rispettivamente contro la porzione costante della catena pesante delle sIgM e delle sIgD, entrambi ad una concentrazione finale di 10 µg/ml.

#### **2.5 Estrazione dell'RNA e analisi del profilo di espressione genica**

Dopo 24 e 48 h di incubazione, le cellule stimulate (S) e non stimulate (NS) sono state lisate e l'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Life Technologies, Grand Island,

NY). Per determinare il profilo di espressione genica sono stati impiegati i chips HGU133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Il protocollo seguito è disponibile su “<http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expressionmanual.affx>”.

## **2.6 Analisi del ciclo cellulare**

I cambiamenti nella distribuzione del ciclo cellulare delle cellule B leucemiche S e NS sono stati valutati, a 24 e 48 h di coltura, mediante l'impiego della tecnica dell'Arancio di Acridina (AO). La percentuale di cellule in fase G0, G1, S, G2M e il contenuto medio di RNA delle cellule in fase G0/1 sono stati determinati misurando simultaneamente il contenuto cellulare totale di DNA e RNA [91]. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro FACSCan (Becton Dickinson) a 488 nm, allo scopo di rilevare la fluorescenza verde (F530-DNA) e rossa (F>620-RNA). L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state eseguite mediante il software CellQuest (Becton Dickinson). L'analisi della distribuzione del ciclo cellulare è stata effettuata mediante il software ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME).

## **2.7 Saggio di proliferazione**

Per valutare l'attività proliferativa delle cellule B neoplastiche S e NS, per ciascun paziente,  $5 \times 10^5$  cellule B CD19<sup>+</sup> sono state piastrate in triplicato in piastre da 96 pozzetti a fondo ad U e coltivate a 37° C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>, per 24 e 48 h, in presenza e assenza di anticorpi anti-IgM o anti-IgD. Allo scadere della coltura, le cellule sono state incubate con 1 µCi di timidina triziata ([<sup>3</sup>H]timidina) (Amersham, Arlington Heights, IL) per 18 h e la lettura della radioattività è stata effettuata mediante l'utilizzo di un beta-counter (Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands). I risultati sono espressi come media dei colpi per minuti (Cpm) ± deviazione standard.

## **2.8 Analisi del tasso apoptotico**

Lo studio dell'apoptosi delle cellule B leucemiche S e NS è stato effettuato attraverso l'impiego di due differenti metodiche. Nel primo caso, dopo 24 h di coltura in presenza e assenza di stimolazione con anticorpi anti-IgM e anti-IgD, le cellule B leucemiche sono state marcate per 10 min al buio e a temperatura ambiente con Annexina-V FITC e Ioduro di

Propidio (Immunotech Research, Quebec, Canada), entrambi alla concentrazione finale di 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in Binding buffer 1x (Binding buffer 10x: 100mM HEPES/NaOH pH 7.5; 1.4M NaCl, 25mM  $\text{CaCl}_2$ ). Dopo la marcatura, le cellule apoptotiche sono state determinate mediante citometria a flusso e i dati analizzati utilizzando il software CellQuest (Becton Dickinson). Nel secondo caso, l'apoptosi è stata misurata sia a 24 che 48 h di coltura valutando il sub picco G0/1 sugli istogrammi delle frequenze di DNA ottenuti mediante la tecnica dell'AO, che misura il tasso di cellule apoptotiche tenendo conto della minore colorabilità degli elementi apoptotici in fluorescenza verde (F530-DNA) associata ad una aumentata colorabilità in fluorescenza rossa (F>620-RNA), evento conseguente al fenomeno della condensazione cromatinica.

## **2.9 Analisi statistica per gli studi di proliferazione e apoptosi**

I dati sono analizzati statisticamente mediante l'utilizzo del metodo "Student's t test". I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

## **2.10 Visualizzazione dell'actina intracitoplasmatica**

Per valutare la presenza di eventuali cambiamenti citoscheletrici nelle cellule B CD19<sup>+</sup> di LLC, dopo stimolazione con anticorpi anti-IgM e anti-IgD, è stata impiegata la Falloidina, un veleno che lega ad alta affinità l'actina filamentosa (F-actina). Le cellule sono state raccolte ai diversi tempi di studio, quali 24 e 48 h, ed è stato effettuato un test di marcatura intracitoplasmatica basato sull'utilizzo del kit di permeabilizzazione "Fix & Perm" (Caltag Laboratories Burlingame, USA). Per la marcatura i campioni d'interesse sono stati incubati in presenza di 100  $\mu\text{l}$  di reagente A (medium di fissazione) per 15 min al buio a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, dopo opportuno lavaggio in PBS, ai campioni sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di reagente B (medium di permeabilizzazione) e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di Falloidina e ciascun campione è stato incubato per 25 min, in agitazione continua, a temperatura ambiente. A questo punto, un'aliquota delle cellule B CD19<sup>+</sup>, raccolta ai diversi tempi di studio, è stata analizzata mediante citometria a flusso. La percentuale di espressione dell'actina all'interno dei diversi campioni S e NS è stata, in tal caso, riportata come Intensità Media di Fluorescenza (MIF), espressa come rapporto tra la fluorescenza del campione e quella dell'isotipo usato per la marcatura. L'aliquota cellulare residua è stata invece ulteriormente marcata per 5 min al buio, con 4',6Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI), un colorante

fluorescente impiegato per la colorazione nucleare. Al termine dei 5 min di incubazione con il DAPI, la localizzazione intracellulare dell'actina e gli eventuali cambiamenti citoscheletrici delle cellule B leucemiche S e NS dei pazienti affetti da LLC sono stati visualizzati attraverso l'utilizzo del microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento 100X.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Analisi del profilo di espressione genica delle cellule B neoplastiche di pazienti affetti da LLC dopo stimolazione del BCR

Allo scopo di analizzare la funzionalità del BCR, sono stati in primo luogo valutati dal gruppo di studio del Profilo di Espressione Genica del nostro laboratorio, gli effetti della stimolazione recettoriale, effettuata per 24 e 48 h mediante l'impiego di anticorpi anti-IgM e anti-IgD, sulla modulazione dell'espressione genica dei campioni primari di cellule B leucemiche CD19<sup>+</sup>, isolate da pazienti affetti da LLC. I profili di espressione genica dei campioni stimolati (S) e non stimolati (NS) sono stati poi confrontati in relazione allo stato dei geni IgHV e all'andamento clinico della malattia, al fine di valutare eventuali differenze nei diversi sottogruppi, e correlare la reattività del BCR leucemico alle caratteristiche prognostiche dei pazienti in esame.

Nel caso della stimolazione dell'isotipo recettoriale M, gli studi di espressione genica sono stati eseguiti su un totale di 10 pazienti: 5 caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata e una malattia in progressione (*C.C.*, *B.A.M.*, *S.P.*, *P.A.*, *P.G.*) e 5 da una configurazione IgHV mutata e una malattia stabile (*D.M.A.*, *F.A.*, *U.R.*, *P.G.*, *N.C.*). L'analisi del profilo di espressione genica effettuata mediante un approccio "supervised" ha evidenziato, esclusivamente nei casi di LLC non mutata e in progressione la presenza di 197 geni differenzialmente espressi tra il controllo NS e il campione S, a seguito del trattamento con anticorpi anti-IgM. Sono stati osservati deregolati principalmente geni per proteine implicate nell'attivazione e nella trasmissione del segnale tramite il complesso del BCR, tra i quali: geni coinvolti nella trasduzione del segnale (*DUSP-2/4/6*, *SYK*, *CXCR4*); geni per fattori di trascrizione (*EGR-1/2/3*, *CHES1*, *NEDD9*); geni per regolatori del metabolismo cellulare (*LDHB*, *HSP90AB1*, *ATP2A3*), del ciclo cellulare (*CCND2*, *CDK4*, *PTPN6*) e dell'organizzazione del citoscheletro (*ACTB*, *ACTG1*, *K-ALPHA1*). L'espressione delle IgM di superficie, positiva in tutti i campioni esaminati, è apparsa invariata in seguito alla stimolazione del BCR, mostrando, indipendentemente dalle caratteristiche prognostiche, valori di espressione più elevati nei casi maggiormente responsivi, a sostegno della stretta correlazione tra la risposta cellulare e la densità di superficie del suddetto isotipo recettoriale. Diversamente da quanto osservato nei casi di LLC caratterizzati da fattori biologici e clinici di prognosi infausta, il confronto del profilo di espressione genica delle cellule S e NS appartenenti a pazienti con LLC a configurazione IgHV mutata e andamento clinico stabile, non ha evidenziato alcuna differenza di espressione realmente significativa, evidenziando un



comportamento anergico, almeno in termini di modulazione genica, alla stimolazione dell'isotipo M del BCR neoplastico. Risultati paragonabili sono stati osservati nelle 2 diverse sottocategorie esaminate a 48 h dalla stimolazione con anticorpi anti-IgM.

Nel caso della stimolazione dell'isotipo recettoriale D è stato incluso un numero complessivo di 11 pazienti: 4 caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata e una malattia in progressione (G.V., A.G., G.P., P.G.); 3 da una configurazione IgHV mutata e una malattia progressiva (F.A., V.C.; S.D.) e 4 da una configurazione IgHV mutata e una malattia stabile (F.F., M.C., M.M.L., M.M.). L'analisi "supervised" a 24 h ha rivelato, in tale ambito, la presenza di 287 geni differenzialmente espressi tra il controllo NS e il campione S. Tra le categorie funzionali più rappresentate all'interno delle classi geniche, modulate in massima parte negativamente, è stata riscontrata, anche in tal caso, la risposta alla stimolazione del BCR in termini di attivazione e trasmissione del segnale a valle. In particolare è risulta deregolata l'espressione di geni codificanti fattori implicati nella trasduzione del segnale (ANXA6, RGS14, ANXA6) e nel processo di trascrizione genica (CEBPB, POU2F2, FOXP1). Sono apparsi downregolati anche geni coinvolti nel differenziamento (SYK, CD79A/B, CD27, CD24) e nella regolazione della morte cellulare programmata (CEBPβ/ζ, TP53INP1, CD24, CD27, CD74). Risultati paragonabili in termini di modulazione genica globale, indipendente dalla sottocategoria di pazienti esaminata, sono stati osservati anche a 48 h dalla stimolazione con anticorpi anti-IgD, nonostante, in tal caso, sia stato rivelato un cambiamento nella tipologia di modulazione genica e geni interessati. Infatti, a 48 h dalla stimolazione recettoriale, dei 229 geni differenzialmente espressi tra campioni NS e S, la maggior parte dei geni è risultata upregolata (172/229, 75.1%) piuttosto che downregolata (58/229; 25.0%). I geni maggiormente interessati dalla stimolazione con anticorpi anti-IgD a 48 h sono risultati coinvolti soprattutto nel controllo dell'espressione genica e nel metabolismo degli RNA ma anche nel ciclo cellulare e nella sua regolazione, nella biosintesi delle macromolecole, nel metabolismo degli aminoacidi e acidi carbossilici e, infine, nel processo di traduzione.

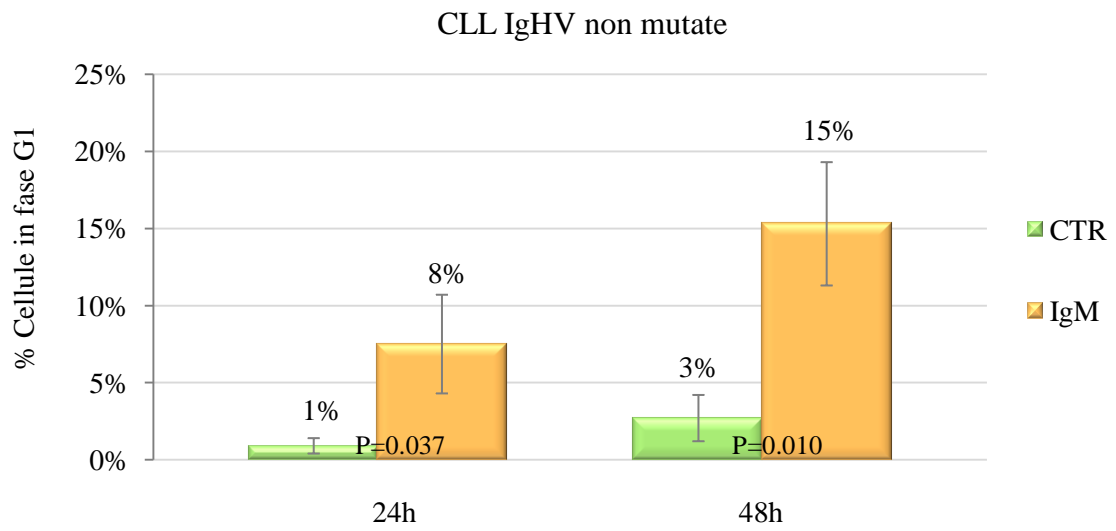
I dati ottenuti complessivamente dall'analisi del profilo di espressione genica sottolineano che le cellule neoplastiche isolate da pazienti affetti da LLC, possono esibire un comportamento diverso, in seguito alla stimolazione *in vitro* del BCR, sia in relazione all'isotipo recettoriale M o D interessato, che ai fattori prognostici. In particolare, la stimolazione dell'isotipo M si associa alla modulazione, prevalentemente positiva, di geni correlati all'induzione di stimoli attivatori di tipo proliferativo, mentre quella dell'isotipo D, alla modulazione, sia negativa che positiva, di geni coinvolti nel controllo della proliferazione, dell'apoptosi, del

differenziamento e della sintesi proteica. Nel caso della stimolazione con anticorpi anti-IgM solo i casi di LLC caratterizzati da fattori di prognosi infausta appaiono responsivi, un dato a sostegno del ruolo del BCR nell'espansione e progressione della malattia. Al contrario, tutti i campioni di LLC indipendentemente dai fattori prognostici, manifestano una responsività, in termini di modulazione genica, alla stimolazione con anticorpi anti-IgD, a supporto di un ruolo più marginale di tale isotipo recettoriale nell'influenzare l'andamento della malattia.

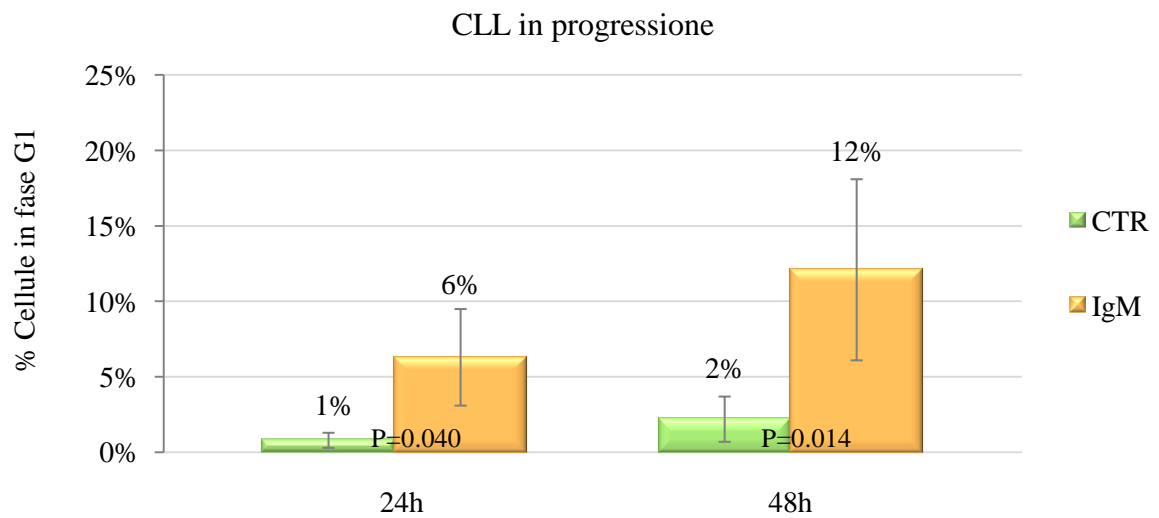
### **3.2 Effetti della stimolazione del BCR delle cellule B neoplastiche di LLC sulla modulazione del ciclo cellulare**

Allo scopo di confermare a livello funzionale le indicazioni ottenute dallo studio del profilo di espressione genica, sono stati in primo luogo esaminati gli effetti della stimolazione del BCR sui cambiamenti nella distribuzione delle cellule B CD19<sup>+</sup> di LLC, all'interno delle varie fasi del ciclo cellulare. I campioni leucemici primari sono stati stimolati per 24 e 48 h con anticorpi anti-IgM e anti-IgD e l'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante l'impiego della tecnica dell'Arancio di Acridina (AO). Come mostrato nelle Figure 5 e 6, la stimolazione recettoriale dell'isotipo M esaminata nei diversi sottogruppi di LLC distinti in base allo stato mutazionale e all'andamento clinico della malattia, si associa all'induzione di una considerevole attività proliferativa esclusivamente nei casi caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata e una malattia in progressione. Nei casi IgHV non mutati (*11 pazienti*) è stato, infatti, rilevato un incremento medio significativo della percentuale di cellule in fase G1 del ciclo cellulare dallo 0.9% ± 1.1% nei campioni NS al 7.5% ± 3.9%, dopo 24 h di stimolazione (P=0.037), e dal 2.7% ± 2.4% nei campioni NS al 15.3% ± 6.7%, dopo 48 h di stimolazione (P=0.010). Allo stesso modo, nei casi di LLC in progressione (*13 pazienti*), la percentuale di cellule in fase G1 del ciclo cellulare pre- e post-stimolazione è risultata pari a 0.8% ± 1.1 vs 6.3% ± 4.5% a 24h (P=0.040) e a 2.2% ± 1.0% vs 12.1% ± 6.1% a 48 h (P=0.014). Al contrario, nei casi di LLC caratterizzati da una configurazione IgHV mutata (*8 pazienti*) e una malattia stabile (*6 pazienti*) è stata osservata una resistenza alla progressione del ciclo cellulare indotta dalla stimolazione con anticorpi anti-IgM, evidenziata dalla presenza di percentuali pressoché identiche di cellule B leucemiche in fase G1 del ciclo cellulare nei campioni NS e S, quali: 0.7% ± 1.1% vs 1.2% ± 1.7% a 24 h e 0.5% ± 0.8% vs 0.7% ± 0.8% a 48 h, nel primo caso e 0.9% ± 1.2% vs 1.6% ± 1.8% a 24 h e 0.6% ± 0.9% vs 0.8% ± 1.1% a 48 h, nel secondo caso.

a)

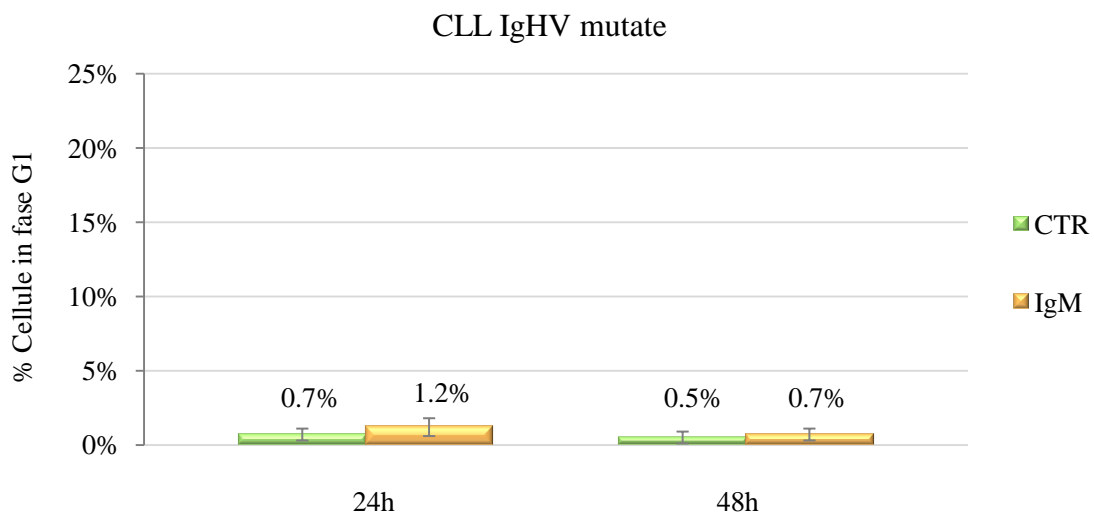


b)

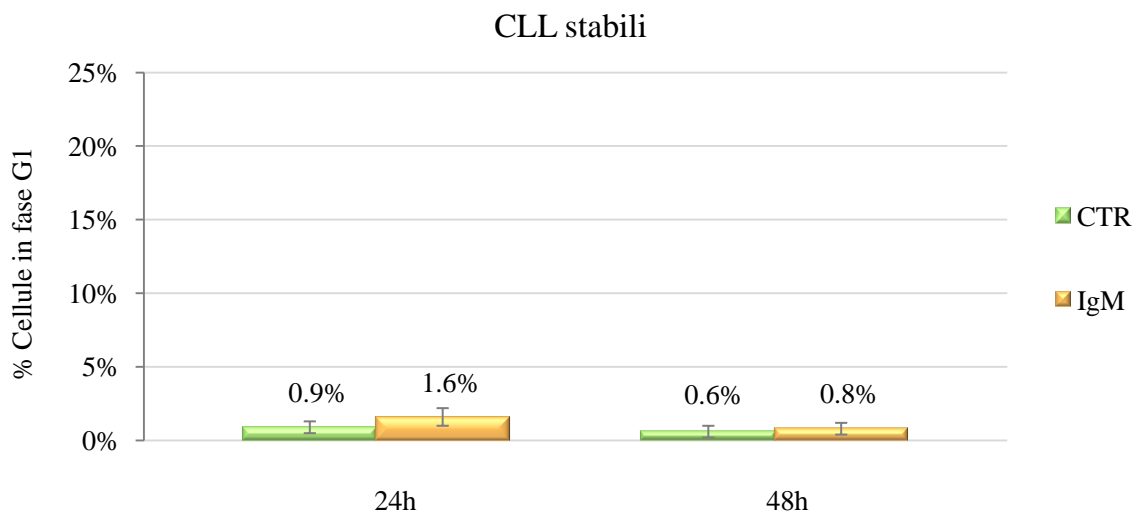


**Figura 5.** Analisi del ciclo cellulare pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata (a) e in progressione di malattia (b).

a)



b)



**Figura 6.** Analisi del ciclo cellulare pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC a configurazione IgHV mutata (a) e malattia stabile (b).

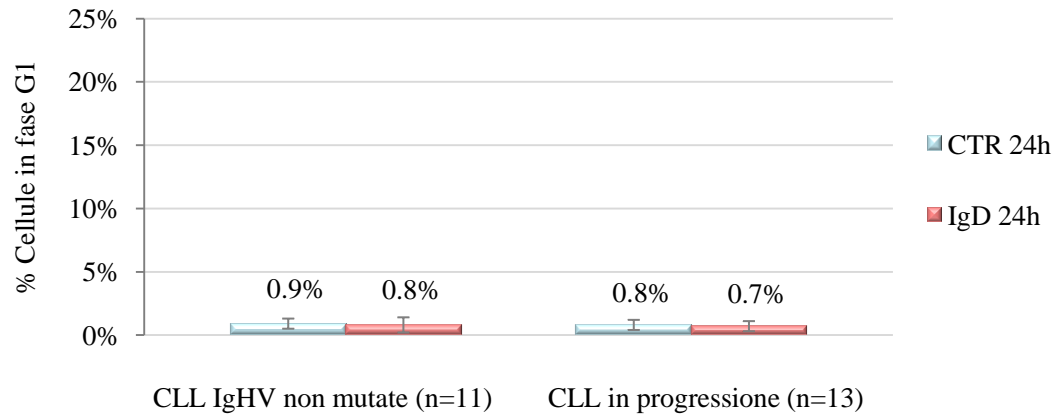
A differenza della stimolazione con anticorpi anti-IgM, l'impiego di anticorpi anti-IgD non si associa ad alcuna significativa progressione in fase G1 del ciclo cellulare, indipendentemente dallo stato mutazionale dei geni IgHV e dallo stato clinico della malattia. A 24 h la percentuale di cellule in fase G1 del ciclo cellulare, nei campioni NS e S, è risultata infatti essere pari a  $0.9\% \pm 1.1\%$  vs  $0.8\% \pm 0.9\%$  nei campioni a configurazione IgHV non mutata (*11 pazienti*); a  $0.8\% \pm 1.1\%$  vs  $0.7\% \pm 0.9\%$  nei campioni di LLC in progressione (*13 pazienti*); a  $0.7\% \pm 1.1\%$  vs  $0.7\% \pm 0.8\%$  nei campioni a configurazione IgHV mutata (*8 pazienti*) e infine a  $0.9\% \pm 1.2\%$  vs  $1.0\% \pm 0.9\%$  nei campioni di LLC stabile (*6 pazienti*) [Figura 7]. Valori pressoché identici sono stati osservati dopo 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgD (dati non mostrati).

Complessivamente, i risultati ottenuti dimostrano, in linea con quelli relativi al profilo di espressione genica, come la stimolazione del BCR delle cellule B di LLC possa avere effetti differenti, in termini di avanzamento nel ciclo cellulare, a seconda dell'isotipo recettoriale interessato, suggerendo l'esistenza di funzioni cellulari isotipo-specifiche all'interno dei linfociti B leucemici. In secondo luogo, i dati emersi in merito alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M hanno permesso di rilevare l'esistenza di un'associazione tra le capacità proliferative delle cellule B di LLC e i fattori biologici e clinici di prognosi infausta quali: lo stato non mutato dei geni IgHV e l'andamento progressivo della LLC, rafforzando la tesi del ruolo della stimolazione recettoriale nel sostegno delle forme più aggressive della malattia.

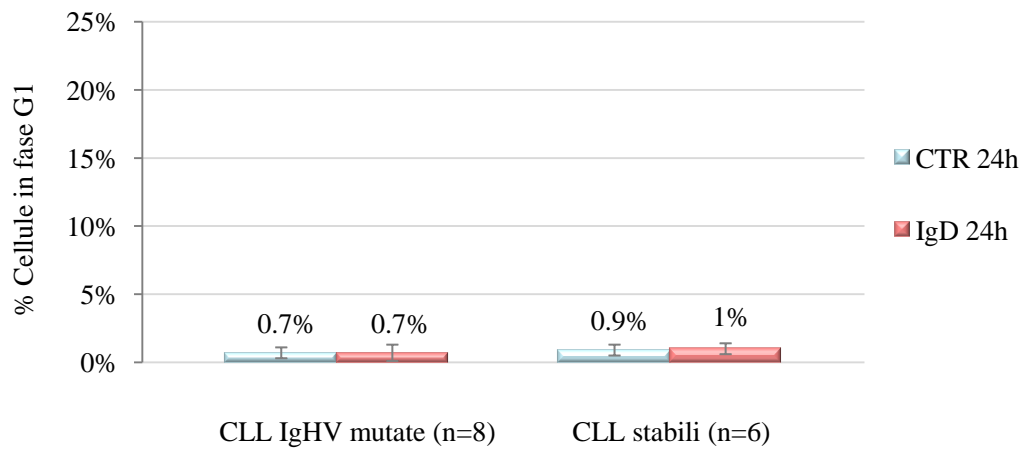
### **3.3 Studio dell'attività proliferativa delle cellule B neoplastiche di LLC dopo stimolazione del BCR**

In base ai risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica e dall'esame dei cambiamenti nella distribuzione del ciclo cellulare, il passo successivo dello studio è stato quello di verificare gli effetti della stimolazione con anticorpi anti-IgM e anti-IgD, sulle capacità proliferative delle cellule B CD19<sup>+</sup> di LLC. A tal proposito i campioni primari di LLC sono stati stimolati per 24 e 48 h ed è stato eseguito un saggio di proliferazione. Tale saggio consente di determinare indirettamente il tasso proliferativo cellulare, attraverso la valutazione del grado di incorporazione della [3H]timidina, un precursore nucleotidico radioattivo che viene normalmente introdotto esclusivamente nel DNA di cellule proliferanti. Il confronto tra i due sottogruppi di LLC distinti in base allo stato mutazionale dei geni IgHV ha rivelato un incremento dei livelli di incorporazione della [3H]timidina esclusivamente nei casi di LLC caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata (*18 pazienti*).

a)



b)

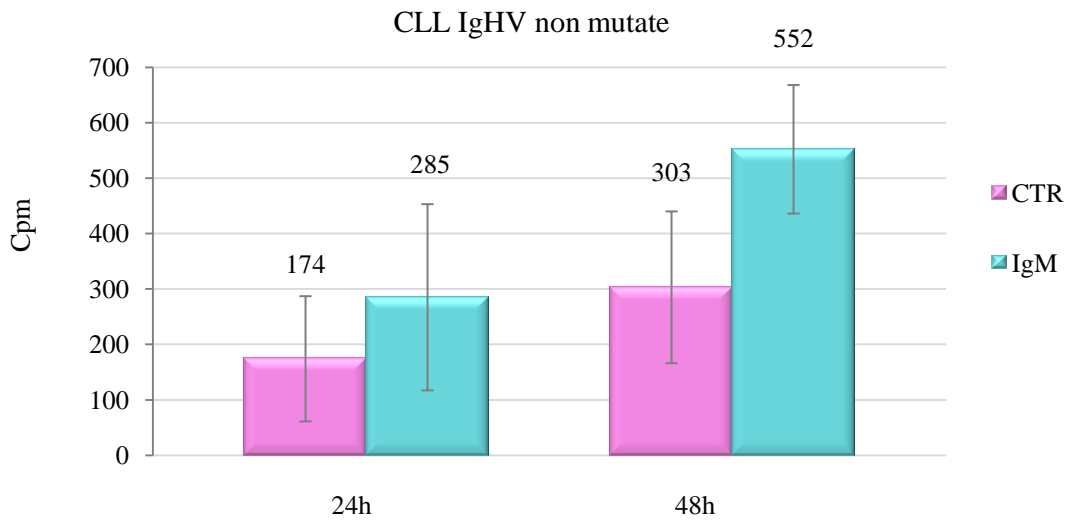


**Figura 7.** Analisi del ciclo cellulare pre- e post- 24 h di stimolazione con anticorpi anti-IgD nei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata e in progressione di malattia (a) e nei campioni di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile (b).

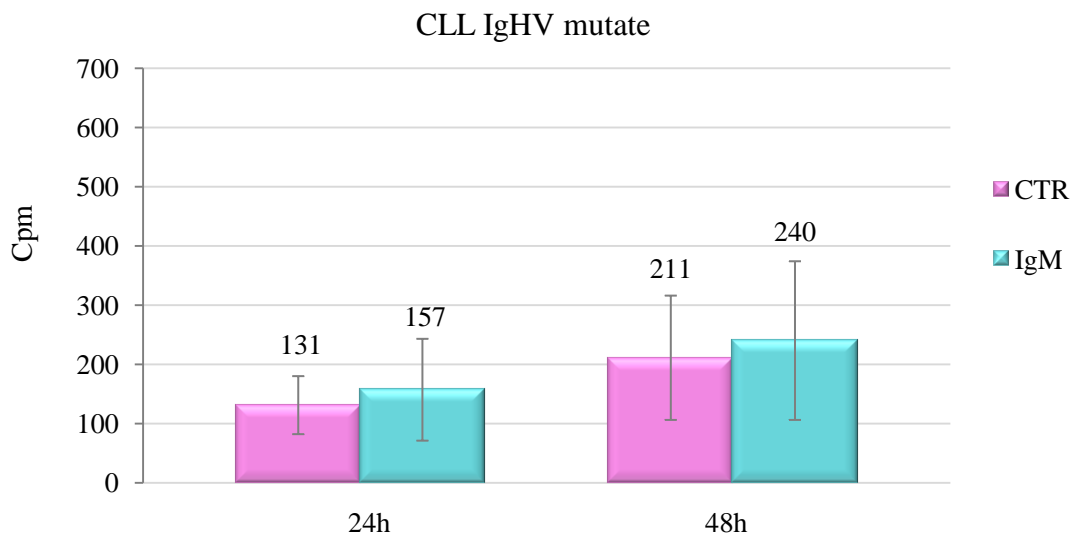
In tali campioni l'incorporazione di [3H]timidina, a 24 e 48 h dalla stimolazione, è risultata aumentata rispettivamente di 1.6 e 1.8 volte rispetto al controllo NS. A 24 h è stato, infatti, rilevato un valore medio di Cpm pari a  $174.0 \pm 112.8$  nei campioni IgHV non mutati NS e  $285.1 \pm 168.4$  in quelli S, mentre a 48 h il valore medio di Cpm è risultato equivalente a  $303.0 \pm 136.9$  in assenza di stimolazione e  $552 \pm 115.9$  dopo stimolazione [Figura 8a]. Al contrario, nessuna variazione significativa dell'attività proliferativa è stata osservata, sia 24 che a 48 h dalla stimolazione, nelle cellule NS e S dei pazienti IgHV mutati analizzati (*10 pazienti*). Tali casi si comportano quindi manifestando una risposta anergica alla stimolazione dell'isotipo M recettoriale. Nelle forme di LLC IgHV mutata il valore medio dei Cpm è risultato infatti pari a  $130.9 \pm 49.2$  nei campioni NS e  $156.5 \pm 86.2$  in quelli S (Fold di incremento=1.2) a 24 h, e a  $211.3 \pm 104.5$  nel controllo NS e  $239.6 \pm 133.7$  nei campioni S (Fold di incremento=1.1) a 48 h [Figura 8b]. In accordo con la stretta associazione tra lo stato mutazionale dei geni IgHV e la prognosi della LLC, risultati simili sono stati ottenuti confrontando gli effetti della stimolazione dell'isotipo M in rapporto all'andamento clinico della malattia. Nei campioni di LLC in progressione (*19 pazienti; 2 IgHV mutati e 17 IgHV non mutati*) è stato infatti rilevato, a 24 e 48 h dalla stimolazione, un incremento del tasso proliferativo pari a 1.5 (Valori medi Cpm:  $161.8 \pm 122.8$  vs  $236.6 \pm 179.4$ ) e 1.7 (Valori medi Cpm:  $309.0 \pm 167.4$  vs  $535.0 \pm 115.3$ ) volte rispetto al controllo [Figura 9a]. Al contrario, nei campioni di LLC stabile (*7 pazienti; 7/7 IgHV mutati*), è stata evidenziata la presenza di un tasso proliferativo pressoché identico pre- e post-stimolazione (Valori medi Cpm:  $129.1 \pm 18.1$  vs  $144.8 \pm 71.2$  a 24 h, Fold di incremento=1.1 e  $199.8 \pm 106.7$  vs  $240.6 \pm 106.9$ , Fold di incremento=1.2 a 48 h) [Figura 9b].

Diversamente da quanto osservato in merito all'impiego di anticorpi anti-IgM, ma in accordo con i dati relativi all'analisi del ciclo cellulare, la stimolazione dell'isotipo recettoriale D è apparsa associata a una riduzione piuttosto che a un aumento del tasso proliferativo delle cellule B di LLC. Tale effetto è risultato inoltre indipendente sia dallo stato mutazionale dei geni IgHV che dall'andamento clinico della malattia. I risultati del saggio di proliferazione hanno, infatti, evidenziato, a 24 e 48 h dalla stimolazione, un abbassamento dei Cpm pari a 1.6 e 1.4 volte rispetto al controllo NS, nei campioni IgHV non mutati (*11 pazienti*). In particolare, sono stati osservati in tale gruppo valori medi rispettivi pre- e post-stimolazione di  $215.4 \pm 122.8$  vs  $134.9 \pm 59.3$  e  $354.1 \pm 153.4$  vs  $251.7 \pm 174.9$  [Figura 10a].

a)



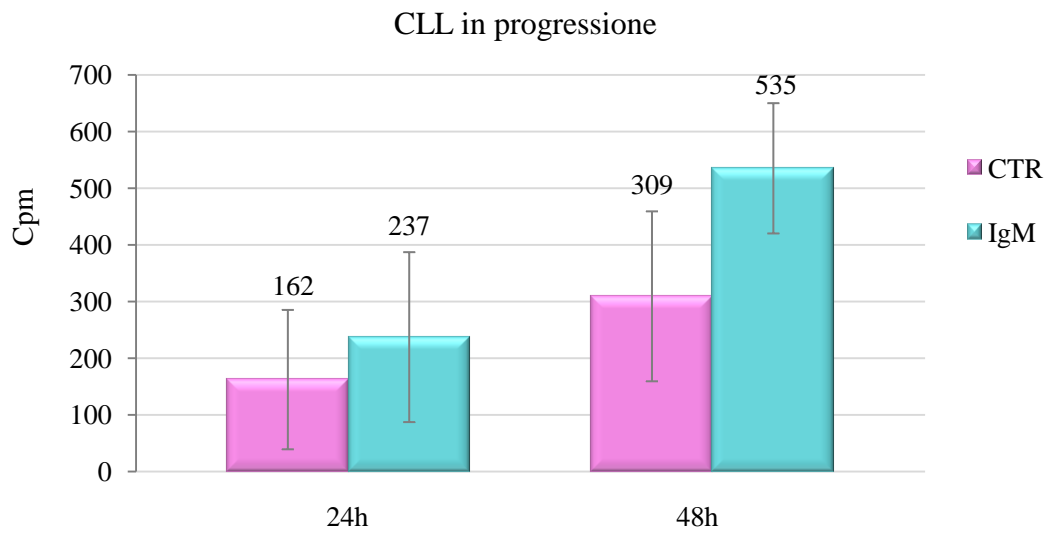
b)



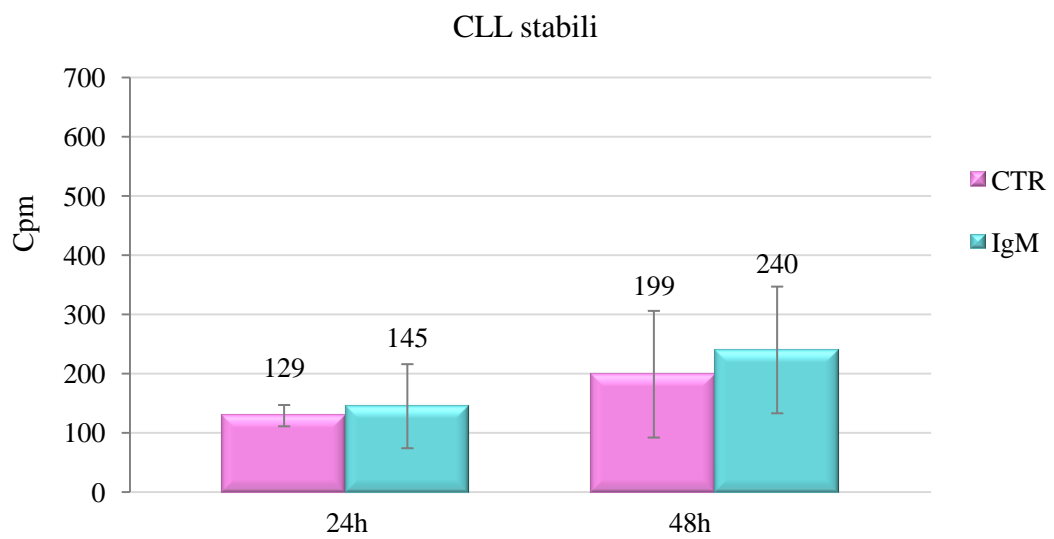
**Figura 8.** Analisi dell'attività proliferativa dei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata (a) e IgHV mutata (b), pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM.



a)



b)



**Figura 9.** Analisi dell'attività proliferativa dei campioni di LLC caratterizzati da una malattia progressiva (a) e stabile (b), pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM.

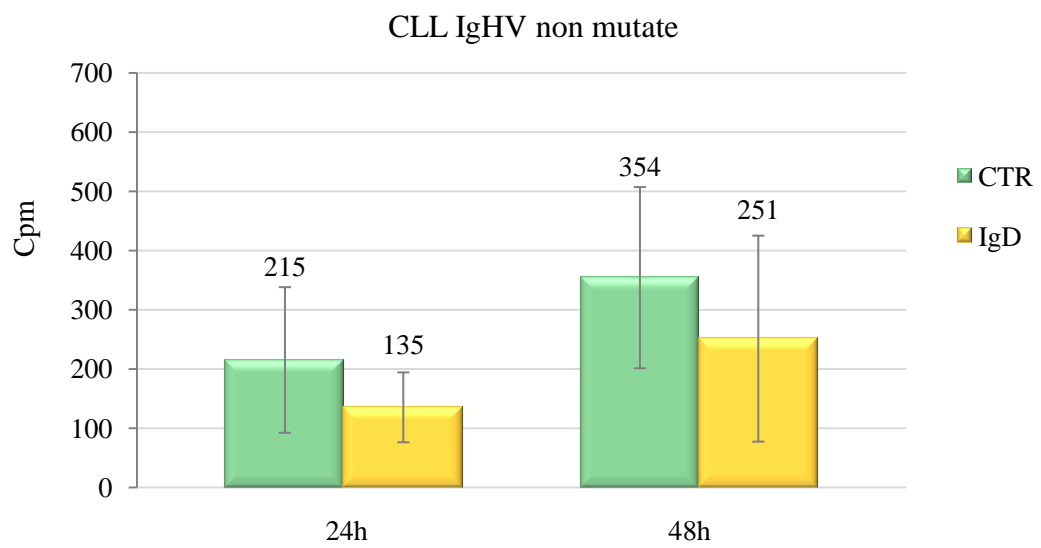
Allo stesso modo, nei campioni IgHV mutati (7 pazienti), il valore medio di Cpm dopo 24 e 48 h di stimolazione, è risultato diminuito in ambo i casi di 1.4 volte rispetto al controllo (Valori medi Cpm 24 h;  $158.7 \pm 28.1$  vs  $113.6 \pm 63.9$ ; Valori medi Cpm 48 h;  $278.4 \pm 91.8$  vs  $191.6 \pm 100.6$ ) [Figura 10b]. Infine, nei campioni di LLC isolati da pazienti con malattia in progressione (13 pazienti; 3 IgHV mutati e 10 IgHV non mutati) è stata osservata una riduzione del tasso proliferativo di 1.4 volte ( $187.5 \pm 112.1$  vs  $137.9 \pm 77.4$ ) a 24 h e 1.4 volte ( $319.6 \pm 167.5$  vs  $232.7 \pm 172.9$ ) a 48 h rispetto al controllo NS e in quelli isolati da pazienti con malattia stabile (4 pazienti; 4/4 IgHV mutati) di 1.4 volte ( $145.5 \pm 16.6$  vs  $104.2 \pm 28.2$ ) e 1.3 volte ( $236.6 \pm 102.9$  vs  $180.1 \pm 106.8$ ), rispettivamente [Figura 11].

I dati ottenuti in tale ambito, in linea con quanto osservato in merito all'avanzamento nel ciclo cellulare, confermano la possibilità di modulare la risposta delle cellule B di LLC alla stimolazione del BCR attraverso la scelta dell'isotipo recettoriale coinvolto nella trasmissione della segnalazione a valle, evidenziando l'abilità dei due isotipi M e D di mediare effetti diametralmente opposti. Inoltre rafforzano l'ipotesi dell'esistenza di un'associazione tra la risposta alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M e i parametri di prognosi sfavorevole, avvalorando la tesi secondo la quale le differenze nella composizione e struttura del recettore possano influenzare il comportamento delle cellule B leucemiche a seguito dell'incontro con l'antigene e, di conseguenza, la variabilità dell'andamento della malattia.

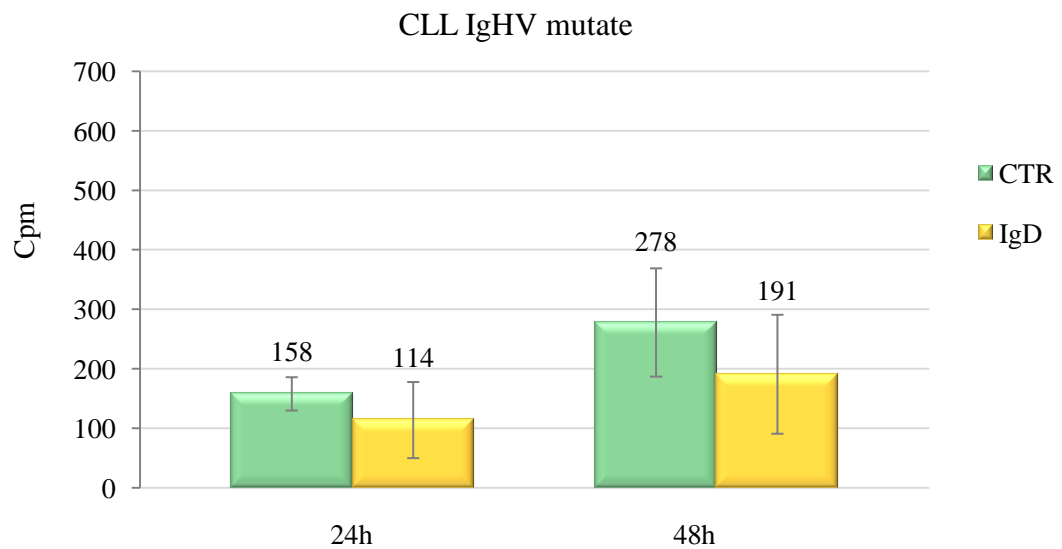
### **3.4 Valutazione degli effetti della stimolazione del BCR delle cellule B neoplastiche di LLC sulla modulazione del processo apoptotico**

Per comprendere se gli effetti proliferativi indotti dalla stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC IgHV non mutata e di LLC progressiva potessero essere associati ad una attività citoprotettiva e se, al contrario, la riduzione del tasso proliferativo nei campioni stimolati con anticorpi anti-IgD potesse dipendere dall'attivazione del processo di morte cellulare, le cellule B leucemiche sono state stimolate per 24 e 48 h con anticorpi anti-IgM e anti-IgD e l'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante l'impiego delle tecniche dell'Annexina V e dell'Arancio di Acridina (AO). A sostegno della prima ipotesi, l'analisi dei risultati relativi alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M ha evidenziato nei campioni di LLC caratterizzati da uno stato IgHV non mutato e una malattia in progressione, un incremento non significativo o, in alcuni casi un decremento, del tasso apoptotico dopo esposizione ad anticorpi anti-IgM.

a)

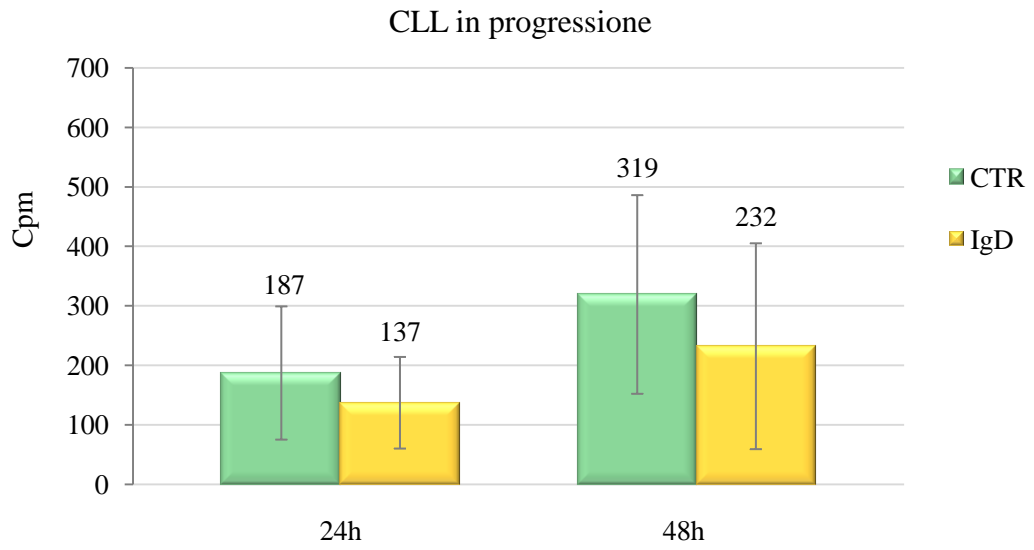


b)

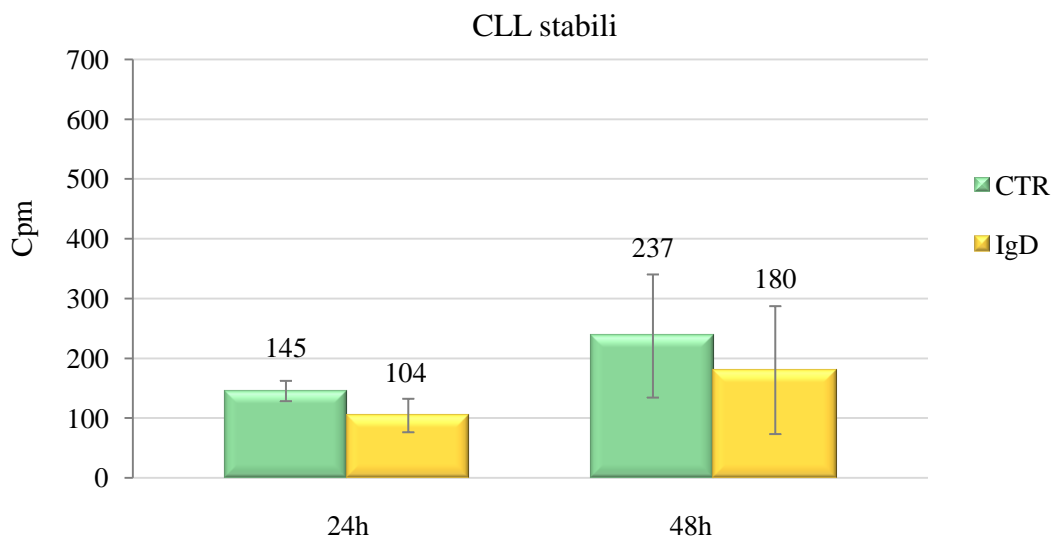


**Figura 10.** Analisi dell'attività proliferativa dei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata (a) e IgHV mutata (b), pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgD.

a)



b)

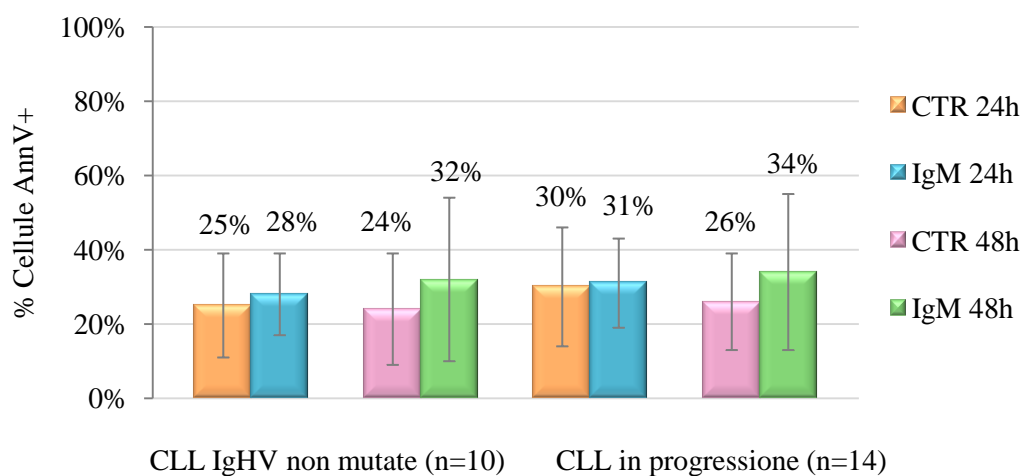


**Figura 11.** Analisi dell'attività proliferativa dei campioni di LLC caratterizzati da una malattia progressiva (a) e stabile (b), pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgD.

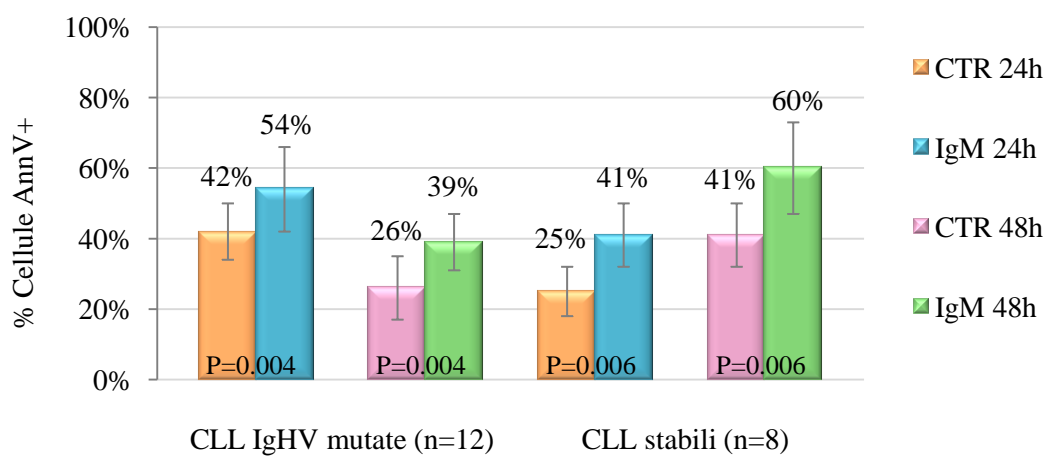
A 24 h, nei casi IgHV non mutati (*10 pazienti*) sono stati, infatti, osservati livelli medi di apoptosi pari a  $25.2\% \pm 14.7\%$  nelle cellule NS e a  $28.7\% \pm 11.6\%$  in quelle S (Incremento apoptosi: 1.1 volte). Allo stesso modo, i campioni di LLC in progressione (*14 pazienti: 4 IgHV mutati e 10 IgHV non mutati*) presentavano livelli di apoptosi del  $30.5\% \pm 15.5\%$  pre- e del  $31.7\% \pm 12.3\%$  post-stimolazione (Incremento apoptosi: 1.04 volte). Questi dati sono stati ulteriormente corroborati dall'analisi dei livelli apoptotici effettuata a 48 h dalla stimolazione recettoriale, che ha evidenziato la persistenza di valori pressoché identici di cellule apoptotiche in entrambe le sottoclassi (Campioni IgHV non mutati:  $24.4\% \pm 14.5\%$  vs  $31.7\% \pm 22.6\%$ , Incremento apoptosi: 1.2 volte; Campioni di LLC in progressione:  $25.6\% \pm 13.4\%$  vs  $34.2\% \pm 21.1\%$ , Incremento apoptosi: 1.3) [Figura 12a]. Al contrario, la stimolazione dell'isotipo M induce una sensibilizzazione nei confronti del processo apoptotico nei casi di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile, evidenziabile già a 24 h. Nei campioni IgHV mutati (*12 pazienti*) è stata, infatti, rilevata una percentuale media di cellule Annexina V<sup>+</sup>, dopo 24 e 48 h di stimolazione, rispettivamente pari a  $41.8\% \pm 8.5\%$  e  $54.1\% \pm 12.2\%$  contro un tasso apoptotico basale del  $26.3\% \pm 8.6\%$  e  $39.4\% \pm 7.9\%$  (Incremento apoptosi di 1.6 volte a 24 h e 1.4 a 48 h; P=0.004), rispettivamente. Ugualmente, i livelli apoptotici caratteristici delle cellule B di pazienti affetti da LLC stabile (*8 pazienti: 8/8 IgHV mutati*) sono apparsi incrementati di 1.6 ( $25.0\% \pm 7.4\%$  vs  $40.8\% \pm 9.5\%$ ) e 1.5 ( $41.1\% \pm 9.5\%$  vs  $59.9\% \pm 13.2\%$ ) volte ai due tempi di stimolazione (P=0.006) [Figura 12b]. I risultati complessivi ottenuti mediante la tecnica dell'Annexina V, nelle 4 sottoclassi di pazienti distinti in base allo stato mutazionale dei geni IgHV e all'andamento clinico della malattia, sono stati ulteriormente confermati da quelli conseguiti con la tecnica dell'AO. Il crosslinking delle sIgM è risultato in grado di indurre un incremento non significativo o un decremento della percentuale di cellule in fase subG0/1 nei casi IgHV non mutati e/o progressivi, contrariamente ai casi IgHV mutati stabili, in cui è stato osservato un incremento della percentuale di cellule in fase subG0/1, proporzionalmente all'aumento del tasso apoptotico (dati non mostrati).

Anche in termini di induzione del processo apoptotico il comportamento delle cellule B leucemiche in risposta alla stimolazione dell'isotipo recettoriale D è apparso differente rispetto a quello osservato in seguito alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M.

a)



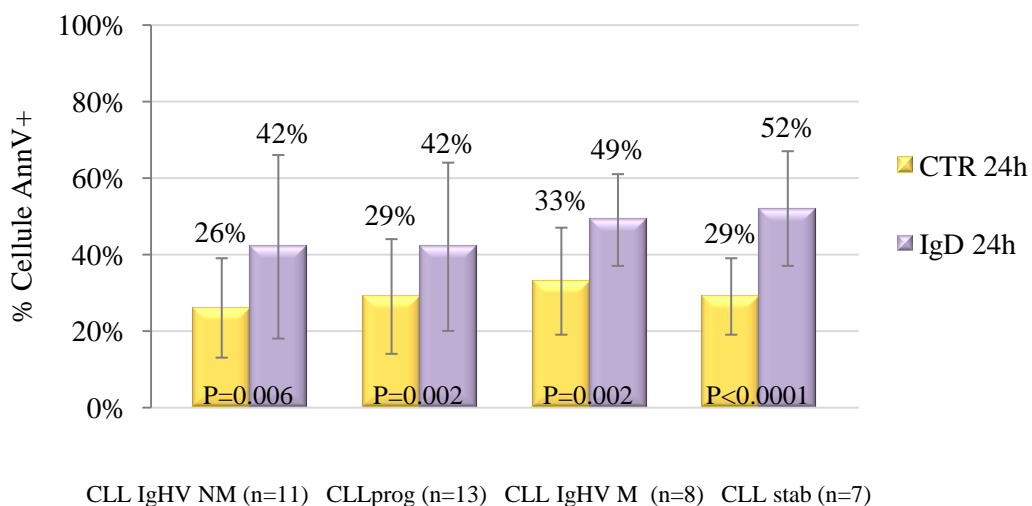
b)



**Figura 12.** Analisi dei livelli apoptotici pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata e in progressione di malattia (a) e nei campioni di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile (b).

L'incubazione dei linfociti B di LLC con anticorpi anti-IgD è apparsa associata a un aumento significativo dei livelli apoptotici in tutte le sottocategorie esaminate, indipendentemente sia dallo stato mutazionale dei geni IgHV che dall'andamento clinico della malattia. A 24 h è stato, infatti, rilevato un incremento medio del tasso apoptotico di 1.59 volte nei casi IgHV non mutati (11 pazienti; 26.4% ± 13.8% vs 41.9% ± 24.2%, P=0.006); di 1.43 nei casi di LLC in progressione (13 pazienti; 29.0% ± 15.6% vs 41.6% ± 21.6%, P=0.002); di 1.49 volte nei casi IgHV mutati (8 pazienti; 32.7% ± 13.9% vs 49.0% ± 11.9%, P=0.002) e infine di 1.78 volte nei casi di LLC stabile (7 pazienti; 29.2% ± 10.4% vs 52.1% ± 14.6%, P<0.0001) [Figura 13]. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti a 48 h, in cui il tasso di incremento del processo apoptotico è risultato, nelle 4 sottoclassi, rispettivamente pari a 2.07 (P=0.0014), 1.98 (P=0.00015), 2.10 (P<0.0001) e 2.22 (P=0.0004) volte.

In conclusione, i dati rilevati in tale ambito dimostrano come la stimolazione dell'isotipo recettoriale M abbia un impatto differenziale sull'induzione del processo di morte cellulare dei linfociti B patologici a seconda delle caratteristiche biologico-cliniche della malattia. Al contrario, la stimolazione dell'isotipo recettoriale D risulta indipendente dalle suddette proprietà, rivelando una risposta funzionale comune che suggerisce una dominanza degli effetti isotipo-specifici sui fattori prognostici predittivi del comportamento della malattia.



**Figura 13.** Analisi dei livelli apoptotici pre- e post- 24 h di stimolazione con anticorpi anti-IgD della totalità dei casi di LLC esaminati, distinti in base allo stato mutazionale della regione IgHV (non mutato o mutato) e all'andamento clinico della malattia (progressivo o stabile).

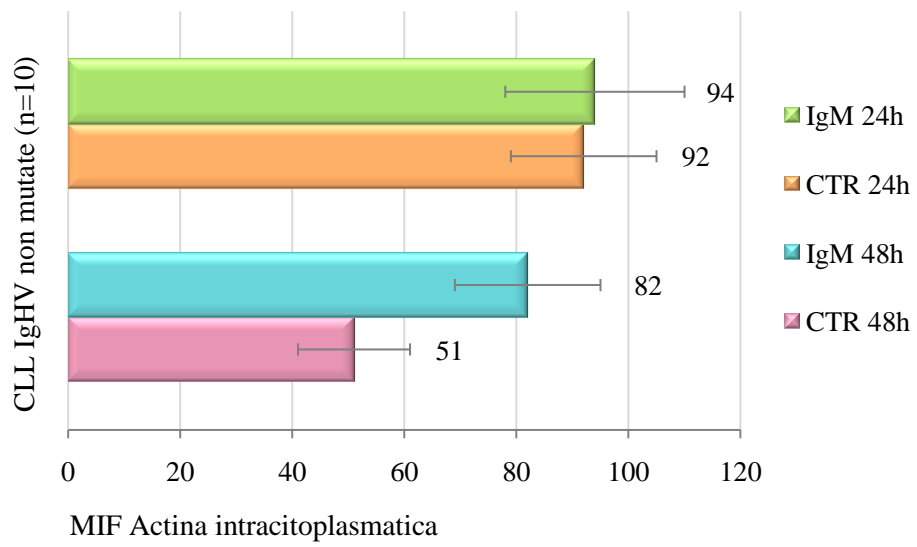
### **3.5 Analisi dei cambiamenti citoscheletrici delle cellule B neoplastiche di LLC dopo stimolazione del BCR**

I risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica hanno rivelato, principalmente a seguito della stimolazione del BCR neoplastico con anticorpi anti-IgM, una deregolazione dei geni coinvolti nell'organizzazione dell'actina citoscheletrica e nel controllo della motilità, nei campioni di cellule B di LLC a configurazione IgHV non mutata. Per valutare se i cambiamenti a livello genico osservati in tale sottogruppo, fossero tradotti anche a livello proteico e se, nel caso della stimolazione dell'isotipo recettoriale D, l'attivazione delle vie di segnalazione a valle del BCR potesse implicare una riorganizzazione del citoscheletro indipendente dalla modulazione del pattern di espressione genica, è stata inclusa nel nostro studio un'analisi dei livelli e della localizzazione intracitoplasmatica dell'actina in forma polimerizzata (F-actina). A tale scopo, le cellule B leucemiche isolate da pazienti di LLC con differenti caratteristiche prognostiche, sono state stimolate per 24 e 48 h con anticorpi anti-IgM e anti-IgD quindi, l'espressione intracellulare dell'actina è stata valutata attraverso analisi citofluorimetrica e espressa come Intensità Media di Fluorescenza (MIF); al contrario, la sua visualizzazione intracellulare è stata eseguita mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza, dopo marcatura con Falloidina fluoresceinata.

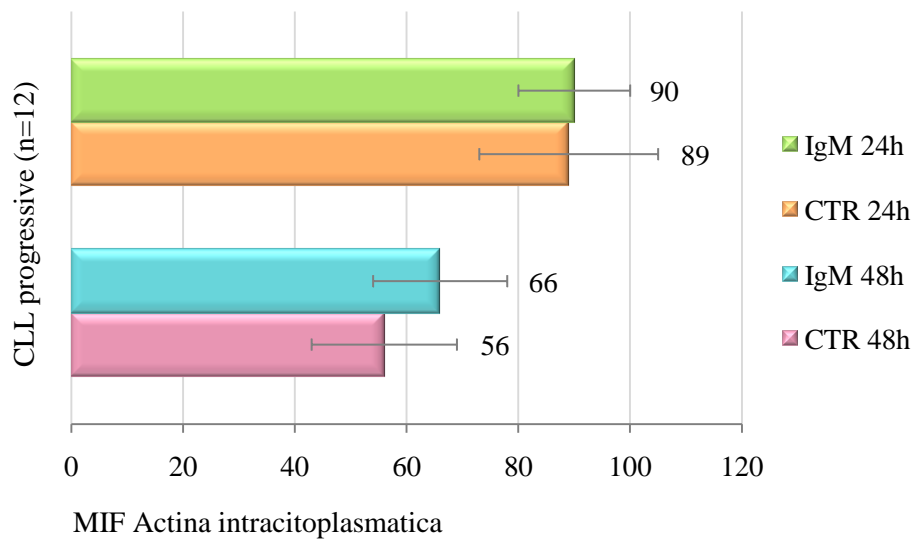
Nel caso della stimolazione dell'isotipo recettoriale M, i risultati dell'analisi citofluorimetrica hanno evidenziato a 48 h di trattamento con anticorpi anti-IgM, un incremento dei livelli intracitoplasmatici di actina esclusivamente nelle cellule B di LLC a configurazione IgHV non mutata (*10 pazienti*) e in progressione di malattia (*12 pazienti: 2 IgHV mutati e 10 IgHV non mutati*), con valori di MIF pari a  $51.50 \pm 10.2$  nei campioni NS e  $81.5 \pm 24.2$  nei campioni S nel primo caso, e a  $56.3 \pm 21.8$  pre- e  $66.1 \pm 24.9$  post-stimolazione, nel secondo caso. Viceversa, a 24 h sono stati osservati valori della MIF pressoché costanti nel controllo e nel campione S, rispettivamente equivalenti a  $92.6 \pm 46.0$  vs  $93.8 \pm 43.3$  e a  $89.7 \pm 43.1$  vs  $90.4 \pm 41.5$  [Figura 14]. Nei campioni di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile (*7 pazienti*) non è stato invece possibile rilevare, come atteso in relazione ai dati ottenuti dallo studio del profilo di espressione genica, nessuna variazione significativa nell'espressione dell'actina intracitoplasmatica, ad entrambi i tempi di studio. Infatti, in tali casi, il valore della MIF a 24 h è risultato pari a  $103.7 \pm 26.9$  nei campioni NS e a  $100.6 \pm 29.6$  in quelli S, mentre a 48 h a  $73.6 \pm 13.7$  nel controllo e a  $69.0 \pm 21.9$  dopo stimolazione [Figura 15].



a)



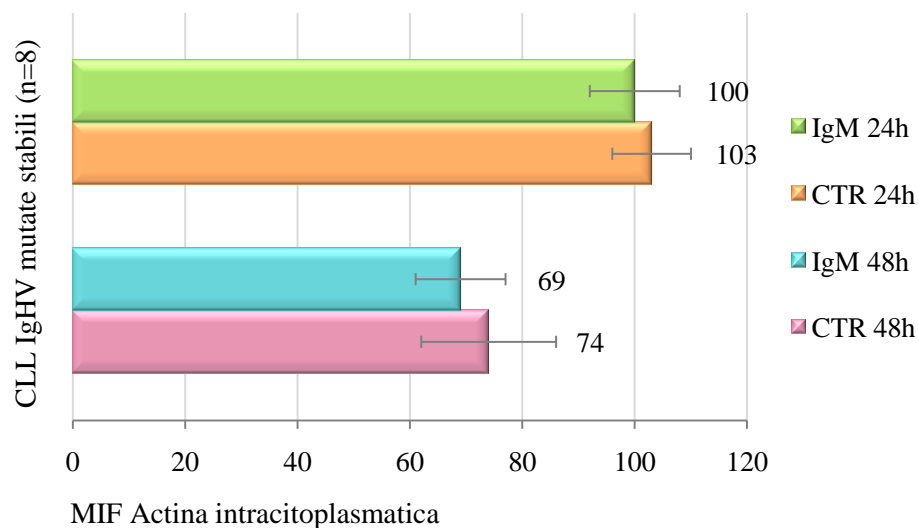
b)



**Figura 14.** Analisi dei livelli intracitoplasmatici di actina pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC a configurazione IgHV non mutata (a) e in progressione di malattia (b). I risultati dell'espressione dei livelli di actina sono riportati come MIF.

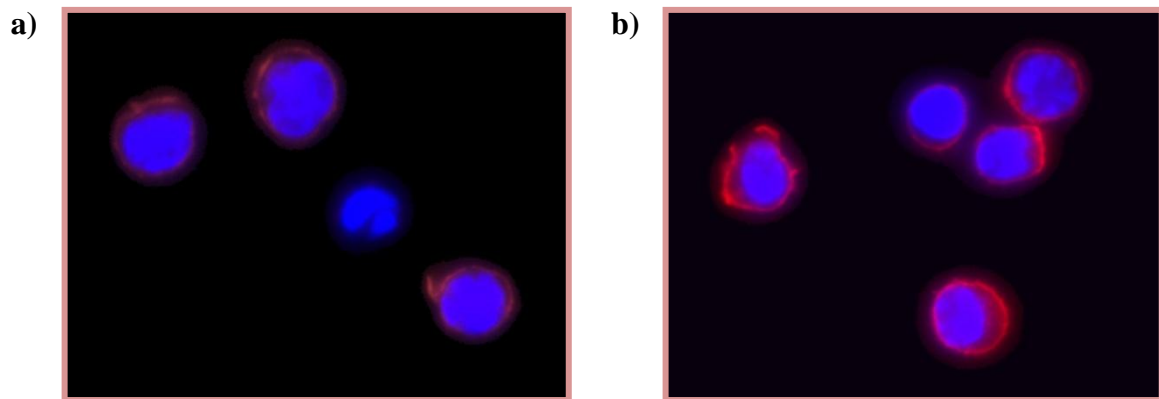
Tali risultati sono stati corroborati dalla visualizzazione al microscopio a fluorescenza, dell'actina intracitoplasmatica, che ha evidenziato non solo una riorganizzazione della proteina ma anche la formazione di regioni più dense di polarizzazione, solamente in quei campioni S di LLC a configurazione IgHV non mutata e in progressione di malattia, in cui era stato in precedenza rilevato un cambiamento quantitativo nei livelli di actina [Figura 16].

Diversamente da quanto osservato con l'impiego di anticorpi anti-IgM, ma in linea con l'assente modulazione genica di molecole citoscheletriche, la stimolazione con anticorpi anti-IgD non si traduce nella modulazione dell'actina, né in termini quantitativi che qualitativi, in nessuna delle sottocategorie esaminate. Più precisamente i dati ottenuti dallo studio citofluorimetrico rivelano a 24 h, valori della MIF pre- e post-stimolazione di  $99.7 \pm 60.9$  vs  $97.2 \pm 56.0$  nei casi di LLC IgHV non mutata (5 pazienti); di  $93.5 \pm 53.2$  vs  $92.4 \pm 50.0$  nei casi di LLC in progressione (7 pazienti: 2 IgHV mutati e 5 IgHV non mutati) e infine di  $78.0 \pm 27.0$  vs  $80.5 \pm 26.5$  nei casi di LLC IgHV mutata stabile (2 pazienti). Valori equivalenti sono stati osservati a 48 h dalla stimolazione (dati non mostrati). Allo stesso modo, non è stato possibile rilevare alcuna tipologia di riorganizzazione citoscheletrica in seguito all'analisi delle cellule B leucemiche al microscopio a fluorescenza.



**Figura 15.** Analisi dei livelli intracitoplasmatici di actina pre- e post- 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM nei campioni di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile. I risultati dell'espressione dei livelli di actina sono riportati come MIF.

Questi risultati dimostrano come cellule di LLC con differenti caratteristiche prognostiche rispondano in maniera differenziale alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M non solo in termini di espressione genica, ciclo cellulare, proliferazione e apoptosi, ma anche in termini di cambiamenti morfologici. Al contrario, la stimolazione dell'isotipo recettoriale D risulta ancora una volta incapace di indurre una risposta differenziale sia in relazione allo stato mutazionale delle cellule neoplastiche che all'andamento clinico della malattia, confermando l'ipotesi di una dominanza degli effetti isotipo-specifici sui principali parametri indicatori di prognosi.



**Figura 16.** *Cambiamenti citoscheletrici delle cellule B di LLC IgHV non-mutata dopo stimolazione con anticorpi anti-IgM.* E' riportata, a titolo esemplificativo la visualizzazione al microscopio a fluorescenza, a un ingrandimento 100X, dell'actina intracitoplasmatica delle cellule B di LLC in progressione a configurazione IgHV non-mutata, NS (a) e S (b), di uno dei pazienti studiati. E' possibile osservare, dopo 48 h di stimolazione, una riorganizzazione dell'actina intracitoplasmatica e la presenza di regioni più dense di polarizzazione, assenti nelle cellule NS.

#### 4. DISCUSSIONE

L'eterogeneità del decorso clinico della LLC rappresenta un affascinante quesito di natura biologica, peculiare di tale malattia nell'ampio spettro delle neoplasie ematologiche. Per questa ragione, numerose speculazioni sono state formulate nel tentativo di comprendere i fattori predisponenti la progressione o, in alternativa, la stabilità del suo decorso clinico. In realtà, nonostante l'identificazione di parametri clinici e biologici di significato prognostico abbia permesso di classificare i pazienti in sottocategorie di rischio, contribuendo a fornire indicazioni sull'evoluzione della malattia nel tempo, le conoscenze acquisite risultano tuttora incomplete e non sempre adeguate a predire il comportamento delle cellule B leucemiche e la risposta farmacologica. La LLC continua, infatti, ad essere una patologia incurabile, caratterizzata, nella maggior parte dei casi, dall'acquisizione di resistenza alla terapia citotossica convenzionale. I dati relativi alle caratteristiche del BCR delle cellule B di LLC hanno avvalorato nel tempo l'ipotesi che l'eterogeneità del decorso clinico peculiare di tale malattia, possa dipendere primariamente dalla reattività del suddetto complesso recettoriale. La segnalazione attraverso il BCR potrebbe influenzare, in combinazione con le altre caratteristiche biologiche delle cellule B leucemiche, il comportamento più o meno aggressivo della patologia. Questo presupposto ha condotto a esplorare la possibilità che la stimolazione antigenica possa rivestire un ruolo chiave non solo nel processo di espansione clonale ma anche nella patogenesi della LLC. Sulla base di tali premesse, il presente progetto di ricerca si è incentrato sullo studio della funzionalità del BCR dei linfociti B leucemici, con l'obiettivo finale di comprendere i meccanismi alla base della patogenesi e progressione della LLC legati alla stimolazione antigenica, quindi, le basi molecolari della prevalenza dei segnali di sopravvivenza, proliferazione o anergia cellulare, e correlare tale risposta all'andamento prognostico della malattia. A tale scopo è stato impiegato un modello sperimentale, basato sulla stimolazione *in vitro* del BCR delle cellule B leucemiche con anticorpi anti-IgM o anti-IgD immobilizzati, in grado di mimare la fisiopatologia della LLC, ovvero gli eventi che si verificano *in vivo* in presenza dell'antigene. La risposta alla stimolazione in termini di variazione del profilo di espressione genica, dell'attività proliferativa ed apoptotica e della struttura citoscheletrica dei linfociti B patologici, è stata esaminata sia in relazione allo stato mutazionale dei geni IgHV che all'andamento, stabile o progressivo, della malattia. I risultati ottenuti in merito all'impiego di anticorpi anti-IgM hanno rivelato l'esistenza di una differenza nella responsività al suddetto isotipo recettoriale, in relazione all'andamento prognostico della malattia. E' stato, infatti, possibile osservare una sensibilità alla

stimolazione, relativamente alla modulazione del profilo di espressione genica, solo nei casi di LLC caratterizzati da una configurazione IgHV non mutata e una malattia in progressione. Al contrario, nessun cambiamento significativo del profilo di espressione genica è stato osservato nei casi a configurazione IgHV mutata e malattia stabile. Complessivamente, i dati ottenuti in merito allo studio del profilo di espressione genica sono risultati in linea con quanto riportato nel lavoro di *Vallat LD et al.* [92] in cui la stimolazione dell'isotipo recettoriale M rivela un pattern trascrizionale BCR-specifico, con prevalenza di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella proliferazione come MYC, NF- $\kappa$ B e YWHAQ, nei casi di LLC a prognosi infausta, ovvero caratterizzati da uno stato IgHV non mutato, dalla positività per la chinasi ZAP-70 e dalla presenza di aberrazioni citogenetiche. La responsività al crosslinking delle sIgM dei casi di LLC caratterizzati da fattori di prognosi infausta, rilevata nel nostro studio, potrebbe quindi supportare in modo ulteriore l'ipotesi del ruolo centrale del BCR nell'espansione e progressione della malattia; al contrario l'iporesponsività alla stimolazione dei casi di LLC stabile IgHV mutata potrebbe evidenziare uno stato anergico potenzialmente correlabile alla stimolazione (auto)antigenica cronica che si verifica *in vivo*. In un recente studio, è stato, infatti, dimostrato che l'iporesponsività agli anticorpi anti-IgM non solo correla con i fattori prognostici favorevoli, ma risulta anche reversibile dopo coltura *in vitro* o induzione del processo di endocitosi recettoriale e ri-espressione dell'isotipo M sulla membrana cellulare [93]. Queste osservazioni potrebbero confermare l'esistenza *in vivo* di un legame anergizzante antigene-BCR patologico, la cui reversibilità rende marginale la presenza di difetti intrinseci nella biosintesi del BCR per giustificare le diverse competenze di segnalazione delle cellule B di LLC.

Contrariamente a quanto osservato nel caso dell'impiego di anticorpi anti-IgM, la stimolazione dell'isotipo recettoriale D ha mostrato una risposta più omogenea in termini di modulazione del pattern di espressione genica, nei diversi sottogruppi di pazienti distinti in base allo stato mutazionale e all'andamento della malattia, evidenziando la presenza di un ruolo più marginale di tale isotipo recettoriale nell'influenzare la prognosi dei pazienti affetti da LLC. La stimolazione con anticorpi anti-IgD è inoltre risultata associata ad una inversione nella tipologia di modulazione genica in relazione ai due tempi di stimolazione, mostrando una preferenziale downregolazione dei geni implicati nel controllo della trasduzione del segnale, della trascrizione genica, del differenziamento e della morte cellulare programmata a 24 h, e una marcata upregolazione dei geni coinvolti nel controllo dei processi metabolici dell'RNA, degli acidi carbossilici e della sintesi proteica a 48 h. Questi risultati ci hanno di conseguenza condotto a ipotizzare l'esistenza di una risposta attivatoria più tardiva nel caso

della stimolazione delle sIgD. Ad ogni modo, non vi sono in letteratura studi relativi alla modulazione genica post-stimolazione con anticorpi anti-IgD, di conseguenza tali dati andrebbero confermati in una casistica più ampia di pazienti.

Allo scopo di validare a livello funzionale le osservazioni emerse dall'analisi del profilo di espressione genica, sono stati quindi esaminati gli effetti della stimolazione del BCR sui cambiamenti nella distribuzione delle cellule B di LLC, all'interno delle varie fasi del ciclo cellulare. In linea con l'upregolazione dei geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, rilevata nei casi di LLC progressiva IgHV non mutata, la stimolazione con anticorpi anti-IgM è apparsa associata a un incremento significativo della quota di cellule in fase G1, esclusivamente nei suddetti casi. Non è stata invece osservata alcuna modulazione del ciclo cellulare nei campioni di LLC caratterizzati da fattori di prognosi favorevole, un dato atteso vista l'iporesponsività di tali campioni all'acquisizione di cambiamenti nel pattern di espressione genica dopo stimolazione. Gli effetti della stimolazione dell'isotipo recettoriale M sul ciclo cellulare sono stati poi ulteriormente confermati dall'esame dell'attività proliferativa dei linfociti B di LLC. Anche in tal caso, è stato, infatti, possibile osservare una responsività, identificabile nell'incremento del tasso di proliferazione *in vitro*, solamente nei campioni cellulari con caratteristiche prognostiche infauste. Questi risultati hanno permesso di supporre che l'esposizione all'antigene, promuovendo l'espansione dei cloni non mutati, contribuisca alla cattiva prognosi di questo sottogruppo. Al contrario i cloni iporesponsivi *in vitro*, potrebbero essersi sviluppati *in vivo* come conseguenza di una transizione verso uno stadio tollerogenico da esposizione antigenica continua dovuto alla selezione di un clone inizialmente responsivo poi condotto a uno stato di desensibilizzazione recettoriale; di conseguenza l'anergia agli stimoli proliferativi giustificerebbe il miglior decorso clinico della malattia. La capacità delle cellule di LLC caratterizzate da fattori prognostici sfavorevoli, di rispondere a stimoli di natura proliferativa è stata anche dimostrata *in vitro* dopo incubazione con oligonucleotidi immunostimolatori. Cellule di LLC IgHV non mutate isolate da pazienti con malattia in progressione sono indotte in tali condizioni a entrare nel ciclo cellulare, proliferare e manifestare un incremento della sopravvivenza [94]. L'associazione tra l'entrata in fase G1 del ciclo cellulare e le caratteristiche prognostiche infauste delle cellule B leucemiche, osservata nel nostro studio, è inoltre apparsa in linea con quanto riportato nel lavoro di *Deglesne PA et al.*, in cui l'incremento della percentuale di cellule in fase G1, osservato in seguito alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M con anticorpi immobilizzati, è apparso associato preferenzialmente con lo stato non mutato dei geni IgHV, la positività per la chinasi ZAP-70, la stadiazione Binet, il tempo di

raddoppiamento dei linfociti e i livelli sierici della timidina chinasi [95]. In realtà, in questo studio, né lo stato mutazionale né ZAP-70 risultano sufficienti ad identificare la popolazione cellulare progressiva, in quanto anche casi IgHV mutati e ZAP-70<sup>-</sup> manifestano, sebbene con una minor frequenza, una responsività alla stimolazione *in vitro*, un'osservazione a sostegno dell'importanza dell'analisi della reattività del BCR patologico per l'identificazione di quei casi, apparentemente a prognosi favorevole ma a rischio di progressione. Anche nel nostro studio, a differenza di quanto osservato in merito allo stato mutazionale, non è stata osservata alcuna associazione tra l'espressione della chinasi ZAP-70 e la risposta alla stimolazione recettoriale. I livelli di tale chinasi, diversamente da quelli della chinasi SYK, non cambiano dopo incubazione con anticorpi anti-IgM, confermando dati precedenti in merito al ruolo predominante di SYK nella trasduzione del segnale anche nei linfociti B patologici [77-96]. Infatti, sebbene inizialmente ZAP-70 sia stata identificata come un fattore prognostico negativo associato alla capacità di segnalazione a valle del BCR delle cellule B leucemiche, è stato postulato che il suo ruolo nella trasduzione dei segnali mediati dalle sIgM potrebbe essere quello di prolungare la persistenza dello stimolo agendo da adattatore molecolare, dal momento che è la positività per tale chinasi, indipendentemente dal suo grado di fosforilazione, a favorire gli eventi di fosforilazione tirosinica a carico di SYK, BLNK e PLC $\gamma$ , e l'aumento del flusso intracellulare di Ca<sup>2+</sup> [87]. Nel lavoro di *Deglesne PA et al.* gli autori ipotizzano l'esistenza di un'associazione tra l'entrata in fase G1 del ciclo cellulare e una maggiore capacità proliferativa *in vivo*, supportata dall'induzione, nei linfociti B leucemici responsivi, della ciclina D2 e di CDK4. Ciononostante, in accordo con i nostri risultati, la frazione di cellule in fase S del ciclo rimane invariata, un dato giustificato, nello studio di *Deglesne PA et al.*, dalla persistente espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p27kip-1, che suggerisce la necessaria presenza di segnali costimolatori addizionali affinché la transizione G1-S possa verificarsi.

In realtà, piuttosto che sul ciclo cellulare e l'attività proliferativa, la maggior parte degli studi precedenti relativi alla stimolazione recettoriale si è focalizzata sull'analisi del ruolo delle sIgM sulla modulazione del processo apoptotico, evidenziando, pur all'interno dello stesso sottogruppo prognostico, una dicotomia nel comportamento dei linfociti B leucemici, rappresentata, in una percentuale di casi, dall'induzione della sopravvivenza e nell'altra, dall'accelerazione della morte cellulare. Nel nostro sistema sperimentale, come atteso da quanto osservato in merito agli studi funzionali relativi alle capacità di espansione del clone leucemico, l'esame dei livelli apoptotici ha rilevato la presenza di un effetto citoprotettivo nei campioni caratterizzati da LLC in progressione IGHV non mutata e, al contrario, una

sensibilizzazione nei confronti del processo apoptotico nei casi di LLC a configurazione IgHV mutata e malattia stabile, a sostegno del ruolo dell'antigene nell'attivazione di un programma di sopravvivenza esclusivamente nelle forme più aggressive della malattia. In particolare, l'effetto citoprotettivo potrebbe garantire alle cellule IgHV non mutate, almeno nelle prime fasi di malattia, il tempo necessario a ricevere il secondo segnale utile nel processo di attivazione antigene-dipendente. Un'inibizione del processo apoptotico nella maggior parte dei campioni di LLC, ma senza correlazioni con specifici sottogruppi prognostici, è stata rilevata nello studio di *Bernal A et al.*, in seguito all'incubazione delle cellule B neoplastiche con anticorpi anti-IgM immobilizzati. La risposta cellulare è stata osservata, in tal caso, in associazione non solo a una riduzione significativa dose-dipendente dei livelli di apoptosi spontanea, ma anche all'inibizione dell'attività delle caspasi, all'induzione di NF- $\kappa$ B e all'espressione di MCL-1, Bcl-2 e BFL-1. Le differenze di responsività sono inoltre apparse correlate alla via della chinasi AKT, in quanto l'inibizione della chinasi PI3-K sarebbe in grado di annullare quasi del tutto gli effetti della stimolazione mentre la presenza di un'agonista del CD40 come segnale costimolatorio, di potenziarli [97]. L'assenza di una correlazione con i principali fattori prognostici rilevata nel suddetto studio, viene giustificata in quanto consistente con la biologia di una forma tumorale indolente in cui le cellule maligne generano sIgM con la capacità di riconoscere antigeni autologhi, tuttavia, questa spiegazione elude le basi dell'eterogeneità del decorso clinico della malattia, e meriterebbe un maggior approfondimento. La variabilità della risposta alla stimolazione dell'isotipo recettoriale M è anche evidente nello studio di *Allsup DJ et al.* in cui solo le forme di LLC IgHV non mutata rispondono incrementando il flusso intracellulare di  $Ca^{2+}$ , la fosforilazione del CD79a e la traslocazione del BCR a livello delle zattere lipidiche. Questo si traduce nell'aumento del tasso di sopravvivenza, nonostante tale risposta risulti indipendente sia dallo stadio di malattia, che, a differenza di quanto riportato nel nostro studio, dall'espressione delle sIgM [98]. Nel nostro caso, la densità delle sIgM si è rivelata, infatti, essere il miglior parametro per discriminare la responsività alla stimolazione del BCR, dal momento che i casi IgHV non mutati sono risultati caratterizzati dalla maggiore espressione di tale isotipo recettoriale e la presenza di una riduzione nei livelli di espressione in un caso di LLC progressiva IgHV non mutata ne ha determinato la clusterizzazione con i casi iporesponsivi di LLC stabile IgHV mutata.

I risultati relativi alla funzione anti-apoptotica delle sIgM riportati nel nostro studio, sono in realtà in contrasto con una serie di lavori in cui l'isotipo M appare invece associato all'induzione di stimoli pro-apoptotici. Molteplici possibili spiegazioni, correlate



primariamente sia alla modalità eterogenea di stimolazione recettoriale (natura monoclonale/policlonale degli anticorpi e/o dosaggio) che ai differenti fattori indicatori di prognosi presi in esame, possono essere adottate per interpretare le differenze rilevate in merito al comportamento delle cellule B leucemiche. In uno dei primi studi, risalenti agli anni '90, è stato dimostrato che l'impiego di anticorpi anti-IgM è in grado di indurre, nelle cellule di LLC, la frammentazione del DNA con conseguente apoptosi, similmente a quanto accade in presenza di glucorticoidi [99]. E' possibile in tal caso che le differenze tra gli anticorpi anti-IgM impiegati, e fattori come la concentrazione di cellule B leucemiche coltivate, possano aver contribuito a quanto rilevato *in vitro*, essendo tali variabili difficili da controllare. Successivamente, anche in una serie di lavori di Zupo S *et al.*, il cross-linking delle sIgM è stato osservato prevalentemente in associazione alla trasduzione di segnali pro-apoptotici, sebbene solo in cellule CD38<sup>+</sup> [80-81]. Tale effetto potrebbe essere in parte originato dall'impiego di anticorpi solubili piuttosto che immobilizzati. Esiste, infatti, una pleora di evidenze a supporto della diversa responsività alla stimolazione del BCR patologico in relazione alla natura solubile o immobilizzata degli anticorpi anti-IgM impiegati, che influenza sia la durata sia la segnalazione a valle del recettore. In particolare, l'impiego, nel nostro sistema sperimentale, della modalità di stimolazione con anticorpi immobilizzati è stato scelto perché presumibilmente in grado di riprodurre più fedelmente quanto accade *in vivo* in relazione alla presentazione antigenica a livello tissutale, partendo dal presupposto che l'incontro con l'antigene abbia luogo all'interno dei tessuti linfoidi secondari. Un'altra importante differenza rispetto al nostro studio è poi rappresentata dalla scelta di analizzare la risposta alla stimolazione del BCR in relazione ai livelli di espressione dell'antigene CD38 sulle cellule B leucemiche, e di ricorrere alla selezione dei linfociti B CD38<sup>+</sup> come popolazione da utilizzare negli esperimenti di stimolazione. Sebbene, infatti, la responsività agli anticorpi anti-IgM appaia correlata esclusivamente alla positività per l'antigene CD38, la selezione della popolazione leucemica impone un notevole bias, in quanto in primo luogo l'espressione del CD38 potrebbe non rappresentare un fattore invariabile nel tempo, in secondo luogo, il comportamento delle cellule CD38<sup>+</sup> potrebbe essere diverso rispetto a quello della popolazione CD19<sup>+</sup> impiegata nel nostro sistema, a causa del presumibile minor grado di differenziamento. In alternativa, la contraddizione insita nell'associazione tra un marcatore a prognosi sfavorevole e l'induzione del processo apoptotico dopo stimolazione del BCR patologico, potrebbe dipendere dall'assenza nel sistema *in vitro*, dei segnali anti-apoptotici determinati *in vivo* dal supporto dei componenti del microambiente. Nel nostro ma anche in altri lavori, nonostante il numero ridotto di casi CD38<sup>+</sup>, non è stata, infatti, rilevata

alcuna influenza della positività per tale antigene sulla capacità di segnalazione a valle del BCR dopo crosslinking delle sIgM, un dato che supporta ulteriormente la probabilità che la selezione magnetica delle cellule CD38<sup>+</sup> possa alterare la risposta alla stimolazione, che il CD38 possa intervenire solo negli eventi secondari alla stimolazione o sia semplicemente un marcatore di attivazione [93]. Nel lavoro di *Nédellec S et al.* è stata invece osservata non solo una distinzione tra i casi di LLC responsivi al crosslinking delle sIgM e quelli non responsivi, ma anche una dicotomia nella tipologia di risposta. I casi di LLC iporesponsivi agli anticorpi anti-IgM sono, come nel nostro studio, caratterizzati da una prognosi favorevole, al contrario i casi responsivi si distinguono in due classi. Alla prima classe appartengono quelli con regioni IgHV non-mutate e livelli più elevati di positività per ZAP-70 e CD38, che vanno incontro ad apoptosi dopo stimolazione; alla seconda classe quelli con prognosi intermedia, che rispondono alla stimolazione proliferando [100]. Ad ogni modo, gli autori non specificano gli effetti della stimolazione distinguendo in modo assoluto le due classi prognostiche, di conseguenza, la contemporanea presenza di casi IgHV mutati e non mutati, ZAP-70<sup>+</sup> e ZAP-70<sup>-</sup> così come CD38<sup>+</sup> e CD38<sup>-</sup> nelle due classi rispondenti, introducendo una notevole eterogeneità nella popolazione in esame, rende tali risultati meno facilmente interpretabili.

L'analisi degli effetti funzionali della stimolazione dell'isotipo recettoriale D ha invece rivelato degli aspetti inattesi. In primo luogo, diversamente da quanto osservato nel caso della stimolazione con anticorpi anti-IgM, l'impiego di anticorpi anti-IgD, a parità di concentrazione, non è risultato associato ad alcuna significativa progressione in fase G1 del ciclo cellulare, indipendentemente sia dallo stato mutazionale dei geni IgHV che dall'andamento clinico della malattia. In accordo con tali dati, tutti i campioni cellulari di LLC si sono mostrati indistintamente caratterizzati da una riduzione del tasso proliferativo piuttosto che da un aumento. L'osservazione di una diminuzione del tasso proliferativo potrebbe essere un'indicazione indiretta dell'attivazione di un pathway apoptotico indipendente dalle caspasi. Alternativamente, la modulazione di espressione del gene CHOP rilevata dall'analisi del profilo di espressione genica, potrebbe supportare l'attivazione, dopo incubazione con anticorpi anti-IgD, di una risposta allo stress cellulare (UPR) che solitamente si verifica nelle cellule B dopo la stimolazione del BCR e precedentemente al differenziamento in plasmacellule. La mancanza di espressione differenziale di altri geni implicati in questo processo potrebbe essere una conseguenza della ridondanza del pathway o della durata insufficiente della stimolazione. A sostegno della correlazione tra la riduzione del tasso proliferativo e l'attivazione del processo di morte cellulare, e in linea con l'osservazione della modulazione dei geni coinvolti nel suddetto processo emersa dall'analisi del profilo di

espressione genica, l'incubazione dei linfociti B di LLC con anticorpi anti-IgD è infatti apparsa contraddistinta dall'aumento significativo dei livelli apoptotici in tutte le sottocategorie esaminate, senza differenze in relazione alla densità superficiale delle sIgD. Quest'ultimo dato potrebbe implicare che tale isotipo recettoriale è in grado di trasdurre segnali intracellulari anche a seguito di un basso livello di crosslinking superficiale oppure che l'induzione dell'apoptosi è indipendente dei livelli di espressione delle sIgD.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno permesso in primo luogo di confermare l'esistenza di funzioni recettoriali isotipo-specifiche nei linfociti B leucemici, fornendo il presupposto per la modulazione della risposta delle cellule B di LLC, attraverso la scelta dell'isotipo recettoriale coinvolto nella trasmissione della segnalazione a valle. L'esistenza di una specializzazione funzionale dei due isotipi è stata a lungo postulata in base all'osservazione della presenza di numerose differenze molecolari e strutturali a carico delle due componenti immunoglobuliniche. Tali differenze sono emerse da una serie di studi finalizzati alla comprensione del significato, tuttora enigmatico, della loro coespressione sulla membrana delle cellule B mature. Gli isotipi immunoglobulinici M e D differiscono primariamente in relazione alla composizione delle loro regioni costanti e transmembrana e alla loro espressione differenziale durante lo sviluppo B linfoide. E' stata inoltre osservata non solo una maggiore stabilità di espressione superficiale delle sIgD rispetto alle sIgM, correlabile al suo elevato grado di glicosilazione, ma anche un ridotto tasso di endocitosi costitutiva antigene-indipendente, un processo molto efficiente nell'ambito dei meccanismi di controllo della densità di superficie delle sIgM [101]. Le IgD, a differenza delle IgM, sono scarsamente secrete in quanto presenti quasi esclusivamente sulla membrana cellulare e non appaiono inoltre interessate dal processo di downregolazione recettoriale che si verifica *in vivo* in seguito all'induzione dello stato anergico, evento che presumibilmente interessa le forme IgHV mutate di LLC. Un'altra caratteristica distintiva delle sIgD è rappresentata dalla possibilità di essere espresse attraverso una duplice modalità: quella classica, in associazione alle molecole  $Ig\alpha/Ig\beta$ , e quella alternativa, in associazione ai lipidi di membrana attraverso la mediazione del glicositolo, correlata alla peculiare induzione della cascata dell'AMP ciclico [102]. Oltre alla presenza di diversità strutturali, la differenza nei livelli di crosslinking, l'identificazione di proteine intracellulari specificamente associate all'uno o all'altro isotipo e la trasmissione di segnali a valle differenti in termini di cinetica e intensità hanno ulteriormente incentivato la tesi di un loro ruolo differenziale nella trasduzione dei segnali intracellulari. In particolare è stato osservato che la fosforilazione indotta dopo stimolazione dell'isotipo M è caratterizzata da un picco a 1 min con riduzione già a 60 min, mentre quella

indotta dalla stimolazione dell'isotipo D cresce più lentamente e si mantiene per un tempo superiore ai 240 min, un dato indicativo dell'assenza in quest'ultimo caso di un controllo di feedback negativo che potrebbe consentire la persistenza degli eventi di fosforilazione intracellulari [103]. Ad ogni modo, sebbene i segnali trasmessi dai due isotipi differiscano, la mancanza di un isotipo sembra essere compensata dalla presenza dell'altro e viceversa, come dimostrato dal fenotipo mite di topi deficitari di sIgM o sIgD [101]. Questo dato potrebbe mostrare una capacità di compensazione funzionale delle sIgM e sIgD, evidenziabile solo in specifiche condizioni. Sulla base delle suddette osservazioni, la presenza di una risposta alla stimolazione delle sIgD differenziale rispetto a quella delle sIgM, e l'uniformità di tale risposta, osservata nel nostro studio in tutte le sottocategorie prognostiche esaminate, potrebbe dipendere in primo luogo dalle caratteristiche intrinseche dell'isotipo recettoriale in esame. A causa della parzialità delle conoscenze relative al ruolo delle sIgD nella fisiologia dei linfociti B, sia normali che patologici, la maggior parte degli studi *in vitro* relativi agli effetti della stimolazione del BCR sulle cellule B di LLC si sono concentrati sull'isotipo recettoriale M, rendendo le conoscenze relative al ruolo delle sIgD piuttosto limitate. Ad ogni modo, i risultati riportati in letteratura, sebbene esigui, appaiono, anche relativamente agli effetti della stimolazione dell'isotipo D del BCR, contraddittori. In linea con la competenza di segnalazione e quindi la responsività indistinta dei campioni di LLC in relazione ai fattori prognostici osservata nel nostro studio, un recente lavoro ha evidenziato l'associazione tra la segnalazione attraverso le sIgD e la presenza di una risposta universalmente positiva, in termini di incremento intracellulare di  $Ca^{2+}$ , nei casi di LLC IgHV mutati e non [93]. Queste osservazioni hanno permesso di supporre che l'isotipo D non sia anergizzato da meccanismi operanti *in vivo*, e che l'anergia possa rivelarsi isotipo-dipendente nel caso della LLC. Evidenze non solo dell'esistenza di segnali isotipo-specifici ma anche del ruolo pro-apoptotico delle sIgD derivano anche da una serie di studi effettuati su cellule spleniche murine. In tali cellule, l'incubazione con anticorpi anti-IgD sia mono- che poli-clonali risulta infatti nell'accelerazione del processo apoptotico in misura più efficace che in presenza di anticorpi anti-IgM, a meno che non si ricorra all'incubazione con IL-4 o un agonista del CD40L, utili a fornire il secondo segnale per l'attivazione B linfoide. E' interessante sottolineare che questo effetto è più evidente nel range di concentrazioni tra 0.1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , dal momento che 10  $\mu\text{g/ml}$  è la concentrazione anticorpale impiegata nel nostro studio. Allo stesso tempo, le sIgD possono causare l'entrata delle cellule B spleniche murine in fase G1 del ciclo cellulare. Questo però si verifica solo se gli anticorpi anti-IgD sono impiegati in soluzione e a concentrazioni superiori a 10  $\mu\text{g/ml}$ , di conseguenza la scelta di utilizzare

anticorpi immobilizzati a concentrazioni pari a 10 µg/ml potrebbe aver impedito l'osservazione, nei nostri esperimenti, dell'attività pro-sopravvivenza delle sIgD [104-105].

Il concetto che le sIgD trasducano segnali apoptotici è al tempo stesso contrario a gran parte dei dati riportati in letteratura. E' noto che l'espressione delle sIgD compare solo quando i linfociti B sono maturi da migrare in periferia. L'osservazione che la co-espressione sIgM/sIgD su tali linfociti si associa, in presenza degli opportuni segnali antigenici, all'attivazione cellulare mentre la mancanza delle sIgD sui linfociti B neonatali causa l'induzione della tolleranza in risposta agli stessi stimoli antigenici, ha condotto a ipotizzare il ruolo negativo delle sIgD nel controllo del suddetto processo. In realtà l'attivazione precoce dell'apoptosi in condizioni di limitato crosslinking, osservata nei modelli murini di cui sopra, favorisce la tesi di un ruolo positivo di tale isotipo recettoriale nella tolleranza immunologica. Probabilmente, quando la concentrazione dell'antigene è elevata, come accade nei follicoli linfoidi, i linfociti dipendono in misura minore dai segnali costimolatori, e possono entrare in ciclo anche solo a seguito della stimolazione recettoriale. Al contrario, lontano dai follicoli linfoidi, quando la concentrazione antigenica è bassa, le cellule B si attivano o vanno incontro all'apoptosi a seconda che il secondo segnale sia o meno presente. Di conseguenza l'effetto apoptotico della stimolazione dell'isotipo D del BCR patologico osservata nei nostri esperimenti, potrebbe semplicemente riprodurre quanto accade *in vivo* in assenza di costimolazione, probabilmente a causa di un crosslinking sub-ottimale per l'induzione dell'attivazione; in alternativa, potrebbe derivare dalla presenza di alterazioni della segnalazione prossimale a valle delle sIgD, peculiari delle cellule B di LLC.

Più recentemente, l'effetto pro-sopravvivenza delle sIgD è stato in realtà osservato anche in cellule di LLC CD38<sup>+</sup> ed è risultato caratterizzato dall'induzione di un aumento del flusso di Ca<sup>2+</sup> e della fosforilazione intracellulare simile, in termini di cinetica e intensità, a quello che si verifica nel caso della stimolazione dell'isotipo M. In realtà, la discrepanza tra il nostro e il suddetto studio, potrebbe essere solo apparente, in quanto l'incremento della sopravvivenza è risultato rilevabile nello studio di *Zupo S et al.* solo al 4°-5° giorno di coltura, diventando 2 volte superiore al controllo non stimolato al 10° giorno. Nel nostro caso, invece, l'analisi degli effetti funzionali della stimolazione con anticorpi anti-IgD è stata effettuata entro le 48 h di stimolazione, di conseguenza la scelta di tempi più precoci potrebbe aver impedito l'identificazione di un programma di sopravvivenza con attivazione più tardiva. Questo dato è, infatti, supportato dal cambiamento nella tipologia e nella modalità di regolazione, da negativa a positiva, dei geni differenzialmente espressi a 48 h in risposta allo stimolo recettoriale. Potrebbe quindi essere opportuno prolungare il tempo della stimolazione con

anticorpi anti-IgD, per verificarne gli effetti funzionali a tempi di esposizione più lunghi. Sempre nello stesso studio, gli autori evidenziano inoltre la capacità delle sIgD di trasdurre stimoli di natura differenziativa. Questo risultato non è in realtà una conseguenza genuina degli effetti della stimolazione *in vitro* in quanto è indotto dall'aggiunta di IL-2 ricombinante e non è infatti rilevabile in presenza esclusiva di anticorpi anti-IgD. In linea, infatti, con i nostri risultati, l'isotipo D non è in grado di indurre il differenziamento dei linfociti B leucemici in plasmacellule, come evidente dall'assenza di variazioni nelle caratteristiche di SSC e FSC della popolazione in esame e dalla persistenza di elevati livelli di CD19 (dati non mostrati). Risultati più eterogenei in merito all'analisi degli effetti della stimolazione delle sIgD sono stati invece osservati nello studio di una popolazione multicentrica di pazienti affetti da LLC [106]. In tal caso, le cellule B leucemiche sono risultate distinte in 3 gruppi in relazione alla tipologia di risposta dopo stimolazione, rappresentata da inibizione, induzione o mancata influenza sul processo apoptotico. Dall'analisi dei casi rispondenti è emerso un ridotto tempo al trattamento dei pazienti interessati, che ha condotto gli autori a postulare l'importanza della responsività alle sIgD, indipendentemente dal tipo di risposta, nella prognosi della LLC. Nel lavoro però non si fa riferimento ai parametri prognostici presi in considerazione nel nostro studio, quali lo stato mutazionale e l'andamento clinico della malattia; inoltre la scelta arbitraria di un cut-off di riduzione o incremento dei livelli apoptotici del 20% potrebbe aver condotto a un'esasperazione dei dati ottenuti e, allo stesso tempo, alla perdita di informazioni presumibilmente importanti correlate ai campioni cellulari con valori di variazione dei livelli apoptotici più deboli.

Un dato interessante emerge dal nostro studio integrando le differenze di comportamento delle cellule B di LLC, distinte in relazione ai fattori prognostici, in rapporto agli effetti della stimolazione delle sIgM o sIgD. Le cellule di LLC stabile e/o IgHV mutate manifestano, infatti, un comportamento univoco nei confronti della stimolazione recettoriale. Vanno, infatti, incontro ad apoptosi sia in presenza di anticorpi anti-IgM che anti-IgD evidenziando non solo una probabile indipendenza dalla tipologia isotipica ma anche una risposta peculiare di cellule tollerogeniche, un dato indicativo di una stimolazione antigenica cronica *in vivo*. Al contrario, le cellule di LLC progressiva e/o IgHV non mutate sono caratterizzate da una risposta differenziale in relazione all'isotipo considerato, traducibile nella proliferazione o nell'apoptosi. Questo dato implica una dipendenza comportamentale di tali cellule dall'isotipo stimolato ed evidenzia l'esistenza di un probabile stato maturativo e d'attivazione differente rispetto alle forme di LLC a prognosi favorevole, che ne preserva la capacità di risposta differenziale alla stimolazione, indispensabile, soprattutto considerando l'integrità dei segnali

proliferativi, alla progressione di malattia. Infatti, molto probabilmente *in vivo* è l'integrazione tra gli effetti specifici di ciascun isotipo, mediati dall'(auto)antigene, a determinare il comportamento tumorale. Di conseguenza sarebbe di grande interesse verificare, attraverso l'impiego del nostro sistema sperimentale, gli effetti *in vitro* della co-incubazione delle cellule B di LLC con anticorpi anti-IgM e anti-IgD.

Partendo dal presupposto che la funzionalità del BCR implica dei cambiamenti nella struttura citoscheletrica intracellulare è stata inclusa, nell'ultima parte del nostro studio, la valutazione dell'espressione e della distribuzione intracitoplasmatica dell'actina in forma polimerizzata (F-actina) a 24 e 48 h di stimolazione con anticorpi anti-IgM e anti-IgD. Nel caso della stimolazione dell'isotipo recettoriale M, l'analisi eseguita mediante citometria a flusso, ha rivelato un incremento tardivo nei livelli d'espressione della proteina in questione, esclusivamente nei campioni di LLC progressiva IgHV non mutata, un dato confermato anche dalla visualizzazione al microscopio a fluorescenza di una riorganizzazione della proteina all'interno del citoscheletro, con formazione di aree più dense di polarizzazione alla periferia cellulare. Quest'osservazione è risultata in accordo con quanto suggerito dall'analisi del profilo di espressione genica in termini di deregolazione dei geni coinvolti nel controllo della motilità cellulare (ALPHA1, H2-ALPHA e PSMA7) e nell'organizzazione dei filamenti dell'actina citoscheletrica (ACTG1 e ACTB), all'interno dei campioni a prognosi infausta, dopo stimolazione con anticorpi anti-IgM. Questi risultati implicano che il BCR possa modulare il comportamento delle cellule B leucemiche non solo in termini di sopravvivenza o apoptosi, ma anche di traffico e homing negli organi linfoidi secondari, partecipando nella formazione e nel mantenimento dell'architettura del microambiente tissutale tumorale. Diventa quindi di grande interesse valutare se i cambiamenti nell'espressione dell'actina e nella riorganizzazione del citoscheletro osservati dopo stimolazione nei campioni di LLC a prognosi sfavorevole possano tradursi in un maggiore grado di invasività tissutale e quindi aggressività della malattia. E' stato, infatti, dimostrato che la capacità di rispondere alla chemochina SDF1 $\alpha$  secreta dalle cellule stromali midollari da parte delle cellule B leucemiche ZAP-70<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>, correla con un incremento delle potenzialità migratorie, e quindi un comportamento neoplastico più aggressivo e una prognosi infausta [107-108]. In questo contesto risultati paragonabili a quelli del nostro studio sono stati ottenuti in due recenti lavori in cui la stimolazione delle cellule B di LLC con anticorpi anti-IgM si associa, preferenzialmente nei casi IgHV non mutati, ZAP-70<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup>, non solo alla trasduzione di segnali pro-sopravvivenza ma anche alla secrezione delle chemochine chemotattiche CCL3 e CCL4, implicate nella localizzazione delle cellule B a livello dei pseudofollicoli, e alla

modulazione dell'espressione dei recettori per chemochine e delle molecole di adesione implicate nel traffico delle cellule B nel midollo osseo e all'interno dei tessuti linfatici [109-110]. Nessuna modulazione quantitativa o qualitativa dell'actina citoscheletrica è stata invece osservata in alcuna delle sottocategorie di LLC dopo stimolazione dell'isotipo recettoriale D. Anche in questo caso i risultati hanno confermato quanto atteso dallo studio del profilo di espressione genica pre- e post-stimolazione, scarsamente rappresentato dalla modulazione di geni coinvolti nel riarrangiamento del citoscheletro intracellulare. Non vi sono dati in letteratura relativi al possibile coinvolgimento delle sIgD nella modulazione dell'actina citoscheletrica, ad ogni modo, il numero dei campioni di LLC valutati nel nostro studio, in citometria a flusso e microscopia confocale, è piuttosto limitato, per cui i risultati ottenuti sono da considerarsi preliminari. Per approfondire il ruolo della stimolazione dell'isotipo recettoriale D nella riorganizzazione citoscheletrica, sarebbe opportuno aumentare la casistica ed eseguire la stimolazione a intervalli di tempo più precoci e tardivi rispetto alle 24 e 48 h. L'impiego del nostro sistema sperimentale ci ha quindi permesso di ottenere interessanti informazioni sulle peculiarità biologiche comportamentali delle cellule B leucemiche, rivelando non solo la presenza di funzioni recettoriali isotipo-specifiche nelle cellule B di LLC ma anche una diversità, negli effetti della stimolazione attraverso il BCR, in relazione alle caratteristiche prognostiche dei campioni leucemici, avvalorando l'ipotesi del contributo dell'antigene nella storia naturale della malattia. Sebbene nel nostro studio le cellule B leucemiche siano invariabilmente destinate all'apoptosi in seguito alla stimolazione delle sIgD, mostrando invece un comportamento duplice, a seconda delle caratteristiche prognostiche, in seguito alla stimolazione delle sIgM, questo potrebbe non essere necessariamente vero *in vivo* dopo interazione con il putativo antigene. In tali condizioni la quota relativa dei due isotipi, la loro capacità di legame antigenico e di modulazione dell'attività dei linfociti T potrebbero avere un ruolo nel determinare il risultato della risposta. Sulla base di tali premesse, un affascinante quesito è rappresentato dalla comprensione delle basi molecolari della modalità di trasmissione e degli effetti della stimolazione degli isotipi recettoriali M e D e delle loro correlazioni con i diversi fattori prognostici della LLC. Queste informazioni potrebbero rivelarsi utili al fine di identificare nuovi target terapeutici per la cura della LLC e disegnare nuovi farmaci, quali agonisti o antagonisti del BCR, da adottare nel trattamento della leucemia per l'innalzamento del tasso di remissioni complete e quindi dell'aspettativa di sopravvivenza.



## 5. REFERENZE

1. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia. *Anticancer Res* 2009; 29:605-615
2. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:399-413
3. Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Ann Oncol* 2008; 19:320-325
4. Eichhorst B, Hallek M. Revision of the guidelines for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:469-477
5. Mauro FR, Giammartini E, Gentile M, Sperduti I, Valle V, Pizzuti A, Guarini A, Giannarelli D, Foà R. Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91:1117-1120
6. Caligaris-Cappio F. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4:5-21
7. Foà R, Hoffbrand AV. Biology of chronic lymphocytic leucemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4:1-100
8. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4:22-47
9. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8:1640-1645
10. Zomas AP, Matutes E, Morilla R. Expression of the immunoglobulin associated protein B29 in B-cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Leukemia* 1996; 10:1966-1970
11. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavoraro S, Castellano L, Magrelli A, Citarella F, Messina M, Maggio R, Peragine N, Santangelo S, Mauro FR, Landgraf P, Tuschl T, Weir DB, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Guarini A, Foà R, Macino G. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109:4944-4951
12. 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

13. Kharfan-Dabaja MA, Chavez JC, Khorfan KA, Pinilla-Ibarz J. Clinical and therapeutic implications of the mutational status of IgVH in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008; 113:897-906
14. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated immunoglobulin V<sub>H</sub> genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1848-1854
15. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 24:804-815
16. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propris MS, Mancini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003; 102:1035-1041
17. Hallek M; German CLL Study Group. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2008; 19:51-53
18. 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; 98:181-186
19. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:2633-2639
20. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev* 2009; 228:41-57
21. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 10:105-111
22. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, Citarella F, Ricciardi MR, Santangelo S, Marinelli M, De Propris MS, Messina M, Mauro FR, Del Giudice I, Foà R. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2008; 112:782-792
23. Del Giudice I, Chiaretti S, Tavolaro S, De Propris MS, Maggio R, Mancini F, Peragine N, Santangelo S, Marinelli M, Mauro FR, Guarini A, Foà R. Spontaneous regression of

chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases. *Blood* 2009; 114:638-646

24. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, De Propris MS, Giammartini E, Mancini F, Milani ML, Guarini A, Foà R. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol* 2005; 130:549-557

25. 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

26. 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; 35:893-901

27. Hallek M. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): first-line treatment. *Haematology* 2005; 285-291

28. Montserrat E. CLL therapy: progress at last! *Blood* 2005; 105:2-3

29. Matsuchi L, Gold MR. New views of BCR structure and organization. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:270-277

30. Zarrin AA, Tian M, Wang J. Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:2466-2470

31. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; 105:3042-3050

32. Zhang M, Srivastava G, Lu L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 2004; 1:89-94

33. Mårtensson I, Keenan R., Licence S. The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:137-142

34. Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99:13014-13019

35. Melchers F, ten Boekel E, Rollink AG. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* 2000; 175:33-46

36. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol* 2003; 21:841-894
37. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev* 2007; 7:102-108
38. Tobin G, Rosén A, Rosenquist R. What is the current evidence for antigen involvement in the development of chronic lymphocytic leukemia? *Hematol Oncol* 2006; 24:7-13
39. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102:1515-1525
40. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104:2879-2885
41. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, Merup M, Juliusson G, Vilpo J, Enblad G, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; 101:4952-4957
42. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 2000; 13:37-45
43. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; 200:519-525
44. Rosenquist R, Lindström A, Holmberg D, Lindh J, Roos G. V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur J Haematol* 1999; 62:123-128
45. 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
46. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Béral H, Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; 109:259-270

47. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008; 264:549-562
48. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; 113:1008-1016
49. Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K, Stavroyianni N, Athanasiadou A, Tsompanakou A, Papadaki T, Kokkini G, Paterakis G, Saloum R, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Fassas A. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia *Blood* 2005; 106:3575-3583
50. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, Tsaftaris A, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Davi F, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K, Belessi C. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113:403-411
51. Lankester AC, van Schijndel GMW, van der Schoot CE, van Oers MHJ, van Noesel CJM, van Lier RAW. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1995; 86:1090-1097
52. Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Haematology* 2005; 278-284
53. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, Minuzzo S, Vallario A, Zamarchi R, Fregonese A, Calderazzo F, Faldella A, Aragno M, Camaschella C, Amadori A, Caligaris-Cappio F. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:2327-2335
54. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 11:4087-4093
55. Hashimoto S, Chiorazzi N, Gregersen P. Alternative splicing of CD79a and CD79b RNA transcripts in human B cells. *Mol Immunol* 1995; 32:651-659
56. Monroe JG, Havran WL, Cambier JC. B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD but not IgM. *Eur J Immunol* 1983; 13:208-213
57. Ternynck T, Dighiero G, Follezou J, Binet JL. Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies, I: detection and quantitation of light chain determinants. *Blood* 1974; 43:789-795

58. Dorken B, Moldenhauer G, Pezzutto A. HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4470-4479
59. Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:301-304
60. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99:4087-4093
61. Schuh K, Avots A, Tony HP, Serfling E, Kneitz C. Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk Lymphoma* 1996; 23:583-592
62. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 1997; 100:3140-3148
63. Chiorazzi N, Ferrarini M. Evolving view of the in-vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cell. *Haematology* 2006; 273-278
64. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105:4807-4812
65. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Ferrarini M, Kipps TJ. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Haematology* 2003; 153-175
66. Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, Gómez ME, Díaz R, Pollán M, Hernández N, de la Cueva P, Marín MC, Swat A, Ruix E, Cuadrado MA, Conde E, Lombardía L, Cifuentes F, Gonzalez M, García-Marco JA, Piris MA. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukaemia is dependent on BCR signalling: clinical correlation. *Leukemia* 2007; 21:1-8
67. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2007; 7:127-131
68. Besmer E, Gourzi P, Papavasiliou FN. The regulation of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:241-245
69. Dighiero G. Natural autoantibodies, tolerance, and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1997; 815:182-192

70. Landgren O, Engels EA, Caporaso NE, Gridley G, Mellekjær L, Hemminki K. Patterns of autoimmunity and subsequent chronic lymphocytic leukemia in Nordic countries. *Blood* 2006; 108:292-296
71. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG, Hamon MD, Oscier DG, Hamblin TJ. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 91:341-344
72. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, Chiorazzi N, Meffre E. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005; 115:1636-1643
73. Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 2008; 111:3838-3848
74. Landgren O, Engels EA, Caporaso NE, Gridley G, Mellekjær L, Hemminki K. Patterns of autoimmunity and subsequent chronic lymphocytic leukemia in Nordic countries. *Blood* 2006; 108:292-296
75. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103:4389-4395
76. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-815
77. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:415-424
78. Semichon M, Merle-Beral H, Lang V, Bismuth G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia* 1997; 11:1921-1928
79. Michel F, Merle-Beral H, Legac E, Michel A, Debré P, Bismuth G. Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. *J Immunol* 1993; 150:3624-3633
80. Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, Dono M, Cosulich E, Ferrarini M. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to antiIgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 1996; 88:1365-1374

81. Zupo S, Massara R, Dono M, Rossi E, Malavasi F, Cosulich ME, Ferrarini M. Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* 2000; 95:1199-1206
82. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Blood* 2005; 105:4820-4827
83. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, Sanhes L, Nataf J, Roger C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F. Ajchenbaum-Cymbalista F. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006; 15:7158-7166
84. 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
85. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:4609-4614
86. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 105:2036-2041
87. 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
88. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, Sherrington P, Matrai Z, Slupsky JR, Cawley J, Zuzel M. B cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2005; 65:7328-7377
89. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, Caligaris-Cappio F, Ghia P. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008; 112:188-195
90. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:251-262
91. Ricciardi MR, Petrucci MT, Gregorj C, Ariola C, Lemoli RM, Fogli M, Mauro FR, Cerretti R, Foà R, Mandelli F, Tafuri A. Reduced susceptibility to apoptosis correlates with



kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113:391-399

92. Vallat LD, Park Y, Li C, Gribben JG. Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 2007; 109:3989-3997

93. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, Louise AL, Packham G, Stevenson FK. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 2007; 109:4424-4431

94. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2006; 21:110-120

95. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, Sanhes L, Nataf J, Roger C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F. Survival response to B-cell receptor ligation restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of ZAP-70 expression. *Cancer Res* 2006; 66:7158-7166

96. Tavolaro S, Chiaretti S, Messina M, Peragine N, Del Giudice I, Marinelli M, Santangelo S, Mauro FR, Guarini A, Foà R. Gene expression profile of protein kinases reveals a distinctive signature in chronic lymphocytic leukemia and in vitro experiments support a role of second generation protein kinase inhibitors. *Leuk Res* 2010; 34:733-741.

97. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou H, Schattner EJ. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001; 98:3050-3057

98. Allsup DJ, Kamiguti AS, Sherrington PD, Matrai Z, Slupsky JR, Cawley JC, Zuzel M. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signalling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphoid leukemia. *Canc Res* 2005; 65:7328-7337

99. McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, Jondal M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 146:1072-1076

100. Nédellec S, Renaudineau Y, Bordron A, Berthou C, Porakishvili N, Lydyard PM, Pers J, Youinou P. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005; 174:3749-3756

101. Geisberger R, Lamers M, Achatz G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 2006; 118:429-437
102. Geisberger R, Königsberger S, Achatz G. Membrane IgM influences membrane IgD mediated antigen internalization in the B cell line Bcl1. *Immunol Lett* 2006; 102:169-176
103. Kim KM, Reth M. Signaling difference between class IgM and IgD antigen receptors. *Ann NY Acad Sci* 1995; 766:81-88
104. Peckham D, Andersen-Nissen E, Finkelman FD, Stunz LL, Ashman RF. Difference in apoptosis induction between surface IgD and IgM. *Int Immunol* 2001; 13:285-295
105. Sieckmann DG, Finkelman FD, Scher I. IgD as a receptor in signaling the proliferation of mouse B-lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1982; 399:277-289
106. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, Fabbi M, Matis S, Colombo M, Reverberi D, Megna M, Spriano M, Callea V, Vigna E, Rossi E, Lucia E, Festini G, Zupo S, Molica S, Neri A, Ferrarini M. Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL. *Br J Haematol* 2010; 149:160-163
107. Batista DF, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Immunol* 2009; 9:15-27
108. Niiro H, Clark EA. Regulation of B cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Immunol* 2002; 2:945-956
109. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, Rosenwald A. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009; 113:3050-3058
110. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F, Ledoux D. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* 2009; 69:6387-6395

## **PARTE II**

*Studio della funzionalità della proteina p53 in  
campioni primari di cellule neoplastiche di pazienti  
affetti da Leucemia Linfatica Cronica (LLC) a  
differente stadio di malattia*

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La proteina p53

### 1.1.1 Cenni introduttivi

Le cellule sono continuamente soggette a condizioni e stimoli esterni, inclusi il metabolismo ossidativo e l'esposizione a radiazioni, che risultano nello stress genotossico. Di conseguenza, la capacità di rilevare e riparare un conseguente danno a carico del DNA rappresenta una funzione critica per le cellule normali. L'osservazione secondo cui l'inefficiente riparazione del danno al DNA cellulare possa condurre alla trasformazione neoplastica, ha consentito l'identificazione delle basi funzionali della soppressione tumorale nel riparo o nell'eliminazione delle cellule danneggiate e quindi potenzialmente deleterie. In tale ambito, un ruolo di primaria importanza riveste la proteina ad attività oncossoppressoria p53. Tale proteina fu identificata per la prima volta nel 1979 all'interno di cellule infettate dal virus SV40 (simian virus 40) come una fosfoproteina che co-immunoprecipitava con l'antigene "large T". Poiché sembrava non condividere determinanti antigenici con l'antigene "large T" di SV40 e dal momento che venne in seguito dimostrata la sua iperespressione anche in cellule di carcinoma embrionale murino non infettate da SV40, si concluse che la proteina p53 fosse codificata da un gene cellulare e non da un gene virale [1]. La successiva dimostrazione che la sequenza aminoacidica di tale proteina risultasse altamente conservata nelle diverse specie di vertebrati, fece quindi supporre un suo ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi tissutale e della fisiologia cellulare.

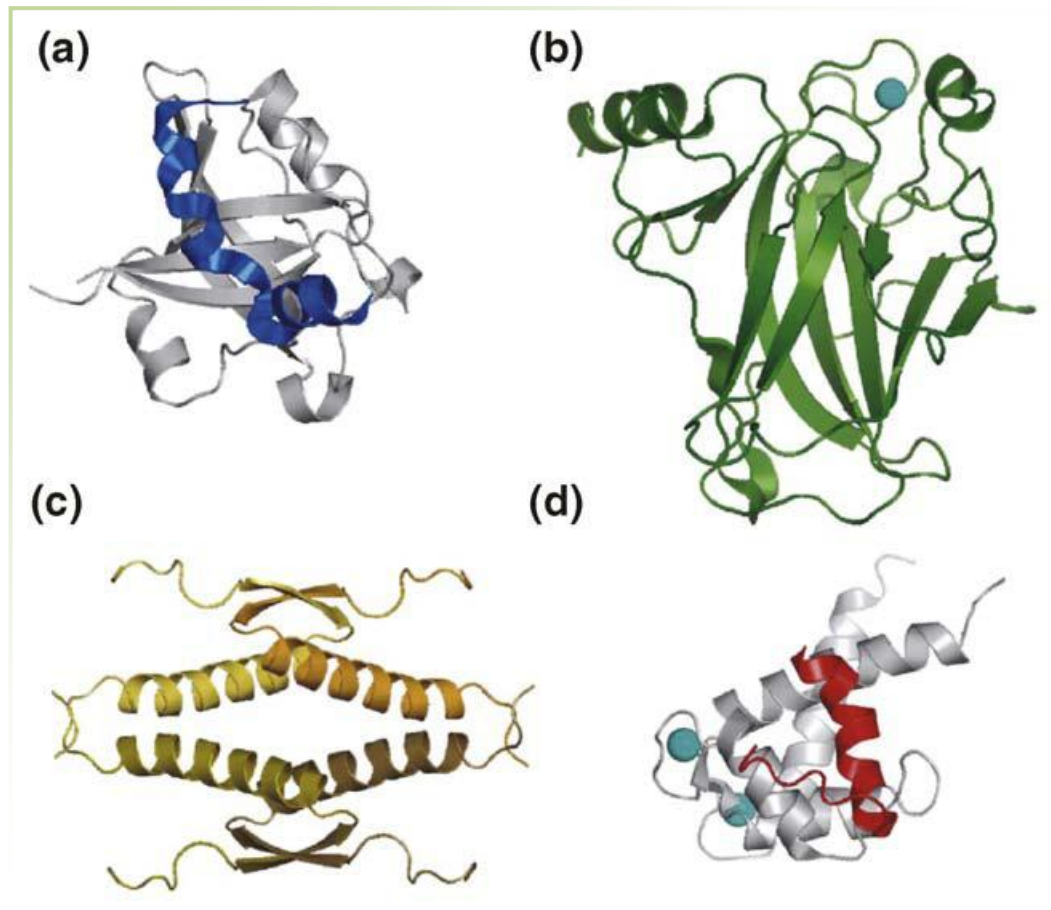
I primi studi condussero a definire erroneamente la proteina p53 come il prodotto di un oncogene. Tale proteina risultava, infatti, presente a basse concentrazioni all'interno delle cellule normali, mentre la sua concentrazione appariva significativamente più elevata nelle linee cellulari tumorali coltivate *in vitro* e nei tessuti tumorali *in vivo*. La base molecolare di questo aumento dei livelli di p53 nelle cellule tumorali era in realtà da attribuire probabilmente ad un fenomeno di stabilizzazione post-trascrizionale, dovuta a cambiamenti nell'ambiente cellulare, o alla formazione di complessi con altre proteine sia cellulari che virali. Il risultato era, in ogni caso, un aumento del tempo di emivita di p53, con conseguente accumulo della proteina stessa e, dunque, aumento della sua concentrazione [2]. L'osservazione che le cellule trasformate potessero contenere una quantità maggiore della proteina p53 rispetto alle corrispondenti cellule normali fece pensare che potesse giocare un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare e che l'aumentata espressione di p53 portasse ad un aumento della proliferazione cellulare. Osservazioni successive relative alla

capacità del prodotto del gene *TP53* di cooperare con l'oncogene *Ras* nella trasformazione dei fibroblasti di embrione di ratto, continuarono a sostenere l'ipotesi che p53 fosse un oncogene dominante e che contribuisse, quindi, alla tumorigenesi, fornendo uno stimolo per la crescita cellulare quando iperespresso [3]. Solo nel 1989 *Hinds PW et al.* dimostrarono che in realtà molti degli studi in cui il gene *TP53* era stato cotrasfettato con il gene *Ras* erano stati realizzati utilizzando la forma mutata del gene *TP53*. Quando questi esperimenti di cotrasfezione furono ripetuti con il cDNA del gene *TP53* "wild type" (non mutato), non si verificò la trasformazione dei fibroblasti. Questi risultati permisero di stabilire, quindi, la vera natura di *TP53*, un gene oncosoppressore che normalmente inibisce la crescita cellulare. In realtà, alcune mutazioni che colpiscono questo gene possono, in taluni casi, dare origine a proteine p53 mutanti che non solo perdono la loro normale funzione di inibizione sulla proliferazione cellulare, ma che acquistano anche una nuova attività di tipo oncogenico, ossia stimolatoria nei confronti della crescita della cellula [4]. Questa particolare caratteristica di alcuni mutanti del gene *TP53* ha reso più difficoltosa e più confusa la sua classificazione come gene oncosoppressore.

### 1.1.2 Struttura della proteina p53

La proteina umana p53 è codificata dal gene oncosoppressore *TP53*, localizzato sul cromosoma 17p13.1. Questo gene è composto da undici esoni (il primo dei quali non codificante), per una lunghezza complessiva di circa 20 Kb [5]. Il gene *TP53* è espresso praticamente in tutti i tessuti ed è altamente conservato in tutte le specie di vertebrati. Il prodotto proteico del gene *TP53* è una fosfoproteina nucleare composta da 393 aminoacidi (Peso Molecolare: 53 KDa), primariamente coinvolta nella regolazione della risposta cellulare allo stress genotossico, attraverso il controllo del ciclo cellulare, della riparazione del DNA, dell'apoptosi e della senescenza. L'attività multifunzionale della proteina p53 è insita nella intrinseca flessibilità della sua organizzazione quaternaria, resa possibile grazie alle peculiari caratteristiche dei suoi domini. Gli studi di cristallografia e spettroscopia NMR hanno permesso di isolare e caratterizzare tali domini distinguendoli in: una regione N-terminale detta di transattivazione (TAD, transactivation domain; residui 1-98), una regione ad alta affinità di legame per il DNA (DBD, DNA-binding domain; residui 98-303), una regione di localizzazione nucleare (residui 303-323), una regione di oligomerizzazione (residui 323-363) e una regione C-terminale (CTD, C-terminal domain; residui 363-393) [6-7]. La regione N-terminale consiste di due sub-domini di attivazione trascrizionale contigui (TADI e TADII) e una regione ricca in residui di prolina (PRD, prolin-rich-domain) [Figura 1a]. L'attività

trascrizionale di p53 è modulata grazie al legame delle molecole target a livello della regione TAD. L'analisi dei frammenti N-terminali di p53 complessati con altre proteine rivela la formazione di  $\alpha$ -eliche, mentre studi su frammenti isolati non rivelano alcuna struttura terziaria definita [8]. Il dominio centrale (core domain; residui 102-292) all'interno del DBD, implicato nel legame con il DNA, è stato studiato tramite cristallografia a raggi X e la sua struttura è stata risolta sia in forma isolata, che complessata con DNA e altre proteine. Questi studi strutturali hanno dimostrato che il dominio si organizza in un  $\beta$ -sandwich antiparallelo che coordina 2 loop che a loro volta prendono contatto con il DNA. Questi loop sono stabilizzati dallo ione zinco, a formare un motivo "loop-sheet-helix" [Figura 1b] [9]. Mutazioni all'interno del dominio di legame al DNA hanno effetti deleteri sull'attività di p53, comportando la perdita della sua attività trascrizionale e/o alterando l'organizzazione strutturale di tale dominio. Il dominio di oligomerizzazione media la formazione di complessi omotetramericici della proteina p53, evento indispensabile per il corretto funzionamento della stessa. Tale dominio forma un tetrametro simmetrico di 20 kDa con una topologia costituita da un dimero di dimeri [Figura 1c]. Ognuno dei due dimeri principali è costituito da due eliche antiparallele collegate ad un  $\beta$ -foglietto antiparallelo. Un  $\beta$ -foglietto e un'elica sono forniti da ogni monomero. L'interfaccia tra i due dimeri che formano il tetrametro è mediata solamente dai contatti elica-elica. Il risultato finale è un insieme di quattro eliche simmetriche, con le eliche adiacenti orientate in senso antiparallelo le une con le altre e con i due  $\beta$ -foglietti antiparalleli collocati sulla faccia opposta della molecola [10]. Indicazioni relative all'importanza del processo di oligomerizzazione per l'esplicazione dell'attività oncosoppressoria di p53, derivano principalmente dallo studio dei siti di legame della proteina al DNA cellulare. La caratterizzazione di tali siti all'interno del genoma, ha evidenziato come ognuno di essi contenga due copie del decanucleotide 5'Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' separate da 0-13 coppie di basi con sequenza casuale. I siti che legano p53 hanno, quindi, un'ovvia simmetria (quattro copie dell'emisito 5'-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' sono orientate, a due a due, in direzione opposta a formare una struttura palindromica) [11]. Ciò suggerisce come la proteina p53 possa legarsi a questi siti sotto forma di tetramero; risultato, questo, confermato anche da studi biofisici che indicano che la proteina p53 in soluzione è tetrameric. Diversamente da altri fattori di trascrizione, p53 possiede, inoltre, un secondo dominio di legame al DNA che mappa nella regione C-terminale, caratterizzata prevalentemente da  $\alpha$ -eliche [Figura 1d].



*AL Okorokov. Curr Opin Struct Biol 19, 2009*

**Figura 1. Struttura dei domini della proteina p53.** (a) Dominio N-terminale di transattivazione (TAD, transactivation domain; residui 1-98); (b) Dominio centrale localizzato all'interno del DBD (core domain; residui 102-292); (c) Dominio di oligomerizzazione (residui 323-363); (d) Dominio C-terminale (CTD, C-terminal domain; residui 363-393).

Tale dominio conferisce alla proteina p53 la capacità di formare complessi con sequenze non specifiche di DNA, stabilizzando probabilmente l'interazione del dominio centrale della proteina con il DNA stesso e modulandone l'attività di fattore trascrizionale.

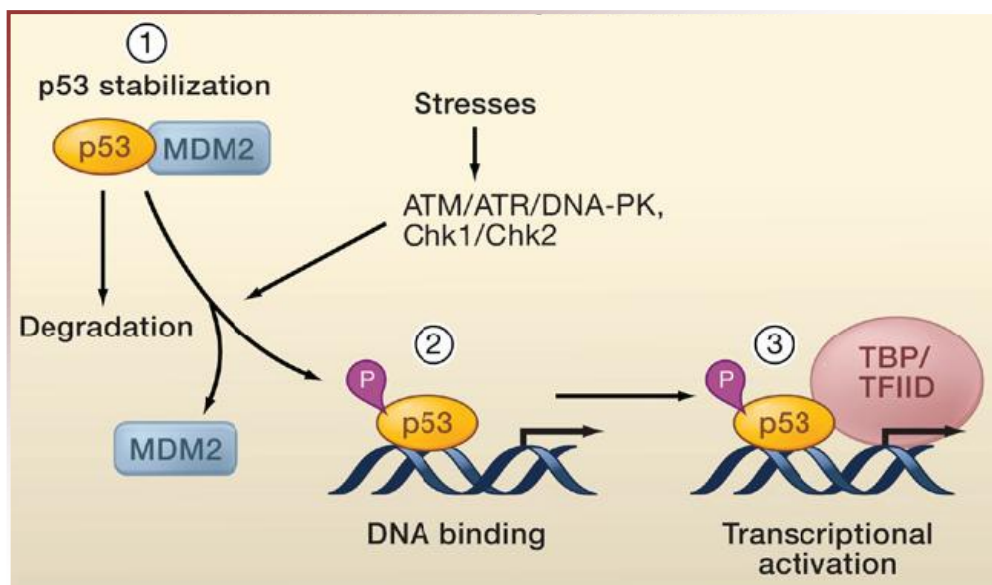
La conformazione della proteina p53 è strettamente correlata alla sua funzione: un'alterazione di tale conformazione a causa, ad esempio, di eventi mutageni, può infatti comportare uno switch nella funzione di p53 da repressore della crescita cellulare a promotore della duplicazione cellulare. La struttura terziaria della proteina p53 sembra essere stabilizzata dalla chelazione di residui conservati di cisteina con ioni metallici, probabilmente con ioni zinco [12]. Due probabili regioni di legame per lo ione zinco (Cys135-X5-Cys141-X34-Cys176-X2-His179 e Cys238-X3-Cys242-X32-Cys275-X1-Cys277), identificate nella proteina p53,

potrebbero formare un ponte tra i diversi domini e questo spiegherebbe come mutazioni lontane anche più di 150 aminoacidi risultino avere un effetto simile sulla struttura terziaria. Numerosi studi *in vitro* hanno, inoltre, contribuito a dimostrare come un altro fattore in grado di influenzare lo stato conformazionale di p53 e quindi la sua funzione biologica, sia rappresentato dalle modifiche post-traduzionali a cui viene esposta tale proteina, una volta indotta [13]. Lo stato di fosforilazione di p53 viene classicamente considerato come lo step cruciale per la sua stabilizzazione e attivazione. Una vasta gamma di differenti chinasi, tra cui ATM/ATR/CDK2/PKC, media l'aggiunta di gruppi fosfato ai residui di serina di p53 [14]. E' stato dimostrato che i tetrametri della proteina p53 possono essere presenti in forma latente o attivata e che gli eventi di fosforilazione aumentano la capacità dei tetrameri in forma latente di legarsi al DNA, convertendoli nella forma attivata. In conclusione, la proteina p53 è un tetramero regolato in modo allosterico, normalmente presente in forma latente ma attivato reversibilmente in seguito a condizioni di stress cellulare [15].

### *1.1.3 Regolazione dei meccanismi di attivazione della proteina p53*

La proteina p53 è stata denominata “guardiano del genoma” a causa del suo ruolo centrale nel coordinare le risposte cellulari alle varie tipologie e livelli di stress, in termini di arresto del ciclo cellulare, riparo del DNA, apoptosi e senescenza. Il meccanismo primario attraverso cui p53 media tali risposte è rappresentato dall'attivazione di una serie di geni target. La transattivazione p53-dipendente rappresenta quindi una caratteristica essenziale della risposta cellulare allo stress, sebbene alcuni effetti di p53 possano essere indotti indipendentemente dalla trascrizione genica. Recentemente sono stati annoverati 129 geni come target diretti di p53 benché, con molta probabilità, questo numero sia destinato a crescere; inoltre, il numero di geni la cui espressione risulta alterata indirettamente dopo induzione di p53 è dell'ordine di migliaia. Quindi, considerando che, come fattore trascrizionale, p53 è in grado di modulare positivamente o negativamente un vasto numero di geni, il controllo della sua attività rende necessario un complesso network di meccanismi di regolazione. Tali meccanismi sono rappresentati principalmente da modifiche post-traduzionali cui va incontro la proteina sia in condizioni di omeostasi che di stress cellulare. E' stato infatti dimostrato che più di 36 aminoacidi all'interno della sequenza di p53 rappresentano potenziali target di modifiche biochimiche [16]. Il modello “classico” di induzione della proteina p53 consiste in tre fasi attivatorie sequenziali: 1) Stabilizzazione stress-dipendente di p53; 2) Legame sequenza specifico di p53 al DNA; 3) Attivazione dei geni target mediante interazione con il macchinario di trascrizione genica [Figura 2].



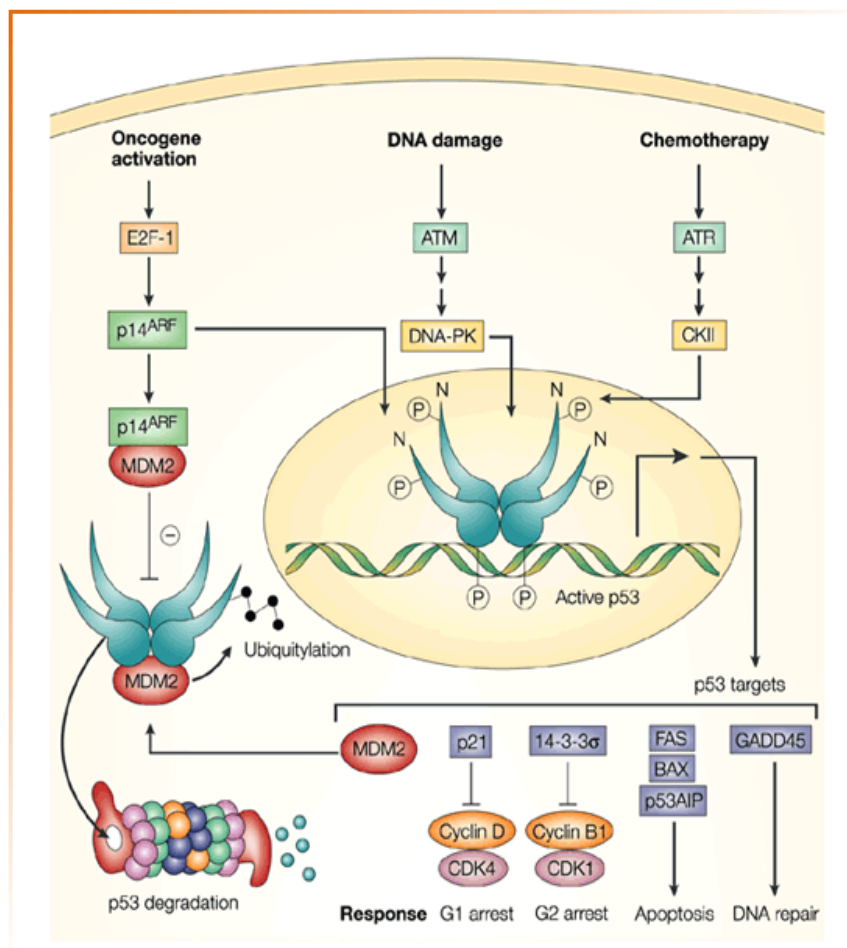


*JP Kruse. Cell 137, 2009*

**Figura 2. Modello “classico” di induzione della proteina p53.** Il modello “classico” di induzione della proteina p53 consiste in tre fasi attivatorie sequenziali: 1) Stabilizzazione stress-dipendente di p53; 2) Legame sequenza specifico di p53 al DNA; 3) Attivazione dei geni target mediante interazione con il macchinario di trascrizione genica.

La prima fase è mediata da eventi di fosforilazione ATM/ATR-dipendenti a carico dei residui di serina 15 e 28 presenti all’interno del dominio N-terminale di transattivazione della proteina p53. La fosforilazione di tali serine ha rappresentato una delle prime modifiche post-traduzionali identificate a carico di p53. Tale evento comporta la stabilizzazione della proteina impedendone il legame con il suo principale inibitore, rappresentato da MDM2. In condizioni di omeostasi, infatti, p53 è caratterizzata da una ridotta emivita ed è presente all’interno della cellula a livelli neghligibili. Tali livelli sono mantenuti non solo grazie al controllo negativo della traduzione dell’RNA messaggero (mRNA) di p53, evento reso possibile grazie al legame della proteina ribosomale L26 alla regione 5’ non tradotta di tale mRNA, ma principalmente grazie all’attività della proteina MDM2 [17]. Tale proteina lega p53 a livello del dominio N-terminale di transattivazione e inattiva p53 funzionando come ubiquitina-ligasi E3, promuovendone, quindi, la degradazione attraverso la via del proteasoma, dopo l’aggiunta di molecole di ubiquitina [Figura 3]. MDM2 non ha in realtà un’attività enzimatica intrinseca, ma coopera con gli enzimi UbcH5B e UbcH5C per l’ubiquitinazione di p53, che si verifica prevalentemente a carico di residui di lisina presenti a livello dei domini di oligomerizzazione e C-terminale della proteina. MDM2 è in grado di indurre sia la monoubiquitinazione che la poliubiquitinazione di p53. Quale di questi eventi si verifichi dipende dai livelli di attivazione di MDM2. Bassi livelli di attivazione inducono la monoubiquitinazione di p53 e il suo esporto

nucleare, con successiva degradazione a livello dei proteasomi citosolici o deubiquitinazione e induzione della forma citosolica apoptoticamente attiva, mentre alti livelli ne promuovono la poliubiquitinazione e la degradazione sia a livello dei proteasomi citosolici che nucleari [18]. In realtà, sebbene i livelli della proteina p53 siano elevati in assenza di MDM2, p53 continua ad essere degradata in cellule murine  $MDM2^{-/-}$ , suggerendo l'esistenza di una via alternativa di degradazione MDM2-indipendente [19]. A tale proposito, è stato recentemente dimostrato, sia in colture tissutali che in esperimenti biochimici *in vitro*, il coinvolgimento di una serie di altre ligasi E3, tra cui COP1, Pirh2 e Arf-BP1, nel controllo dei livelli intracellulari di p53. Nonostante ciò, il ruolo dei meccanismi di degradazione MDM2-indipendente di p53, nella risposta allo stress cellulare, deve essere ancora delucidato.



AN Bullock. *Nat Rev Cancer* 1, 2001

**Figura 3. Meccanismo di degradazione della proteina p53 MDM2-dipendente.** L'oncosoppressore MDM2 lega la proteina p53 a livello del dominio N-terminale di transattivazione e la inattiva funzionando come ubiquitiniliasi E3, promuovendone la degradazione attraverso la via del proteasoma, dopo l'aggiunta di molecole di ubiquitina.

Sono diversi i livelli di regolazione che correlano la funzione di MDM2 alla stabilizzazione della proteina p53 durante la risposta allo stress. Il principale regolatore di MDM2 è rappresentato dall'oncosoppressore ARF [20]. ARF è una proteina nucleolare in grado di stabilizzare p53 sia interferendo con il legame di p53 ad MDM2, sia inibendo direttamente l'attività di ubiquitina-ligasi di MDM2. I ridotti livelli di ARF in condizioni di omeostasi sono infatti drammaticamente incrementati in condizioni di stress oncogenico, garantendo così il controllo della proliferazione cellulare attraverso il blocco del ciclo e l'apoptosi p53-dipendenti. Un altro regolatore di MDM2 è rappresentato dalla proteina MdmX (anche nota come MDM4) che, oltre alla sua capacità di interagire direttamente con p53, è in grado di stabilizzare MDM2 e promuovere la sua attività di ubiquitina-ligasi. Inoltre, lo stesso MDM2 è sottoposto a regolazione mediante fosforilazione e acetilazione, entrambe modifiche in grado di favorire, a seconda del sito interessato e dell'enzima coinvolto, sia l'inibizione che l'attivazione di MDM2.

Una volta ridotta l'efficacia del ruolo inibitorio di MDM2 nei confronti di p53 grazie agli eventi iniziali di fosforilazione a carico delle serine 15 e 28, un'ulteriore fosforilazione della treonina in posizione 18 consente il legame della proteina PIN1 (una prolil-isomerasi) a p53 con conseguente polimerizzazione dei domini PRD di p53, evento che riduce ulteriormente l'affinità di legame con MDM2 e, nel contempo, determina l'aumento dell'affinità di legame con l'acetil-trasferasi CBP/p300. Il legame covalente di un gruppo acetile ad un residuo di lisina rappresenta un evento primariamente identificato a carico degli istoni e l'acetilazione istonica è nota avere un impatto importante sulla regolazione trascrizionale. p53 è stata identificata come prima proteina non istonica in grado di essere regolata funzionalmente dalle modifiche di acetilazione e deacetilazione. Tali eventi sono importanti per un efficiente reclutamento dei cofattori trascrizionali e per l'attivazione dei geni target di p53 *in vivo*. L'acetil-trasferasi CBP/p300 rappresenta il principale enzima acetilante di p53, sebbene recentemente sia stato dimostrato il coinvolgimento di differenti acetil-trasferasi, quali Tip60 e hMof, nella regolazione dell'attività di p53. I siti target di acetilazione sono rappresentati da una sequenza di 6 lisine presente nella regione C-terminale e dalle lisine in posizione 120 e 164 presenti all'interno del DBD. Una volta localizzate a livello dei promotori genici grazie al legame con la proteina p53, le acetil-trasferasi facilitano la trascrizione non solo agendo direttamente su p53 ma anche acetilando gli istoni presenti nelle vicinanze dei geni target, stabilendo in questo modo una conformazione cromatinica più flessibile. Le conseguenze funzionali dell'acetilazione di p53 suggeriscono che il "timing" degli eventi di acetilazione delle differenti regioni della proteina risulta importante per una sua accurata regolazione e per

la determinazione del destino cellulare. In realtà, a complicare ulteriormente il modello relativo all'attivazione di p53, bisogna ricordare che tale proteina rappresenta il target di numerose altre modifiche post-traduzionali, tra le quali: metilazione, sumonilazione e neddilazione, tutte coinvolte nel controllo della sua attività trascrizionale. Ad esempio, sono state identificate tre differenti metil-transferasi in grado di metilare i residui di lisina C-terminali della proteina p53. La monometilazione mediata dalla metil-transferasi Set7/9 a livello della lisina K372 promuove l'attivazione di p53, in particolare favorendo la transattivazione di p21, mentre la monometilazione delle lisine K370 e K382 Smyd2- e Set8/PR-Set7-dipendenti reprime l'attività di p53 [21]. Inoltre, a sostegno dell'importanza degli eventi di metilazione nella regolazione di p53, vi è l'osservazione che sia p53 sia gli istoni che circondano la proteina una volta legata al DNA, sono metilati a livello dei residui di arginina e che tale evento garantisce la specificità di legame di p53 ai promotori dei geni target attraverso una modifica dell'affinità.

Per ciascuna tipologia di risposta allo stress, almeno tre classi di geni sono attivate da p53. La prima classe di geni target protegge le cellule dai potenziali effetti deleteri, sulla vitalità cellulare, di un'eccessiva attivazione di p53. Tali geni includono molecole come MDM2 o MdmX e la loro induzione è indipendente dall'acetilazione di p53. La regolazione positiva dell'espressione di MDM2 comporta un aumento della sua concentrazione intracellulare in relazione alla presenza di p53, con induzione, quindi, di un meccanismo di feedback negativo che permette una fine regolazione dell'attività di p53 all'interno della cellula [22]. La seconda classe di geni comprende molecole implicate nell'induzione dell'arresto della crescita cellulare, la cui attivazione rappresenta un evento fondamentale per garantire l'inizio dei processi di riparazione del DNA cellulare danneggiato in seguito all'esposizione ai fattori di stress. Tale evento richiede una parziale acetilazione della proteina p53. Il target principale di tale classe di geni è rappresentato da p21, una molecola di 165 aminoacidi appartenente alla famiglia degli inibitori delle cicline chinasi-dipendenti (CDK) che, attraverso il legame con il complesso CycE/CDK2, induce il blocco del passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare [23]. Altri geni appartenenti alla seconda classe e regolati positivamente da p53 sono: il gene *GADD45*, la cui espressione indotta da danni al DNA dovuti a radiazioni ionizzanti è associata al blocco del ciclo cellulare in fase G1 mediato dall'inibizione della formazione del complesso CycB/Cdc2, e il gene *TP53* stesso. Infine, la terza classe di geni indotti è costituita dai regolatori del processo apoptotico, rappresentati principalmente da *PUMA*, *Bax*, *NOXA* e *APAF-1*. Dal momento che l'induzione del processo apoptotico, che si verifica qualora la cellula non sia stata in grado di riparare efficacemente il danno a carico del DNA, rappresenta

un evento irreversibile, la sua piena attivazione presuppone che: tutti i coattivatori chiave siano stati reclutati; p53 sia completamente acetilato e che i corepressori (MDM2 e MdmX) siano stati completamente allontanati dai promotori target. In realta, come vedremo in seguito, l'induzione dell'apoptosi non rappresenta l'unico meccanismo attraverso cui p53 è in grado di indurre l'eliminazione di cellule caratterizzate da lesioni genetiche irreparabili. Un altro importante meccanismo è infatti rappresentato dalla senescenza cellulare, un processo meno noto da un punto di vista molecolare, ma altrettanto efficace nella soppressione della crescita di cellule pre-cancerose.

E' stato recentemente dimostrato come la proteina p53 sia in grado non solo di attivare ma anche di reprimere la trascrizione genica, sebbene i meccanismi di transrepressione così come i target transrepressi non siano ancora del tutto compresi. Sembrerebbe che p53 regoli negativamente quei geni la cui espressione risulta controllata da promotori che contengono sequenze TATA-box o CAAT-box, probabilmente interagendo con i fattori trascrizionali che si legano a tali sequenze e/o reclutando enzimi deacetilanti (DACs) a livello di tali promotori [24]. E' stato ad esempio osservato come la soppressione della crescita indotta da p53 sia accompagnata dalla diminuzione dell'espressione del gene PCNA, codificante per l'Antigene Nucleare della Proliferazione Cellulare, una proteina nucleare che agisce come cofattore della DNA polimerasi  $\delta$ . Anche l'espressione dell'oncogene B-myb e del gene per la DNA polimerasi  $\alpha$  diminuiscono in relazione al blocco del ciclo cellulare mediato da p53. Si ritiene che p53 controlli l'espressione del gene B-myb direttamente e che la proteina prodotta da tale oncogene regoli a sua volta la trascrizione del gene PCNA e del gene per la DNA polimerasi  $\alpha$  [25]. Inoltre, p53 potrebbe reprimere l'espressione genica indirettamente, ovvero attraverso la transattivazione di geni codificanti microRNA, regolatori negativi della trascrizione.

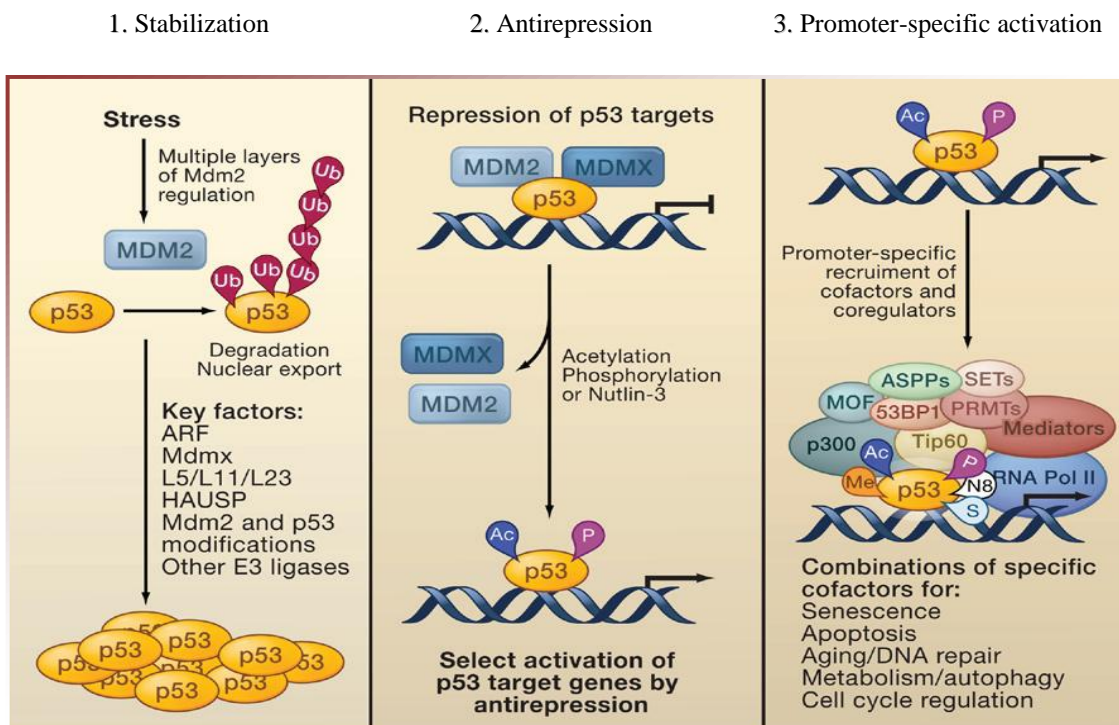
A complicare ulteriormente il modello relativo ai meccanismi di transattivazione e transrepressione mediati dalla proteina p53 vi è poi la difficoltà di predire e identificare la totalità dei geni da essa modulati considerando che: 1) non tutte le sequenze consenso riconosciute da p53 a livello dei promotori genici sono occupate da tale proteina durante la risposta allo stress cellulare; 2) non tutte le regioni del DNA cui p53 si associa una volta indotto sono conformi alle sequenze consenso per p53; 3) non tutti i geni nelle vicinanze dei siti di legame per p53 sono modulati positivamente come conseguenza di tale legame; 4) la presenza di repressori della trascrizione genica potrebbe contrastare l'attività di transattivazione di p53 [26].

Una volta mediata la sua azione, la proteina p53 deve essere naturalmente sottoposta ad un controllo negativo. A tale scopo, uno dei principali eventi di modulazione negativa è

rappresentato dalla sua deacetilazione, catalizzata da una serie di complessi di istone-deacetilasi (HDACs) contenenti HDAC1 o Sir2 $\alpha$  /Sirt1 [27]. Le reazioni di deacetilazione si verificano piuttosto rapidamente, una volta che l'attivazione trascrizionale p53-dipendente non è più richiesta, e il ripristino dei livelli normali di p53 all'interno della cellula, dopo il completamento del riparo del DNA, è cruciale per il ritorno alla normale omeostasi. Una delle principali conseguenze della deacetilazione di p53 è quella di rendere la proteina suscettibile all'ubiquitinazione MDM2-dipendente, dal momento che l'acetilazione di p53 inibisce tale evento, come dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* [28].

Nel complesso, il modello "classico" di attivazione di p53 consiste quindi nella stabilizzazione stress-indotta della proteina, seguita da un intricato network regolatorio finalizzato all'induzione del legame al DNA e al controllo dell'espressione dei geni target. In realtà, recenti studi genetici effettuati mediante l'introduzione di mutazioni puntiformi nella sequenza di *TP53*, hanno rivelato aspetti relativi alla regolazione della proteina, che non possono essere spiegati sufficientemente secondo il modello "classico". È stata di conseguenza proposta l'esistenza di una ridondanza regolatoria tra le modifiche post-traduzionali di p53 che assicurerebbe il controllo appropriato della proteina in risposta ai diversi stimoli di stress e alle loro differenti intensità, e che quindi assicurerebbe l'appropriata specificità tissutale. Tali osservazioni hanno inoltre condotto a ridefinire il modello "classico" di attivazione di p53 mediante l'introduzione di un'ulteriore fase rappresentata dagli eventi di antirepressione a carico della proteina, eventi che avverrebbero a seguito della sua stabilizzazione e prima dell'attivazione trascrizionale dei geni target e contribuirebbero all'induzione della proteina p53 in relazione all'insieme di tutte le modifiche post-traduzionali a suo carico [Figura 4]. L'introduzione di tale fase deriva dall'osservazione che gli inibitori MDM2 e MdmX sono in grado di legare p53 anche a livello dei promotori dei geni target, nascondendo il suo dominio di transattivazione al complesso di trascrizione. Conseguentemente, MDM2 e MdmX non solo mediano la degradazione di p53 attraverso la via del proteasoma, ma agiscono anche reprimendone direttamente l'attività di fattore trascrizionale [29]. Tale osservazione ha indotto a supporre che p53 sia probabilmente intrinsecamente attivo all'interno della cellula e che necessiti di una continua repressione. Il legame di p53 ai suoi repressori a livello del DNA viene principalmente regolato da eventi di fosforilazione e acetilazione a carico di residui aminoacidici chiave. Naturalmente, gli eventi di antirepressione, da soli, garantiscono solo l'attivazione di geni altamente responsivi come quelli coinvolti nel blocco del ciclo cellulare, ma risultano insufficienti per l'induzione dei geni mediatori dell'apoptosi, i cui promotori, infatti, sono legati da p53 a bassa affinità, per

cui tale evento richiederebbe modifiche post-traduzionali aggiuntive di p53. Di conseguenza, un segnale di stress dovrebbe indurre un arresto reversibile del ciclo cellulare mentre la risposta apoptotica irreversibile richiederebbe eventi stimolatori aggiuntivi.



JP Kruse. *Cell* 137, 2009

**Figura 4. Modello "rifinito" di attivazione della proteina p53.** L'osservazione dell'esistenza di aspetti relativi alla regolazione della proteina p53 che non possono essere spiegati sufficientemente secondo il modello "classico" di attivazione ha condotto a ridefinire tale modello mediante l'introduzione di una ulteriore fase rappresentata dagli eventi di antirepressione a carico della proteina p53. Questi eventi avverrebbero a seguito della stabilizzazione di p53 e prima dell'attivazione trascrizionale dei geni target e contribuirebbero all'induzione della proteina in rapporto all'insieme di tutte le modifiche post-traduzionali a suo carico.

#### *1.1.4 Ruolo della proteina p53 nella soppressione tumorale*

La proteina p53, grazie alla sua capacità di avvertire la presenza di un danno a carico del DNA con conseguente induzione dell'arresto del ciclo cellulare e della riparazione del DNA o, nel caso in cui il danno sia esteso, promozione dell'apoptosi o della senescenza, svolge un ruolo cruciale nella soppressione tumorale, prevenendo l'espansione di cellule anormali potenzialmente cancerose. A sostegno dell'importanza di p53 nel controllo della tumorigenesi è stato infatti dimostrato che oltre il 50% di tutti i tumori umani presentano mutazioni del gene *TP53* e che alterazioni genetiche a carico di proteine che regolano o mediano l'attività di p53 si riscontrano in buona parte della restante metà dei tumori; il gene *MDM2*, ad esempio, è amplificato in almeno il 7% dei tumori umani p53 negativi [30]. Inoltre, i pazienti affetti dalla sindrome di Li-Fraumeni, una rara patologia ereditaria a carattere autosomico dominante il cui difetto genetico è rappresentato, nella maggior parte dei casi, dalla presenza di una mutazione somatica a carico di uno dei due alleli del gene *TP53*, sono caratterizzati da un'elevata predisposizione allo sviluppo di tumori multipli in età precoce.

I principali meccanismi antitumorali mediati dalla proteina p53 sono rappresentati dall'apoptosi e dalla senescenza cellulare. L'apoptosi è un processo coinvolto nell'eliminazione di cellule ad alto rischio di trasformazione neoplastica mentre la senescenza cellulare opera da barriera della tumorigenesi mediante l'induzione di un arresto irreversibile del ciclo cellulare. p53 agisce direttamente o indirettamente e a multipli livelli nell'induzione dell'uno o dell'altro processo. L'apoptosi è un fenomeno universale negli organismi multicellulari ed è alla base di processi fondamentali come l'organogenesi, l'omeostasi tissutale e la selezione negativa dei cloni linfocitari autoreattivi. Viene normalmente indotta dai processi di controllo dello sviluppo ma anche insulti tossici per la cellula sono alla base della sua induzione. La proteina p53 è in grado di attivare la via apoptotica sia in modo trascrizione-dipendente che indipendente. Quest'ultimo meccanismo sarà esaminato nel sottoparagrafo successivo relativo alle funzioni citoplasmatiche della proteina p53, mentre per quanto riguarda l'induzione dell'apoptosi in modo trascrizione dipendente, tale processo consiste essenzialmente nella transattivazione di target pro-apoptotici mediatori sia della via intrinseca che estrinseca del processo di morte cellulare. Nell'ambito dei target coinvolti nella via intrinseca possono essere annoverati i geni codificanti le molecole appartenenti alla famiglia Bcl-2, quali Bax e le proteine BH3-only (Bid, PUMA, NOXA) che possono fungere da attivatori o derepressori dei fattori pro-apoptotici e OKL38, un oncosoppressore in grado di localizzarsi a livello mitocondriale e favorire il rilascio del Citocromo c. Per quanto riguarda i target coinvolti nella via estrinseca, p53 induce l'espressione dei recettori e dei ligandi di



morte cellulare quali DR5 e CD95, TRAIL e FasL, rispettivamente. p53 è inoltre in grado di attivare la trascrizione dei geni codificanti per i componenti del macchinario effettore dell'apoptosi, rappresentati da APAF-1 e le Caspasi 6 e 8, e per fattori meno noti come la proteina PIG-3, che induce stress ossidativo e causa un aumento dei radicali reattivi dell'ossigeno, e IGF-BD (Insulin Growth Factor-Binding Protein), che a sua volta compete per il legame con il recettore del fattore di crescita insulinico 1 (IGF1R), bloccando la via di trasduzione dei segnali di sopravvivenza trasmessi da questo recettore in presenza di IGF1. Contemporaneamente, p53 reprime la trascrizione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-XL, la proteina ARC che contrasta le funzioni apoptotiche di PUMA e Bad, la Survivina e la Galectina-3, un inibitore del rilascio di Citocromo c mitocondriale [31]. E' importante sottolineare che l'apoptosi mediata da p53 agisce non solo come meccanismo di difesa per proteggere l'organismo dalla propagazione di cloni cellulari con mutazioni permanenti, ma è anche coinvolto nella modulazione dell'attività citotossica di diversi farmaci antitumorali. Studiando la relazione esistente tra l'attività di p53 e la sensibilità o resistenza a vari agenti antitumorali è stato dimostrato che tale proteina è necessaria per la morte cellulare programmata indotta indirettamente da questi farmaci. Le cellule tumorali con mutazioni del gene *TP53* potrebbero, di conseguenza, diventare resistenti agli agenti antitumorali con peggioramento della prognosi del paziente.

In realtà, diverse evidenze indicano che funzioni mediate da p53 e diverse dall'apoptosi sono ugualmente importanti nella soppressione tumorale. E' stato ad esempio osservato che topi *PUMA*<sup>-/-</sup> sono protetti dalla tumorigenesi sebbene caratterizzati dalla compromissione di uno dei principali mediatori apoptotici di p53. Inoltre, topi esprimenti proteine p53 mutanti contraddistinte da perdita della capacità di induzione della morte cellulare ma da preservata capacità di induzione dell'arresto della crescita, non sviluppano, nella maggior parte dei casi, tumori. Tale osservazione ha consentito di identificare il blocco del ciclo come ulteriore meccanismo mediato dalla proteina p53, efficace nella soppressione della crescita di cellule pre-cancerose. Comunque, un arresto transiente della crescita potrebbe essere rischioso, se il potenziale oncogenico cellulare non fosse contrastato e la cellula riprendesse a proliferare; di conseguenza, la risposta più appropriata consiste nell'arresto irreversibile della crescita, noto con il termine di "Senescenza cellulare" [32]. L'accorciamento dei telomeri è un meccanismo universale utile a eliminare il potenziale proliferativo delle cellule normali a seguito di estensivi cicli di divisioni cellulari. Tale processo è noto come "Senescenza Replicativa" ed è stato ipotizzato che l'erosione telomerica oltre un limite definito, possa comportare l'attivazione di una risposta al danno a carico del DNA associata all'induzione della via

ATM/ATR-p53 e all'arresto del ciclo cellulare. In realtà, è stata recentemente dimostrata anche l'esistenza di una forma di senescenza nota con il termine di “*Senescenza Accelerata*” o “*Senescenza Prematura*” che risulta indipendente dall'accorciamento telomerico ma viene indotta dalla risposta delle cellule a condizioni di stress [33]. In ogni caso, le cellule che non sono in grado di andare incontro a senescenza e continuano a proliferare nonostante siano caratterizzate da telomeri disfunzionali o siano sottoposte a condizioni di stress, acquistano, di conseguenza, aberrazioni cromosomiche che possono comportare la loro trasformazione maligna. La senescenza rappresenta quindi un meccanismo evolutivamente conservato di soppressione tumorale, che agisce come barriera naturale all'immortalizzazione cellulare. La proteina p53 è in grado di controllare la senescenza cellulare sia dipendente che indipendente dall'accorciamento telomerico. I principali segnali induttori di senescenza attraverso la via di p53 indipendente dall'accorciamento telomerico, sono rappresentati da: danno al DNA; attivazione inappropriata di oncogeni (es: *Ras*, *RUNX1* e *RUNX1-ETO*); stress ossidativo, deplezione di chaperoni molecolari (es: Hsp70) e attività di farmaci chemioterapici (es: Ciclofosfamide; Etoposide) [34]. I meccanismi responsabili dell'attivazione di p53 nelle cellule senescenti sono solo parzialmente compresi, sebbene le evidenze molecolari stiano crescendo. Tra le cause di attivazione identificate sinora, l'incremento dell'espressione dell'oncosoppressore ARF, che agisce inibendo la regolazione negativa MDM2-dipendente di p53, e l'attivazione dell'oncosoppressore PML che interagisce con l'acetiltrasferasi CBP/p300 stabilizzando indirettamente p53 mediante la sua acetilazione [35-36]. Anche i meccanismi attraverso cui p53 induce la senescenza sono attualmente incompiuti. L'induzione di p21 risulta importante per la senescenza indotta dal danno al DNA tanto quanto lo è per l'induzione dell'arresto transiente della crescita, sebbene quale meccanismo sia alla base della decisione tra l'arresto definitivo o transiente della crescita, attraverso l'attivazione di p21, non sia stato ancora del tutto delucidato. E' stato suggerito che un efficiente riparo del DNA comporti l'inibizione della via p53-p21, consentendo la progressione nel ciclo cellulare, mentre lesioni irreparabili del DNA sostengano l'attivazione della via ATM/ATR-p53-p21 con acquisizione del fenotipo di senescenza. p53 sembra inoltre indurre la senescenza cellulare anche attraverso la regolazione dell'espressione dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), un noto marcatore di senescenza, e del gene *MIC-1*, codificante una citochina della famiglia del TGF- $\beta$  [37]. Una volta attivata, p53 può indurre, quindi, a seconda delle circostanze, l'apoptosi o l'arresto irreversibile del ciclo cellulare. Tuttavia, non è ancora del tutto chiaro quali meccanismi siano alla base della scelta di un destino cellulare di morte o senescenza, sebbene la loro conoscenza potrebbe essere importante per modulare la risposta di

p53 nelle cellule tumorali. Per la comprensione di tali meccanismi è necessario considerare la tipologia di stress cellulare, la sua durata e intensità, quindi lo stato quantitativo e qualitativo della proteina p53 in termini di conformazione, localizzazione, stabilità e attività, caratteristiche che a loro volta dipendono sia da modifiche post-traduzionali a carico di p53 sia da interazioni dirette proteina-proteina. E' stato ad esempio dimostrato che l'acetilazione della lisina 120, presente all'interno del DBD di p53, da parte delle acetil-trasferasi Tip60 e hMOF, favorisce l'induzione dell'apoptosi e che la prevenzione di tale evento si associa ad una selettiva riduzione della transattivazione dei geni pro-apoptotici *Bax* e *PUMA* [38]. Lo stesso effetto ha la fosforilazione della serina 46 di p53 mediata dalle chinasi p38, DYRK2 o HIPK2, grazie all'induzione di un cambio conformazionale che consente a p53 di dissociarsi dall'inibitore dell'apoptosi iASPP e allo stesso tempo altera la specificità di legame di p53 ai promotori e co-attivatori specifici per l'apoptosi quali p63, p73 e STAT1 [39]. Inoltre, in un recente studio è stato dimostrato come l'acetilazione della lisina 320 PCAF-mediata causi l'ipofosforilazione dei residui N-terminali di p53 consentendo l'induzione di p21, mentre l'acetilazione della lisina 373 induca la fosforilazione dei residui N-terminali della proteina con attivazione dei geni pro-apoptotici [40]. Sembra poi che l'attivazione di alcuni oncogeni, come MYC, sia coinvolta nell'induzione preferenziale dell'apoptosi ARF/p53-dipendente attraverso la soppressione specifica del promotore di p21; mentre l'oncogene *Ras* rappresenta, ad esempio, un tipico mediatore di senescenza nei fibroblasti primari [41-42]. Infine, l'attivazione dell'uno o dell'altro meccanismo di soppressione tumorale sarebbe influenzata dal tipo di cellula interessata. Ad esempio, le cellule linfoidi sono intrinsecamente predisposte ad andare incontro all'apoptosi, contrariamente ai fibroblasti e alle cellule epiteliali che vanno normalmente incontro a senescenza.

Considerando la complessità dei meccanismi alla base dell'induzione dei diversi processi di soppressione tumorale all'interno delle cellule, acquisire una maggiore conoscenza dei determinanti molecolari alla loro base diviene quindi particolarmente importante per il disegno di strategie terapeutiche antineoplastiche.

#### *1.1.5 Funzioni citoplasmatiche della proteina p53*

In aggiunta alle sue funzioni nucleari di attivatore trascrizionale, p53 possiede, in realtà, anche attività biologiche citosoliche trascrizione-indipendenti. E' stato osservato che l'overespressione di una forma mutata del gene *TP53*, caratterizzata dalla mancanza della maggior parte del DBD e completamente inefficiente nella funzione di transattivazione, può ancora essere associata all'induzione del processo apoptotico. Similmente, l'attivazione di

p53 risulta nell'apoptosi anche in cellule caratterizzate dall'assenza del nucleo o in condizioni di parziale o totale blocco trascrizionale [43]. L'abilità di p53 di indurre la via apoptotica in maniera indipendente dalla trascrizione genica è una conseguenza degli effetti dell'associazione di tale proteina alla membrana mitocondriale. Una serie di differenti condizioni di stress cellulare, tra cui l'esposizione a radiazioni ionizzanti, stimolano, infatti, la rapida traslocazione di p53 sulla superficie esterna della membrana mitocondriale (MOM), a livello della quale p53 induce una variazione di permeabilità, causando il rilascio di fattori pro-apoptotici dallo spazio trasmembrana mitocondriale [44]. La permeabilizzazione della MOM (MOMP) è solitamente inibita dal legame di molecole anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 (quali: Bcl-2, Bcl-XL e Mcl1) e, al contrario, attivata da molecole appartenenti alla stessa famiglia, ma con funzione pro-apoptotica (Bim, Bak e Bax). In relazione alla loro affinità ai componenti della famiglia Bcl-2, una serie di proteine pro-apoptotiche "BH3-only" (come PUMA e NOXA) è in grado di interagire direttamente con Bax o Bak inducendone l'omo-oligomerizzazione, favorendo in questo modo la MOMP e/o contrastando l'attività dei fattori anti-apoptotici. Una serie crescente di evidenze ha dimostrato come in condizioni pro-apoptotiche p53 si comporti, a livello citosolico, come una proteina "BH3-only", funzionando da attivatore diretto di Bax e Bak o da derepressore. Sono stati proposti due diversi modelli relativi all'azione di p53 a livello mitocondriale. Secondo il primo modello, p53 in condizioni di omeostasi è sequestrata, a livello della MOM, dalle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-XL. I segnali di stress cellulare inducono il rilascio del legame di p53 dai fattori anti-apoptotici grazie all'azione di spiazzamento esercitata dalla proteina PUMA. In questo modo p53 può essere attivata e può associarsi alle proteine Bax e Bak, inducendo la loro oligomerizzazione, con conseguente aumento della permeabilità mitocondriale e rilascio del Citocromo c [45]. In base al secondo modello, invece, p53 è in grado di legare esclusivamente Bcl-2 e Bcl-XL; questo legame permette a Bak e Bax di sganciarsi da Bcl-2 e Bcl-XL, dalle quali sono inattivate all'interno delle cellule, in condizioni normali. L'azione di p53 diventa in tal caso quella di inattivare Bcl-2 e Bcl-XL, in modo tale che Bak e Bax possano a loro volta essere attivate dalla forma tronca di Bid (tBid), un fattore pro-apoptotico che induce la loro oligomerizzazione, con conseguente formazione dei pori sulla membrana mitocondriale esterna [46]. Quindi, secondo il primo modello p53 si comporterebbe, al pari di Bid, come un attivatore dell'apoptosi, in quanto in grado di legare direttamente Bax e Bak; in base al secondo modello, invece, p53 si comporterebbe, al pari di Bad, come un sensibilizzatore dell'apoptosi, in quanto in grado di legare direttamente solo Bcl-2 e Bcl-XL e, quindi, di attivare solo indirettamente Bak e Bax. In realtà, gli effetti

citoplasmatici pro-apoptotici di p53 sono trascrizione-indipendenti solo in parte, in quanto il controllo della trascrizione mediato da p53 contribuisce decisamente alle sue funzioni citoplasmatiche. Infatti, senza la regolazione dell'espressione di MDM2 da parte di p53, il sistema non sarebbe in grado di rispondere ai fattori di stress cellulare in quanto p53 non potrebbe stabilizzarsi e accumularsi a livello sia citosolico che nucleare. Inoltre, anche la proteina PUMA rappresenta un target dell'attività di transattivazione di p53, senza il quale p53 non potrebbe contrastare il sequestro citoplasmatico mediato da Bcl-2 e Bcl-XL. In conclusione, le due vie di induzione dell'apoptosi trascrizione-dipendente e trascrizione-indipendente sono strettamente correlate, e quindi, mutazioni del gene *TP53* in cellule neoplastiche hanno la potenzialità di abolire contemporaneamente entrambe le attività.

Un'ulteriore funzione della proteina p53 citoplasmatica è rappresentata dalla capacità di controllare il fenomeno dell'autofagia, ovvero il sequestro e la successiva digestione, da parte delle cellule, di porzioni del citoplasma, finalizzata all'adattamento a condizioni di stress così come alla rimozione di strutture citosoliche danneggiate e quindi potenzialmente dannose. Dal momento che l'autofagia ha un ruolo essenziale nel mantenimento della stabilità genomica, l'inibizione dell'autofagia rappresenta un evento oncogenico. Sebbene p53 sia in grado di transattivare geni induttori di autofagia come *DRAM* e le *Sestrine 1* e *2*, livelli normali di p53 mediano invece un segnale tonico inibitorio nei confronti dell'autofagia. La soppressione dell'autofagia è mediata dalla proteina p53 citoplasmatica attraverso il blocco dell'attività della chinasi AMP-dipendente, un regolatore positivo dell'autofagia, e l'induzione di mTOR, un target della Rapamicina con funzione di regolatore negativo dell'autofagia. E' stato proposto un modello secondo cui l'inibizione dell'autofagia e l'induzione della MOMP costituiscono una risposta coordinata finalizzata a facilitare l'attivazione della morte cellulare. L'autofagia, infatti, attraverso la rimozione dei mitocondri danneggiati o permeabilizzati, contrasta gli effetti letali della MOMP, per cui, la sua inibizione mediata da p53 potrebbe facilitare l'esecuzione della morte cellulare tramite MOMP. Non sono tuttavia ancora chiari i meccanismi attraverso cui p53 possa passare dalla sua funzione basale di inibitore dell'autofagia a quella di induttore della MOMP a livello citoplasmatico [47]. Potrebbe apparire paradossale che livelli citoplasmatici normali di p53 inibiscano l'autofagia, considerando che tale evento è essenzialmente oncogenico. In realtà, tale paradosso può essere risolto prendendo in considerazione l'osservazione che la maggior parte delle forme mutate di p53, che ha quindi perso la sua attività di transattivazione genica, è ancora in grado di inibire l'autofagia. Di conseguenza, nei casi in cui p53 non è più in grado di esercitare la sua azione di fattore pro-apoptotico, la soppressione dell'autofagia può diventare

sostanzialmente dannosa, promuovendo la progressione tumorale. Questo potrebbe contribuire alla potente azione oncogenica di alcuni mutanti, difficilmente spiegabile considerando esclusivamente la mera inibizione delle capacità oncosoppressive di p53.

Gli effetti della proteina p53 citoplasmatica e di quella nucleare sono determinati da una serie di modificazioni post-traduzionali, che stabiliscono il destino della proteina modulandone l'interazione con altri fattori e/o lo spostamento da un compartimento cellulare all'altro. È stato dimostrato che la poli(ADP)ribosilazione di p53 comporta un accumulo nucleare della proteina; al contrario, la sua monoubiquitinazione da parte di MDM2 induce un esporto nucleare della proteina che, una volta giunta a livello dei mitocondri, può essere deubiquitinata dall'enzima mitocondriale HAUSP trasformandosi nella forma citosolica apoptoticamente attiva. Altre modificazioni post-traduzionali di p53, come la fosforilazione delle serine C-terminali, possono stimolare l'esporto nucleare e/o l'associazione alla MOM. Inoltre, è stato osservato che il fattore trascrizionale Foxo3a promuove l'accumulo citoplasmatico di p53, aumentando il suo esporto nucleare. Infine, la proteina p53 nucleare risulta acetilata, mentre la forma citoplasmatica è normalmente deacetilata. Ulteriori studi sarebbero comunque utili al fine di chiarire meglio quali modifiche post-traduzionali di p53 determinano la sua attività pro-MOMP o anti-autofagia.

#### *1.1.6 Ruolo dei microRNA nel controllo dell'attività della proteina p53*

Fino a poco tempo fa, si riteneva che i componenti del network di p53 fossero rappresentati esclusivamente da geni codificanti prodotti proteici, inclusi quelli coinvolti nella regolazione dell'attività di p53, sia a monte che a valle, e nella sua mediazione. Recenti studi hanno invece dimostrato che l'oncosoppressore p53 è in grado di modulare anche l'espressione di una serie di microRNA (miR), tra i quali un ruolo primario è stato attribuito alla famiglia dei miR34. L'identificazione di tali miR come componenti della via di p53 ha rappresentato la prima rivelazione dell'esistenza di una correlazione tra proteine e RNA non codificanti, nell'ambito della soppressione tumorale. I miR sono una classe di piccoli RNA ad attività regolatoria coinvolti nel silenziamento post-trascrizionale di specifici mRNA target. La famiglia dei miR34 comprende un insieme di microRNA (mir34-a, mir34-b e mir34-c) altamente conservati da un punto di vista evolutivo, direttamente indotti da p53 in risposta alla presenza di un danno a carico del DNA o in condizioni di stress oncogenico [48]. Sia stimoli di natura esogena che endogena sono infatti in grado di indurre l'espressione dei miR34, secondo una modalità p53-dipendente, in sistemi cellulari *in vitro* e in tessuti animali. Tale induzione non dipende da sintesi proteica *de-novo*, ma dalla presenza di siti di legame

intatti per la proteina p53 a livello dei promotori genici dei miR34 [49]. La cinetica e l'intensità di induzione dell'espressione di tali miR sono paragonabili a quelle di altri target canonici di p53, come p21. E' stato dimostrato che l'espressione ectopica di tali miR ricapitola gli effetti di p53, con induzione dell'arresto della crescita o dell'apoptosi, attraverso l'abilità di reprimere l'espressione di geni proliferativi e anti-apoptotici. In particolare, l'overespressione del miR34-a in fibroblasti primari e in alcune linee tumorali, causa un significativo arresto del ciclo cellulare, evidente dall'incremento di cellule in fase G1 e diminuzione in fase S. Inoltre, a seconda del tipo cellulare, l'overespressione ectopica del miR34-a è in grado di indurre senescenza, come avviene in fibroblasti primari di polmone umano, o apoptosi, come nel caso della maggior parte delle linee tumorali [50]. Ad ogni modo, data la potenzialità dei miR di riconoscere molteplici target a causa della capacità di appaiamento imperfetto di basi, gli effetti pleiotropici del miR34-a potrebbero semplicemente riflettere il vasto spettro di mRNA disponibili come target all'interno di un dato sistema cellulare. Approcci bioinformatici e sperimentali sono stati impiegati per identificare i target attraverso cui i miR34 contribuiscono all'attività di p53: gli studi di espressione genica hanno rivelato che l'attivazione di tali miR è in grado di causare la downmodulazione di centinaia di mRNA, rappresentati soprattutto da quelli codificanti i regolatori del ciclo cellulare quali CDK4, CDK6, la ciclina E2, i fattori trascrizionali E2F1/3 e Notch1. A differenza dei geni proliferativi, i geni anti-apoptotici non sono particolarmente rappresentati nell'insieme dei target dei miR34; tuttavia Bcl-2, un regolatore negativo dell'apoptosi, risulta downregolato dai miR34 in svariati tipi cellulari, confermando il ruolo di tali miR nell'apoptosi indotta da p53 [51].

La scoperta del contributo dei miR34 alla regolazione dell'attività di p53 ha condotto ad intraprendere numerosi studi finalizzati all'identificazione di eventuali ulteriori miR target di p53. E' stata in questo modo individuata una dozzina di miR caratterizzati da pattern di espressione indicativi di una regolazione mediata da p53, sebbene solo un numero esiguo di essi è stato confermato quale target della proteina in studi multipli. Tra i suddetti miR vanno inclusi: i miR15 e 16, coinvolti nella regolazione post-trascrizionale di Bcl-2; let7, modulatore negativo di *Ras* e del miR221 che a sua volta downmodula l'inibitore delle CDK p27 e i miR372 e 373, che contrastano la senescenza p53-dipendente indotta dall'oncogene *Ras* [52]. In accordo con il loro ruolo nel controllo dell'attività di p53, i miR34 rappresentano frequenti target di eventi di mutagenesi nell'ambito delle patologie tumorali. Ridotti livelli di tali miR sono stati riscontrati sia in tumori umani che in linee tumorali *in vitro*. Sebbene infatti la pressione selettiva per l'acquisizione di delezioni a carico dei geni codificanti i miR34 sia

alleviata dall'elevata frequenza di mutazioni a carico del gene *TP53*, tale evento è stato riportato in diverse forme tumorali umane *TP53* wild-type. Ad esempio, la regione 1p36 su cui mappa il gene codificante il miR34-a, rappresenta un sito di frequente delezione eterozigote. Recentemente un altro gene presente all'interno di tale regione, codificante la proteina cromodominio CHD5, è stato implicato nell'attività oncosoppressiva del suddetto locus. È stato proposto che CHD5 agisca a monte di p53 regolandone l'espressione, in risposta a diverse condizioni di stress, attraverso l'attivazione di ARF. In questo modo, la delezione del locus 1p36 influenzerebbe l'integrità della via di p53 sia a monte e a valle [53].

Considerando il ruolo dell'alterazione del funzionamento dei miR nella tumorigenesi, come accade nel caso del contributo alla perdita di integrità della via di p53, diviene quindi importante capire se essi hanno uno specifico ruolo di oncosoppressori nella biologia cellulare o se tale osservazione riflette semplicemente la loro funzione di regolatori flessibili dei programmi di espressione genica.

## **1.2 Meccanismi di deregolazione a carico del gene *TP53* e carcinogenesi**

### *1.2.1 Mutazioni del gene *TP53**

Noto il ruolo primario della proteina p53 nella soppressione tumorale, mutazioni a carico del gene *TP53* rappresentano le più comuni alterazioni genetiche associate a tumori umani. Esse avvengono con differente frequenza in quasi tutte le neoplasie ereditarie e sporadiche finora studiate, compresi il carcinoma del colon, il carcinoma della mammella, il carcinoma epatocellulare, i tumori del polmone e dell'esofago, i tumori cerebrali, le leucemie e i linfomi, il tumore della vescica e quello dell'ovaio. Mutazioni germinali in uno dei due alleli del gene *TP53* determinano, inoltre, un'alta predisposizione allo sviluppo di tumori multipli; è questa una condizione familiare nota come sindrome di Li-Fraumeni [54]. Sia mutazioni somatiche che acquisite di *TP53* possono poi essere accompagnate dal fenomeno della "perdita di eterozigosità" nel corso della progressione tumorale; un evento causato da una forza selettiva di inattivazione del rimanente allele wild-type. In questi ultimi anni si è iniziato a chiarire come l'inattivazione della funzione oncosoppressiva p53-dipendente, rappresenti una tappa quasi universale nello sviluppo dei tumori umani, in quanto la funzione fisiologica della proteina p53 risulta essenziale per il mantenimento del fenotipo normale, non neoplastico, delle cellule [55]. La perdita della funzione oncosoppressiva della proteina p53 è in molti casi un evento tardivo associato alla progressione del tumore da neoplasia benigna a neoplasia maligna. Nei carcinomi mammari, polmonari, prostatici, renali, nel neuroblastoma, nei

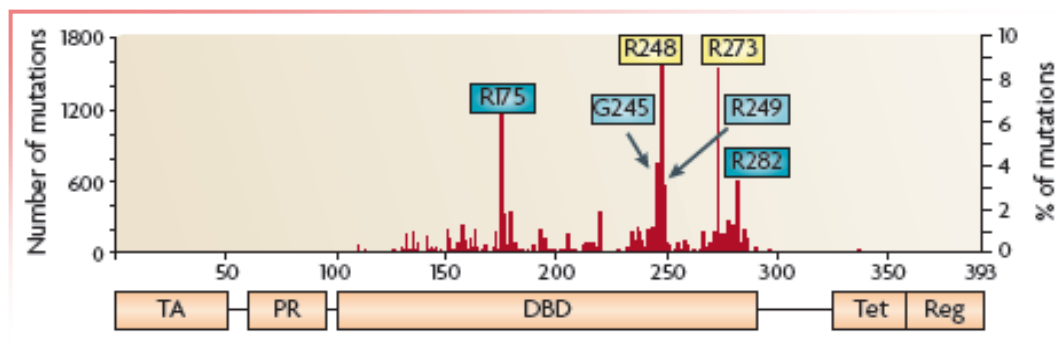


carcinomi della testa e del collo, nell'epatocarcinoma e nel melanoma, le mutazioni del gene *TP53* e l'accumulo della proteina anomala sono particolarmente rilevanti nei casi clinicamente più aggressivi e meno differenziati.

La localizzazione e le caratteristiche delle mutazioni di *TP53* rappresentano importanti indicatori dell'eziologia e della patogenesi molecolare dei tumori. In generale, la maggior parte delle mutazioni di *TP53* possono essere classificate, in relazione al loro effetto sulla stabilità termodinamica della proteina, in due categorie, note con il termine di mutazioni di "contatto" e "conformazionali" [56]. Alla prima classe appartengono mutazioni a carico di residui direttamente coinvolti nel legame della proteina p53 al DNA; la seconda classe comprende invece mutazioni che causano distorsioni nella conformazione di p53 di natura locale o globale. A differenza della maggior parte degli altri geni oncosoppressori, che vanno tipicamente incontro a inattivazione biallelica mediante l'acquisto di delezioni o mutazioni troncanti nel corso della tumorigenesi, *TP53* viene inattivato, in circa il 75% dei casi, da singole mutazioni monoalleliche di natura missenso, che causano la produzione di una proteina alterata altamente stabile e facilmente rivelabile all'interno delle cellule tumorali [57]. Tali mutazioni colpiscono solitamente le porzioni di sequenza codificanti quattro regioni della proteina p53, altamente conservate nell'evoluzione. Queste regioni comprendono i codoni 117-142, 171-181, 236-258 e 270-286, che mappano all'interno del DBD di p53; per cui mutazioni a carico di tali siti comportano solitamente l'abrogazione della capacità di legame di p53 al DNA [Figura 5]. Inoltre, almeno 1/3 di tutte le mutazioni missenso interessa 6 residui definiti "punti caldi" di mutazione e rappresentati dai codoni R248 e R273, che rientrano nella classe dei mutanti di "contatto"; G245 e R249 che rappresentano mutanti "conformazionali" con influenza locale sulla distorsione della proteina p53; e infine R175 e R282, mutanti "conformazionali" con effetto globale sulla distorsione strutturale di p53 [58]. La frequenza e la distribuzione dei punti caldi di mutagenesi varia a seconda della diversa tipologia tumorale, probabilmente in relazione al tipo e alla quantità di mutageno che può raggiungere il tessuto e anche in relazione alle diverse pressioni selettive sulla crescita cellulare alle quali il tessuto è sottoposto [59]. Oltre alle mutazioni puntiformi, che sono quelle che intervengono più frequentemente nell'inattivazione del gene *TP53*, sono state riscontrate anche piccole delezioni o inserzioni nel gene, nonché alterazioni della proteina dovute al legame con oncoproteine virali o cellulari, che inibiscono la capacità della forma "wild type" di legarsi al DNA e attivare la trascrizione genica.

La tipologia delle mutazioni di *TP53* è influenzata non solo da processi di selezione, ma anche da fattori intrinseci che interessano, differenzialmente, specifici nucleotidi e regioni del

gene, e rivelano un coinvolgimento di meccanismi mutagenici endogeni nella formazione del tumore. Le transizioni a livello dei siti CpG sono infatti più frequenti a causa dell'elevata mutagenicità di tali regioni e rappresentano una forza chiave nell'influenzare la distribuzione delle mutazioni nel gene *TP53*. Ad esempio, l'alta frequenza di transizioni da C a T in siti dinucleotidici CpG nel carcinoma del colon è molto probabilmente dovuta a meccanismi di deaminazione endogena [60]. Lo spettro di mutazioni del gene *TP53* può inoltre dipendere e, quindi, dare informazioni sui particolari carcinogeni e meccanismi biologici che intervengono nella formazione di uno specifico tumore [61]. Infatti, è stato dimostrato che differenti carcinogeni causano mutazioni caratteristiche specifiche. Ad esempio, le radiazioni UV determinano preferenzialmente transizioni a livello di siti dipirimidinici sul DNA; l'esposizione all'aflatossina B1 è correlata a trasversioni da G:C a T:A che portano ad una sostituzione aminoacidica del residuo 249 della proteina p53 nel carcinoma epatocellulare; l'esposizione al fumo di sigaretta provoca trasversioni da G:C a T:A nei carcinomi del polmone, della testa e del collo.



CJ Brown. *Nat Rev Cancer* 9, 2009

**Figura 5. Siti della sequenza del gene *TP53* preferenzialmente interessati dalle mutazioni.** La maggior parte delle mutazioni inattivanti ricade all'interno del dominio di legame con il DNA (DBD), mentre il dominio di transattivazione è relativamente libero da mutazioni. Le mutazioni rappresentate in giallo (R248; R273) interessano i punti di contatto con il DNA; quelle in azzurro (G245; R249) causano distorsioni locali della struttura proteica di p53 e quelle in blu (R175; R282) eventi di denaturazione globali.

Gli effetti fenotipici delle mutazioni del gene *TP53* possono sostanzialmente essere classificati in tre gruppi non mutualmente esclusivi. Al primo gruppo appartiene la maggior parte delle mutazioni di *TP53* osservate nei tumori umani; tali mutazioni sono caratterizzate dalla capacità di abrogare o attenuare l'efficienza di legame di p53 al DNA e, di conseguenza,

impediscono la regolazione dei promotori genici attivati dalla proteina p53. In genetica, tali mutazioni sono definite “ipomorfiche” o “amorfiche”, a seconda che causino una parziale o totale perdita di funzione. La perdita di funzione è frequente tra le mutazioni missenso, sebbene sia particolarmente rilevante nel caso di mutazioni nonsense, troncanti o di splicing, così come nel caso delle delezioni. Il secondo gruppo comprende quelle mutazioni che causano la produzione di una proteina con effetto dominante-negativo (DN), ovvero in grado di inibire, a svariati livelli, la funzione della proteina normale prodotta dall’allele “wild type”. Questo effetto DN “antimorfico” può essere ottenuto grazie alla capacità della proteina mutata di formare con il prodotto “wild type” etero-oligomeri inattivi o difettivi funzionalmente, incapaci cioè di attivare la trascrizione dei geni bersaglio di p53 [62]. La fosfoproteina nucleare p53 agisce, infatti, solo dopo avere formato complessi oligomerici (omotetrameri). Se tali complessi sono costituiti, anche parzialmente, da una proteina p53 alterata in siti critici della molecola, la loro capacità di interagire con il DNA risulta compromessa e le specifiche funzioni sopresse. E' quindi sufficiente che una sola copia del gene *TP53* subisca una mutazione perché il suo prodotto, interagendo con quello dell'allele normale, formi omotetrameri a scarsa affinità per il DNA. L’osservazione, tuttavia, che nella maggior parte dei tipi cellulari tumorali con mutazioni nel gene *TP53* venga perso anche l’altro allele “wild type”, sembra indicare che le mutazioni dominanti negative siano in realtà piuttosto rare. Infine, al terzo gruppo appartengono quelle mutazioni di *TP53*, solitamente di natura missenso, caratterizzate dall’abilità di conferire alla proteina mutata, non solo la perdita della funzione soppressiva sulla crescita cellulare propria della proteina “wild type”, ma anche l’acquisto di nuove funzioni tumorigeniche, indipendenti dalla proteina “wild type”. Tali proprietà “neomorfiche” di guadagno di funzione (GOF) sono di natura oncogenica dominante e possono essere dimostrate sperimentalmente in assenza della proteina p53 funzionale, overesprimendo, ad esempio, in cellule *TP53*<sup>-/-</sup>, una forma mutata di p53 con presunte proprietà GOF [63-65]. Si ritiene che la maggior parte di tali proprietà dipenda dall’abilità della forma mutata di p53 di interagire con proteine cellulari, come i fattori trascrizionali, alterandone la normale attività. Sebbene quindi la maggior parte delle mutazioni di *TP53* causi una perdita della capacità di transattivazione dei geni target, la modulazione della trascrizione genica rappresenta uno dei principali meccanismi GOF della proteina mutante. Ad esempio, le mutazioni di *TP53* sono spesso associate a resistenza ai farmaci in svariate neoplasie. Tale fenomeno sembrerebbe dipendere in parte dall’attivazione trascrizionale, da parte della proteina p53 mutata, del gene *MDR1*, codificante un fattore coinvolto nella resistenza multifarmaco [66]. A partire dalla dimostrazione del controllo della

trascrizione genica di *MDR1*, numerosi altri geni sono stati identificati quali target della forma mutata di p53. La maggior parte di tali geni manca della sequenza consenso di legame al DNA per p53, per cui è stato ipotizzato che i mutanti di p53, sebbene difettivi nel legame sequenza-specifico al DNA, mantengano l'abilità di legare ad alta affinità specifiche strutture genomiche ricche in elementi ripetuti [67]. Tra le altre proprietà oncogeniche della forma mutata di p53, coinvolte nel controllo della trascrizione genica, va menzionata anche l'abilità di interagire con fattori trascrizionali sequenza-specifici. Alcuni mutanti di p53 sono, ad esempio, in grado di legare e inattivare gli altri membri della sua famiglia proteica, p63 e p73, con inibizione della loro capacità di indurre il blocco del ciclo cellulare [68]. Infine, dati recenti implicano la forma mutata di p53 nel controllo dell'espressione dei geni coinvolti nei fenomeni infiammatori, come quelli codificanti citochine, chemochine e modulatori della matrice extracellulare. In realtà, esistono anche forme di GOF indipendenti dalla modulazione della trascrizione genica. E' stato dimostrato che i mutanti p53<sup>R248W</sup> e p53<sup>R273H</sup> sono in grado di legare MRE11, un componente a monte della via di risposta al danno a carico del DNA ATM-dipendente, con conseguente inibizione del riparo di rotture a doppio filamento del DNA [69]. Tale evento non solo giustificherebbe l'associazione tra la forma mutata di p53 e l'instabilità cromosomica dei tumori umani, ma avrebbe importanti implicazioni cliniche, probabilmente favorendo la produzione di cloni neoplastici resistenti a quegli agenti terapeutici che agiscono inducendo rotture a doppio filamento a carico del DNA [70].

Le forme mutate di p53 presentano, ad ogni modo, alcune caratteristiche generali che le contraddistinguono dalla proteina "wild type". In particolare, hanno un tempo di emivita molto maggiore e pertanto una concentrazione intracellulare molto più elevata a livello basale, di conseguenza, la rilevazione immunoistochimica di p53 nelle cellule tumorali indica solitamente la presenza di mutazioni missenso e può garantire informazioni prognostiche predittive; hanno, inoltre, una conformazione diversa e quindi espongono epitopi non presenti nella conformazione "wild type". La capacità di accumulo intracellulare della forma mutata di p53 sembra dipendere dalla sua impossibilità di transattivare il gene codificante *MDM2* che, normalmente, controlla i livelli di p53 inducendone la degradazione attraverso la via del proteasoma [71]. In realtà, è stato recentemente dimostrato che le mutazioni missenso inattivanti sono insufficienti, da sole, a causare l'accumulo della proteina mutata e che, con molta probabilità, eventi addizionali sono richiesti, durante la tumorigenesi, per garantire tale effetto. Questo spiegherebbe il perché la proteina p53 mutata non si accumula in cellule sane di pazienti affetti dalla sindrome di Li-Fraumeni, ma solo in cellule tumorali dello stesso soggetto [72]. Esistono inoltre anche meccanismi di accumulo MDM2-indipendenti; alcune

forme mutate, ad esempio, pur mantenendo la proprietà di legare MDM2 caratteristica della proteina “wild-type”, sono resistenti all’ubiquitinazione mediata da MDM2; altre forme mutate possono essere invece stabilizzate dall’interazione con fattori quali PTEN o le “heat shock proteins” Hsp90 e 70, che ne prevengono la degradazione dopo ubiquitinazione [73].

L’accumulo della proteina mutata diventa, quindi, il presupposto per favorire la sua attività DN e/o GOF, come dimostrato in diversi modelli sperimentali sia *in vitro* che *in vivo*. In cellule embrionali murine derivate da un topo knock-in per una forma mutata di p53, all’accumulo della proteina consegue infatti un incremento nel tasso di crescita; una ridotta inibizione da contatto della crescita e un’augmentata abilità di cooperazione con l’oncogene *Ras* [74]. E’ ancora oggetto di dibattito quale proprietà della forma mutata di p53 sia preferenzialmente selezionata durante lo sviluppo tumorale: la perdita di funzione, l’acquisto di proprietà dominanti negative, il guadagno di nuove funzioni oncogeniche o addirittura una combinazione di tutte e tre le caratteristiche sopraelencate. Ad ogni modo, la natura della mutazione, la sua estensione all’interno della popolazione neoplastica, la capacità di formare oligomeri e la localizzazione cellulare della proteina, sono tutti fattori che influenzano la capacità trasformante delle forme mutanti di p53. La conoscenza quindi del tipo e numero di mutazioni che riguardano il gene *TP53*, del loro effetto e della specifica relazione tra mutazione ed esposizione ad un particolare carcinogeno assumono un grande interesse, perché permettono di identificare tra i soggetti sani le persone ad alto rischio per lo sviluppo di una neoplasia, e possono permettere di ottenere, in questo modo, una diagnosi precoce che dovrebbe consentire un miglioramento dell’approccio terapeutico alla malattia. Inoltre mutazioni di questo genere potrebbero avere diverse e specifiche connotazioni prognostiche e terapeutiche nelle varie forme neoplastiche in campo clinico.

### *1.2.2 Impatto dello stato del gene TP53 sulla prognosi tumorale*

Dati iniziali piuttosto inconsistenti, relativi all’associazione tra la presenza di mutazioni a carico del gene *TP53* e la sopravvivenza o la risposta alla terapia, hanno condotto ad un dibattito circa il ruolo prognostico e predittivo dello stato di *TP53* nelle diverse forme tumorali, ritardando, di conseguenza, l’introduzione della valutazione dello stato di tale gene in ambito clinico [75]. Una delle ragioni principali di tale inconsistenza è rappresentata dall’impiego, nella maggior parte degli studi effettuati sino a poco tempo fa, della rilevazione immunocitochimica (ICC) dell’accumulo intracellulare della proteina p53 mutata. Infatti, l’assegnazione indiretta dello stato del gene *TP53* mediante il solo impiego dell’ICC risulta spesso inaccurata, dal momento che in molti tumori caratterizzati dalla presenza di mutazioni

di *TP53* non si osserva un accumulo intracellulare della proteina; questo risulta particolarmente vero nel caso di mutazioni frameshift, nonsense e di splicing. Inoltre, non tutti i tumori con mutazioni missenso di *TP53* appaiono ICC positivi; alcuni tumori accumulano la forma “wild-type” di p53 a causa della persistenza di segnali di stress e infine, altre forme tumorali inattivano la funzione della proteina normale attraverso meccanismi indipendenti da eventi mutazionali come l’amplificazione di *MDM2* o la deregolazione di altri componenti a monte o a valle della via di p53 [76]. A complicare ulteriormente il quadro, la mancanza di protocolli standard e di cut-off univoci di rilevamento dell’accumulo della proteina mutata. Più recentemente, grazie all’introduzione di metodiche di sequenziamento genico, è stato possibile ottenere una valutazione più accurata dello stato di *TP53* e, di conseguenza, un’associazione maggiormente affidabile tra mutazioni di *TP53* e caratteristiche cliniche della malattia tumorale, con la tendenza generale ad associare tali alterazioni a ridotta sopravvivenza, ridotto intervallo di malattia libero dal trattamento e scarsa risposta terapeutica. In realtà, in neoplasie coinvolgenti il seno, il collo, l’intestino ed il sistema emopoietico, il 65-90% degli studi riscontra un’associazione tra mutazioni del gene *TP53* e prognosi avversa, mentre nei tumori polmonari o ovarici tale correlazione risulta meno chiara. Ad ogni modo, una combinazione di ICC e sequenziamento genico potrebbe rappresentare un migliore strumento diagnostico; è stato infatti dimostrato che mutanti del gene *TP53* ICC<sup>+</sup> hanno una prognosi peggiore dei mutanti di *TP53* ICC<sup>-</sup> [77]. Inoltre, per una fine correlazione delle disfunzioni di p53 alla prognosi tumorale, diviene necessario non solo il rilevamento di mutazioni a carico del gene *TP53*, ma anche un attento esame degli effetti delle singole mutazioni sulla struttura e/o funzione della proteina, che a loro volta dipendono dall’esone o dal dominio funzionale interessato e dallo specifico residuo mutato, quindi un’analisi dello stato di addizionali oncosoppressori ed oncogeni regolatori o mediatori della via di p53. Nell’ambito di uno studio su larga scala comprendente 1749 pazienti affetti da tumore al seno è stato, ad esempio, dimostrato non solo che mutazioni missenso del gene *TP53* a livello della regione del DBD sono associate a prognosi peggiore rispetto a mutazioni missenso che ricadono all’esterno del DBD, ma anche che nell’insieme delle mutazioni missenso, alcune risultano più aggressive di altre e che, infine, pazienti caratterizzati da mutazioni troncanti o nonsense presentano solitamente una prognosi più infausta [78].

Lo stato del gene *TP53* deve essere quindi considerato non come una variabile binaria, ma un insieme multi-parametrico di dati, affinché la sua analisi possa acquisire un valore reale nella pratica clinica tanto per la diagnosi tumorale precoce, il rilevamento della recidiva, la valutazione della prognosi e la predizione della resistenza alla terapia antineoplastica quanto

per il disegno di innovative strategie terapeutiche finalizzate al ripristino dell'attività della proteina mutata disfunzionale.

### *1.2.3 Ripristino della funzionalità della proteina p53 nei tumori umani*

Considerando l'elevata frequenza di alterazioni molecolari e funzionali a carico dell'oncosoppressore p53 nei tumori umani, il ripristino della sua normale attività continua a rappresentare una delle ambizioni primarie nell'ambito delle terapie antineoplastiche. Naturalmente, il potenziale di tale approccio è strettamente correlato alla natura della proteina p53 endogena. Infatti, a causa della ridondanza funzionale dei componenti a monte e a valle della via di p53, mentre una metà delle forme tumorali si caratterizza per l'inattivazione funzionale diretta della proteina, a causa della presenza di mutazioni a carico del gene *TP53*, nella restante metà l'inattivazione della proteina è una conseguenza indiretta dell'alterazione di molecole coinvolte nel controllo o nella mediazione della sua attività. E' stato ipotizzato che le proprietà pro-sopravvivenza di p53, facilitando il recupero di cellule danneggiate o in condizioni transienti di stress, possano favorire il mantenimento della sua integrità e ridirigere la pressione selettiva nei confronti di altri target della via di p53. Questo potrebbe significare che le cellule tumorali sono, almeno all'inizio, maggiormente dipendenti dalle funzioni di p53 rispetto alla loro controparte normale, almeno fino a che mutazioni oncogeniche addizionali non fanno perdere qualsiasi tipo di competenza omeostatica. Alternativamente, p53 potrebbe essere selezionata per una perdita parziale di attività, con mantenimento delle funzioni vantaggiose per la crescita tumorale, ed acquisire nuove proprietà oncogeniche quando, ad esempio, indotta da segnali di stress. Tutti questi elementi che dipendono, ovviamente, dal tessuto e dalla linea cellulare interessati e riflettono la vulnerabilità degli elementi genetici in relazione al loro grado di espressione o stato cromatinico, influenzano la diversità dei meccanismi di inattivazione della proteina p53 nelle patologie tumorali [79].

Nell'ambito delle forme tumorali caratterizzate dalla presenza della proteina p53 "wild-type", numerosi studi si sono focalizzati sull'identificazione di piccole molecole o peptidi in grado di proteggere p53 dall'attività del suo inibitore cellulare, MDM2. Infatti, l'inattivazione di p53 ottenuta attraverso l'overespressione di MDM2, evento conseguente, nella maggior parte dei casi, all'amplificazione del segmento cromosomico su cui mappa tale gene, è molto frequente nei tumori umani. Molteplici studi hanno permesso di validare MDM2 quale target terapeutico; è stato ad esempio dimostrato, in sistemi murini caratterizzati da bassi livelli di espressione di MDM2 a causa della presenza di un allele ipomorfo del suo gene, che minime riduzioni nei livelli di tale proteina bastano a garantire un incremento di attività della

forma “wild-type” di p53 [80]. I primi antagonisti di MDM2 con attività *in vivo* identificati sono rappresentati dalle “Nutline”, una serie di molecole derivate da composti di cis-imidazolina. Le “Nutline” agiscono legando il sito di interazione per p53 presente all’interno di MDM2 attraverso una modalità che mima le interazioni molecolari tra MDM2 ed una serie di residui aminoacidici cruciali della proteina p53 [81]. In questo modo, le “Nutline” impediscono il riconoscimento di p53 da parte del suo inibitore per cui la proteina non viene ubiquitinata e degradata attraverso la via del proteasoma ma si accumula con conseguente aumento dei livelli intracellulari ed attivazione dei target trascrizionali. Le “Nutline”, di cui “Nutlin-3” rappresenta il prototipo, agiscono in modo altamente specifico ed indipendente dalla stabilizzazione di p53 associata all’induzione di un danno a carico del DNA e la loro efficacia è stata dimostrata in diversi modelli sperimentali. Cellule cancerose proliferanti che esprimono la proteina p53 “wild-type” sono efficacemente arrestate in fase G1 e G2 del ciclo o vanno incontro ad apoptosi se trattate con concentrazioni micromolari di “Nutline”; questo implica che la tipologia cellulare influenza l’induzione di una risposta differenziale sebbene i meccanismi molecolari alla base di tale differenza siano ancora oggetto di studio [82].

In realtà, nonostante vi siano risultati promettenti relativamente all’uso degli inibitori di MDM2, bisogna ricordare le potenziali problematiche correlate alla scelta dell’interazione MDM2-p53 come target terapeutico. In primo luogo, MDM2 viene indotto dall’attivazione di p53 come parte di un meccanismo di feedback negativo di regolazione, di conseguenza farmaci come “Nutlin-3” causerebbero un’induzione del loro stesso target, con limitazione dell’efficacia medica; in secondo luogo le molecole sinora prodotte appaiono inefficaci nell’inibizione di MdmX che ha un’attività sovrapponibile a quella di MDM2 e risulta allo stesso modo overespresso in una vasta quantità di forme tumorali.

Approcci differenti sono stati invece identificati per la riattivazione della funzione di p53 nelle cellule tumorali caratterizzate dalla presenza di forme mutate della proteina. Tali approcci sono resi possibili grazie all’osservazione che le mutazioni a carico di *TP53* cadono nella maggior parte dei casi nei siti “hot spots” all’interno del DBD, il loro effetto è reversibile e tali mutazioni causano solitamente la stabilizzazione e l’accumulo di p53 nelle cellule tumorali, al contrario di quanto accade per altri oncosoppressori (pRB e p16) la cui inattivazione si realizza tramite una riduzione dell’espressione. La ricostituzione della corretta funzionalità di p53 permetterebbe l’eliminazione delle cellule tumorali, andando a ristabilire i programmi di riparo e/o garantendo l’eliminazione delle cellule il cui DNA risulta danneggiato [83]. Il presupposto di tali approcci è rappresentato dal ripristino della conformazione normale di p53 e quindi della sua capacità di legame al DNA, mediante



“correzione chimica”. Infatti, sebbene le mutazioni a carico del gene *TP53* siano da sole insufficienti ad indurre lo sviluppo tumorale, la conversione della forma mutata di p53 in “wild-type” può rivelarsi costrittiva nei confronti della crescita, forse a causa dei livelli anormalmente elevati di tale proteina e dei continui segnali attivatori che permeano le cellule neoplastiche. E’ noto che il dominio centrale di p53 è piuttosto instabile, con un’emivita media di 9 minuti a temperatura corporea. Le mutazioni del gene *TP53* causano solitamente un’ulteriore destabilizzazione termica della proteina a temperatura corporea quindi, sulla base della dimostrazione che i processi di unfolding e/o misfolding del dominio centrale delle forme mutanti di p53 non sono irreversibili e che la loro gravità varia tra le diverse forme mutanti per cui una sostanza capace di legarsi alla frazione correttamente foldata può spostare l’equilibrio verso il folding nativo, una serie di studi sono stati condotti per l’identificazione di molecole capaci di stabilizzare la forma mutata di p53 nella sua conformazione biologica [84]. A tale proposito, le estremità C- ed N-terminale rappresentano dei target idonei, nota la loro capacità di influenzare e regolare il legame del DBD di p53 al DNA. I primi risultati hanno portato alla realizzazione di anticorpi, come pAb421, in grado di legare la porzione C-terminale di p53 ed aumentare la resistenza del dominio centrale alla denaturazione termica. È stato quindi dimostrato che un peptide sintetico derivato dal dominio C-terminale di p53, il peptide 46, può ripristinare il corretto legame al DNA e la funzione di transattivazione trascrizionale di un certo numero di proteine p53 mutanti e che il recupero della funzione delle proteine p53 endogene mutate risulta nell’inibizione della crescita cellulare e nell’induzione dell’apoptosi. È stato ipotizzato che i peptidi derivanti dall’estremità C-terminale di p53 siano in grado di riattivare le forme di p53 mutate attraverso la stabilizzazione del folding del dominio core e/o stabilendo nuovi contatti col DNA [85]. La stabilizzazione del dominio centrale di p53 può essere altresì mediata dal legame a chaperoni cellulari. La proteina p53 può legarsi a Hsp40, Hsp70 e Hsp90. Le forme mutate di p53 si legano a Hsp70 con un’affinità maggiore della forma “wild-type”. Le proteine Hsp stabilizzano p53 nella sua conformazione “unfolded”; la distruzione del loro legame alla forma mutata di p53 consente il recupero della conformazione di p53 [86]. Sono state inoltre identificate, grazie allo screening di librerie di piccole molecole, sostanze di natura non peptidica in grado di ripristinare l’attività dei mutanti di p53. Tra queste, CP-31398 ha dimostrato la capacità di indurre arresto del ciclo cellulare ed apoptosi p53-dipendente sia *in vitro* che *in vivo* in modelli murini atimici e modelli murini di cancro [87]. Il suo meccanismo di azione rimane tuttora ignoto. Gli studi tramite MNR non hanno rilevato nessun legame tra la molecola e il dominio centrale di p53. E’ stato supposto che CP-31398 agisca aumentando i

livelli dalla proteina p53 “wild-type” nelle cellule, prevenendone l’ubiquitinazione. Mediante l’utilizzo di approcci basati sull’impiego di sistemi cellulari è stato invece identificato un composto, noto con il termine di “PRIMA-1” (p53 reactivation and initiation of massive apoptosis), efficace nella riattivazione della transattivazione dei geni target in cellule caratterizzate dalla forma mutata di p53, secondo un meccanismo dipendente dall’induzione dell’espressione della proteina Hsp90 e dall’attivazione della via della chinasi JNK (Jun-NH2-kinase) [88]. Infine, sono state proposte anche strategie di terapia genica finalizzata all’introduzione di copie extra del gene *TP53*; all’induzione dell’espressione selettiva di geni killer nelle cellule contenenti copie di p53 non funzionali o all’utilizzo di virus replicazione-difettivi che possano propagarsi nelle cellule p53-deficienti. Tuttavia, l’assenza di un efficiente “sistema di consegna e distribuzione” ha precluso, almeno finora, gli approcci mirati ad una somministrazione sistemica.

La pleora di composti attivi identificati si dimostra tuttavia inutilizzabile nella pratica clinica, per problemi legati sia alla tossicità che alla reale efficacia. L’ulteriore accumulo di informazioni riguardo la struttura di p53 e il miglioramento delle tecniche di screening e sviluppo di nuovi farmaci diventano quindi necessari per la sperimentazione di molecole innovative sempre più efficaci e meno tossiche.

### **1.3 Meccanismi di deregolazione della via di p53 in pazienti affetti da LLC**

L’importanza dello studio dei meccanismi di deregolazione nei componenti della via di p53 nell’ambito della LLC è emersa sostanzialmente grazie alla dimostrazione della differenza fondamentale del decorso clinico dei pazienti caratterizzati dalla delezione del braccio corto del cromosoma 17 (del17p13). La del17p13 viene riscontrata nel 5-7% dei pazienti in fase precoce di malattia e nel 25-40% dei pazienti affetti da LLC in stadio avanzato. Tali pazienti presentano, al contrario della maggior parte dei soggetti affetti da LLC, una prognosi altamente infausta, contraddistinta da rapida progressione di malattia, resistenza o refrattarietà al trattamento chemioterapico e sopravvivenza media da 2 a 3 anni dalla diagnosi [89]. La cattiva prognosi associata alla del17p13 è legata all’evidenza che il gene *TP53* mappa sul braccio corto del cromosoma 17 e che delezioni di questo cromosoma interessano nella quasi totalità dei casi il suddetto gene [90]. Inoltre, nella maggior parte dei pazienti caratterizzati dalla del17p13 (del17p13<sup>+</sup>), l’inattivazione del rimanente allele del gene *TP53* attraverso meccanismi mutageni, contribuisce in modo fondamentale all’avversità della prognosi. E’ importante poi sottolineare come la del17p13 non si presenti quasi mai come unica

aberrazione cromosomica all'interno delle cellule tumorali. Uno studio del profilo genomico dei pazienti affetti da LLC del17p13<sup>+</sup> ha, infatti, rivelato che la presenza della suddetta delezione si associa solitamente a un cariotipo complesso, caratterizzato dalla comparsa di anomalie citogenetiche addizionali come la del13q14, che interessa il locus codificante i miR15 e 16; la trisomia 12 e, sebbene in minor percentuale, le alterazioni a carico delle regioni cromosomiche 8p, 9q, 2p e 3q. In particolare, la del8p21-p23, interessando il locus dell'oncosoppressore TRAIL1/2, sembrerebbe essere associata a resistenza al Nutlin-3, un farmaco impiegato nelle patologie neoplastiche con alterazioni della via di p53 causate da aberrante attività di MDM2, la cui azione apoptotica nelle cellule di LLC è TRAIL2-dipendente [91]. La del17p13 rappresenterebbe, quindi, un marcatore di cellule caratterizzate da un genoma instabile, incline all'acquisizione di lesioni genetiche e all'evoluzione clonale. E' stato dimostrato, in due diversi studi prospettici, che la comparsa della del17p13 in pazienti affetti da LLC è in grado di predire una riduzione del tasso di risposta alla terapia convenzionale a base di analoghi purinici ed una riduzione della sopravvivenza media [92]. Tali effetti risultano, inoltre, nell'ambito di tali studi, strettamente correlati al dosaggio della del17p13, in quanto pazienti caratterizzati dalla presenza del 5-20% di cellule nucleate delete mostrano una prognosi simile a pazienti non deleti (del17p13<sup>-</sup>), mentre pazienti con una percentuale di delezione superiore al 20 presentano una prognosi infausta, con tasso di risposta terapeutica del 13% e sopravvivenza media di soli 11 mesi [93].

In realtà, la maggior parte degli studi relativi al decorso clinico dei pazienti del17p13<sup>+</sup> affetti da LLC è stata condotta esaminando soggetti con malattia progressiva destinati ad essere inclusi in protocolli terapeutici di prima linea o precedentemente sottoposti a terapia antitumorale. A tal proposito le osservazioni riportate, nonostante la loro importanza sia ormai consolidata, non garantiscono la comprensione degli effetti relativi alla presenza della delezione al momento della diagnosi piuttosto che durante il follow-up del paziente. La scarsità di dati in tale ambito deriva essenzialmente dalla difficoltà di osservare pazienti affetti da LLC del17p13<sup>+</sup> asintomatici e in stadi precoci di malattia. E' stato, infatti, osservato che le anomalie citogenetiche sono normalmente acquisite durante il decorso della malattia neoplastica, per cui la del17p13 costituisce frequentemente un evento secondario.

Un recente studio è stato condotto al fine di comprendere la valenza prognostica della presenza della del17p13 in pazienti affetti da LLC non progressiva, non esposti a terapia. Dai risultati del suddetto studio è emerso che circa il 50% dei soggetti con del17p13 "de novo" sviluppa una malattia progressiva che richiede terapia entro 12-18 mesi dalla diagnosi, mentre la restante metà è caratterizzata da una malattia relativamente stabile che non necessita di

terapia ad un follow-up di 70 mesi [94]. Queste osservazioni sottolineano l'importanza che assume il momento in cui la delezione viene acquisita dal paziente nel determinare le implicazioni cliniche ad essa correlate e sostengono la possibilità di una associazione non assoluta tra presenza della del17p13 e avversità della prognosi. Di conseguenza, data l'eterogeneità del decorso clinico dei pazienti con del17p13 "de novo", risulta indispensabile evitare di sottoporre i suddetti pazienti a un approccio terapeutico differente, esclusivamente sulla base della presenza della delezione. La sopravvivenza dovrebbe, in tal caso, essere predetta attraverso la valutazione di ulteriori parametri sia clinici che biologici. Diventa ad esempio di grande interesse, dal momento che la prognosi avversa della del17p13 è solitamente correlata ai suoi effetti sulla via di p53, valutare se i pazienti con LLC del17p13<sup>+</sup> apparentemente benigna sono caratterizzati dall'allele non deletato del gene *TP53* "wild-type" o da una normale funzione della proteina, entrambi fattori che permetterebbero di giustificare l'andamento favorevole della malattia in tale sottogruppo. Infatti, nonostante sia stata osservata una frequente associazione tra la presenza della del17p13 e la comparsa di mutazioni a carico del gene *TP53* sull'allele non deletato, è stato tuttavia riscontrato un numero minore di casi di LLC in cui la delezione non risulta associata a tali mutazioni (0.8% dei casi) o viceversa, l'acquisizione delle mutazioni di *TP53* risulta indipendente dalla del17p13 (4.5% dei casi) [95].

Sebbene la presenza di mutazioni a carico del gene *TP53* nei pazienti affetti da LLC sia nota sin dalla fine degli anni '90, il suo preciso significato prognostico, in particolare nei casi in cui non si associa alla del17p13, è meno chiaro. La sua comprensione diventa di grande rilevanza clinica se si considera che il gene *TP53* risulta mutato nel 5-40% dei pazienti affetti da LLC, con una incidenza del 5-10% alla diagnosi, in soggetti non trattati, e del 25-40% in fase di progressione di malattia o nei casi di LLC resistenti alla chemioterapia a base di analoghi purinici o agenti alchilanti [96]. Inoltre, da un punto di vista clinico, identificare la presenza di mutazioni a carico del gene *TP53* come fattore prognostico indipendente, permetterebbe di chiarire, come nel caso della del17p13 e indipendentemente da essa, il suo ruolo nella predizione dell'aggressività della malattia e nella resistenza o refrattarietà ai regimi terapeutici convenzionali. Diversi studi sono stati intrapresi per comprendere se le mutazioni del gene *TP53* in assenza della del17p13 conferiscono lo stesso profilo biologico, le stesse caratteristiche cliniche e la stessa prognosi delle mutazioni di *TP53* associate a delezione e i primi risultati sembrano confermare tale ipotesi [Figura 6] [97].



anche in altre forme di neoplasie umane, il 95% delle mutazioni di *TP53* identificate in pazienti affetti da LLC cade nel DBD della proteina. Sono, infatti, principalmente interessati gli esoni 5-8. Si tratta, nella maggior parte dei casi, di mutazioni missenso sebbene siano state identificate anche mutazioni nonsense, mutazioni di splicing e microdelezioni o microinserzioni che comportano uno slittamento della cornice di lettura del codice genetico. Sono inoltre maggiormente frequenti le transizioni piuttosto che le trasversioni. Tali risultati sono stati confermati anche da altri studi paralleli. Un gruppo di ricerca tedesco ha dimostrato che l'inattivazione monoallelica di *TP53* nella LLC si associa a prognosi infausta e, in particolare, all'evoluzione clonale della malattia osservata in termini di aumento della taglia della popolazione tumorale mutata. Inoltre, l'analisi dei pazienti refrattari alla Fludarabina, che appaiono caratterizzati da un'elevata incidenza di mutazioni a carico di *TP53* in assenza di delezione (18% pazienti refrattari vs 4.5% pazienti non trattati), suggerisce l'impatto determinante della terapia nella selezione dei subcloni mutati, sottolineando la correlazione tra mutazioni e chemioresistenza [99]. Infine, è stata recentemente osservata una correlazione tra l'incidenza delle mutazioni del gene *TP53* in pazienti affetti da LLC e lo sviluppo di un cariotipo complesso e aberrante ( $\geq 3$  aberrazioni cromosomiche), che potrebbe contribuire a spiegare l'impatto il significato prognostico negativo di tali mutazioni.

Nonostante la dimostrazione della correlazione tra la presenza di mutazioni del gene *TP53* e la prognosi infausta nei pazienti affetti da LLC, è necessario comunque considerare l'esistenza di una considerevole variabilità nella sopravvivenza nei pazienti. Tale variabilità riflette sostanzialmente la taglia del clone *TP53* mutato, il sito e il tipo di mutazione e la funzione della proteina mutata. Risulta inoltre indispensabile la valutazione della correlazione delle mutazioni agli altri fattori prognostici, sia clinici che biologici. Le correnti guide linea diagnostiche suggeriscono tuttavia di studiare i pazienti affetti da LLC per la presenza della del17p13 ma non delle mutazioni di *TP53* [100]. Di conseguenza, i soggetti caratterizzati da mutazioni di *TP53* indipendenti dalla del17p13 non possono essere riconosciuti al momento della diagnosi e rischiano di essere sottoposti a una terapia non idonea. Noto quindi il significato prognostico indipendente delle mutazioni del gene *TP53*, l'introduzione dello screening di tutte le diverse anomalie genetiche a suo carico nei pazienti con diagnosi di LLC, assume un'importanza primaria per il miglioramento della pratica clinica.

In realtà, è necessario ricordare che la via di p53 può risultare alterata a molteplici livelli a causa di potenziali eventi addizionali che escludono la del17p13 o le mutazioni a carico del gene *TP53*. In primo luogo sono stati identificati alcuni polimorfismi nella sequenza di *TP53* con impatto sull'attività biologica della proteina. In particolare, due forme polimorfe del gene

*TP53* sono ampiamente distribuite nella popolazione umana. Esse codificano per un'arginina o una prolina in posizione 72 all'interno della regione codificante il dominio ricco in proline della sequenza genica di *TP53* [101]. E' stato dimostrato che la presenza dell'una o dell'altra forma influenza la struttura primaria della proteina p53 e, di conseguenza, la sua attività trascrizionale e la sua capacità di induzione del processo apoptotico. In particolare, la forma Arg72 di p53 è caratterizzata da un'inferiore capacità di transattivazione genica ma da una maggiore attività pro-apoptica. Questo sembra dipendere dalla sua superiore abilità di localizzazione mitocondriale, conseguenza della maggiore suscettibilità al legame e all'ubiquitinazione da parte di MDM2, evento che ne comporta l'esporto nucleare [102]. E' stato ipotizzato che le differenze biologiche correlate a tale polimorfismo possano avere importanti implicazioni nel rischio allo sviluppo del cancro o nell'influenzare la prognosi nei casi di perdita mono- o bi-allelica del gene *TP53*. Inoltre, il polimorfismo del codone 72 potrebbe alterare la sensibilità delle neoplasie agli agenti chemioterapici; si potrebbe ad esempio predire che l'omozigosi dell'allele codificante la forma Arg72 di p53 risponda in misura maggiore alle radiazioni o alla chemioterapia. Sono state inoltre osservate alterazioni a carico di componenti sia a monte che a valle della via di p53 con effetti paragonabili a quelli conseguenti le mutazioni del gene *TP53*. In particolare, in pazienti affetti da LLC, le alterazioni a carico del gene ATM rappresentano una potenziale causa di disfunzioni della proteina p53. Ridotti livelli di ATM sono stati riscontrati nel 30-40% dei pazienti e mutazioni del suo gene sono state osservate in una sostanziale proporzione di casi [103]. Inoltre, circa il 20% dei soggetti affetti da LLC presenta la delezione della regione 11q22-23 su cui mappa il gene ATM, che, in una buona percentuale dei casi, è associata alla mutazione del rimanente allele. Altri meccanismi di deregolazione della via di p53 nella LLC sono rappresentati dai difetti a carico del gene MDM2, correlati a eventi di amplificazione genica o alla presenza di polimorfismi; difetti funzionali nell'induzione di p21 ed alterazioni dell'espressione del miR34-a. Il miglioramento della prognosi dei pazienti di LLC con mutazioni a carico del gene *TP53* o disfunzioni nella via di p53 rimane quindi strettamente correlato alla corretta identificazione di coloro che, allo stesso modo dei pazienti del17p13<sup>+</sup>, non beneficerebbero di un'intensa chemioterapia a base di farmaci citotossici standard che agiscono attraverso p53, come gli agenti alchilanti e gli analoghi purinici. Tali pazienti dovrebbero essere candidati a terapie alternative non convenzionali, come l'inclusione in protocolli clinici che studiano l'attività di farmaci con meccanismi d'azione indipendenti dalla via apoptotica p53-dipendente, di cui esempi sono il Flavopiridolo e la Lenalidomide; terapie a base di anticorpi monoclonali come l'Alemtuzumab e trapianto di cellule staminali emopoietiche.

#### **1.4 Scopo del progetto di ricerca**

La LLC è una patologia caratterizzata da un decorso clinico altamente variabile. Parte di questa variabilità può essere attribuita alla proteina oncosoppressoria p53. I difetti del gene *TP53* nella LLC sono fortemente associati a progressione di malattia, resistenza alla chemioterapia ed accorciamento dell'aspettativa di sopravvivenza. Nonostante l'osservazione di tale correlazione, esiste, tuttavia, anche all'interno del sottogruppo di pazienti affetti da LLC caratterizzati da mutazioni nel gene *TP53*, una considerevole variabilità prognostica che incide sull'indice di sopravvivenza. Tale variabilità riflette sostanzialmente la taglia del clone *TP53* mutato, il profilo mutazionale in termini di sito e tipologia di mutazione e la funzione della proteina mutata. A complicare poi ulteriormente la comprensione della variabilità del decorso clinico dei pazienti affetti da LLC correlata all'oncosoppressore p53, vi è la possibilità di osservare anomalie funzionali della proteina indipendenti dalla presenza di mutazioni a carico del gene *TP53*.

In tale contesto si inserisce il presente progetto di ricerca incentrato sullo studio della funzionalità di p53 in pazienti affetti da LLC, nel tentativo sia di identificare l'eventuale presenza di una correlazione tra l'attività della proteina p53 e le caratteristiche molecolari del gene *TP53*, che di predire la risposta ai chemioterapici convenzionali in pazienti non trattati o associare la risposta terapeutica alle caratteristiche funzionali di p53 in pazienti precedentemente esposti a terapia antitumorale. Sono stati inclusi nello studio pazienti affetti da LLC a diversi stadi di malattia, quali: esordio, progressione e resistenza a una o più linee di terapia convenzionale a base di farmaci citotossici. La funzionalità di p53 è stata studiata valutando, mediante Western blot, l'induzione della proteina in risposta all'esposizione dei campioni primari di cellule neoplastiche di LLC a 5 Gray di radiazioni ionizzanti (IR). Una volta esaminata la funzionalità della proteina e definite le differenti tipologie di disfunzioni, è stato effettuato un confronto tra i dati funzionali ottenuti, lo stato del gene *TP53* e le caratteristiche prognostiche dei pazienti disfunzionali. E' stata infine eseguita una valutazione della sensibilità, delle forme funzionali e disfunzionali della proteina p53 identificate, al processo apoptotico indotto dal danno subletale causato dopo esposizione dei campioni cellulari primari di LLC a IR. Il fine ultimo del suddetto studio è rappresentato dall'opportunità di esaminare il ruolo della proteina p53 nel decorso della malattia e identificare quei pazienti affetti da LLC caratterizzati da disfunzioni a carico di p53 che non potrebbero, quindi, beneficiare di un approccio terapeutico convenzionale ma dovrebbero essere indirizzati verso approcci terapeutici innovativi.



## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Pazienti e Controlli**

Nel nostro studio sono stati inclusi 87 pazienti affetti da LLC a differente stadio di malattia, seguiti presso la Sezione di Ematologia del Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia dell'Università degli studi di Roma "Sapienza". All'interno di tale coorte, 13 pazienti presentavano una malattia all'esordio, 54 pazienti risultavano caratterizzati da una malattia in progressione e 20 pazienti da una malattia resistente a una o più linee di terapia convenzionale. Il prelievo dei campioni di sangue periferico e le analisi biologiche sono stati eseguiti previo consenso informato fornito da ciascuno di loro in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. La diagnosi di LLC è stata effettuata attraverso l'identificazione, nel sangue venoso periferico (SVP) di ciascun paziente, di una quantità di linfociti superiore a  $5 \times 10^9/L$ , con una morfologia ed un profilo immunofenotipico caratteristici di LLC ( $CD5^+CD20^+CD23^+CD22^+sIg^+CD10^-$ ). Sono state effettuate nei pazienti studiati le seguenti analisi di routine: la valutazione dello stato mutazionale dei geni IgVH [104]; l'analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina ZAP-70 [105-106] e dell'antigene CD38 [107]; l'analisi FISH (ibridazione in situ fluorescente) per l'identificazione delle aberrazioni citogenetiche coinvolgenti le regioni 11q22-23, 13q14, 17p13 e la trisomia 12, ed il sequenziamento del gene *TP53* [104]. Al tempo dello studio, i pazienti all'esordio di malattia presentavano un'età media di 52 anni e una conta media di globuli bianchi (WBC) pari a  $31,704/\mu L \times 10^6$  (range  $5,790-69,870/\mu L \times 10^6$ ); i pazienti caratterizzati da una malattia in progressione, un'età media di 64 anni e un valore medio di WBC pari a  $93,566/\mu L \times 10^6$  (range  $6,200-511,400/\mu L \times 10^6$ ); infine, i pazienti caratterizzati da una malattia resistente, un'età media di 68 anni e un valore medio di WBC pari a  $97,080/\mu L \times 10^6$  (range  $12,250-610,500/\mu L \times 10^6$ ).

In qualità di controllo sono stati utilizzati, previo consenso informato, campioni di SVP prelevati da donatori sani adulti ottenuti dalla Banca del Centro Trasfusionale della stessa Università.

### **2.2 Induzione dell'attivazione della proteina oncosoppressoria p53**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti affetti da LLC a differente stadio di malattia, sono state ottenute mediante separazione su gradiente di densità (Lymphoprep; Nycomed Pharma, Oslo, Norway) e coltivate overnight a  $37^\circ C$  in atmosfera

umidificata con un tasso di CO<sub>2</sub> pari al 5%, in terreno colturale RPMI 1640 (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS, HyClone, South Logan, UT), 1% di L-glutamina (EuroClone, Europe) e 1% di Pen-Strepto (EuroClone, Europe). Quindi, al fine di indurre l'attivazione della proteina p53, un'aliquota delle cellule mononucleate è stata esposta a 5 Gray (Gy) di radiazioni ionizzanti (IR) e, successivamente, l'aliquota cellulare irradiata e le PBMC non esposte a IR sono state mantenute in coltura per ulteriori 8 e 24 h dal tempo dell'esposizione. Allo scadere della coltura, i campioni cellulari sono stati criopreservati come pellet secchi per il successivo utilizzo.

### **2.3 Valutazione dell'attivazione della proteina oncosoppressoria p53**

Allo scopo di esaminare l'induzione dell'attivazione della proteina p53 mediante Western blot, le PBMC dei pazienti in esame, conservate in pellet secchi dopo 8 e 24 h di coltura dall'esposizione a IR, sono state sottoposte a lisi diretta mediante incubazione per 30 minuti a 4°C in una soluzione contenente: Tris-HCl 2M (pH 8); EDTA 0.5M (pH 8); NaCl 5M; NaF 0.05M (pH 7.2); Sodio Ortovanadato 0.001M; 10% Triton X-100 ed 1 pasticca composta da una miscela di Inibitori delle Proteasi (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Al termine dei 30 min di incubazione, i lisati cellulari sono stati centrifugati a 14,000 rpm per 15 min e i sovranatanti, contenenti la frazione proteica purificata, sono stati raccolti. La concentrazione proteica dei sovranatanti è stata quindi determinata utilizzando il Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

A questo punto, quantità equivalenti di campioni proteici (40µg) sono state miscelate con Sample Buffer (una soluzione di Laemmli sample al 5% di 2-mercaptoetanololo; Bio-Rad Laboratories) e incubate 5 min a 95°C per la denaturazione al calore; quindi separate mediante elettroforesi su gel di Sodio Dodecil Solfato (SDS)-Poliacrilamide all'8% (10% SDS; 30% Soluzione di Poliacrilammide; Tris-HCl 1.5M pH 8.8; 10% Ammonio Persolfato, 6% TEMED). Al termine della corsa elettroforetica è stato effettuato a +4°C il trasferimento overnight dei campioni proteici su membrane di nylon PVDF (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). Dopo il recupero, le membrane sono state lavate in una soluzione di TBS 1x (1M Tris-HCl pH8 e 5M NaCl) allo 0.05% di Tween 20 (TBS-T) ed è stato effettuato il passaggio di "blocking", al fine di saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana e prevenire il legame dell'anticorpo primario alla membrana stessa. Per il blocco è stata impiegata una

soluzione di TBS-T al 5% di latte scremato. Terminato il blocco di 1 h a temperatura ambiente (TA), le membrane sono state lavate in TBS-T per poi procedere all'incubazione con l'anticorpo primario. È stato utilizzato, a tale scopo, un anticorpo monoclonale di topo diretto contro l'isoforma umana della proteina p53 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) a una diluizione 1:500 in TBS-T al 5% di latte. Le membrane sono state incubate in tale soluzione per 1 h a TA, lavate in TBS-T e incubate nuovamente per 45 min a TA con un anticorpo secondario policlonale di capra anti-topo coniugato con l'enzima perossidasi (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), diluito 1:150 in TBS-T. Al termine dell'incubazione le bande proteiche specifiche sono state visualizzate utilizzando il sistema ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Al fine di verificare se il caricamento di tutti i campioni fosse avvenuto in modo quantitativamente corretto, le membrane sono state incubate addizionalmente con un anticorpo primario monoclonale di topo diretto contro la Gliceraldeide-3-Fosfato Deidrogenasi (GAPDH; Chemicon, Millipore) e un anticorpo secondario policlonale di pecora anti-topo coniugato all'enzima perossidasi (GE Healthcare), entrambi diluiti 1:2.000.

#### **2.4 Analisi del tasso apoptotico**

Il tasso apoptotico è stato misurato sulle PBMC dei pazienti affetti da LLC, esposte e non a 5 Gy di IR, dopo 24 h di coltura. A tale scopo è stata impiegata la tecnica dell'Annexina-V, che prende il nome da una proteina in grado di legare la fosfatidilserina, un marcatore di apoptosi precoce che, all'inizio della cascata apoptotica, trasloca dalla parte interna della membrana a quella esterna.

Per la marcatura, i campioni cellulari sono stati lavati 2 volte in PBS, quindi risospesi in Binding buffer 1x (Binding buffer 10x: 100mM HEPES/NaOH pH 7.5; 1.4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>) in presenza di Annexina-V FITC e Ioduro di Propidio (IP; Immunotech Research, Quebec, Canada) entrambi alla concentrazione finale di 1 µg/ml. Lo IP è utile a marcare il DNA delle cellule necrotiche la cui membrana risulta degradata. La miscela è stata quindi incubata 10 min al buio a TA e, dopo la marcatura, la percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata mediante citometria a flusso e i dati analizzati utilizzando il software CellQuest (Becton Dickinson). La combinazione Annexina V-FITC/IP (Immunotech Research, Quebec, Canada) ha permesso la differenziazione tra: cellule vitali (Annexina<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>), cellule in fase precoce di Apoptosi (Annexina<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>), cellule in fase tardiva di Apoptosi (Annexina<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>), cellule necrotiche (Annexina<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>).

## **2.5 Analisi statistica per gli studi di apoptosi**

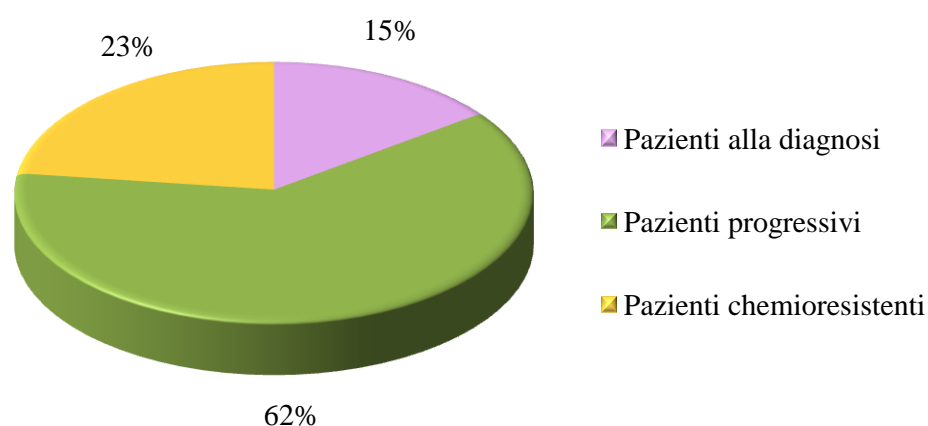
I dati sono stati analizzati statisticamente mediante l'utilizzo del metodo "Student's t test". I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Analisi della funzionalità della proteina p53 in campioni primari di cellule neoplastiche di pazienti affetti da LLC a differente stadio di malattia

Allo scopo di esaminare la funzionalità di p53, nel nostro studio è stato valutato l'effetto, sull'espressione della proteina, dell'esposizione delle PBMC di pazienti affetti da LLC a IR. I livelli della proteina p53, normalmente non rilevabili nelle cellule quiescenti, sono, infatti, soggetti a un incremento in risposta a differenti tipologie di stress cellulare, in quei casi caratterizzati da una normale funzionalità di p53. Al contrario, la presenza di alterazioni molecolari a carico del gene *TP53* o anomalie funzionali della proteina p53 indipendenti dalla presenza di tali mutazioni, comporta solitamente un prolungamento della sua emivita, con la possibilità di rilevare la proteina anche in condizioni basali, ovvero in assenza di qualunque tipologia di stimolo induttore.

Nel nostro studio sono stati inclusi complessivamente 87 campioni cellulari di pazienti affetti da LLC. All'interno di tale coorte, 13 pazienti (14.9%) presentavano una malattia all'esordio, 54 pazienti (62.0%) risultavano caratterizzati da una malattia in progressione e 20 pazienti (23.1%) da una malattia resistente ad una o più linee di terapia convenzionale a base di farmaci citotossici [Figura 7]. L'espressione della proteina p53 è stata valutata, mediante Western blot, sia sui campioni irradiati che sulla controparte non esposta a IR, dopo una coltura di 8 e 24 h dal tempo dell'esposizione. Cellule linfoidi normali, prive di alterazioni a carico di p53, sono state impiegate come controllo negativo.



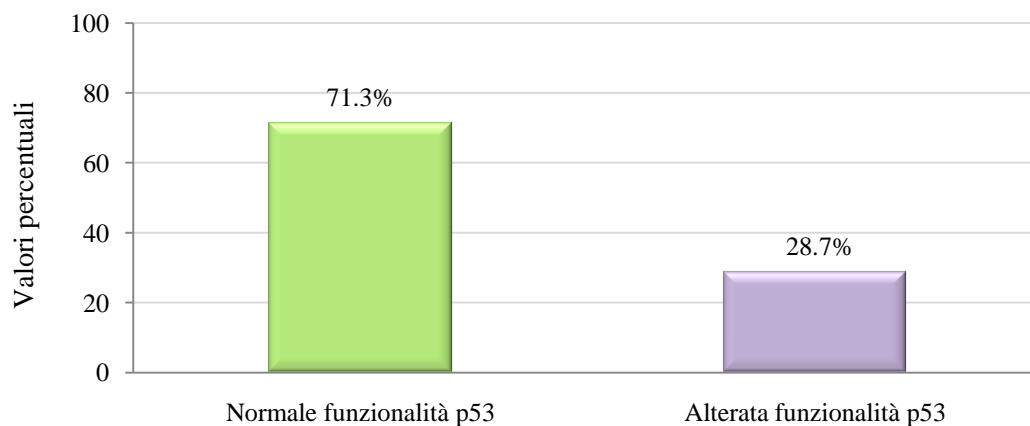
**Figura 7.** Distribuzione nelle diverse fasi di malattia dei pazienti affetti da LLC inclusi nello studio.

Una normale funzionalità di p53, caratterizzata dall'assenza della proteina nella controparte non esposta IR e dal suo massivo incremento dopo irradiazione, è stata rilevata in 62/87 pazienti esaminati (71.3%) e, più precisamente, in 12/13 pazienti (92.3%) all'esordio di malattia; 40/54 pazienti (74.0%) in progressione di malattia e 10/20 pazienti (50.0%) resistenti alla terapia. Al contrario, 25/87 pazienti (28.7%), di cui 1/13 pazienti (7.7%) all'esordio di malattia, 14/54 pazienti (26.0%) in progressione di malattia e 10/20 pazienti (50.0%) resistenti alla terapia presentavano un'alterata funzionalità di p53 [Tabella 1; Figura 8]. Nei pazienti caratterizzati da un'alterata funzionalità di p53 è stato possibile distinguere 3 differenti tipologie di disfunzioni. In 13/25 pazienti disfunzionali (52.0%) i livelli di p53 risultavano costitutivamente incrementati nella controparte non irradiata ma subivano un ulteriore accumulo dopo esposizione del campione a IR (Disfunzione di tipo I). In 11 di loro (44.0%), nonostante la proteina p53 fosse rilevabile nella controparte non irradiata, i suoi livelli rimanevano immutati dopo irradiazione (Disfunzione di tipo II).

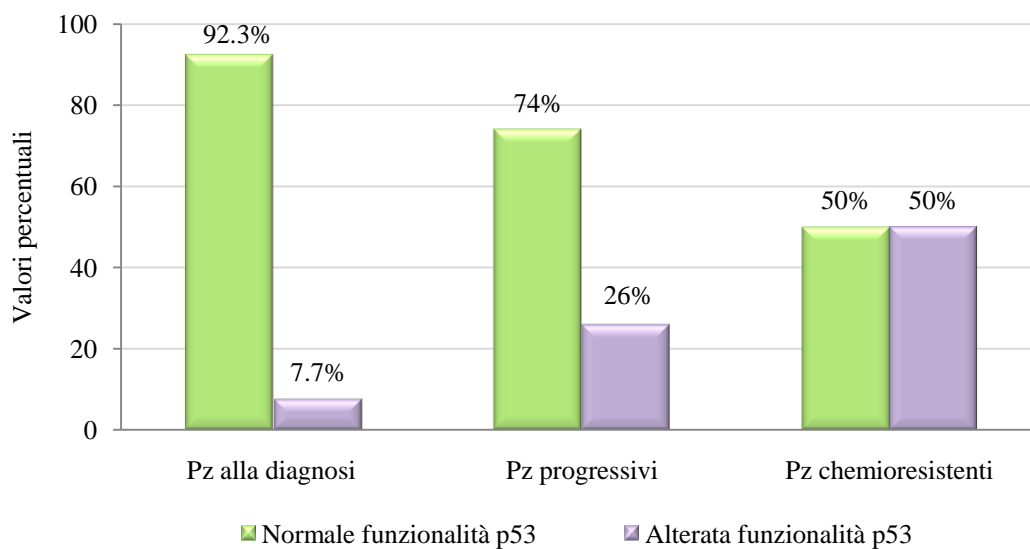
**Tabella 1.** Analisi della funzionalità della proteina p53 nei pazienti affetti da LLC inclusi nello studio.

<b>Pazienti inclusi nello studio (n=87)</b>	<b>Pazienti caratterizzati da normale funzionalità di p53 (n=62; 71.3%)</b>	<b>Pazienti caratterizzati da alterata funzionalità di p53 (n=25; 28.7%)</b>
<b>Esordio (n=13)</b>	12/13; 92.3%	1/13; 7.7%
<b>Progressione (n=54)</b>	40/54; 74.0%	14/54; 26.0%
<b>Resistenza (n=20)</b>	10/20; 50.0%	10/20; 50.0%

a)



b)



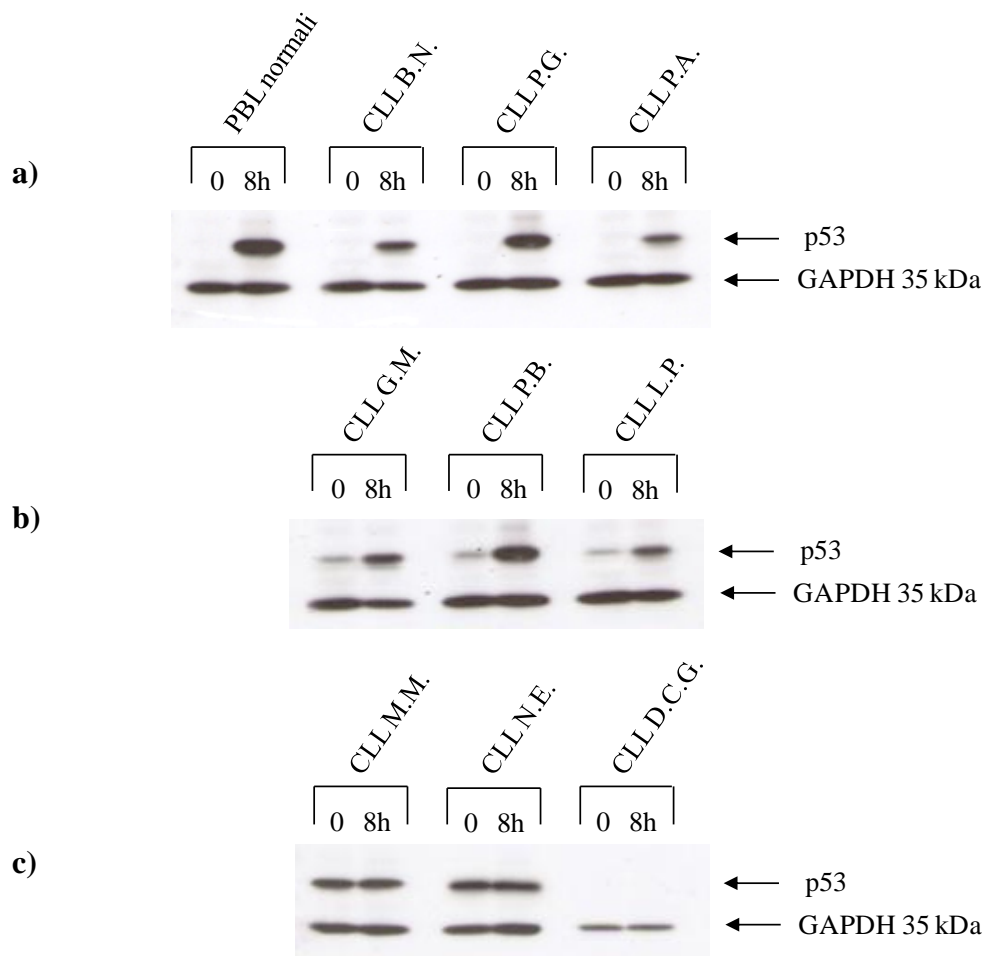
**Figura 8.** Funzionalità della proteina p53 nella totalità dei pazienti affetti da LLC inclusi nello studio (a) e nei pazienti affetti da LLC in relazione allo stadio di malattia (b). I campioni B cellulari leucemici sono stati esposti a IR e l'espressione della proteina p53 è stata valutata mediante Western blot, sia sui campioni irradiati che sulla controparte non esposta a IR, dopo una coltura di 8 h dal tempo dell'esposizione.

Infine in 1/25 pazienti (4.0%) la proteina p53 risultava assente sia nelle cellule non irradiate che dopo esposizione a IR (Disfunzione di tipo III) [Figura 9].

L'unico paziente (*CLL I.A.*) all'esordio di malattia caratterizzato da anomalie funzionali a carico della proteina p53, presentava una disfunzione di tipo II. Dei 14 pazienti in progressione di malattia, 8 risultavano caratterizzati da una disfunzione di tipo I (57.1%; *CLL F.M.R.; G.M.; L.P.; S.C.; C.G.; B.V.; G.C.; D.G.*), 5 da una disfunzione di tipo II (35.7%; *CLL M.M.; B.A.M.; I.A.; N.L.; S.A.*) e un solo paziente da una disfunzione di tipo III (7.2%; *CLL D.C.G.*). Infine, dei 10 pazienti disfunzionali con LLC chemioresistente, in 5 è stata riscontrata una disfunzione di tipo I (50.0%; *CLL P.B.; M.F.; F.C.; G.L.; D.A.A.*) e nei restanti 5 una disfunzione di tipo II (50.0%; *CLL A.R.; N.E.; L.P.; D.V.A.; S.A.*). La distribuzione delle differenti tipologie di disfunzioni nell'intera coorte di pazienti affetti da LLC e in ciascuna delle tre classi in cui i pazienti sono stati suddivisi in relazione allo stadio di malattia, è mostrata nella Figura 10.

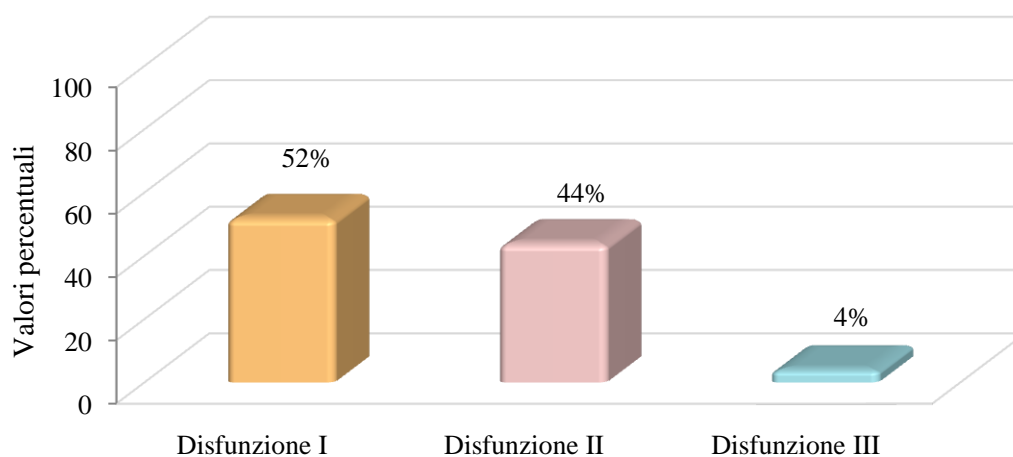
Nel complesso i risultati ottenuti rivelano una maggiore incidenza delle disfunzioni a carico di p53 nelle forme di LLC progressiva e chemioresistente piuttosto che all'esordio di malattia. E' stato possibile osservare una prevalenza delle disfunzioni di tipo I non solo nella popolazione complessiva di pazienti affetti da LLC ma anche in 1 delle 3 classi di pazienti suddivisi in relazione allo stadio di malattia, rappresentata dai casi progressivi. Al contrario, i casi di LLC resistente sono apparsi ugualmente associati a disfunzioni di tipo I e II, mentre non è stato possibile valutare la correlazione tra la tipologia di disfunzione e i pazienti con LLC all'esordio a causa della scarsità di campioni disfunzionali osservati nella suddetta fase di malattia.



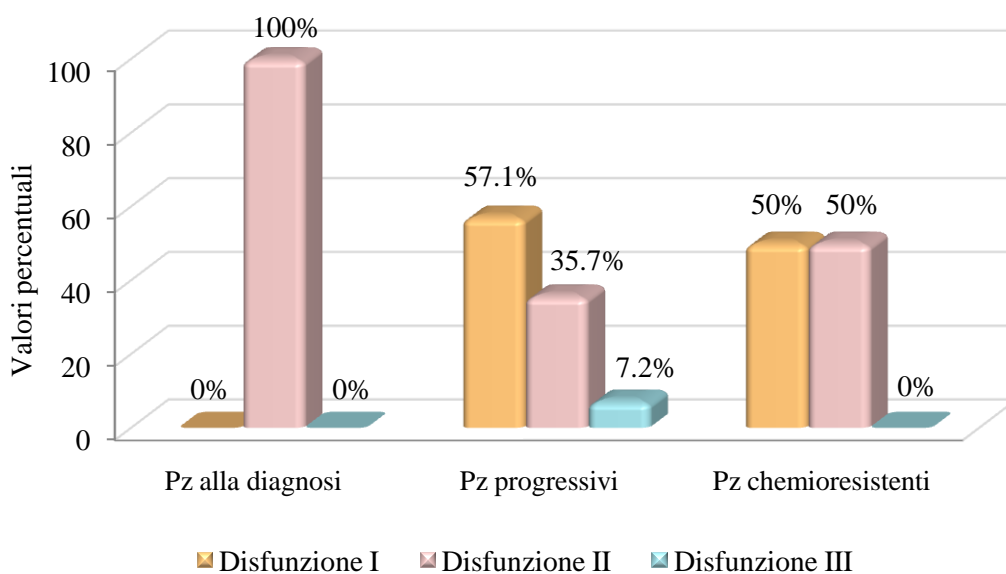


**Figura 9. Rappresentazione al Western blot delle bande relative all'espressione della proteina p53 al tempo 0 e a 8 h dall'esposizione dei campioni cellulari di LLC a IR.** Sono rappresentate a titolo esemplificativo le bande relative all'espressione della proteina in: **a)** 3 campioni di LLC con normale funzionalità di p53 (assenza della proteina in condizioni basali e forte upregolazione dopo irradiazione); **b)** 3 campioni di LLC con disfunzione di tipo I (costitutivo incremento della proteina nelle cellule non irradiate e suo ulteriore accumulo dopo irradiazione); **c)** 2 campioni di LLC con disfunzione di tipo II (costitutivo incremento della proteina in condizioni basali in assenza di un suo ulteriore accumulo dopo irradiazione) e 1 campione di LLC con disfunzione di tipo III di p53 (D.C.G.; assenza della proteina sia pre- sia post-esposizione a IR). E' stato impiegato in qualità di controllo negativo un campione di linfociti normali (PBL). Per evidenziare le differenze potenzialmente attribuibili al caricamento del gel, le membrane sono state incubate additionally con un anticorpo primario monoclonale anti-GAPDH.

a)



b)



**Figura 10.** a) *Distribuzione delle tipologie di disfunzioni a carico della proteina p53 nella totalità dei pazienti (Pz) affetti da LLC inclusi nello studio.* b) *Distribuzione delle tipologie di disfunzioni a carico della proteina p53 nei pazienti affetti da LLC in relazione allo stadio di malattia.* I campioni cellulari leucemici sono stati esposti a IR e l'espressione della proteina p53 è stata valutata mediante Western blot, sia sui campioni irradiati che sulla controparte non esposta a IR, dopo una coltura di 8 h dal tempo dell'esposizione.

### 3.2 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con lo stato del gene TP53

Il passo successivo dello studio è stato quello di valutare la correlazione tra la risposta funzionale di p53 alle IR e lo stato del gene TP53, analizzato dal gruppo di studio del Sequenziamento Genico del nostro laboratorio. Dei 62 pazienti caratterizzati da una normale funzionalità della proteina, la totalità di essi (100%) è risultata wild type per la sequenza del gene TP53, come atteso. In tale gruppo è stata quindi rilevata una concordanza del 100% tra dati proteici e dati genomici. Al contrario, dei 25 pazienti con anomalie funzionali della proteina p53, 20 hanno evidenziato mutazioni nella sequenza del gene TP53, mentre i rimanenti 5 (CLL P.B.; M.F.; F.C.; A.R.; D.V.A./3 disfunzioni di tipo I e 2 di tipo II), tutti contraddistinti da una malattia resistente, sono risultati wild-type per il locus TP53, suggerendo la presenza di un difetto in un differente target della via di p53. Conseguentemente, la concordanza tra dati proteici e dati genomici è risultata, nell'ambito dei casi disfunzionali, pari all'80.0% [Tabella 2].

In particolare, all'interno del sottogruppo di pazienti con anomalie funzionali e molecolari a carico di p53, 19/20 (10 disfunzioni di tipo I, 8 disfunzioni di tipo II e 1 disfunzione di tipo III) hanno evidenziato la presenza di una singola mutazione del gene TP53, mentre 1/20 (CLL N.E., disfunzione di tipo II) la presenza di una doppia mutazione del gene TP53, ossia di due diverse mutazioni in due differenti posizioni della sequenza genica.

**Tabella 2.** Correlazione tra la funzionalità della proteina p53 e lo stato del gene TP53: Valori di predittività negativa (NPV) e positiva (PPV).

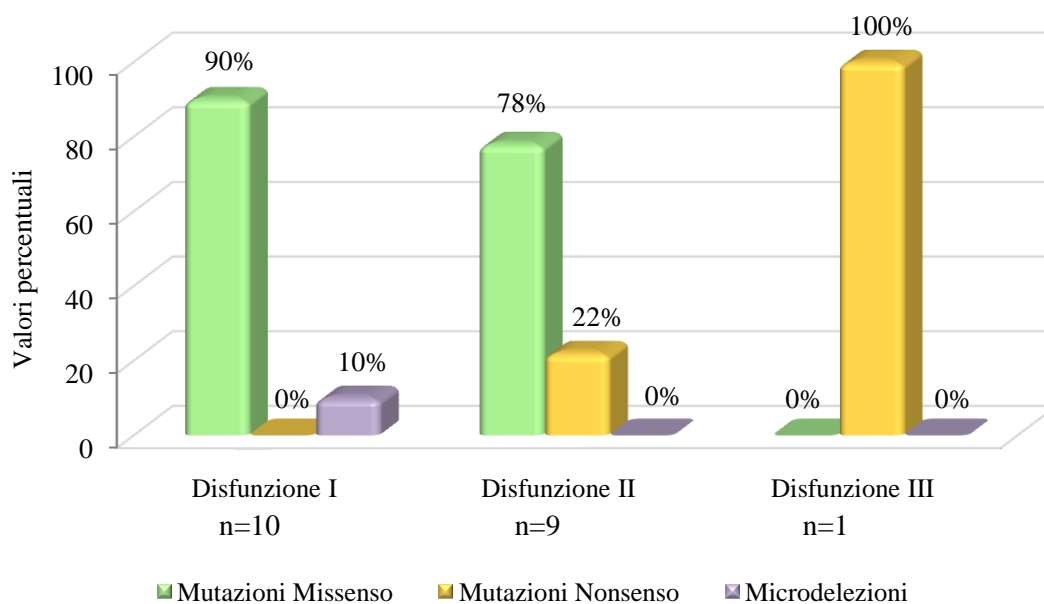
<b>Pazienti inclusi nello studio (n=87)</b>	<b>Pazienti caratterizzati da normale funzionalità di p53 (n=62; 71.3%)</b>	<b>Pazienti caratterizzati da alterata funzionalità di p53 (n=25; 28.7%)</b>
<b>Pazienti TP53 wild-type</b>	62/62; 100.0% (NPV)	5/25; 20.0%
<b>Pazienti TP53 mutati</b>	0/62; 0.0%	20/25; 80.0% (PPV)

Nell'ambito dei 20 pazienti disfunzionali caratterizzati da mutazioni del gene *TP53*, sono state complessivamente identificate mediante sequenziamento genico, 18 mutazioni missenso, 2 nonsense ed 1 microdelezione; di queste, 15 mutazioni risultavano in omozigosi mentre 6 in eterozigosi. Sulla base di tali dati, per una migliore comprensione dei meccanismi alla base della comparsa di disfunzioni a carico dell'oncosoppressore p53, è stata valutata la correlazione tra le differenti tipologie di disfunzioni di p53 e il profilo mutazionale del gene *TP53* in termini di natura e stato allelico della mutazione [Tabella 3]. Dall'analisi delle mutazioni in ciascuna categoria di disfunzioni è emerso, in primo luogo, come la disfunzione di tipo I sia associata principalmente a mutazioni eterozigoti di natura missenso a carico del gene *TP53*. Infatti, 9/10 pazienti di LLC con disfunzioni di tipo I (90.0%) presentavano mutazioni con le suddette caratteristiche. Le mutazioni di natura missenso sono risultate peculiari anche della maggior parte dei casi disfunzionali di tipo II (7/9 pazienti; 77.8%) mentre in tale sottogruppo è stata riscontrata una maggiore associazione con lo stato allelico omozigote del gene *TP53*. Infatti, sebbene il 55.6% dei casi disfunzionali di tipo II (5/9 pazienti), appariva caratterizzato da mutazioni in eterozigosi del gene *TP53*, il rimanente 44.4% (4/9 pazienti) presentava mutazioni in omozigosi contrariamente all'10.0% dei casi disfunzionali di tipo I [Figura 11]. È stata dunque analizzata la correlazione tra le differenti classi disfunzionali di p53 e lo stato del gene *TP53* in relazione al sito della mutazione, ovvero all'esone e codone interessato e al cambio di natura nucleotidica. La disfunzione di tipo I è stata osservata in associazione a mutazioni del gene *TP53* localizzate esclusivamente negli esoni 5-8 della regione codificante il DBD di p53. Tali esoni, codificando per la regione più significativa della proteina p53 dal punto di vista funzionale e filogeneticamente più conservata, in quanto coinvolta nell'interazione con il DNA, rappresentano, infatti, i cosiddetti punti caldi di mutagenesi, ovvero i siti in cui si riscontra, normalmente, il maggior numero di mutazioni. In particolare, nel 60.0% dei casi di LLC con disfunzione di tipo I (6/10 pazienti) sono state riscontrate mutazioni all'interno dell'esone 8, nel 20.0% mutazioni all'interno dell'esone 6 (2/10 pazienti), mentre il rimanente 20% risultava equamente caratterizzato da mutazioni all'interno dell'esone 7 (10.0%; 1/10 pazienti) e dell'esone 5 (10.0%; 1/10 pazienti). Al contrario, sebbene le mutazioni del gene *TP53* a livello degli esoni 8 e 6 presentavano la più alta incidenza nei casi disfunzionali di tipo II (33.4%, 3/9 pazienti e 22.2%, 2/9 pazienti rispettivamente), seguite dalle mutazioni negli esoni 7 e 6 (22.2%, 2/9 pazienti in entrambi i casi), è stata osservata, in tale sottogruppo, anche la presenza di mutazioni a livello dell'esone 4 (11.1%; 1/9 pazienti), in posizione 110 del DBD, e 9 (11.1%; 1/9 pazienti), in posizione 321 della regione segnale di localizzazione nucleare [Figura 12].

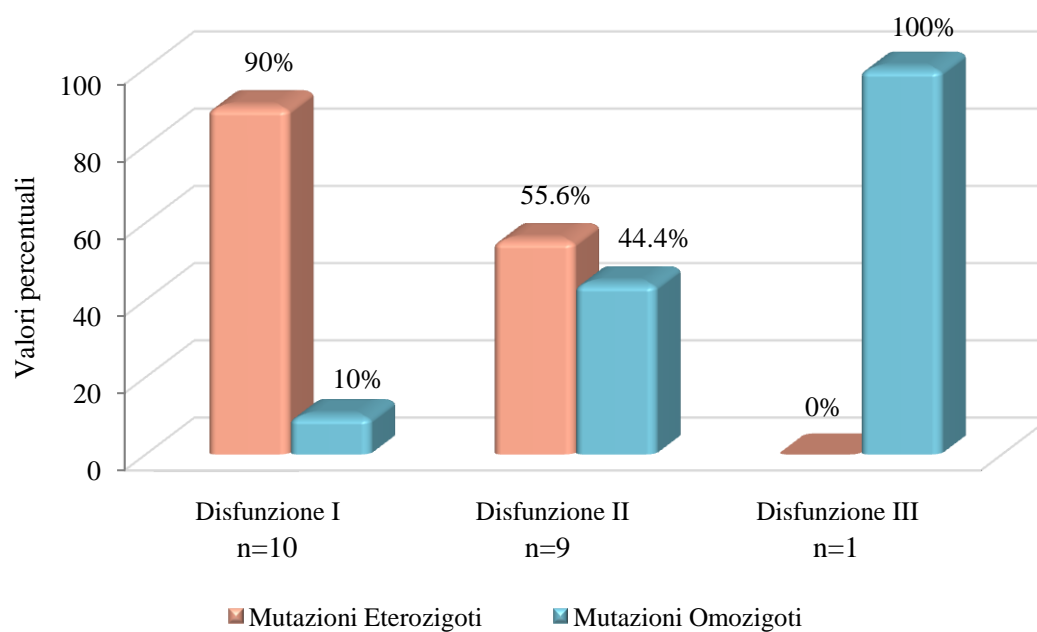
**Tabella 3.** Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e il profilo mutazionale del gene *TP53* nei pazienti affetti da LLC distinti in base allo stadio di malattia.

Fasi della malattia	Paziente	Disfunzione proteina p53	Esone <i>TP53</i> mutato	Codone <i>TP53</i> mutato	Cambio nucleotidico	Transizione (Ts) vs Trasversione (Tv)	Cambio aminoacidico	Tipologia di mutazione	Stato allelico della mutazione
<b>Esordio (n=1)</b>	I.A.	II	6	193	CAT-CGT	Ts	His-Arg	Missenso	Eterozigote
<b>Progressione (n=14)</b>	B.A.M.	II	8	282	CGG-GGG	Tv	Arg-Gly	Missenso	Omozigote
	F.M.R.	I	8	283	CGC-TGC	Ts	Arg-Cys	Missenso	Omozigote
	G.M.	I	6	191	CCT-CAG	-	In Frame	Delezione	Eterozigote
	L.P.	I	8	273	CGT-CAT	Ts	Arg-His	Missenso	Eterozigote
	S.C.	I	8	275	TGT-TTT	Tv	Cys-Phe	Missenso	Eterozigote
	S.A.	II	7	241	TCC-TTC	Ts	Ser-Phe	Missenso	Omozigote
	D.C.G.	III	6	213	CGA-TGA	Ts	Arg-Stop	Nonsenso	Omozigote
	C.G.	I	7	248	CGG-TGG	Ts	Arg-Trp	Missenso	Eterozigote
	G.C.	I	5	175	CGC-CAC	Ts	Arg-His	Missenso	Eterozigote
	I.A.	II	6	193	CAT-CGT	Ts	His-Arg	Missenso	Eterozigote
	D.G.	I	6	195	ATC-ACC	Ts	Ile-Thr	Missenso	Eterozigote
	M.M.	II	8	281	GAC-AAC	Ts	Asp-Asn	Missenso	Omozigote
	N.L.	II	4	110	CGT-CTT	Tv	Arg-Leu	Missenso	Eterozigote
	B.V.	I	8	275	TGT-TAT	Ts	Cys-Tyr	Missenso	Eterozigote
<b>Resistenza (n=5)</b>	G.L.	I	8	273	CGT-CAT	Ts	Arg-His	Missenso	Eterozigote
	L.P.	II	9	321	AAA-TAA	Tv	Lys-Stop	Nonsenso	Omozigote
	N.E.	II	8	272	GTG-ATG	Ts	Val-Met	Missenso	Eterozigote
		II	7	235	AAC-GAC	Ts	Asn-Asp	Missenso	Eterozigote
	D.A.A.	I	8	278	CCT-CGT	Tv	Pro-Arg	Missenso	Eterozigote
P.B.	II	5	126	TAC-TAG	Tv	Tyr- Stop	Nonsenso	Eterozigote	

a)

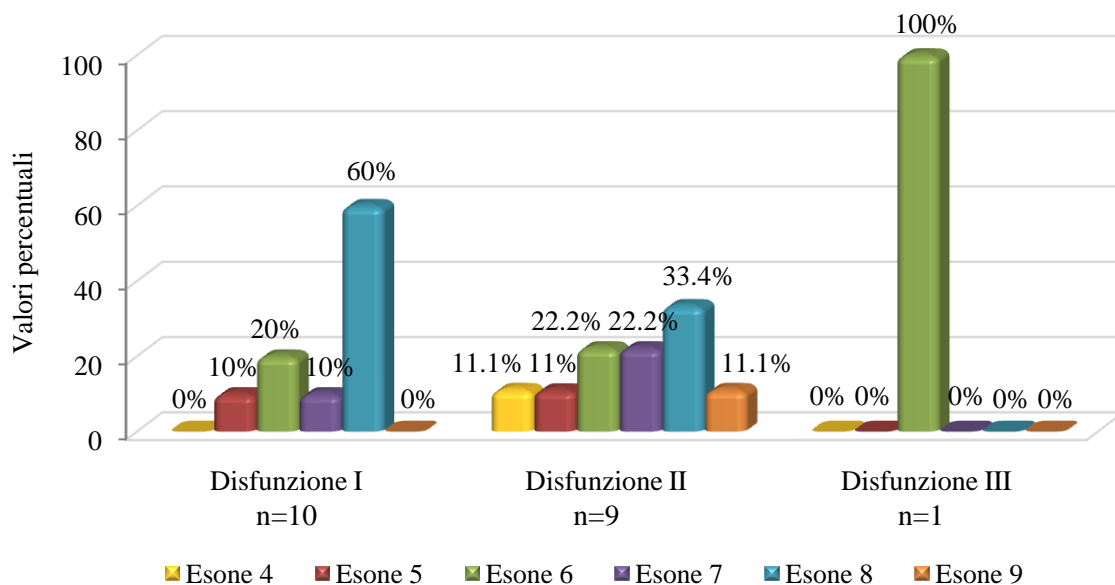


b)



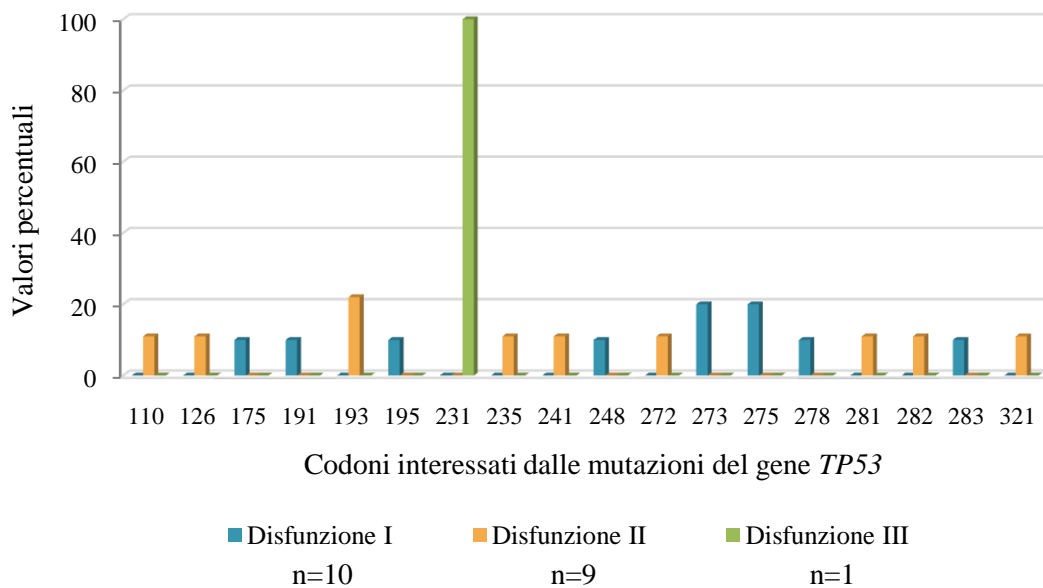
**Figura 11.** a) Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e la tipologia delle mutazioni del gene *TP53*; b) Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e lo stato allelico delle mutazioni del gene *TP53*.

Nell'ambito delle classi disfunzionali I e II è stato anche possibile rilevare una distribuzione del tutto distinta dei residui *TP53* interessati dalla mutazione. Infatti, mentre mutazioni del gene *TP53* a carico dei residui 175-190-191-195-248-273-275-278-283 sono state osservate esclusivamente in associazione a disfunzioni di tipo I, mutazioni a livello dei residui 110-126-193-235-241-272-281-282-321 sono risultate unicamente caratteristiche delle disfunzioni di tipo II [Figura 13]. Inoltre, dei 10 casi disfunzionali di tipo I, 8/10 (80.0%) mostravano una correlazione con la classe dei mutanti di “Contatto” (residui 112-141; 236-251; 271-286) mentre 2/10 (20.0%) con la classe dei mutanti “Conformazionali” (residui 163-195). Al contrario, nell'ambito dei 9 casi disfunzionali di tipo II, sono stati identificati 5 mutanti di “contatto” (55.6%); 2 mutanti “conformazionali” (22.2%) e 2 mutanti a livello di residui non compresi nelle regioni corrispondenti alle suddette classi mutazionali (22.2%) [Figura 14a]. Infine, le disfunzioni di tipo I hanno rivelato una prevalente correlazione con le transizioni (77.8%; 7/9 pazienti) mentre le disfunzioni di tipo II sono risultate più equamente suddivise tra transizioni (55.6%; 5/9 pazienti) e trasversioni (44.4%; 4/9 pazienti) [Figura 14b].



**Figura 12.** Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e gli esoni interessati dalle mutazioni del gene *TP53*.

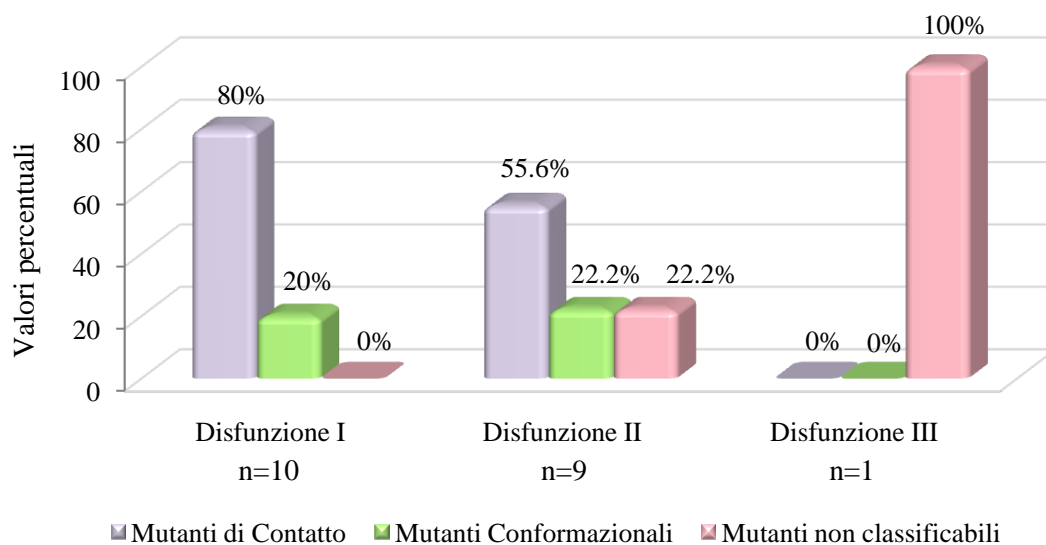
Non è stato invece possibile identificare un pattern di associazioni peculiari o ricorrenti tra la disfunzione di tipo III e il profilo mutazionale del gene *TP53*, dal momento che tale tipologia disfunzionale è stata osservata solamente in uno dei 25 pazienti affetti da LLC e caratterizzati da anomalie della proteina p53. Ad ogni modo, tale paziente risultava portatore di una mutazione omozigote di natura nonsense del gene *TP53* a livello del residuo 213 dell'esone 6. I dati ottenuti rivelano, dunque, l'esistenza di un'associazione tra le differenti tipologie di disfunzioni e le caratteristiche delle mutazioni a carico del gene *TP53*, identificando, in particolar modo nel sottogruppo dei pazienti caratterizzati da disfunzioni di tipo II, un più complesso e sfavorevole profilo di correlazione con lo stato del suddetto gene. E' stato, inoltre, possibile constatare l'esistenza di anomalie della proteina p53 indipendenti dalla presenza di mutazioni nella sequenza codificante del gene *TP53* ma fenotipicamente sovrapponibili a quelle riscontrate in presenza di tali mutazioni.



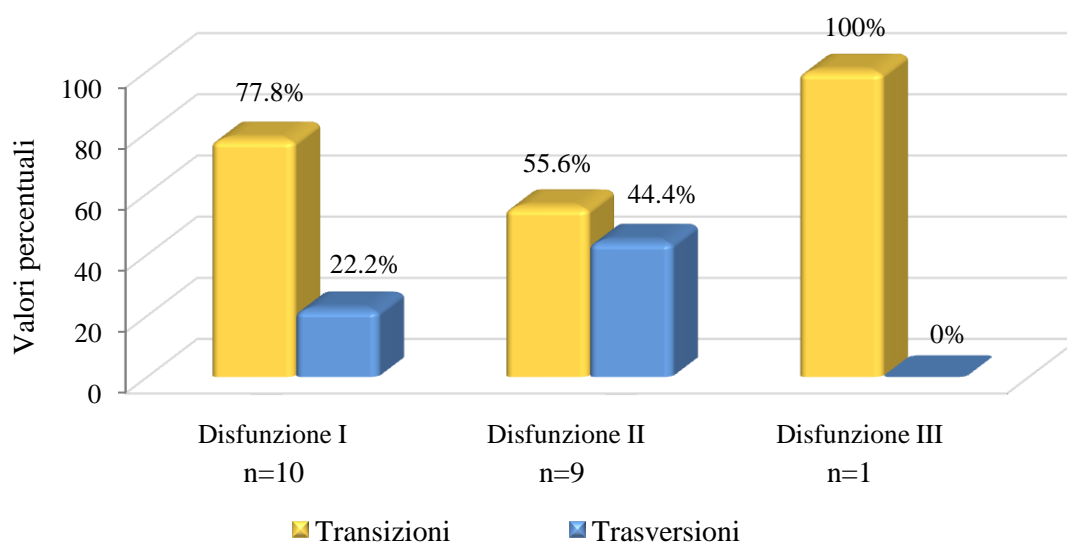
**Figura 13.** Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e i codoni interessati dalle mutazioni del gene *TP53*.



a)



b)



**Figura 14.** a) Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e le classi mutazionali del gene *TP53*; b) Correlazione tra le disfunzioni a carico di p53 e la natura del cambio nucleotidico nella sequenza mutata del gene *TP53*.

### 3.3 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con i principali fattori prognostici caratteristici della LLC

Allo scopo di comprendere il possibile significato prognostico delle disfunzioni a carico della proteina p53, è stata valutata la presenza di un'eventuale correlazione tra le suddette tipologie di disfunzioni e i principali fattori indicatori di prognosi nei pazienti affetti da LLC, quali: lo stato mutazionale della regione IgHV; l'espressione della proteina ZAP-70 e dell'antigene CD38; la presenza della delezione del braccio corto del cromosoma 17.

In primo luogo, dei 25 pazienti disfunzionali (13 disfunzioni di tipo I, 11 di tipo II ed 1 di tipo III), 20 (80.0%) sono risultati caratterizzati dalla presenza di una sequenza non mutata della regione IgHV, di cui: 9/13 (69.2%) con disfunzione di tipo I; 10/11 (90.9%) con disfunzione di tipo II e 1/1 (100.0%) con disfunzione di tipo III. Al contrario, dei restanti 5 pazienti, caratterizzati da una sequenza IgHV mutata, 4/13 (30.8%) presentavano una disfunzione di tipo I ed 1/11 (9.1%) di tipo II. L'analisi relativa alla correlazione tra le anomalie della proteina p53 e l'espressione della proteina ZAP-70, effettuata su un totale di 20/25 pazienti disfunzionali (11 disfunzioni di tipo I, 8 di tipo II ed 1 di tipo III), ha rivelato la presenza, di 13/20 (60.0%) casi ZAP-70<sup>+</sup>, 7/11 (63.6%) con disfunzioni di tipo I e 6/8 (75.0%) con disfunzioni di tipo II; al contrario, 7/20 casi (40.0%) risultavano ZAP-70<sup>-</sup>, 4/11 (36.4%) con disfunzioni di tipo I, 2/8 (25.0%) con disfunzione di tipo II ed 1/1 (100.0%) di tipo III. I casi disfunzionali CD38<sup>+</sup> sono invece risultati pari al 52.2% (12/23 casi disfunzionali esaminati; 12 disfunzioni di tipo I, 10 di tipo II ed 1 di tipo III), con la seguente distribuzione all'interno delle differenti tipologie di disfunzioni: 33.3% (4/12 pazienti) e 80.0% (8/10 pazienti) rispettivamente nei casi disfunzionali di tipo I e II. Nell'ambito dei casi disfunzionali CD38<sup>-</sup>, il 66.7% (8/12 pazienti) risultava bensì associato a disfunzioni di tipo I, il 20.0% (2/10 pazienti) a disfunzioni di tipo II e il 100.0% (1/1 pazienti) di tipo III [Tabella 4].

Infine, un cariotipo alterato è stato osservato in tutti i 20 pazienti disfunzionali in cui è stato possibile eseguire uno studio citogenetico (10 disfunzioni di tipo I, 9 di tipo II ed 1 di tipo III). La prevalenza della trisomia 12 e delle anomalie strutturali a carico delle regioni cromosomiche 13q14 e 11q22-, valutata mediante FISH in 14 dei suddetti pazienti (7 disfunzioni di tipo I e 7 di tipo II) è risultata rispettivamente pari a 7.1%, 42.8% e 7.1%. La trisomia 12 è stata osservata in 1/14 pazienti (*CLL progressiva F.C.*; 14.3%, 1/7 disfunzioni di tipo I); la del13q14 in 6/14 pazienti (57.2%, 4/7 disfunzioni di tipo I e 28.6%, 2/7 disfunzioni di tipo II) e la del11q22-23 in 1/14 pazienti (*CLL progressiva S.A.*; 14.3%, 1/7 disfunzioni di tipo II) [Tabella 4].

Sedici dei 20 pazienti p53 disfunzionali analizzati per la presenza di anomalie strutturali a carico della regione cromosomica 17p sono risultati caratterizzati dalla del17p13 (16/20; 80.0%). All'interno di tale coorte, 6/16 (37.5%) pazienti presentavano una disfunzione di tipo I (60.0%, 6/10 disfunzioni di tipo I), 9/16 (56.3%) di tipo II (100.0%, 9/9 disfunzioni di tipo II) e 1/16 (6.2%) di tipo III (100.0%, 1/1 disfunzioni di tipo III). Prendendo in considerazione la totalità dei pazienti disfunzionali (n=20) inclusi nell'analisi citogenetica della regione 17p è stato possibile rilevare valori di cellule del17p13<sup>+</sup> compresi tra il 5% e il 20% nel 10.0% (1/10) delle disfunzioni di tipo I e nel 33.3% (3/9) delle disfunzioni di tipo II, mentre valori superiori al 20% sono stati osservati nel 50.0% (5/10) delle disfunzioni di tipo I, nel 66.7% (6/9) delle disfunzioni di tipo II e nel 100% (1/1) delle disfunzioni di tipo I [Tabella 4].

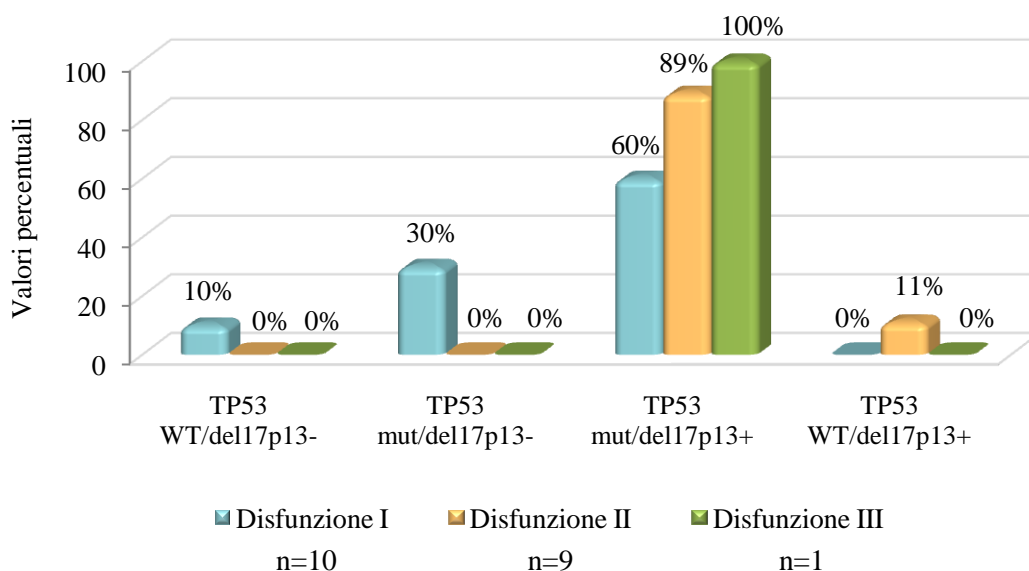
**Tabella 4.** Caratteristiche biologiche dei pazienti affetti da LLC contraddistinti dalla presenza di difetti funzionali a carico della proteina p53.

<b>Caratteristiche Biologiche</b>	<b>Disfunzioni di Tipo I</b>	<b>Disfunzioni di Tipo II</b>	<b>Disfunzioni di Tipo III</b>
<b>Omologia IgHV ≥98%</b>	9/13 (69.2%)	10/11 (90.9%)	1/1 (100.0%)
<b>ZAP-70 ≥20</b>	7/11 (63.6%)	6/8 (75.0%)	0/1 (0.0%)
<b>CD38 ≥7%</b>	4/12 (33.3%)	8/10 (80.0%)	0/1 (0.0%)
<b>del 17p13 5 ≤ &lt;20%</b>	1/10 (10.0%)	2/9 (33.3%)	0/1 (0.0%)
<b>del 17p13 ≥20%</b>	5/10 (50.0%)	6/9 (66.7%)	1/1 (100.0%)
<b>del 11q22-23 &gt;10%</b>	0/7 (0.0%)	1/7 (14.3%)	-
<b>del 13q14 &gt;5%</b>	4/7 (57.2%)	2/7 (28.6%)	-
<b>+12&gt;5%</b>	1/7 (14.3%)	0/7 (0.0%)	-

(-, non eseguito)

Quindici (75.0%) dei 20 pazienti disfunzionali analizzati, 6/10 (60.0%) disfunzioni di tipo I, 8/9 (88.9%) disfunzioni di tipo II ed 1/1 (100%) disfunzioni di tipo III, risultavano caratterizzati sia da mutazioni a carico del gene *TP53* che dalla del17p13. La sola presenza di mutazioni del gene *TP53* è stata osservata in 3/20 (15.0%) pazienti, tutti contraddistinti da una disfunzione di tipo I (30.0%, 3/10 disfunzioni di tipo I), mentre 1/20 pazienti (5.0%; *CLL resistente A.R.*; 1/9, 11.1 disfunzioni di tipo II) presentava unicamente la del17p13. Infine, in 1/20 pazienti (5.0%, *CLL resistente F.C.*; 10%, 1/10 disfunzioni di tipo I) non è stata rilevata la presenza né di mutazioni del gene *TP53* né della del17p13 [Figura 15]. Nei pazienti con disfunzioni a carico della proteina p53 è stata inoltre osservata la stessa distribuzione dei fattori prognostici indipendentemente dalla presenza di mutazioni del gene *TP53*.

Nel complesso, i dati ottenuti, sebbene relativi ad una piccola coorte di pazienti, hanno rivelato una prevalente associazione tra le disfunzioni a carico della proteina p53 e i principali fattori di prognosi infausta caratteristici della LLC. Inoltre, nell'ambito delle differenti classi disfunzionali è stato possibile identificare una maggiore tendenza a tale associazione nel sottogruppo dei pazienti caratterizzati da disfunzioni di tipo II.



**Figura 15.** Correlazione tra la tipologia di disfunzione a carico della proteina p53 e la presenza di anomalie mono- o bi-alleleliche del gene *TP53*.

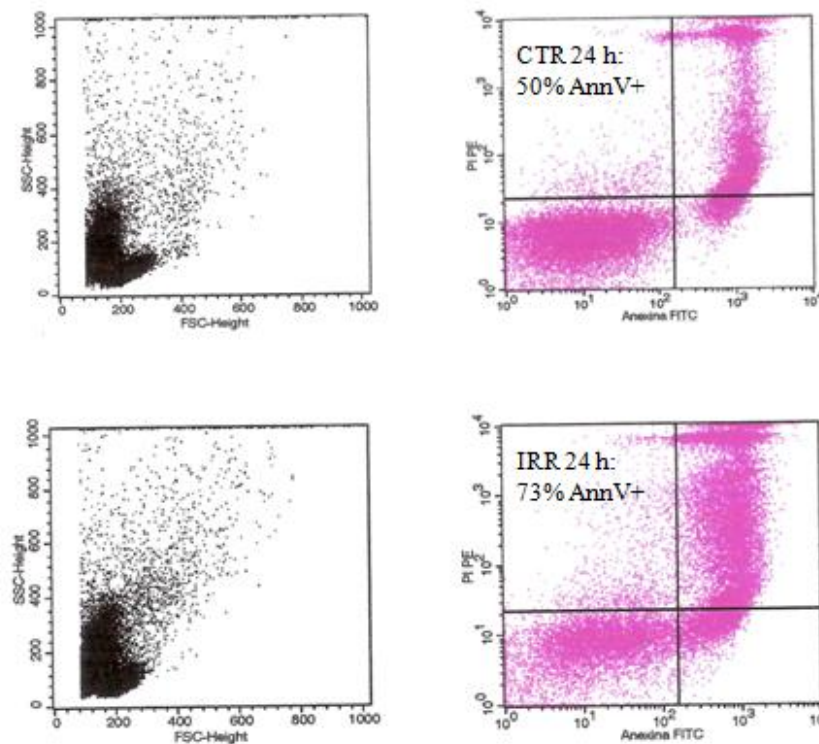
### **3.4 Correlazione della funzionalità della proteina p53 con la capacità di induzione del processo apoptotico**

Il passo conclusivo di questo studio è stato quello di stabilire se le disfunzioni della proteina p53, associate o meno ad alterazioni del gene *TP53*, identificate all'interno delle cellule neoplastiche dei pazienti affetti da LLC, potessero causare un'alterazione dei meccanismi cellulari p53-dipendenti. Dal momento che le cellule di LLC sono prevalentemente non ciclanti e refrattarie agli stimoli mitogeni, la valutazione della sensibilità, delle forme funzionali e disfunzionali della proteina p53, al processo apoptotico indotto dopo esposizione dei campioni di LLC a IR, è stato preferito rispetto all'analisi della capacità di arresto del ciclo cellulare. Le radiazioni ionizzanti, infatti, danneggiano il DNA cellulare inducendo la via apoptotica p53-dipendente. Di conseguenza, le cellule caratterizzate da assenza di alterazioni nella via di p53 vanno normalmente incontro a una progressiva morte cellulare dopo esposizione a IR.

Il tasso apoptotico delle cellule di LLC in condizioni basali e dopo esposizione a 5 Gy di IR, è stato valutato dopo 24 h di coltura dall'induzione del danno al DNA, mediante doppia marcatura con Annexina V e Ioduro di Propidio e successiva analisi citometrica a flusso. L'analisi è stata effettuata su un numero complessivo di 26 pazienti, di cui: 16 caratterizzati da normale funzionalità della proteina p53 e 10 caratterizzati da una proteina disfunzionale. Come atteso, in tutti i casi di LLC con normale funzionalità di p53 e quindi sequenza "wild-type" del gene *TP53*, è stato possibile osservare una preservata capacità di induzione del processo apoptotico dopo esposizione a IR. In particolare, a 24 h è stata stimata una percentuale media di cellule apoptotiche pari, in tali casi, a  $52.4\% \pm 15\%$  nelle cellule non irradiate e  $74.5\% \pm 14\%$  dopo irradiazione, con un incremento medio di 1.4 volte. Tale differenza è risultata statisticamente significativa ( $P=0.007$ ). La Figura 16 mostra, a scopo esemplificativo, la visualizzazione al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche osservata in 1 paziente caratterizzato da normale funzionalità di p53.

In contrasto con quanto osservato nei campioni contraddistinti dalla presenza di una proteina p53 funzionale, le cellule isolate da 9/10 pazienti studiati caratterizzati da disfunzioni di p53 hanno manifestato una resistenza al processo apoptotico indotto dall'esposizione a IR. Complessivamente in tali casi è stata osservata una percentuale media di apoptosi pari a  $49.7\% \pm 25\%$  in condizioni basali e  $57.6\% \pm 24\%$  dopo esposizione a IR, con un incremento medio di 1.2 volte, confermando che la morte cellulare indotta dalle IR è, nelle cellule di LLC, p53-dipendente [Figura 17].

Nell'ambito, dei suddetti pazienti, è stato inoltre possibile distinguere, in relazione alla tipologia di disfunzione riscontrata, due differenti livelli di resistenza al processo apoptotico indotto da IR. Infatti, nei 4/9 pazienti resistenti caratterizzati da disfunzioni di tipo I studiati, la percentuale media di apoptosi è risultata pari a  $35.3\% \pm 14.9\%$  in condizioni basali e  $47.3\% \pm 15.7\%$  dopo irradiazione, con un incremento medio di 1.3 volte, evidenziando una condizione di parziale resistenza alle IR.



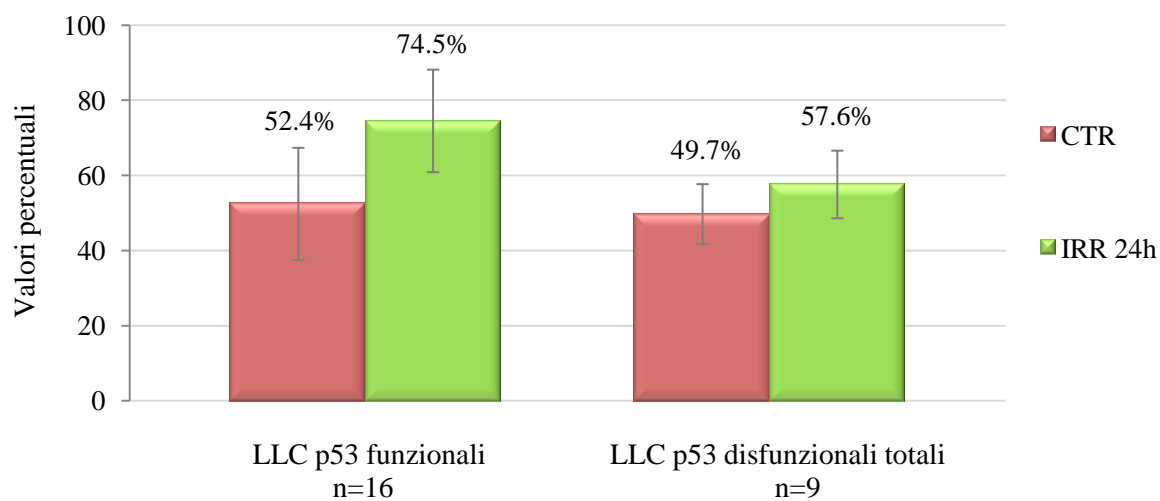
**Figura 16.** Visualizzazione al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche prima e dopo esposizione a IR osservata in 1 paziente caratterizzato da normale funzionalità di p53 (Paziente Z.G., LLC alla diagnosi).

Al contrario, nei restanti 5/9 pazienti, di cui 4 con disfunzioni di tipo II ed 1 con disfunzione di tipo III, è stata stimata una percentuale media di cellule apoptotiche pressoché identica prima e dopo irradiazione, con valori rispettivamente pari a  $61.2\% \pm 25.6\%$  e  $65.8\% \pm 25.9\%$  ed incremento medio di 1.07, indicando una condizione di completa resistenza alle IR [Figura 18]. Otto di tali pazienti risultavano caratterizzati anche da mutazioni a carico del gene *TP53*, mentre in 1 paziente, affetto da LLC resistente, era stata rilevata una normale sequenza del suddetto gene, evidenziando un'alterazione della funzionalità di p53 indipendente dalla

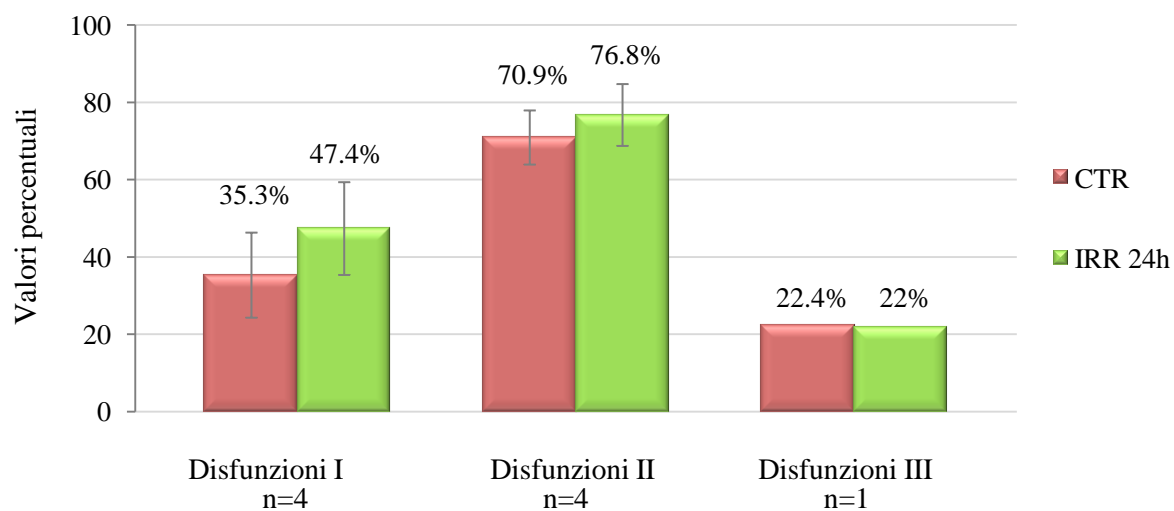
presenza di mutazioni del gene *TP53*. La Figura 19 mostra la visualizzazione al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche osservata in 3 pazienti di LLC ciascuno caratterizzato da una delle differenti tipologie di disfunzione di p53.

Infine, in 1 dei 9 pazienti (*CLL progressiva N.L., disfunzione di tipo II*) studiati caratterizzati da disfunzioni di p53, è stata riportata una normale risposta alle IR (dati non mostrati), consistente o con la possibilità che l'anomalia funzionale interessi un piccolo subclone della popolazione neoplastica o con l'attivazione di un processo apoptotico p53-indipendente.

In conclusione, i dati osservati evidenziano l'associazione tra la presenza di disfunzioni a carico della proteina p53 e la comparsa di alterazioni nel meccanismo di induzione del processo apoptotico indotto dalle IR. Le differenti forme di resistenza al processo apoptotico osservate in tale studio nei pazienti disfunzionali, mostrano, inoltre, come ciascuna tipologia di disfunzione possa avere un impatto più o meno forte sull'alterazione dei meccanismi cellulari p53-dipendenti.



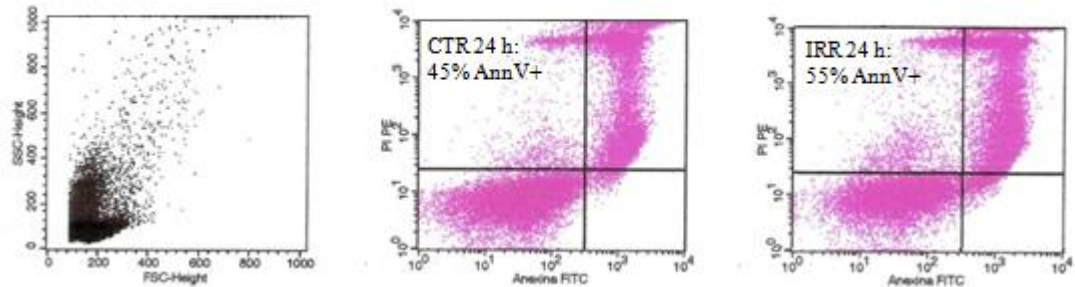
**Figura 17.** Confronto delle percentuali medie di cellule apoptotiche prima e dopo esposizione a IR osservate nella totalità dei pazienti caratterizzati da normale o alterata funzionalità di p53.



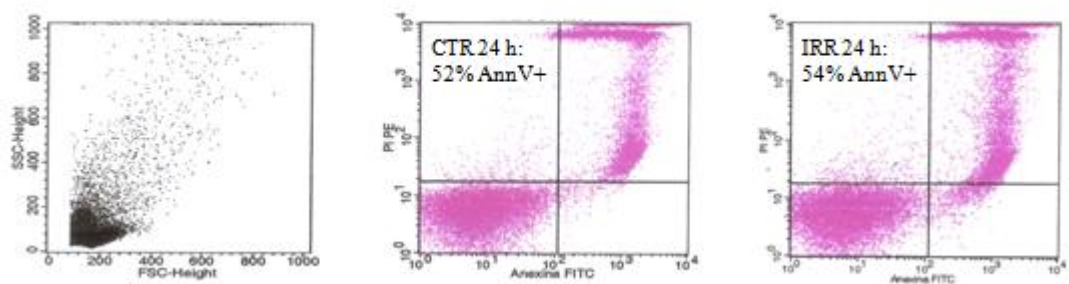
**Figura 18.** Correlazione tra le percentuali medie di cellule apoptotiche prima e dopo esposizione a IR e la tipologia di disfunzione a carico di p53.



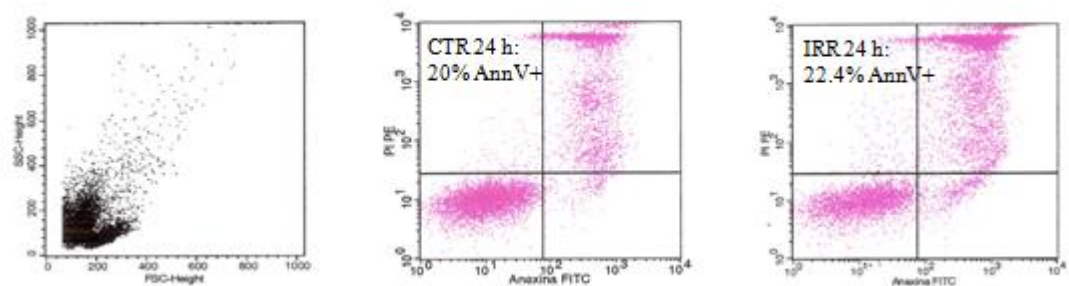
a) Disfunzione I



b) Disfunzione II



c) Disfunzione III



**Figura 19.** Visualizzazione al citofluorimetro della percentuale di cellule apoptotiche osservata in 3 pazienti di LLC ciascuno caratterizzato da una delle differenti tipologie di disfunzione di p53: **a)** Paziente L.P., disfunzione I, LLC in progressione; **b)** Paziente A.R., disfunzione II, LLC resistente; **c)** Paziente D.C.G., disfunzione III, LLC in progressione.

#### 4. DISCUSSIONE

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della suscettibilità al cancro e della resistenza a terapie farmacologiche specifiche è essenziale per migliorarne l'esito terapeutico. La LLC è una patologia a decorso clinico altamente variabile e sebbene l'identificazione di parametri prognostici, sia di natura clinica che biologica, abbia consentito la classificazione dei pazienti in categorie di rischio, tale suddivisione non sempre si rivela adeguata alla predizione del comportamento clinico e della risposta farmacologica. Le principali opzioni terapeutiche destinate a pazienti affetti da LLC sono tuttora rappresentate dall'impiego di farmaci citotossici o di antimetaboliti, quali agenti alchilanti e analoghi purinici, che mediano l'eliminazione delle cellule neoplastiche attivando il processo di morte cellulare programmata dopo induzione di un danno diretto o indiretto a carico del DNA. Di conseguenza, lo studio delle proprietà che determinano la suscettibilità delle cellule di LLC alla terapia antitumorale e la loro eventuale correlazione con i marcatori prognostici caratteristici della patologia, potrebbe diventare utile per ottenere informazioni predittive aggiuntive. In tale ambito, un ruolo di primaria importanza riveste la proteina oncosoppressoria p53 che, attraverso l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, dell'apoptosi o della senescenza in risposta a differenti condizioni di stress, tra cui la presenza di un danno a carico del DNA, non solo protegge il genoma dagli insulti mutageni, ma contribuisce anche all'azione citotossica della maggior parte dei chemioterapici. Non sorprende quindi l'osservazione che i difetti del gene *TP53* nella LLC siano fortemente associati a progressione di malattia, resistenza alla chemioterapia e accorciamento dell'aspettativa di sopravvivenza. Tali dati sono emersi in primo luogo dall'analisi del decorso della LLC in pazienti caratterizzati dalla delezione del braccio corto del cromosoma 17, regione su cui mappa il gene *TP53*, ma sono stati successivamente consolidati dall'analisi di pazienti contraddistinti dalla comparsa di mutazioni a carico del suddetto gene, in associazione o meno alla del17p13. In realtà, nonostante la dimostrazione dell'esistenza di una correlazione tra le alterazioni molecolari a carico del gene *TP53* e il peggioramento della prognosi, esiste, anche all'interno del sottogruppo di pazienti affetti da LLC caratterizzati da tali alterazioni, una considerevole variabilità prognostica. Parte di questa variabilità può essere attribuita alle proprietà funzionali della proteina p53 mutata. A differenza, infatti, di altri geni oncosoppressori, che normalmente sono inattivati da mutazioni associate a perdita di sintesi del prodotto genico, la maggior parte delle mutazioni del gene *TP53* è contraddistinta dalla produzione di una proteina mutata che, a seconda dei casi, può esercitare un effetto dominante negativo sulla

proteina “wild-type” e/o essere caratterizzata da nuove proprietà oncogeniche. La combinazione tra le suddette caratteristiche e l'estensione della mutazione all'interno della popolazione neoplastica, che influenzano rispettivamente l'attività residua della proteina normale e la quantità di proteina mutata prodotta, può quindi esercitare un'influenza più o meno negativa sui meccanismi cellulari alla base della progressione tumorale e della resistenza alle terapie farmacologiche antineoplastiche. Tuttora, però, gli effetti di tale combinazione sono poco chiari e quindi oggetto di intenso dibattito.

Sulla base di tali premesse, il presente progetto di ricerca si è incentrato sullo studio della funzionalità della proteina p53 in pazienti affetti da LLC, nel tentativo di correlare l'attività di tale proteina al decorso della malattia e, quindi, alle caratteristiche molecolari del gene *TP53*, con lo scopo di implementare la comprensione della variabilità dell'andamento clinico in pazienti contraddistinti da alterazioni a carico di tale oncosoppressore e identificare, all'interno di tale gruppo, quei pazienti che potrebbero beneficiare di un approccio terapeutico innovativo. Sono stati inclusi nello studio pazienti affetti da LLC a diversi stadi di malattia, quali: esordio, progressione e resistenza a una o più linee di terapia citotossica convenzionale. La funzionalità di p53 è stata studiata valutando l'induzione della proteina in risposta all'esposizione dei campioni primari di cellule neoplastiche di LLC a radiazioni ionizzanti. Da tale analisi è emerso, prendendo in considerazione la totalità dei pazienti inclusi nello studio, che la proteina p53 risulta caratterizzata da una normale funzionalità nella maggior parte dei casi e più precisamente in una quota pari al 71.3%, presentando, al contrario, anomalie funzionali nel restante 28.7%. Questo primo dato suggerisce come, diversamente da altre forme di neoplasie in cui la percentuale di alterazioni a carico dell'oncosoppressore p53 si estende sino all'80.0% dei pazienti, nella LLC tale proteina rivesta probabilmente un ruolo più marginale nel processo tumorale o, in alternativa, sfrutti la ridondanza della sua via di segnalazione intracellulare per influenzare tale processo.

All'interno dei casi disfunzionali è stato quindi possibile osservare una peculiare distribuzione in relazione alle differenti classi di pazienti affetti da LLC. Infatti, sebbene le disfunzioni della proteina p53 siano state rilevate anche in pazienti al momento della diagnosi, esse sono apparse concentrate maggiormente in pazienti in progressione di malattia e in pazienti con malattia resistente o refrattaria alle terapie citotossiche convenzionali. In seguito a tale osservazione, è stato possibile supporre che le anomalie a carico di p53 siano rilevanti, nella LLC, non tanto nel condizionare la patogenesi della malattia, quanto nell'influenzare e governare la progressione, quindi l'espansione del clone leucemico all'interno della popolazione cellulare, e la suscettibilità alla terapia antitumorale, con implicazioni nello

sviluppo di resistenze farmacologiche. Non vi sono in letteratura studi di funzione della proteina p53 in pazienti affetti da LLC a differente stadio di malattia, ma i risultati ottenuti in tale ambito sono paragonabili e riflettono quanto osservato relativamente alla presenza di alterazioni molecolari del gene *TP53* nei suddetti pazienti. Infatti, tali alterazioni sono normalmente riscontrate dal 4 al 37% dei pazienti di LLC, con la più bassa incidenza, pari al 4-10%, al momento della diagnosi e la più alta, del 25-37%, al momento della comparsa della chemioresistenza [97]. A giustificare la bassa incidenza di alterazioni a carico della proteina p53 al momento della diagnosi, vi è la considerazione che tra le ipotesi relative alla patogenesi della LLC, una delle più accreditate riguarda la stimolazione antigenica del recettore B cellulare delle cellule neoplastiche. Di conseguenza, la comparsa di tali alterazioni potrebbe inserirsi in questo contesto ed esserne conseguenza piuttosto che causa scatenante, considerando che un comportamento biologico più aggressivo delle cellule B neoplastiche, in termini di rapida proliferazione e avanzato danno al DNA, potrebbe comportare una pressione mutazionale selettiva nei confronti di p53. Al contrario, a conferma del possibile ruolo delle alterazioni di p53 nella progressione di malattia, è emerso, da un recente studio, come tale proteina sia in grado di controllare la polarità delle divisioni cellulari in cellule staminali cancerose (CSC) [108]. Attraverso l'impiego di un modello di cellule tumorali mammarie, è stato osservato come tali cellule siano caratterizzate da una maggiore tendenza a divisioni simmetriche e illimitate e come queste proprietà possano essere trasferite in cellule staminali normali (CSN), mediante l'introduzione di mutazioni a carico del gene *TP53*. Al contrario, la riattivazione farmacologica di p53 si associa al ripristino dell'asimmetria delle divisioni cellulari sia nelle CSN che nelle CSC. Di conseguenza, l'acquisizione di anomalie a carico di p53 da parte delle cellule tumorali, può rappresentare un meccanismo utile a favorire, influenzando la simmetria delle divisioni cellulari, la crescita tumorale e quindi la progressione di malattia. La relazione tra anomalie della proteina p53 e acquisizione di resistenze alla terapia antitumorale risulta invece più facilmente comprensibile, dal momento che i farmaci citotossici impiegati nella LLC agiscono attivando la via apoptotica p53-dipendente, per cui la loro somministrazione potrebbe favorire un meccanismo di "escape" tumorale consistente con la comparsa o la selezione di cloni caratterizzati da alterazioni molecolari e/o funzionali di p53 all'interno di nicchie ematiche rese disponibili dall'attività dei farmaci.

Dall'analisi dei campioni dei pazienti affetti da LLC in cui la proteina p53 è risultata disfunzionale, è stato possibile individuare 3 tipologie di disfunzioni, classificate come disfunzioni di tipo I, II e III. La disfunzione di tipo I si associa a un costitutivo incremento

della proteina p53 nelle cellule di LLC non irradiate e un suo ulteriore accumulo dopo irradiazione. Nella disfunzione di tipo II, pur essendo presente il costitutivo incremento della proteina in condizioni basali, non si verifica alcun ulteriore accumulo dopo irradiazione. Infine, nella disfunzione di tipo III, la proteina p53 non risulta rilevabile né prima né dopo esposizione delle cellule di LLC a radiazioni ionizzanti. Le disfunzioni di tipo I sono state riscontrate con maggiore frequenza sia all'interno della totalità dei pazienti inclusi nello studio che in 1 delle 3 classi di pazienti suddivisi in relazione allo stadio di malattia, rappresentata dai casi progressivi. Non essendo state riscontrate disfunzioni di tipo I nei pazienti all'esordio di malattia, non è stato invece possibile valutare la correlazione di tali alterazioni all'interno della suddetta classe.

Il dato relativo alla prevalenza delle disfunzioni di tipo I nei pazienti affetti da LLC risulta interessante se si considera la definizione di p53 come oncosoppressore. Infatti, essendo le disfunzioni di tipo I caratterizzate dalla co-presenza di una quota di proteina mutata e una quota di proteina normale, giustificata dall'aumento dell'accumulo di p53 dopo irradiazione, si potrebbe supporre che nella maggior parte dei casi siano selezionate, diversamente da quanto accade per altri oncosoppressori, alterazioni monoalleliche del gene *TP53*, associate alla produzione di una proteina p53 con effetto dominante negativo nei confronti della proteina normale o con nuove proprietà oncogeniche. In ambo i casi, infatti, gli effetti deleteri delle anomalie di p53 potrebbero essere sufficientemente esercitati anche in presenza di una porzione normale della proteina stessa, senza dover essere necessariamente accompagnate da inattivazione biallelica. In alternativa, si potrebbe pensare alla presenza di anomalie addizionali di altri componenti della via di p53 che agirebbero in maniera sinergica con le alterazioni monoalleliche a carico del gene *TP53* o alla presenza di alterazioni bialleliche estese solamente ad un subclone della popolazione neoplastica.

Per quanto riguarda le disfunzioni di tipo II, è importante sottolineare come i pazienti chemioresistenti siano caratterizzati dalla più alta percentuale di tali alterazioni. Dal momento che nel caso delle disfunzioni di tipo II non è stata rilevata alcuna quota normale di proteina p53, si potrebbe supporre, in tal caso, un'inattivazione biallelica del gene *TP53* estesa all'intera popolazione tumorale. Come riportato da uno studio recente, l'analisi sequenziale di pazienti affetti da LLC *TP53* "wild-type" e sottoposti a terapia citotossica, ha rivelato che la simultanea inattivazione di ambo gli alleli del gene *TP53* appare peculiare in tali casi poiché, probabilmente, viene accelerata dalla terapia stessa e segue meccanismi diversi rispetto ai processi di mutagenesi spontanea. L'inattivazione biallelica appare inoltre caratterizzata, in tale studio, da un primo evento di mutagenesi cui può associarsi, sull'altro allele, un secondo

evento mutagenico o l'acquisizione della del17p13 [97]. Queste osservazioni potrebbero quindi giustificare la concentrazione delle disfunzioni di tipo II all'interno della categoria dei pazienti chemioresistenti. Infine, essendo stata osservata la disfunzione di tipo III in un unico paziente affetto da LLC in progressione di malattia, non è stato possibile valutare, in tal caso, una reale associazione all'una o l'altra classe di malattia.

Allo scopo di verificare le ipotesi relative alla correlazione tra le differenti tipologie di disfunzioni dell'oncosoppressore p53 e lo stato del gene *TP53* è stato quindi effettuato un confronto tra il dato funzionale di natura proteica e il dato genomico relativo all'analisi di sequenza del suddetto gene. Tale confronto ha rivelato, in primo luogo, una concordanza assoluta tra la normale funzionalità della proteina p53 e lo stato "wild-type" del gene *TP53*. Al contrario, è stata osservata una concordanza elevata, seppur non assoluta, tra la presenza di disfunzioni della proteina p53 e lo stato mutato del gene *TP53*. L'analisi dei casi disfunzionali concordanti, precisamente pari all'80.0%, ha identificato nella maggior parte mutazioni missenso, osservate per lo più in eterozigosi. Tale dato riflette le peculiarità del profilo mutazionale del gene *TP53* che, svariati studi di pubblicazione più o meno recente, riportano sia caratterizzato, in circa il 75% dei casi, proprio da alterazioni missenso [96-99].

Il confronto tra i dati di funzionalità e quelli genomici ha inoltre mostrato la tendenza delle varie tipologie di disfunzioni ad associarsi a un profilo mutazionale specifico sia in termini di natura che posizione della mutazione genica. In particolare, la disfunzione di tipo I è stata osservata in associazione prevalente sia a mutazioni missenso che a mutazioni in eterozigosi, osservate entrambe in circa il 90.0% dei casi, a supporto dell'ipotesi relativa alla correlazione tra tali disfunzioni e le forme di inattivazione monoallelica del gene *TP53*. Anche le disfunzioni di tipo II sono apparse associate a mutazioni missenso del gene *TP53*, sebbene, rispetto alle disfunzioni di tipo I, si sono rivelate caratterizzate da una più stretta correlazione a mutazioni omozigoti. Quest'ultimo dato favorisce, in tal caso, la tesi dell'associazione delle disfunzioni di tipo II alle forme di inattivazione biallelica del gene *TP53*. L'analisi dei 3 pazienti con disfunzione di tipo II e mutazioni eterozigoti di *TP53* ha inoltre permesso di supportare ulteriormente questa tesi. Tali pazienti sono, infatti, apparsi caratterizzati da un assetto genomico più complesso. Uno di loro presentava due diverse mutazioni del gene *TP53* in eterozigosi. Se tali mutazioni fossero presenti sullo stesso allele, una mutazione con effetto dominante negativo sul prodotto genico normale potrebbe giustificare il fenotipo di una disfunzione di tipo II; in alternativa, se le due mutazioni fossero presenti su due alleli diversi, tale condizione potrebbe mimare quello che si verifica nel caso di una mutazione in omozigosi e, anche in questo caso, correlare con il fenotipo di una disfunzione di tipo II. Il

secondo paziente, studiato orizzontalmente al momento della diagnosi e in progressione di malattia, ha manifestato, all'analisi effettuata mediante FISH, la presenza addizionale di una delezione del braccio corto del cromosoma 17 in una percentuale iniziale di cellule B neoplastiche del 14.0%, con successiva estensione sino all'84.0% in progressione di malattia. In aggiunta, in tale paziente è stata riscontrata una singola mutazione missenso in eterozigosi nel gene ATM, concordante con la mancata induzione di p53 dopo irradiazione delle cellule tumorali. La presenza di cellule del17p13<sup>+</sup> è stata rivelata anche nel terzo paziente, in una percentuale pari al 75.0%. In quest'ultimo paziente, la presenza di un fenotipo di tipo II nonostante una mutazione eterozigote del gene *TP53* e una del17p13 non estesa a tutta la popolazione neoplastica, risulta consistente con l'esercizio di un effetto dominante negativo da parte della proteina p53 mutata sulla forma normale. Anche la disfunzione di tipo III, sebbene identificata in un solo paziente, è risultata associata ad una forma di inattivazione biallelica del gene *TP53*, rappresentata da una mutazione in omozigosi con introduzione di un codone di stop. In questo caso, si potrebbe supporre che la mancata osservazione di p53 sia in condizioni basali che dopo irradiazione, dipenda dall'impossibilità dell'anticorpo impiegato nello studio di riconoscere la forma tronca della proteina o dalla tendenza della proteina tronca ad essere riconosciuta e degradata.

E' stato possibile distinguere le disfunzioni di tipo I e II anche in relazione alla differente corrispondenza con gli esoni e i codoni del gene *TP53* interessati dalla mutazione. Mentre nel caso delle disfunzioni di tipo I è stata, infatti, osservata la presenza esclusiva di mutazioni nelle regioni codificanti il DBD, con prevalenza di mutanti di "contatto", le disfunzioni di tipo II sono risultate associate non solo a mutazioni nel DBD ma anche in regioni esterne al DBD, con una correlazione più stretta con la classe dei mutanti "conformazionali", nota per essere associata ad un effetto prognostico peggiore. In tali casi è stata osservata anche un'associazione con mutanti a livello di residui non compresi nelle regioni corrispondenti alle suddette classi mutazionali. Di conseguenza, si potrebbe supporre che le disfunzioni di tipo I siano la manifestazione degli eventi classici di mutagenesi a carico del gene *TP53* e, al contrario, che le disfunzioni di tipo II, siano la manifestazione di eventi mutageni più complessi, nati da una pressione selettiva in parte diversa e con un probabile maggiore impatto prognostico sfavorevole. E' stato ad esempio dimostrato, attraverso la trasfezione di differenti mutanti di *TP53* in cellule di lievito, che circa il 30% delle mutazioni ha un effetto dominante negativo sull'allele *TP53* "wild-type" e che tali mutazioni ricadono preferenzialmente in codoni codificanti aminoacidi altamente conservati localizzati all'interno del DBD [109]. La correlazione delle disfunzioni di tipo I a mutazioni prevalentemente

localizzate nel DBD avvalorano l'ipotesi che quest'ultime possano esercitare un meccanismo dominante negativo sulla proteina normale e quindi, come supposto, manifestare il loro effetto anche in assenza di meccanismi di inattivazione biallelica del gene *TP53*. Per quanto riguarda la disfunzione di tipo III, essa è stata osservata in associazione a una mutazione interna al DBD ma a livello di residui non compresi nelle regioni corrispondenti alle classi dei mutanti di "contatto" o "conformazionali".

I risultati ottenuti relativamente alle varie tipologie di disfunzioni e alle loro correlazioni con lo stato del gene *TP53*, concordano solo in parte con i dati pubblicati in letteratura. Questo deriva principalmente dalla scarsità di studi di funzione della proteina p53 nella LLC. Solo due recenti lavori riportano l'identificazione di altrettante tipologie di disfunzioni a carico di p53 nella LLC, ma in termini non totalmente sovrapponibili a quanto rilevato in questo studio. Sebbene, infatti, nel lavoro pubblicato dal gruppo di ricerca di *Stankovic T et al.* [103] sia stata identificata una tipologia di disfunzione, definita di tipo A, sovrapponibile, sia in termini di definizione che di relazione con lo stato di inattivazione monoallelica del gene *TP53*, alla disfunzione di tipo I osservata in questo studio, non è stato possibile trovare alcuna corrispondenza relativamente alle disfunzioni di tipo II e III. Al contrario, nel suddetto lavoro, viene descritta l'esistenza di una seconda tipologia di disfunzione, definita di tipo B, per definizione ma non per correlazione con lo stato del gene *TP53*, paragonabile alla disfunzione di tipo III di questo studio. L'assenza di una corrispondenza può essere giustificata considerando i differenti parametri presi in esame in ciascuno degli studi, sulla base dei quali ruota la definizione della tipologia di disfunzione. In questo lavoro, è stato possibile identificare 3 classi di disfunzioni prendendo in considerazione la sola espressione della proteina p53. La classificazione suggerita dal gruppo di ricerca di *Stankovic T et al.*, nasce invece dall'analisi simultanea dei livelli di espressione delle proteine p53 e p21. Di conseguenza, la disfunzione di tipo B, che si associa ad assenza di accumulo basale di p53 e deficit contemporaneo di induzione di entrambe le proteine dopo irradiazione, risulta associata a mutazioni del gene *ATM*, confermando il ruolo di tale proteina nell'attivazione della via di p53 a seguito dell'induzione di un danno al DNA. Analogamente, nel lavoro pubblicato da *Pettitt AR et al.*, ritroviamo un'ulteriore classificazione delle tipologie di disfunzioni, basata sull'espressione di p53 e p21 [110]. In questo lavoro, viene inoltre identificata una terza tipologia di disfunzione, definita di tipo C, caratterizzata da incapacità della proteina p21 di accumularsi in seguito ad un danno a carico del DNA cellulare, nonostante una normale risposta di p53. Tale disfunzione è riportata in circa il 10% dei pazienti affetti da LLC e sembra essere causata dalla presenza di un polimorfismo nel codone



31 del gene *p21*. Questo difetto è infine associato a fenomeni di resistenza alla citotossicità indotta dalle radiazioni ionizzanti [110]. Ad ogni modo, quello che risulta evidente dai lavori pubblicati in letteratura e viene avvalorato da questo studio è che ad ogni tipologia di disfunzione della proteina p53 rilevata, si associa una diversa alterazione di natura genica, che può coinvolgere la proteina p53 stessa o diverse componenti a monte o a valle della sua via di segnalazione.

Una quota pari al 20.0% dei pazienti disfunzionali è risultata caratterizzata dall'assenza di alterazioni molecolari del gene *TP53*. In questi casi si potrebbe supporre che la mutazione non sia del tutto assente, ma che l'alterazione genica sia presente in esoni non routinariamente sequenziati, ovvero esoni esterni al DBD. Questo implica che la restrizione dell'analisi di sequenza agli esoni 5-8 del gene *TP53* potrebbe dare origine a dei falsi negativi, sottostimando la presenza di mutazioni non presenti nei comuni hot-spots. In realtà, in tutti i casi discordanti, nonostante sia stato eseguito il sequenziamento dell'intera regione codificante del gene *TP53* (esoni 2-11), non è stata rivelata presenza alcuna di mutazioni. Questo dato conferma quanto osservato recentemente in letteratura riguardo la possibilità di osservare anomalie funzionali e, quindi, meccanismi di stabilizzazione della proteina p53, indipendenti dalla presenza di mutazioni a carico del gene *TP53*. In realtà, si potrebbe ipotizzare che la mutazione sia presente in un subclone di ridotta estensione all'interno della popolazione neoplastica, tanto da risultare non rilevabile, oppure che i casi discordanti siano contraddistinti da alterazioni di altre componenti della via di p53. È stato, infatti, dimostrato che il 15%-35% dei pazienti affetti da LLC possiede una copia soprannumeraria del cromosoma 12, che codifica per MDM2, proteina inibitoria di p53. L'overespressione di MDM2 è stata, inoltre, riportata nella LLC sia come anomalia singola che in associazione alla trisomia del cromosoma 12. Anche l'inattivazione del gene *ATM*, come descritto nel lavoro del gruppo di ricerca di *Stankovic T*, rappresenta un'ulteriore potenziale causa di disfunzioni di p53 in pazienti affetti da LLC *TP53* "wild-type". Ridotti livelli della proteina ATM sono stati rilevati complessivamente nel 30%-40% dei pazienti di LLC e nel 20% dei casi è stata dimostrata la presenza della del11q22-23, regione su cui mappa il gene *ATM*. Sia l'overespressione di MDM2 che l'inattivazione di *ATM* comporterebbero tuttavia una alterazione nella capacità della proteina p53 di accumularsi dopo irradiazione, in assenza di quantità rilevabili della stessa in condizioni basali. In realtà, il fenotipo osservato nei pazienti disfunzionali *TP53* "wild-type", di cui 3 caratterizzati da disfunzioni di tipo I e 2 di tipo II, non mostra una correlazione con quanto atteso in presenza di anomalie di MDM2 o *ATM*, essendo caratterizzato, sia nel caso delle disfunzioni di tipo I che II, da un aumento costitutivo

basale della proteina p53. Di conseguenza, in tali casi si potrebbe pensare ad anomalie dei meccanismi di degradazione di p53 a carico di molecole diverse da MDM2, come l'oncosoppressore ARF o i regolatori del processo di ubiquitinazione. Nei pazienti disfunzionali *TP53* “wild-type” è quindi in corso uno studio volto all'identificazione di cause alternative di disfunzione dell'oncosoppressore p53, che comprende comunque la valutazione dello stato dei geni ATM e MDM2. Ad ogni modo, indipendentemente dalle cause di stabilizzazione della proteina p53 in condizioni basali, è necessario ricordare come la presenza di alterazioni funzionali di p53 possa predisporre il paziente a un'eventuale ridotta o mancata risposta terapeutica in quei casi in cui è previsto l'impiego di farmaci citotossici che agiscono, come le IR, inducendo, attraverso il danno al DNA, la via apoptotica p53-dipendente. La rilevazione di tali disfunzioni a prescindere dal sequenziamento del gene *TP53*, data la loro incidenza, pari nel nostro studio al 20.0%, diviene quindi di grande importanza al fine di identificare quei pazienti che, nonostante siano caratterizzati da assenza di alterazioni molecolari a carico di *TP53*, potrebbero presentare una scarsa risposta ai chemioterapici convenzionali e dovrebbero quindi essere indirizzati verso approcci terapeutici differenti. Appare inoltre interessante sottolineare come i casi disfunzionali/*TP53* “wild-type” siano tutti caratterizzati da una malattia resistente. L'associazione tra questa fase di malattia e la comparsa di anomalie di p53 indipendenti da eventi mutazionali supporta, infatti, ulteriormente la tesi che i farmaci citotossici possano sfruttare la ridondanza della via di p53 per indurre chemiorefrattarietà.

Per identificare il possibile significato prognostico delle disfunzioni a carico della proteina p53, è stata in seguito valutata la presenza di un'eventuale correlazione tra le suddette tipologie di disfunzioni e i principali fattori indicatori di prognosi nei pazienti affetti da LLC. Come atteso, la maggior parte dei pazienti disfunzionali ha manifestato una corrispondenza, più evidente nel caso delle disfunzioni di tipo II, con fattori prognostici infausti, rappresentati dalla presenza di una sequenza non mutata dei geni IgHV, dalla positività per l'espressione della proteina ZAP70 e dalla presenza della del17p13. Un'associazione meno forte è stata invece osservata nei confronti della positività per l'antigene CD38. Quest'ultimo dato è in accordo con quanto riportato nel lavoro di *Lin K et al.*, nel quale, nonostante la conferma del valore predittivo indipendente dello stato mutazionale, dell'espressione del CD38 e delle disfunzioni della proteina p53 nei pazienti affetti da LLC, è stata osservata l'esistenza di una correlazione di tali disfunzioni con lo stato IgHV non mutato ma non con la positività per l'antigene CD38 [111]. In particolare, l'associazione delle disfunzioni di p53 con stato IgHV non mutato potrebbe essere giustificata formulando una serie di ipotesi. Si potrebbe supporre

che tali disfunzioni alterino la capacità delle cellule B neoplastiche di andare incontro al processo di ipermutazione somatica; alternativamente, le cellule B di LLC IgHV non mutate potrebbero essere propense all'acquisizione di lesioni genetiche che risultano nella comparsa di disfunzioni a carico di p53 o le stesse disfunzioni della proteina p53 potrebbero facilitare l'espansione clonale delle cellule B tumorali con stato IgHV non mutato. Quale di queste ipotesi sia la più corretta non è ancora noto, di conseguenza, la comprensione di questi meccanismi diventa fondamentale per la predizione della sopravvivenza e della risposta terapeutica in pazienti affetti da LLC con difetti a carico di p53. Anche il dato relativo all'associazione delle disfunzioni della proteina p53 alla del17p13 rispecchia le evidenze riportate in letteratura, secondo le quali, nonostante la presenza di mutazioni del gene *TP53* si sia rivelata essere un fattore prognostico indipendente, la loro natura monoallelica rimane ristretta ad una piccola percentuale di casi, essendo, tali mutazioni, spesso presenti in concomitanza alla suddette delezioni, che conferiscono aggressività, chemioresistenza e prognosi infausta alla patologia. Inoltre, quanto osservato in questo studio si accompagna all'osservazione che le delezioni del braccio corto del cromosoma 17 non si presentano quasi mai come unica aberrazione cromosomica nel genoma dei pazienti affetti da LLC [91]. La positività per la del17p13 anche in pazienti con disfunzioni di tipo I, delle quali era stata supposta, in questo studio, una correlazione a forme di inattivazione monoallelica del gene *TP53*, non deve essere considerata una discrepanza in quanto, in tali casi, la presenza di una quota normale di proteina p53 può essere giustificata ipotizzando che l'alterazione biallelica sia estesa solo all'interno di un subclone della popolazione neoplastica e non nella totalità di essa.

Il passo conclusivo di questo studio è stato quello di valutare se le disfunzioni della proteina p53 rilevate nei pazienti di LLC, causassero un difetto nell'induzione del processo apoptotico, dopo esposizione dei campioni a radiazioni ionizzanti. Queste, infatti, danneggiano il DNA cellulare inducendo la via apoptotica p53-dipendente, per cui le cellule caratterizzate da assenza di alterazioni nella via di p53 vanno normalmente incontro a una progressiva morte cellulare dopo irradiazione. Come atteso, le cellule isolate da pazienti con normale funzionalità di p53 hanno presentato una preservata capacità di andare incontro al processo apoptotico a seguito dell'insulto genotossico. Al contrario, le cellule isolate da pazienti caratterizzati da disfunzioni di p53, eccetto che in un singolo caso, hanno mostrato, indipendentemente dalla presenza di mutazioni a carico del gene *TP53*, difetti nell'induzione del processo apoptotico, confermando che la morte cellulare indotta dalle radiazioni ionizzanti è p53-dipendente. La normale risposta alle radiazioni ionizzanti riportata in uno dei pazienti

disfunzionali studiati, potrebbe essere invece consistente con l'induzione di una via apoptotica p53-indipendente. Un dato interessante, emerso dall'analisi dei risultati ottenuti in tale ambito, è rappresentato dall'identificazione di due diversi livelli di resistenza all'induzione del processo apoptotico, ciascuno strettamente correlato alla tipologia di disfunzione. Infatti, le disfunzioni di tipo I, sono risultate caratterizzate da una resistenza "parziale" mentre sia le disfunzioni di tipo II che III da una resistenza "totale" all'apoptosi indotta dopo esposizione a radiazioni ionizzanti. Questo dato correla perfettamente con quanto atteso in relazione alla descrizione del fenotipo delle differenti disfunzioni di p53. Infatti, la resistenza parziale al processo apoptotico è stata osservata laddove presente una quota normale di proteina p53; al contrario, in assenza di una quota normale di proteina p53 è stata rilevata una resistenza totale. La resistenza al processo apoptotico indotto dalle radiazioni ionizzanti, osservata in questo studio nei pazienti p53 disfunzionali, trova conferma non solo nel lavoro di *Stankovic T e coll.* ma anche in un lavoro di recente pubblicazione in cui si dimostra l'esistenza di una correlazione tra la suddetta forma di resistenza e la presenza di un'elevata complessità genomica nelle cellule B di LLC, caratterizzata non solo da mutazioni del gene *TP53* ma anche dalle delezioni delle regioni 17p13 e 13q14 e dipendente da errori nel processo di riparo del DNA piuttosto che dall'accorciamento telomerico [112]. Nei casi caratterizzati da resistenza parziale, la proporzione di cellule apoptotiche è risultata differente a seconda del campione in esame. Questo dato riflette, ovviamente, la quota residua di proteina p53 funzionale specifica di ciascun paziente, la peculiarità delle caratteristiche della proteina p53 disfunzionale in termini di effetto dominante negativo o acquisto di nuove proprietà oncogeniche e l'eventuale contributo di vie apoptotiche p53-indipendenti. Ad ogni modo, a prescindere dalla maggiore o minore parzialità della resistenza al processo apoptotico, caratteristica delle disfunzioni di tipo I, in tali casi la popolazione neoplastica disfunzionale potrebbe essere comunque selezionata positivamente in seguito all'esposizione a farmaci citotossici convenzionali, i quali potrebbero, a loro volta, favorire l'acquisizione di ulteriori anomalie a livello della via apoptotica p53-dipendente, con peggioramento della prognosi del paziente. Tali effetti potrebbero verificarsi, in misura ancor più evidente, nei pazienti caratterizzati da disfunzioni di tipo II o III e quindi da resistenza totale al processo apoptotico. All'interno di tale gruppo, nei pazienti non trattati all'esordio o in progressione di malattia, si potrebbe predire la possibilità di una mancata risposta ai chemioterapici citotossici convenzionali; al contrario, nei pazienti già esposti a una o più linee di terapia si potrebbe correlare l'acquisizione della resistenza farmacologica alla rilevazione della specifica alterazione molecolare e funzionale della proteina p53. Di conseguenza, in entrambi i casi

sarebbe necessario indirizzare i pazienti a terapie alternative, come l'impiego di anticorpi monoclonali o il trapianto di cellule staminali emopoietiche, che non comportino l'ulteriore selezione di subcloni con anomalie di p53.

Lo studio della risposta di p53 alle radiazioni ionizzanti si è rivelata, in questo studio, una modalità efficace sia per la valutazione di anomalie funzionali a carico di tale proteina che per l'indicazione di anomalie molecolari a carico del gene *TP53*. Il fatto che i difetti funzionali della proteina p53 siano stati osservati in tutti i casi con mutazioni del gene *TP53* rivela un alto livello di specificità della metodica, indicando una probabilità quasi irrisoria di falsi negativi. Inoltre, la rilevazione di disfunzioni di p53 anche in pazienti *TP53* "wild-type", evidenzia l'importanza dello studio funzionale nell'evitare di sottostimare le anomalie a carico di tale oncosoppressore che potrebbero avere un impatto prognostico paragonabile a quello osservato in presenza di mutazioni del gene *TP53* e/o delezioni del braccio corto del cromosoma 17. I pazienti p53 disfunzionali ma *TP53* "wild-type" diventano oltretutto interessanti per uno studio finalizzato all'individuazione di meccanismi alternativi di stabilizzazione di p53, che potrebbe comportare la scoperta di nuovi target terapeutici destinati a tale sottogruppo. Infine, l'osservazione dell'assenza di un'equivalenza funzionale tra le differenti forme anomale della proteina p53, correlate o meno a eventi mutazionali a carico del gene *TP53*, rappresenta un punto chiave nella comprensione dell'eterogeneità prognostica dei pazienti affetti da LLC e caratterizzati da alterazioni del suddetto oncosoppressore.

Dal momento che le anomalie a carico di p53 si sono dimostrate rilevanti non tanto nella patogenesi, quanto nella progressione della LLC e nello sviluppo di resistenze farmacologiche, dimostrando come una errata linea terapeutica in questi pazienti possa comportare lo sviluppo di forme più aggressive della malattia, sarebbe fondamentale proporre dei nuovi algoritmi terapeutici che definiscano un "percorso individuale" per ciascun paziente, finalizzato ad una selezione razionale della terapia medica sulla base dello stato di p53. A tale scopo l'analisi simultanea dello stato mutazionale del gene *TP53*, non ancora incluso nelle attuali linee guida diagnostiche della LLC, e della funzionalità del suo prodotto proteico sarebbe di grande importanza per un'opportuna gestione del paziente che abbia, come fine ultimo, il miglioramento della prognosi e l'allungamento delle aspettative di sopravvivenza.

## 5. REFERENZE

1. Lane D, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990; 4:1-8
2. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456
3. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57:1083-1093
4. Hinds PW, Finlay CA, Levine AJ. Mutation is require to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63:739-746
5. Roemer K, Friedmann T. Mechanisms of action of the p53 tumor suppressor and prospects for cancer gene therapy by reconstitution of p53 function. *Ann NY Acad Sci* 1994; 716:265-282
6. Ho WC, Fitzgerald MX, Marmorstein R. Structure of the p53 Core Domain Dimer Bound to DNA. *J Biol Chem* 2006; 281:20494-20502
7. Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 2008; 77:557-582
8. Okorokov AL, Orlova EV. Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19:197-202
9. Tidow H, Melero R, Mylonas E, Freund SM, Grossmann JG, Carazo JM, Svergun DI, Valle M, Fersht AR. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:12324-12329
10. Okorokov AL, Sherman MB, Plisson C, Grinkevich V, Sigmundsson K, Selivanova G, Milner J, Orlova EV. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *EMBO J* 2006; 25:5191-5200
11. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992; 1:45-49
12. Hainaut P, Milner J. A Structural Role for Metal Ions in the Wild- Type Conformation of the Tumor Suppressor Protein-p53. *Cancer Res* 1993; 53:1739-1742
13. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009; 137:609-622
14. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001; 268:2764-2772
15. Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 1994; 4:865-875

16. Kruse JP, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell* 2008; 133:930-930
17. Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 2005; 123:49-63
18. Boehme KA. Regulation of p53-insights in a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44:367-392
19. Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* 2006; 10:501-514
20. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:77-83
21. Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, Reinberg D. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 2004; 432:353-360
22. Boehme KA, Blattner C. Regulation of p53-insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44:367-392
23. Xiong Y and Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366:701-710
24. Frebourg T, Friend SH. The Importance of p53 Gene Alterations in Human Cancer - Is There More Than Circumstantial Evidence. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85:1554-1557
25. Stephens T. Closing in on p53's normal function. *J NIH Res* 1991; 3:32-36
26. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137:413-431
27. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107:137-148
28. Kruse JP, Gu W. p53 aerobics: the major tumor suppressor fuels your workout. *Cell Metab* 2006; 4:1-3
29. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 2008; 133:612-626
30. Harris CC, Hollstein M. Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. *N Engl J Med* 1993; 329:1318-1327
31. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18:6145-6157
32. Vousden KH. p53: Death Star. *Cell* 2000; 103:691-694

33. Drayton S, Peters G. Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:98-104
34. Zuckerman V, Wolynec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 2009; 219:3-15
35. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000; 14:2015-2027
36. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000; 406:207-210
37. Shetty S, Shetty P, Idell S, Velusamy T, Bhandary YP, Shetty RS. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* 2008; 283:19570-19580
38. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 2006; 24:841-851
39. Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X, Crook T, Del Sal G. The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:912-920
40. Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, Triboulet R, Bossis G, Shmueli A, Rodriguez MS, Coux O, Sardet C. E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 2006; 127:775-788
41. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602
42. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12:2424-2433
43. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacological activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 2003; 4:371-381
44. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11:577-590
45. Chipuk JE, Green DR. p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol* 2003; 23:355-361



46. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanism of neural cell apoptosis. *J Neurochem* 2004; 90:1281-1289
47. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; 458:1127-1130
48. Lie H. miR join the p53 network-another piece in the tumor-suppression puzzle. *Natu Rev Canc* 2007, 7:819-822
49. Bommer G. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppression genes. *Curr Biol* 2007; 17:1298-1307
50. Chang TC. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26:745-752
51. Raver Shapira N. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26:731-743
52. Tarasov V. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR34a is a p53 target that induces apoptosis and G1 arrest. *Cell Cycle* 2007; 6:1586-1593
53. Lin He. A microRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Nature* 2007; 447:1130-1135
54. Bougeard G, Sesboue R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, Brugières L, Chompret A, de Paillerets BB, Stoppa-Lyonnet D, Bonaïti-Pellié C, Frébourg T. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet* 2008; 45:307-356
55. Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999; 18:477-485
56. Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 2004; 23:2330-2338
57. Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Inga A, Abbondandolo A, Resnick MA, Fronza G. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* 2002; 21:1641-1648
58. JV Gannon, R Greavesl, Riggo and DP Lane. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9:1595-1602

59. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53
60. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:701-713
61. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; 26:2157-2165
62. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:8424-8429
63. Milner J, Medcalf EA, Cook AC. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* 1991; 11:12-19
64. Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65:765-774
65. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60:6788-6793
66. Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992; 255:459-462
67. Koga H, Deppert W. Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser.) in vivo. *Oncogene* 2000; 19:4178-4183
68. Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1999, 19:1438-1449
69. Song H, Hollstein M, Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nature Cell Biol* 2001; 9:573-580
70. Lu C, El-Deiry WS. Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity. *Apoptosis* 2009; 14:597-606
71. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60:6788-6793
72. Soussi T. in *25 Years of p53 Research* (eds P. Hainaut & K. G. Wiman) 255-292 (Springer, 2005)
73. Solit DB, Rosen N. Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2006; 6:1205-1214

74. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004; 119:861-872
75. Olivier M, Hainaut P, Borresen AL. in *25 Years of p53 Research* (eds P. Hainaut & K. G. Wiman) 321-338 (Springer, 2005)
76. Shi H, Le Calvez F, Olivier M, Hainaut P. in *25 Years of p53 Research* (eds P. Hainaut & K. G. Wiman) 293-319 (Springer, 2005)
77. Bartel F, Jung J, Böhnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S. Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14:89-96
78. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. A large-scale analysis of the prognostic association of TP53 mutations in breast cancer, including comparison of the clinical effects of different mutation categories. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1157-1167
79. Junttila MR. p53-a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Canc* 2009; 9:821-829
80. Mendrysa SM, O'Leary KA, McElwee MK, Michalowski J, Eisenman RN, Powell DA, Perry ME. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev* 2006; 20:16-21
81. Gatz C, Moore L, Dumble M, Donehower L. Tumor suppressor dosage regulates stem cell dynamics during aging. *Cell Cycle* 2007; 6:52-55
82. Vijg J, Hasty P. Aging and p53: getting it straight. A commentary on a recent paper by Gentry and Venkatachalam. *Aging Cell* 2005; 4:331-333
83. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:68-76
84. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. Restoration of p53 leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007; 445:661-665
85. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 2007; 26:2243-2254
86. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the Therapeutic Efficacy of p53 Restoration in Tumors. *Cell* 2006; 127:1323-1334

87. Tang X, Zhu Y, Han L, Kim AL, Kopelovich L, Bickers DR, Athar M. CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117:3753-3764
88. Bykov VJ, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG. PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 2005; 24:3484-3491
89. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910-1916
90. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W, Lichter P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85:1580-1589
91. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PMV, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Berton F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Brit J Haematol* 2008; 143:532-536
92. Stilgenbauer S, Krober A, Busch R. 17p Deletion predicts for inferior overall survival after fludarabine-based first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: first analysis of genetics in the CLL4 Trial of the GCLLSG. *Blood* 2005; 106:Abstract 715
93. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370:230-239
94. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, Ferrajoli A, Lerner SA, Lynn A, Kay NE, Keating MJ.. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; 114:957-964
95. 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
96. Zenz T, Benner A, Döhner H, Stilgenbauer S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer. The role of the p53 pathway. *Cell Cycle* 2008; 24:3810-3814
97. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112:3322-3329
98. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The Prognostic Value of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Independent of Del17p13: Implications for Overall Survival and Chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15:995-1004
99. Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009; 114:2589-2597
100. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111:5446-5456
101. Murphy ME. Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13:916-920
102. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33:357-365
103. 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
104. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propriis MS, Mancini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukemia

patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003; 102:1035-1041

105. 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

106. 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; 35:893-901

107. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, De Propriis MS, Giammartini E, Mancini F, Milani ML, Guarini A, Foà R. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol* 2005; 130:549-557

108. Cicalese A, Ionizzi G, Pasi EC, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minacci S, Di Fiore PP, Pelicci PG. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing division in mammary stem cells. *Cell* 2009; 138:1083-1095

109. Monti P. Tumor p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* 2002; 21:1641-1648

110. Johnson GG, Sherrington PD, Carter A, Lin K, Liloglou T, Field JK, Pettitt AR. A Novel Type of p53 Pathway Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia Resulting from Two Interacting Single Nucleotide Polymorphisms within the p21 Gene. *Cancer Res* 2009; 69:5210-5217

111. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IGVH mutation in chronic lymphocytic leucemia. *Blood* 2002; 100:1404-1409

112. Sali H. Increased genomic alteration complexity and telomere shortening in B-CLL cells resistant to radiation-induced apoptosis. *Cytogenet Genome Res* 2008; 122:343-349

### **PARTE III**

*Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule  
T regolatorie di pazienti affetti da neoplasie  
ematologiche sottoposti a trapianto allogenico di  
cellule staminali emopoietiche*

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (TCSE)**

#### *1.1.1 Tipologie di TCSE e principi relativi all'impiego del TCSE in pazienti affetti da neoplasie ematologiche*

Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (TCSE) consiste nell'infusione di CSE normali al fine di sostituire un sistema emopoietico anormale. Viene comunemente impiegato in ambito clinico per il controllo a lungo termine di patologie maligne, principalmente di natura ematologica, e disordini ereditari o acquisiti, sia di origine emopoietica che non-emopoietica, come le immunodeficienze primarie, i disturbi metabolici, le emoglobinopatie e le forme severe di anemia e/o infezioni sviluppate a seguito di aplasia midollare [1-2]. Le prime evidenze relative alle potenzialità delle CSE nella sfera trapiantologica risalgono alla fine della II Guerra Mondiale e derivano dalle numerose ricerche atte ad affrontare il problema delle conseguenze dannose dell'esposizione alle radiazioni nucleari. Nel 1952 è stato dimostrato che la trasfusione di cellule di origine midollare garantisce la sopravvivenza di topi esposti a un dosaggio sovramassimale letale di radiazioni ionizzanti (IR), grazie al recupero della funzione emolinfopoietica e quindi dell'aplasia midollare irreversibilmente compromessa [3]. Sempre nello stesso anno è stato osservato che l'inoculo di cellule midollari successivo all'esposizione a dosi mieloablativa di IR permette anche di curare modelli tumorali animali sperimentali con prolungamento della sopravvivenza libera da malattia, e che questo evento, così come il recupero della cellularità del midollo osseo, si verifica sia nel caso in cui si ricorre all'impiego di un donatore di cellule midollari geneticamente identico che non-identico [4]. Questi studi hanno rappresentato la base per l'evoluzione di uno schema terapeutico basato sull'impiego del TCSE in pazienti affetti da patologie midollari. In realtà la dizione propria di TCSE è stata introdotta solo in seguito rispetto alle prime evidenze sperimentali. Infatti, l'impiego iniziale di cellule di origine midollare ha comportato per svariati decenni l'utilizzo della terminologia di "trapianto di midollo osseo", fino alla dimostrazione che non solo il midollo osseo, ma anche altre sedi quali il sangue venoso periferico e il sangue placentare, sono caratterizzate da componenti cellulari a carattere staminale, rappresentate appunto dalle CSE, capaci di mediare la funzione emolinfopoietica. Il principio del TCSE è quindi rappresentato dall'impiego di elevate dosi di terapia mieloaplastizzante, finalizzato all'eliminazione della patologia con coinvolgimento midollare, seguito dall'infusione di CSE con lo scopo di ripristinare la funzione midollare emopoietica compromessa dalla terapia stessa. Nell'ambito delle patologie ematologiche neoplastiche,



l'impiego terapeutico del TCSE è stato favorito dall'osservazione che il soggetto può beneficiare di un incremento della posologia farmacologica radio/chemioterapica, a cui la risposta antitumorale risulta direttamente proporzionale, senza limitazioni correlate alla tossicità midollare.

Esistono due principali tipologie di TCSE: autologo e allogenico. Nel primo caso, il donatore di CSE è rappresentato dal paziente stesso, nel secondo da un soggetto diverso. Il TCSE autologo viene impiegato principalmente in pazienti affetti da neoplasie ematologiche radio/chemiosensibili ad alto rischio di recidiva o resistenti ai dosaggi standard di radio/chemioterapia. Di conseguenza, il proposito di questa forma di TCSE è quello di garantire un incremento della terapia antileucemica finalizzato al raggiungimento della massima uccisione delle componenti tumorali, con il limite esclusivo della tossicità extra-midollare sistemica [5]. Un concetto diverso è alla base del TCSE allogenico. Esso mira alla completa sostituzione del patrimonio staminale emopoietico del ricevente mediante l'infusione di CSE, ottenute da un idoneo donatore compatibile, con conseguente ricostituzione sia di un nuovo sistema ematopoietico che di un nuovo sistema immunitario [6-7]. Quindi, l'obiettivo del TCSE allogenico è quello di eradicare e sostituire le cellule ematopoietiche malate con quelle del donatore, affinché queste possano dare origine a un sistema ematopoietico e immunitario sano, con la realizzazione di un "chimerismo" completo. Con il termine di chimerismo si vuole intendere la coesistenza in uno stesso individuo di cloni cellulari con patrimonio genetico diverso. Nei trapianti allogenici si instaura, infatti, un interscambio di cloni cellulari portatori di corredi genetici diversi fra le cellule emopoietiche del donatore e il sistema immune del ricevente, che si traduce nella realizzazione di un chimerismo sistemico misto [8-9]. Il trapianto allogenico costituisce una procedura complessa, ma particolarmente efficace non solo nel trattamento di varie forme di Leucemie Acute e Croniche, Linfomi e Mieloma Multiplo, ma anche per la correzione di difetti quantitativi o congeniti (es: Talassemia major) del sistema emopoietico. Nell'ambito della terapia antitumorale, esso consente al paziente di beneficiare sia dell'incremento della posologia antineoplastica che, grazie alla derivazione del prodotto di infusione da un donatore compatibile, della possibilità di induzione di una risposta immune antileucemica, mediata, come vedremo in seguito, dalle componenti alloreattive del donatore stesso. Il primo problema da affrontare nel caso di un trapianto allogenico è quindi rappresentato dalla disponibilità di un donatore compatibile [10]. I geni del "Complesso Maggiore di Istocompatibilità" o HLA (Human Leukocyte Antigen), sono i loci primariamente coinvolti nel controllo della compatibilità tra individui. Mappano sul cromosoma 6p con i geni di classe

II, III e I organizzati dalla regione centromerica verso la regione telomerica e sono altamente polimorfi [11]. Tale caratteristica riflette la loro funzione primaria, che è quella di codificare per molecole coinvolte nel legame e nella presentazione dei peptidi antigenici alle cellule T linfoidi. I geni HLA sono codominanti; presentano una modalità di trasmissione mendeliana aploipica, per cui gli alleli presenti sullo stesso cromosoma omologo vengono ereditati insieme e sono, infine, caratterizzati dal fenomeno del “Linkage Disequilibrium” per cui alcuni alleli risultano più frequentemente associati ad altri [12]. Quest’ultima peculiarità è fondamentale per la sfera trapiantologica, in quanto è stato calcolato che se ciascun allele fosse ereditato indipendentemente, vi sarebbero  $10^{23}$  combinazioni HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ uniche, il che comporterebbe una probabilità quasi irrilevante di identificare un donatore istocompatibile [13]. L’estremo polimorfismo del sistema HLA comporta che l’identità HLA sia più probabile tra consanguinei; di conseguenza, qualora un soggetto sia candidato a un TCSE allogeneico, la ricerca del donatore ha inizio con la tipizzazione del sistema HLA all’interno dei membri della famiglia. La probabilità di identificare un donatore HLA-identico familiare si verifica con una frequenza del 25% nei fratelli, ovvero in tale percentuale di casi due fratelli ereditano gli stessi aplotipi materni e paterni [14]. Il caso di gemelli omozigoti, quindi geneticamente identici è invece una situazione molto rara, nota con il termine di trapianto singenico. I notevoli progressi nel campo della genetica dell’istocompatibilità, con conseguente definizione delle complessità del sistema HLA, hanno recentemente permesso di estendere la ricerca di donatori compatibili anche all’esterno dell’ambito familiare, garantendo così la possibilità di ricorso alla procedura trapiantologica a un maggior numero di pazienti. A tale scopo sono stati creati dei registri internazionali mediante i quali è possibile identificare un donatore volontario non correlato (Matched Unrelated Donor, MUD) HLA-identico (probabilità=40%) o solo parzialmente identico (HLA-mismatched), ovvero identico per 4 o 5 dei 6 alleli dei 3 loci HLA (A, B e DR) comunemente tipizzati [15-16]. Allo stesso modo, quasi tutti i pazienti che potrebbero beneficiare di un trapianto, ma che non hanno un donatore compatibile, dispongono almeno di un potenziale donatore non perfettamente compatibile tra i familiari HLA aploidentici, ovvero identici solo per uno dei due aplotipi HLA presenti nel loro genoma (3 alleli su 6) [17-18]. Si potrebbe ricorrere a quest’ultima opzione nel caso in cui il paziente richieda un trapianto immediato e non possa attendere la ricerca di un donatore non familiare, che solitamente richiede non meno di 4-5 mesi.

In realtà, anche qualora sia disponibile un donatore HLA-compatibile, esistono altre molecole con il ruolo di barriere di compatibilità donatore-ricevente, rappresentate dagli “Antigeni del complesso Minore di Istocompatibilità” (miHA). I miHA sono codificati sia da geni

autosomali che da geni presenti sui cromosomi del sesso ereditati indipendentemente dai geni HLA e sono peptidi di derivazione self contenenti varianti polimorfiche all'interno della popolazione [19]. Nell'uomo sono stati inizialmente identificati durante gli anni '70 come antigeni responsabili del rigetto del prodotto di infusione allogenico nel contesto di un trapianto da donatore HLA-identico, sebbene rivestano un ruolo chiave anche nello sviluppo della reattività donatore *vs* ricevente [20]. La risposta immune indotta dagli antigeni miHA codificati dai geni che mappano sul cromosoma Y è poi anche associata al rischio o gli effetti positivi della combinazione donatore-ricevente di sesso diverso, il che rende indispensabile, a seconda dei casi, la valutazione della scelta di un donatore dello stesso sesso o meno. Recentemente è stato dimostrato come, nella definizione di un donatore compatibile, rivestano un ruolo importante anche fattori genetici non HLA-correlati diversi dai miHA, e rappresentati dai geni codificanti citochine di natura infiammatoria caratterizzati da polimorfismi nella regione regolatoria al 5' o al 3' della sequenza. Ne sono esempi i geni per il TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1, l'IL-8 e l'IL-10 [21]. Le forme di reattività osservate in soggetti sottoposti a un allotrapianto, dipendono quindi dall'impossibilità di raggiungere una totale istocompatibilità donatore/ricevente, anche nelle condizioni più ottimali. Questo si traduce nella coesistenza delle cellule immunocompetenti residue del ricevente, mediatrici del rigetto, e delle cellule immunocompetenti del donatore, mediatrici della GvHD (*Graft versus Host Disease*) e della GvL (*Graft versus Leukemia*) [22-26]. L'attività di entrambe le popolazioni cellulari, come vedremo in seguito, influenza ampiamente, a seconda della tipologia di antigeni non compatibili, la prognosi del paziente post-trapianto; di conseguenza, la scelta del donatore e la tipizzazione sia dei loci HLA-correlati che non-correlati, assume una primaria importanza nella fase pre-allotrapianto.

### *1.1.2 Scelta della fonte di CSE*

Indipendentemente dalla tipologia di trapianto, autologo o allogenico, la prima fase della procedura prevede l'isolamento delle CSE. Le CSE sono una popolazione morfologicamente e immunologicamente eterogenea il cui elemento unificante è rappresentato dalla capacità di generare *in vitro* aggregati clonali derivati sia da progenitori ontogenicamente primitivi che orientati, e *in vivo* dalla capacità di ricostituire l'emopoiesi dopo terapia mielo-linfoablativa. Sono cellule multipotenti, linea-specifiche e funzionalmente caratterizzate dalle capacità di autoreplicazione illimitata e differenziamento in tutti i componenti ematici sia di natura mieloide che linfoide [27]. Le CSE sono caratterizzate dall'espressione di superficie dell'antigene CD34 e di recettori di adesione che ne permettono l'insediamento spontaneo

(homing) all'interno del midollo osseo del ricevente dopo infusione, con ricostituzione di un nuovo tessuto ematopoietico. IL CD34 rappresenta ad oggi il marcatore universalmente riconosciuto delle CSE. E' una molecola coinvolta nei processi di "homing" e adesione cellulare, caratterizzata da un pattern di espressione intraspecie altamente conservato [28]. Viene espresso, sia sulle CSE sia sui progenitori midollari precoci, mentre i suoi livelli di espressione diminuiscono proporzionalmente al differenziamento emopoietico [29]. In realtà, anche cellule di origine non emopoietica, come quelle dell'endotelio vascolare, appaiono caratteristicamente CD34<sup>+</sup>, suggerendo una funzione di tale antigene anche al di fuori dell'emopoiesi. La positività per il CD34 nelle CSE si associa solitamente alla presenza di un pattern di espressione di molecole di superficie peculiare, quale Lin<sup>-</sup>, HLA<sup>low</sup>, Thy.1<sup>low</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD45RA<sup>low</sup>, CD38<sup>-</sup>. Sono state però identificate anche CSE caratterizzate dalla negatività per il marcatore CD34 associata a: Lin<sup>-</sup>, HLA<sup>-</sup>, Thy.1<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>. Tali osservazioni hanno condotto a due differenti ipotesi. Le CSE CD34<sup>-</sup> potrebbero rappresentare un compartimento cellulare più primitivo rispetto a quello delle CSE CD34<sup>+</sup>; in alternativa, il CD34 potrebbe essere un marcatore d'attivazione la cui espressione viene modulata negativamente durante il ripristino dello stato di quiescenza cellulare [30]. In ambo i casi, il differenziamento dei diversi componenti ematici risulta strettamente correlato alla combinazione di segnali di natura intrinseca, caratteristici delle CSE, ed estrinseca, derivanti dai componenti cellulari ed extra-cellulari della nicchia midollare.

Le CSE sono isolabili da 3 differenti fonti quali: il midollo osseo (MO); il sangue venoso periferico (SVP) e il sangue placentare (SCO) [31]. Ciascuna fonte differisce in termini di modalità di raccolta, composizione dell'inoculo ed effetti post-trapiantologici. Il MO ha rappresentato per molti anni l'unica fonte di CSE. Le CSE rappresentano l'1-3% delle cellule mononucleate (CM) midollari totali. La raccolta delle CSE dal MO viene effettuata mediante espianto e richiede fino a 100-200 punture delle creste iliache posteriori e, se necessario, dello sterno, eseguite in anestesia generale [32]. La quantità totale di sangue midollare che viene prelevata a fini trapiantologici è pari a circa 10-15 ml/kg del peso corporeo del ricevente. In alternativa, le CSE possono essere prelevate dal SVP, mediante "Leucoaferesi", dopo opportuna mobilizzazione delle CSE dal MO [33-35]. La mobilizzazione avviene attraverso la somministrazione di fattori di crescita per i 4-5 giorni antecedenti il prelievo, ed è necessaria a incrementare la quota di CSE periferiche, poiché normalmente essa risulta pari solo allo 0.1-0.2% delle CM totali [36]. Il G-CSF è il fattore di crescita maggiormente impiegato a tale scopo. Agisce inducendo la proliferazione delle CSE midollari e la loro mobilizzazione nel SVP grazie alla downregolazione del fattore SDF-1 (stroma-derived factor 1) presente sulla

superficie delle cellule stromali midollari (CSM) e all'induzione della proliferazione e del rilascio da parte dei neutrofili midollari di enzimi proteolitici (metalloproteasi, catepsina G, elastasi) che degradano CXCR4, recettore di SDF-1, esposto sulla superficie delle CSE [37-38]. Negli ultimi dieci anni, il numero dei trapianti di CSE isolate dal SVP è rapidamente incrementato, sostituendo il MO come principale fonte di CSE utilizzata nelle procedure trapiantologiche. L'impiego del SVP si associa infatti ad un ampio numero di vantaggi tra cui: la minore invasività del prelievo, la possibilità di determinare il numero assoluto di cellule CD34<sup>+</sup> infuse per Kg di peso corporeo del ricevente e l'induzione di una ricostituzione emopoietica completa e significativamente più rapida rispetto a quella ottenuta con CSE da MO. Il principale svantaggio deriva invece dagli effetti collaterali dovuti all'impiego dei fattori di crescita nella fase di mobilizzazione delle CSE. L'impiego del G-CFS si associa ad esempio, sebbene in un numero limitato di casi, a ingrossamento della milza, complicanze cardiocircolatorie e aumento della probabilità di sviluppare neoplasie ematologiche (es: leucemie) [39]. La fonte di CSE di più recente identificazione è invece rappresentata dal sangue placentare (SCO). La raccolta delle CSE avviene in tal caso subito dopo il parto, una volta reciso il cordone ombelicale. Tra i vantaggi relativi all'utilizzo del SCO: l'immediata disponibilità delle unità di SCO (al contrario, il 20-30% dei donatori iscritti nei registri non è infatti disponibile al momento del trapianto); la maggior probabilità di reperire donatori; il minor rischio di trasmissione di alcuni agenti infettivi (CMV, EBV) e, infine, le caratteristiche biologiche uniche delle CSE isolate [40]. E' stato, infatti, dimostrato che tali cellule, rappresentanti lo 0.8-1.2% delle CM totali del SCO, sono caratterizzate da un elevato grado di immaturità immunologica che si traduce sia in una capacità di replicazione e differenziazione verso le diverse linee cellulari emopoietiche, superiore a quella delle corrispondenti cellule midollari e periferiche, che, nel contesto di un allotrapianto, in una ridotta capacità delle stesse di esercitare un'aggressione immunologica nei confronti dei tessuti del ricevente e pertanto in una ridotta incidenza di GvHD acuta e cronica. Questa forma di allotolleranza riduce di conseguenza l'importanza del grado di compatibilità HLA donatore/ricevente, consentendo un TCSE anche in situazioni di non consanguineità e/o di parziale compatibilità HLA donatore/ricevente [41-43]. La raccolta del SCO è inoltre un'operazione semplice e rapida, che non comporta alcun rischio legato a procedure invasive di prelievo per la madre o per il neonato. Gli svantaggi sono, invece, essenzialmente rappresentati dall'impossibilità di riutilizzo del prodotto di infusione in caso di rigetto, mancato attecchimento o recidiva, e dal numero limitato di cellule CD34<sup>+</sup> infuse, legato anche alla quantità di SCO che può essere raccolta da una placenta al momento del parto. Esso influenza la ricostituzione dell'intero

sistema immunitario del ricevente, che manifesta una cinetica più lenta, con conseguente effetto negativo sulla sopravvivenza del paziente, dovuto a una maggiore possibilità di insorgenza delle infezioni [44].

La scelta di una piuttosto che di un'altra fonte di CSE dipende essenzialmente dalla tipologia di trapianto. Nel caso di un TCSE autologo, il principale fattore influenzante l'impatto clinico dell'inoculo, dipende principalmente dalla quantità di CSE e dei loro effetti sulle cinetiche di recupero del sistema emolinfopoietico. Di conseguenza il SVP, distinto, grazie al processo di mobilitazione, dal maggior numero di progenitori emopoietici, rappresenta la fonte di impiego preferenziale in tale forma di TCSE. Al contrario, più complessa risulta la scelta della fonte di CSE nel TCSE allogenico. In tal caso, infatti, il decorso post-trapianto dipende non solo dalla quantità di progenitori emopoietici e dalla loro influenza sulle cinetiche di ricostituzione emopoietica, ma anche dalla quantità di cellule accessorie sempre di origine ematica, quali linfociti T, cellule NK e cellule dendritiche (DC), contaminanti l'inoculo di CSE [45]. Tali componenti influenzano sia le cinetiche di recupero del sistema emolinfopoietico che le reazioni immunologiche donatore-ricevente e viceversa. Si ritiene che il MO possa costituire la fonte preferenziale del TCSE allogenico in pazienti affetti da patologie midollari non maligne o neoplasie ematologiche in stadio precoce; e, al contrario, che il SVP possa essere impiegato nelle neoplasie ematologiche in stadio tardivo o nelle forme di TCSE associate ad un regime preparativo radio/chemioterapico non-mieloaplastizzate. In questi ultimi casi, il ricevente potrebbe beneficiare degli effetti di accelerazione delle cinetiche correlate alla produzione di un nuovo sistema emopoietico e del controllo della patologia mediato dalla potenziale reattività delle cellule immunocompetenti del donatore nei confronti delle cellule patologiche del ricevente. L'impiego delle CSE isolate da SCO è infine previsto, a causa del numero modesto di CSE isolabili da tale fonte, solo in ambito allogenico in pazienti pediatrici [46-47]. Per superare le barriere del dosaggio cellulare nel trapianto da SCO, sono stati però intrapresi numerosi studi, per valutare alcune soluzioni possibili, come ad esempio l'infusione di due unità di SCO o la stimolazione dell'espansione, *in vitro*, dei progenitori isolati dal cordone ombelicale [48-53]. In base a quanto riportato appare quindi evidente l'importanza della scelta della fonte più appropriata di CSE in ambito trapiantologico. Tale processo dovrebbe essere adattato al singolo paziente per garantire i maggiori vantaggi correlati a ciascuna delle tre fonti.

### *1.1.3 Il Condizionamento pre-TCSE*

Il Condizionamento è un regime terapeutico preparativo cui è sottoposto il ricevente di un TCSE, sia autologo che allogenico, indispensabile per il successo del TCSE. Consiste in un trattamento intensivo chemio/radioterapico caratterizzato dall'impiego di dosi "sovramassimali" in grado di causare un danno irreversibile a carico dei componenti emopoietici midollari tale da non consentire un recupero ematologico spontaneo. Lo scopo del Condizionamento è quello di eradicare la patologia da cui il ricevente è affetto; favorire l'homing e l'attecchimento delle CSE trapiantate e prevenire e/o sopprimere l'attività del sistema immune del ricevente per evitare il rigetto e la GvHD nel caso del TCSE allogenico [54]. Esistono 2 tipologie di Condizionamento: Mieloablativo ad alte dosi e ad Intensità Ridotta (RIC). Il primo include una combinazione di agenti citotossici e terapia radiante "total body" a elevato dosaggio e garantisce la necessità di una minor stringenza nell'identità HLA donatore-ricevente. Il suo impiego si associa a una maggior mortalità trapianto-correlata ma anche a più rapide cinetiche di ricostituzione emopoietica e a una minor probabilità di recidiva. Al contrario, il RIC si basa sull'impiego di una combinazione di agenti immunosoppressivi (analoghi delle Purine), terapia radiante linfoide e/o uso di anticorpi per T-deplezione [55-58]. Mediante l'impiego del RIC è possibile candidare al TCSE anche pazienti anziani, pazienti per cui il condizionamento mieloablativo è controindicato e pazienti affetti da co-morbidità. Naturalmente la ridotta intensità della terapia antitumorale comporta una maggior probabilità di recidiva post-TCSE, e un rallentamento delle cinetiche di recupero dell'emopoiesi, pur riducendo la mortalità. Per tali ragioni, l'impiego del RIC è indicato nei casi di neoplasie a più lenta crescita o per offrire un TCSE allogenico a pazienti che hanno fallito un TCSE autologo.

Il Condizionamento si sta attualmente evolvendo da una radio/chemioterapia standard ad un trattamento personalizzato. In base alla tipologia di malattia, all'età, allo stato di salute complessivo e alle caratteristiche della fonte di CSE e del tipo di donatore, può, infatti, variare considerevolmente, con lo scopo di garantire al paziente il maggior beneficio e migliorarne il decorso post-trapianto.

### *1.1.4 Attecchimento e ricostituzione del sistema emopoietico post-TCSE*

Una volta che il paziente candidato a un TCSE è stato esposto al regime di Condizionamento preparativo, avviene l'infusione delle CSE attraverso un catetere venoso centrale, mediante una procedura del tutto non invasiva. L'infusione deve essere seguita, affinché un TCSE possa essere considerato riuscito, dal processo di attecchimento, attraverso il quale le CSE

circolanti in modo transiente nel SVP sono convertite in cellule residenti midollari, e dalla Ricostituzione Emopoietica (RE) e Immunologica (RI). L'attecchimento prevede il reclutamento delle CSE dalla microvascolatura midollare, la migrazione transendoteliale delle CSE a livello dei cordoni emopoietici extravascolari del MO e infine la migrazione delle CSE all'interno del MO verso le "nicchie" midollari; eventi che si verificano grazie all'attività di molecole di adesione e citochine prodotte da tutte le componenti cellulari in esame. Una volta nelle nicchie midollari, le CSE si sviluppano in stretto contatto con i componenti dello stroma midollare sia di natura cellulare (Cellule Reticolari, Adipociti, Cellule Osteogeniche, Cellule Endoteliali, Macrofagi) che della matrice extracellulare (Collagene, Laminina, Trombospondina, Proteoglicani) che ne controllano l'automantenimento e il differenziamento. La RE e la RI rappresentano invece il recupero numerico e funzionale di tutte le componenti ematiche. In alcuni casi possono non coincidere temporalmente e questo si traduce solitamente nell'incremento del rischio infettivo [59]. E' noto che i componenti dell'Immunità Adattativa sono caratterizzati da cinetiche di RE/RI più lente rispetto ai componenti dell'Immunità Innata perché richiedono durante il loro sviluppo il supporto di uno specifico microambiente (es: il timo per i linfociti T); sono coinvolti nei processi alloreattivi e sono suscettibili alla profilassi/terapia anti-GvHD [60]. Tra i fattori pre/peri-trapiantologici influenzanti la RE e RI: il tipo di malattia, la precedente chemioterapia, il grado di identità HLA, la fonte di CSE, la mobilitazione delle CSE, la manipolazione dell'inoculo, la tipologia di TCSE e il Condizionamento. Tra i fattori pre/post-trapiantologici: la profilassi e/o terapia anti-GvHD e la profilassi e/o terapia delle infezioni. Per fronteggiare lo stato di immunodepressione che si instaura nel paziente, a causa del tempo necessario al ripristino delle componenti emopoietiche, si ricorre solitamente ad una profilassi a base di farmaci antibatterici, anti-fungini e anti-virali ad ampio spettro o, in alternativa, all'accelerazione delle cinetiche di recupero. Nel caso dei linfociti T, ad esempio, si utilizza la somministrazione di fattori solubili stimolanti la funzionalità timica o il meccanismo timo-indipendente di "Espansione Omeostatica Periferica", oppure all'infusione di cellule T linfoidi del donatore (Donor Lymphocyte Infusion; DLI) isolate mediante singola aferesi [61].

Negli ultimi anni sono stati intrapresi numerosi studi al fine di identificare approcci innovativi, come la vaccinazione peptidica o la manipolazione del prodotto di DLI, finalizzati sia alla riduzione del rischio infettivo post-TCSE che all'aumento della specificità della terapia anti-microbica, con il fine ultimo di garantire un miglior decorso del paziente in seguito all'infusione di CSE, con aumento della probabilità di sopravvivenza.



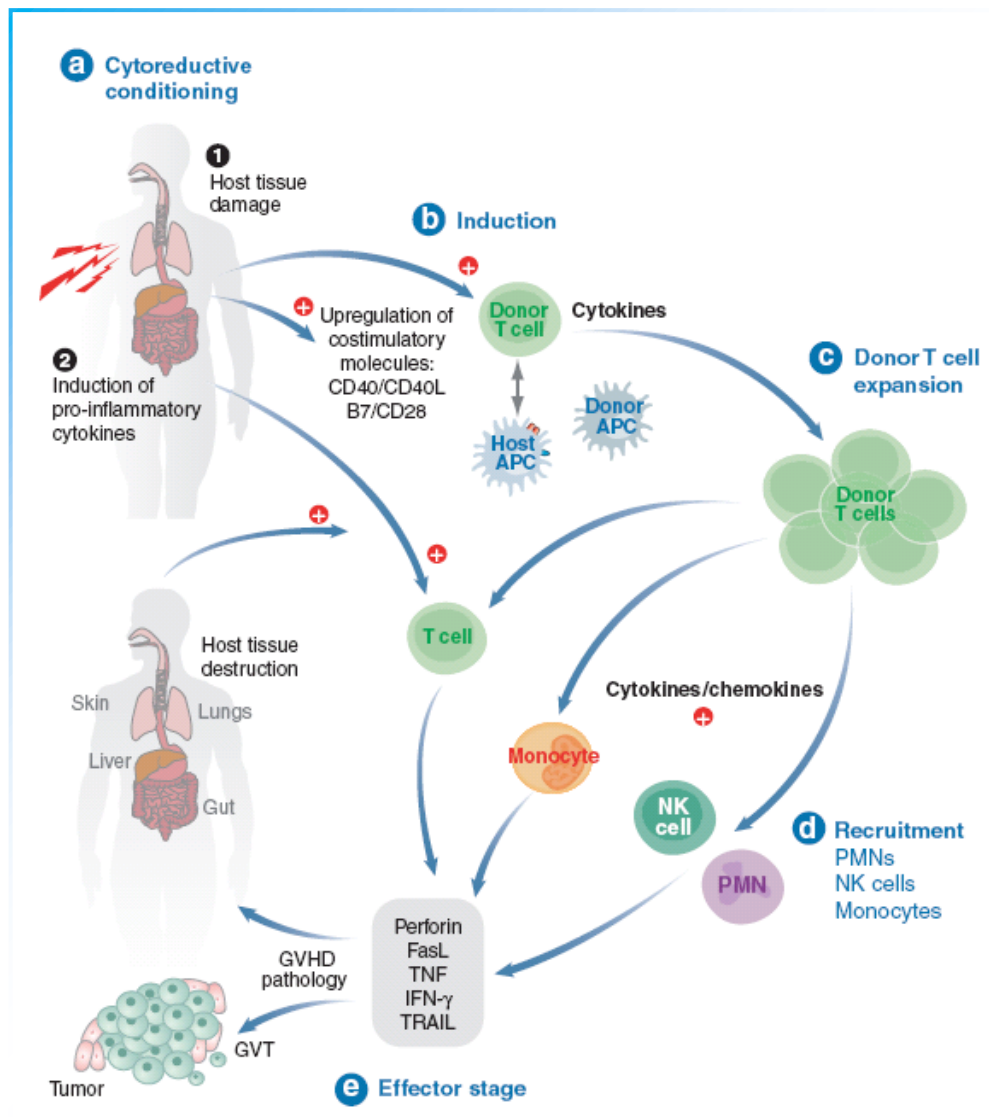
### *1.1.5 Alloreattività post-TCSE: il rigetto, la GvHD e la GvL*

Nel TCSE allogenico esiste una “doppia barriera immunologica” dovuta alla contemporanea presenza delle cellule immunocompetenti del ricevente sopravvissute al regime di Condizionamento e delle cellule immunocompetenti del donatore contenute nell’inoculo e/o prodotte dopo attecchimento delle CSE infuse. Questa doppia barriera comporta il potenziale sviluppo di due differenti forme di alloreattività. La prima è rappresentata dall’insieme delle reazioni mediate dalle cellule immunocompetenti del ricevente nei confronti dei componenti emopoietici dell’inoculo (HVG) e si traduce nel rigetto del TCSE. La seconda è costituita dalle reazioni mediate dalle cellule immunocompetenti del donatore (GVH) nei confronti sia dei tessuti sani che patologici del ricevente e comporta nel primo caso lo sviluppo di GvHD, nel secondo lo sviluppo di GvL [62]. La GvHD e la GvL rappresenterebbero quindi due aspetti contrapposti dello stesso processo. Gli antigeni causa di alloreattività possono essere, a seconda del grado di compatibilità donatore-ricevente: di natura ubiquitaria (HLA e miHA); tessuto-specifici o espressi in modo aberrante dalle cellule patologiche (miHA e proteine self normali); specifici delle cellule patologiche (Prodotti di traslocazioni cromosomiche: t(9;22) nella Leucemia Mieloide Cronica) o di derivazione virale (CMV: pp65; EBV: LMP-1/2).

Il rigetto è solitamente tipico di un TCSE da donatore familiare HLA parzialmente compatibile o aploidentico o da donatore non-familiare HLA compatibile (MUD). E’ stato dimostrato che i principali mediatori del rigetto sono rappresentati dalle cellule NK, dalle cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, dalle cellule T  $\gamma\delta^+$  e dalle cellule B del ricevente [63]. I meccanismi effettori del rigetto differiscono in base alla precedente sensibilizzazione del ricevente agli alloantigeni target. Infatti, nel caso di un ricevente non-sensibilizzato il rigetto delle molecole non condivise, viene mediato principalmente da linfociti T naive CD8<sup>+</sup> attraverso i meccanismi classici di Perforina/Granzima e Fas/FasL mentre, nel caso di un ricevente sensibilizzato in seguito ad esempio a trasfusioni o gravidanze, il rigetto delle molecole non condivise dipende dall’attività di linfociti T memoria CD8<sup>+</sup>, attraverso meccanismi non noti [64]. Il rigetto può essere valutato esaminando la conta leucocitaria, la cellularità midollare, l’ematocrito o il grado di chimerismo donatore/ricevente, e il rischio che si verifichi post-allotrapianto è influenzato principalmente dal regime di Condizionamento. La probabilità di rigetto risulta, infatti, maggiore nel caso di un TCSE preceduto da RIC piuttosto che da Condizionamento mieloablativo, un dato che dimostra l’importanza dell’eliminazione pre-TCSE delle cellule alloreattive del ricevente.

La GvHD è invece una Patologia Infiammatoria, mediata principalmente dalle cellule accessorie T linfoidi alloreattive del donatore contaminanti l’inoculo di CSE. Deriva dal

riconoscimento, da parte delle cellule T del donatore, dei componenti tissutali sani del ricevente e rappresenta, di conseguenza, una delle principali complicanze del TCSE allogenico. Il suo sviluppo richiede naturalmente che le cellule del ricevente siano incapaci di rigettare adeguatamente il TCSE; che l'inoculo di CSE contenga cellule immunocompetenti e che vi siano incompatibilità antigeniche donatore/ricevente [65]. La GvHD è una patologia complessa multifase [Figura 1]. La prima fase è contraddistinta dal "priming" della risposta immune indotto dal danneggiamento tissutale causato dal regime di Condizionamento preparativo, che comporta il rilascio di numerose citochine e fattori pro-infiammatori coinvolti nell'attivazione e nella maturazione delle cellule presentanti l'antigene (APC). Il ruolo del Condizionamento nella GvHD è stato ampiamente dimostrato grazie all'osservazione che la GvHD ha una comparsa ritardata in pazienti esposti a una terapia non mieloaplastizzante, e che l'aumento scalare del dosaggio di radiazioni ionizzanti, in modelli murini, comporta una forma di GvHD più severa [66]. La seconda fase della GvHD prevede, invece, l'induzione e la rapida amplificazione della risposta delle cellule T linfoidi del donatore, che ha inizio con il riconoscimento dei peptidi antigenici associati alle molecole HLA sulla superficie delle APC all'interno dei tessuti linfoidi secondari [67]. Sia le APC del donatore che quelle del ricevente partecipano all'induzione di GvHD. E' stato dimostrato che mentre nel TCSE HLA parzialmente compatibile o aploidentico, le APC del ricevente sono indispensabili per la presentazione degli antigeni target ai linfociti del donatore, nel TCSE HLA identico sono indispensabili sia le APC del ricevente sia quelle del donatore per la presentazione degli alloantigeni target [68]. Nella terza fase della GvHD, i linfociti alloreattivi del donatore si espandono e differenziano nelle sottopopolazioni Th1 e Th2, diversamente associate alle manifestazioni della suddetta patologia infiammatoria, e nella quarta, migrano verso i tessuti target [69]. Questo evento è seguito dal reclutamento al loro interno di altre popolazioni leucocitarie effettrici, mediata da citochine infiammatorie e chemochine. Lo stadio finale effettore della GvHD prevede quindi la distruzione dei tessuti target attraverso meccanismi di contatto cellula-cellula o mediati da fattori solubili quali FasL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  che, comportando il rilascio ulteriore di fattori pro-infiammatori, non fanno altro che esacerbare il quadro clinico [70]. I mediatori della GvHD sono principalmente rappresentati dai linfociti T  $\alpha\beta^+$  del donatore; la loro deplezione dall'inoculo previene infatti la GvHD sia in modelli murini che nell'uomo. In particolare, nel TCSE HLA parzialmente compatibile o aploidentico sia le cellule T naive  $CD4^+$  che  $CD8^+$  mediano la GvHD mentre nel TCSE HLA identico sono le cellule T naive  $CD8^+$  le principali mediatrici.



LA Welniak. *Annu Rev Immunol* 25, 2007

**Figura 1. Patofisiologia multifasica della GvHD nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.**

a) “Priming” della risposta immune indotto dal danneggiamento tissutale causato dal regime di Condizionamento preparativo; b) Induzione e c) Amplificazione della risposta delle cellule T linfoidi del donatore; d) Migrazione delle cellule T linfoidi del donatore verso i tessuti target e reclutamento di altre popolazioni leucocitarie effettrici; e) distruzione dei tessuti target attraverso meccanismi di contatto cellula-cellula o mediati da citochine infiammatorie e chemochine.

Le cellule T memoria sono invece implicate nel mantenimento della GvHD, piuttosto che nella sua patogenesi, a causa della debole espressione del CD62L e del CCR7, entrambi fondamentali per il ricircolo a livello degli organi linfoidi secondari; del repertorio HLA

ristretto, associato a una ridotta frequenza di cellule T alloreattive, e della ridotta capacità di espansione clonale [71].

La GvHD può essere classificata, in base alle caratteristiche cliniche e istologiche, in cronica e acuta. La GvHD acuta compare entro i primi 100 giorni dal trapianto, si presenta con necrosi delle cellule epiteliali a carico di cute, fegato, intestino e polmoni, ed è caratterizzata da una risposta cellulare di tipo Th1. La GvHD cronica compare dopo i 100 giorni dal trapianto, colpisce non solo cute e mucose ma anche ghiandole esocrine e membrane sierose ed è caratterizzata da una risposta cellulare di tipo Th2. Origina da meccanismi patogenetici più complessi, e provoca sostanzialmente quadri clinici molto simili a quelli delle malattie autoimmuni per alterazione della selezione timica negativa [72-73]. La prevenzione della GvHD si basa sull'impiego di agenti immunosoppressori (Ciclosporina, Metotrexate, Corticosteroidi) e di inibitori dell'attivazione T-cellulare (Rapamicina), in grado di mantenere "quiescenti" i linfociti del donatore, o sul ricorso alla manipolazione dell'inoculo (T-deplezione). I limiti di tali approcci sono però rappresentati dall'aumento della probabilità di mancato attecchimento, recidiva e infezioni. Si stanno di conseguenza affiancando approcci più innovativi basati sull'uso di agenti bloccanti le citochine (ETANERCEPT), sulla modulazione dell'attività delle APC mediante fotoferesi extracorporea e sull'impiego di terapie cellulari, basate sul trasferimento cellulare adottivo, finalizzato a modulare le risposte immunitarie allogeniche attraverso l'induzione di una tolleranza immunitaria "periferica [74-76]. In questo contesto, sta emergendo il ruolo di una sottopopolazione di cellule T ad attività regolatoria, responsabili dell'induzione e del mantenimento della tolleranza e omeostasi immunologica, nella modulazione e soppressione della risposta immune non solo fisiologica ma anche patologica, come nel caso della GvHD.

La GvL, al contrario delle GvHD, rappresenta una "componente vantaggiosa" delle reazioni allogeniche mediate dalle cellule immunocompetenti del donatore, nel caso di un TCSE in un soggetto affetto da una neoplasia ematologica. Consiste nell'eliminazione delle cellule tumorali residue del ricevente mediata dai linfociti T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e dalle cellule NK alloreattive del donatore. Rappresenta, insieme al Condizionamento, uno dei principali motivi di successo del TCSE allogenico, in quanto contribuisce alle sue proprietà antileucemiche, ed è il motivo per cui il TCSE allogenico viene tuttora considerato una forma di "Immunoterapia Adottiva". La GvL richiede per il suo sviluppo gli stessi presupposti della GvHD e i suoi target sono sia molecole espresse selettivamente dalle cellule neoplastiche (BCR/ABL nella Leucemia Mieloide Cronica) sia miHA non condivisi tra donatore e ricevente espressi dalle cellule neoplastiche. Un ruolo fondamentale rivestono le cellule NK in questa forma di

alloreattività. La parziale istocompatibilità donatore-ricevente si traduce, infatti, nel potenziale mismatch tra i KIR (Killer cell Ig-like Receptors) sulle cellule NK del donatore e le molecole HLA di classe I presenti sulle cellule del ricevente e viceversa. I KIR modulano negativamente l'attività litica delle cellule NK, attraverso il riconoscimento di specifici epitopi condivisi dagli HLA self di classe I [77]. Nell'ambito di un TCSE allogenico parzialmente identico/aploidentico o da MUD tale reattività si manifesta nei confronti delle cellule target allogeniche del ricevente che non esprimono gli HLA complementari ai KIR espressi dalle cellule NK del donatore ("Missing self" recognition). Questo si traduce nella lisi mediata dalle cellule NK del donatore diretta prevalentemente verso le cellule del sistema emopoietico del ricevente, piuttosto che degli altri tessuti, con induzione dell'effetto GvL. Lo studio dell'incidenza della GvL e GvHD in TCSE aploidentici KIR-incompatibili ha suggerito che le cellule NK incrementano lo sviluppo delle reazioni antitumorali senza influenzare la comparsa di GvHD [78]. Il trasferimento adottivo di cellule NK dopo TCSE inibisce la GvHD e promuove la GvL in svariati modelli murini, sebbene attraverso un meccanismo d'azione ancora non noto, ma che potrebbe implicare l'accelerazione dell'eliminazione delle APC del ricevente o la secrezione del TGF- $\beta$  [79].

Sostanziali progressi sono stati raggiunti nella pratica clinica del TCSE allogenico e nella comprensione della biologia sottostante questa complessa procedura. L'ampliamento delle conoscenze nelle tecniche diagnostiche, il perfezionamento delle cure supportive e del controllo delle componenti immunoterapiche, diviene quindi importante per il miglioramento della prognosi post-TCSE, con possibile indirizzamento verso l'individualizzazione della procedura trapiantologica.

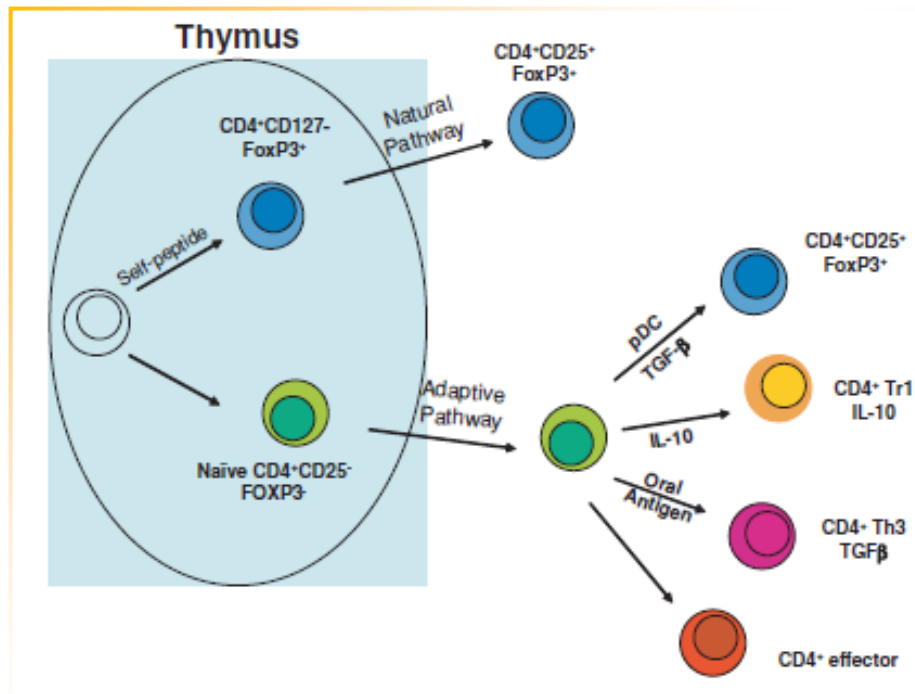
## **1.2. Le cellule T regolatorie "naturali"**

### *1.2.1 Ontogenesi e caratterizzazione delle cellule T regolatorie "naturali"*

L'abilità del sistema immune di discriminare le componenti self da quelle non self si traduce nel fenomeno della "Tolleranza Immunologica", che può essere definita come la mancanza di responsività nei confronti di specifiche molecole, acquisita attraverso meccanismi centrali o periferici. La tolleranza di natura "Centrale" si verifica durante l'ontogenesi delle cellule T linfoidi e comporta l'eliminazione dei linfociti potenzialmente autoreattivi, generati come risultato dei processi di riarrangiamento casuale delle sequenze geniche codificanti il recettore T cellulare (TCR), principalmente attraverso un processo di delezione clonale timica. Al contrario, la tolleranza di natura "Periferica" ha luogo durante il corso della vita ed è

finalizzata al controllo delle risposte immuni mediate da cellule T linfoidi autoreattive sfuggite alla selezione negativa timica perché dirette contro antigeni a bassa affinità/avidità o non sufficientemente presenti negli organi linfatici primari perché prodotti tardivamente o in modo transiente, o perché sequestrati all'interno dei tessuti periferici [80]. In realtà, in alcuni casi, l'organismo può anche sviluppare, in seguito ad esposizione cronica, una forma di tolleranza dannosa, diretta ad esempio nei confronti di antigeni estranei come quelli virali o tumorali. I meccanismi di tolleranza "Periferica" includono l'induzione dell'anergia cellulare e la soppressione dell'attività delle componenti autoreattive, realizzata principalmente attraverso il contributo di specifiche sottopopolazioni T linfoidi di natura regolatoria (Treg) [81]. Le cellule Treg rappresentano quindi una componente essenziale per il mantenimento della tolleranza al self e la prevenzione di fenomeni autoimmuni, grazie alla loro capacità di controllare negativamente le cellule T autoreattive *in vivo* [82]. Sono comunemente distinte in "naturali" e "indotte", ciascuno dei due sottotipi caratterizzato da pattern differenziativi e funzioni specializzate distinte. Si definiscono "naturali" le cellule Treg che originano nel timo, mentre vengono definite "indotte" o "adattative" quelle generate in periferia, in seguito a particolari condizioni di presentazione antigenica e in presenza di specifiche citochine [Figura 2]. Queste ultime comprendono diverse popolazioni linfoidi con funzione regolatoria, tra cui le cellule T CD4<sup>+</sup> di tipo 1 (o Tr<sub>1</sub>) secernenti Interleuchina (IL)-10 e di tipo 3 (Th<sub>3</sub>) secernenti TGF-β, le cellule T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, le cellule T CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>, le cellule T γδ e le cellule NK-T [83]. Diversamente dalle cellule Treg "indotte" (iTreg), quelle "naturali" (nTreg) si identificano in una singola popolazione cellulare CD4<sup>+</sup> caratterizzata dall'espressione costitutiva di elevati livelli della catena α del recettore per l'IL-2 (CD25), un marcatore normalmente utilizzato per l'identificazione di linfociti T attivati in seguito all'incontro con l'antigene, la cui positività sulle nTreg denota il ruolo centrale dell'IL-2 nella biologia di tali cellule. Le nTreg corrispondono nel topo all'8-12%, nell'uomo al 5-10% del compartimento periferico dei linfociti T CD4<sup>+</sup>. Sono contraddistinte, come già anticipato, da un'ontogenesi timica, vengono quindi prodotte durante i normali processi di maturazione delle popolazioni T linfoidi che si verificano nel timo, e il loro repertorio di TCR è in massima parte self-reattivo [84]. E' stato suggerito che i timociti regolatori CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> vengano prodotti all'interno del timo a partire da timociti doppio positivi CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> selezionati attraverso il riconoscimento di peptidi autologhi in associazione a molecole HLA di classe II, speculando che l'interazione sia ad avidità sufficientemente elevata da consentire il processo di selezione positiva ma allo stesso tempo sfuggire quello di selezione negativa, normalmente deputato alla delezione delle cellule autoreattive. Questa particolare forma di

selezione è stata definita con il termine di “selezione alterata” [85]. I timociti sono selezionati positivamente all’interno dell’epitelio corticale timico, mentre la selezione negativa ha luogo a livello della giunzione cortico-midollare e midollare timica, dove appaiono le cellule T mature singolo-positivo [86]. Diversi dati hanno in passato supportato l’ipotesi secondo la quale la regione midollare timica potesse costituire il sito della selezione positiva delle nTreg. Tali cellule sono, infatti, localizzate nel topo, così come nell’uomo, a livello della suddetta regione; inoltre, il fenotipo regolatorio non compare sino al momento in cui i linfociti T hanno raggiunto lo stadio maturativo di cellule singolo-positivo, che accade abbastanza tardivamente nel processo di selezione timica [87].



SM Kang. Am J Transplant 7, 2007

**Figura 2.** Vie differenziative delle cellule T regolatorie naturali e adattative. pDC=cellule dendritiche plasmacitoidi.

In realtà, sebbene sia stato dimostrato, in diversi modelli murini, che le componenti stromali epiteliali timiche siano necessarie e sufficienti per la selezione delle nTreg, è stato recentemente osservato che l’induzione dell’espressione delle molecole MHC di classe II unicamente a livello dell’epitelio corticale timico, consente il normale sviluppo di cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> funzionali sia *in vitro* che *in vivo* [88].

Queste osservazioni hanno portato a supporre che le nTreg, siano selezionate positivamente nell'epitelio corticale timico attraverso le interazioni tra il loro TCR e i peptidi self presentati in associazione alle molecole HLA di classe II. Alcune di queste cellule vengono poi sottoposte a selezione negativa nella regione midollare timica, e delete secondo un processo molto simile a quello che si verifica nel caso delle sottopopolazioni T ad attività effettrice, con la sola differenza nell'avidità delle interazioni antigene-recettore. Si potrebbe immaginare che il grado di avidità comporti sia la selezione delle nTreg che la trasduzione al loro interno di segnali che le rendono anergiche alla stimolazione antigenica e ne inducono la produzione di molecole che a loro volta le proteggono dai segnali apoptotici che ricevono nella regione midollare timica, a causa dell'alta affinità per il self [89]. Naturalmente, il repertorio di specificità antigenica delle nTreg è influenzato dalla tipologia di antigeni self presentati all'interno del timo. Molto probabilmente, anche molecole differenti rispetto al TCR e ai complessi peptide self-HLA e dotate di attività costimolatoria o adesiva, intervengono nella selezione e nel differenziamento delle nTreg. Ne sono esempi il CD28, B7, il CTLA-4, LFA-1 e ICAM-1 [90]. In realtà, è stato suggerito che in particolari circostanze le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> possano essere generate anche in periferia. Quando ottenute da cellule mononucleate di sangue periferico umano appaiono, infatti, caratterizzate da telomeri più corti; questo dato, combinato con la bassa espressione dell'antigene CD45RB, potrebbe indicare che si tratti cellule altamente differenziate stimulate ripetutamente dall'incontro con l'antigene. Quest'osservazione ha portato a supporre che le nTreg periferiche derivino da cellule memoria attraverso l'interazione con antigeni presentati da cellule APC non-professionali che, mancando dei sufficienti segnali costimolatori indispensabili per l'attivazione T cellulare, risulterebbero in grado di indurre anergia piuttosto che attivazione della risposta immune [91].

Dopo la loro produzione timica, le nTreg migrano in periferia. Qui, diversamente da quanto accade nel caso dei linfociti T effettori che, per la loro sopravvivenza, richiedono un contatto continuo con gli stessi complessi peptide-HLA coinvolti nella loro selezione, le nTreg sopravvivono grazie all'attività di citochine e molecole costimolatorie. E' stato, infatti, dimostrato che topi IL-2<sup>-/-</sup> e CD28<sup>-/-</sup> non sviluppano nTreg e che il loro numero risulta ridotto nel caso di un deficit delle molecole B7-1/2 [92]. Tutti questi fattori sono coinvolti essenzialmente nella produzione di IL-2 o nella co-stimolazione della produzione di IL-2, un dato che evidenzia il ruolo centrale di questa citochina nel mantenimento delle nTreg così come nel loro differenziamento. Questo spiegherebbe il motivo per il quale topi con un deficit di IL-2 sviluppano patologie autoimmuni organo-specifiche. Dal momento che le nTreg non



producono IL-2, molto probabilmente l'IL-2 prodotta da altre componenti cellulari riveste una importanza cruciale a tale proposito. Ad ogni modo, anche altre citochine come l'IL-4 sembrerebbero avere un ruolo nel mantenimento delle nTreg in periferia [93].

Le nTreg sono state inizialmente definite utilizzando la sola espressione delle molecole di superficie CD4 e CD25. Questa modalità di classificazione risulta in realtà insufficiente per l'identificazione di tale sottotipo linfocitario, in quanto in condizioni di infiammazione o attivazione del sistema immune, il CD25 va incontro ad una rapida upregolazione, mantenendosi stabile sulla superficie delle cellule convenzionali T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> effettrici per diversi giorni. Va inoltre ricordato che nell'uomo i linfociti convenzionali possono esprimere il CD25 anche in assenza di uno stimolo attivatorio [94]. Conseguentemente, è stata condotta un'estensiva ricerca nel tentativo di identificare marcatori fenotipici addizionali che potessero essere utilizzati per distinguere in modo più accurato le nTreg dalle altre popolazioni T linfoidi. Diverse molecole sono apparse caratteristicamente presenti sulla superficie delle nTreg ma tutte si sono rivelate potenzialmente upregolabili in cellule T effettrici in condizioni attivatorie o espresse in altre componenti del sistema immune. Ad ogni modo le nTreg, oltre al CD25, esprimono numerose molecole di superficie come il CD45RB; le selectine (CD62 ligando o CD62L) e le integrine (CD103), indispensabili per il processo di homing linfonodale e tissutale; le chemochine (CCR5); il recettore del TNF indotto dai glucocorticoidi (GITR); l'antigene-4 associato ai linfociti T citotossici (CTLA-4 o CD152); il TGF- $\beta$  e diversi membri della famiglia dei recettori Toll-like (inclusi TLR-4, TLR-5, TLR-7 e TLR-8). GITR è coinvolto nella soppressione dell'attività delle nTreg attraverso un meccanismo non del tutto noto. La somministrazione di anticorpi anti-GITR *in vivo* induce la comparsa di patologie autoimmuni; mentre in altri modelli la stimolazione di GITR rende i linfociti T effettori resistenti alla soppressione mediata dalle nTreg [95]. Il CTLA-4 è espresso costitutivamente dalle nTreg e la sua inibizione causa un'abrogazione dell'attività di tali cellule, suggerendo un suo ruolo nella costimolazione delle nTreg. In realtà, il CTLA-4 è anche in grado di mediare direttamente l'attivazione delle nTreg grazie all'induzione dell'enzima indoleamina 2, 3-diossigenasi (IDO) in seguito all'interazione con le molecole CD80 e CD86 presenti sulla superficie delle DC, evento che conduce al catabolismo del triptofano e quindi all'immunosoppressione localizzata [96]. L'espressione dell'enzima IDO è anche utilizzata da un gran numero di tumori umani per evadere l'attacco da parte del sistema immunitario, in quanto la sua espressione correla con il mancato accumulo di linfociti T antigene-specifici nel sito tumorale [97]. I TLR rappresentano, invece, un sistema di riconoscimento dei patogeni con funzione fondamentale nella risposta immune di natura

innata. E' stato dimostrato che la stimolazione di nTreg con il lipopolisaccaride attraverso il TLR-4 si traduce in una risposta proliferativa e nell'incremento delle funzioni soppressorie [98]. In realtà, questo dato appare contraddittorio se si pensa che normalmente i TLR sono coinvolti nell'attivazione piuttosto che nella soppressione della risposta immune. Inoltre, la stimolazione delle DC attraverso i TLR induce la produzione di citochine, come l'IL-6, che rendono le cellule T convenzionali resistenti all'attività soppressoria delle nTreg [99]; di conseguenza molto probabilmente i TLR potrebbero essere implicati nel controllo negativo delle nTreg. Oltre ai suddetti marcatori, gli studi volti a migliorare l'identificazione delle nTreg, hanno di recente permesso di individuare anche altri antigeni di superficie caratteristici di tali cellule, come ad esempio la catena  $\alpha$  del recettore dell'interleuchina 7 (CD127), espressa a bassa intensità, e gli antigeni CD39 e CD73, che sembrerebbero regolare la capacità inibitoria delle nTreg [100].

Ad ogni modo, al di là delle molecole di superficie, il marcatore più specifico e di maggior contributo per l'identificazione delle nTreg è attualmente rappresentato dal fattore di trascrizione nucleare, Forkhead Transcription Factor Family 3, FOXP3. E' stato identificato agli inizi degli anni 2000 da tre differenti gruppi di ricerca e la sua espressione costituisce oggi il "gold standard" per la distinzione delle nTreg dalle cellule T linfoidi effettrici. La sua identificazione è stata resa possibile grazie allo studio della patologia "scurfy" sviluppatasi spontaneamente in topi del "Oak Ridge National Laboratory" nel 1949 [101]. La mutazione genica causale la malattia, interessa un gene X-linked inizialmente chiamato "*scurfin*". Gli animali affetti da tale mutazione solitamente non sopravvivono oltre la terza settimana di vita e presentano lesioni interne simili a quelle osservate in corso di GvHD, infiltrate da cellule T linfoidi proliferanti e secernenti citochine infiammatorie [102]. Il clonaggio del gene "*scurfin*" nel 2001 ha permesso di identificare il prodotto del suddetto gene in un fattore della famiglia dei fattori di trascrizione Forkhead, da cui la sigla di FOXP3. Topi affetti dalla patologia "scurfy" possono essere curati attraverso la trasfezione del gene esprimente FOXP3 o, in alternativa mediante ricostituzione del compartimento di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [103]. Attraverso l'impiego di un sistema di delezione condizionale, è stato in seguito dimostrato come il silenziamento del gene FOXP3 possa comportare l'immediata comparsa di patologie autoimmuni persino in topi adulti, fornendo una prova del ruolo di FOXP3 e delle nTreg nel controllo dell'autoimmunità [104]. Nel timo l'espressione di FOXP3 è rilevabile allo stadio maturativo T doppio-positivo e cellule CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> sono osservabili nel topo già a 3 giorni dalla nascita, con una buona correlazione con il dato che la timectomia effettuata dopo il terzo giorno dalla nascita induce patologie autoimmuni organo-specifiche che possono essere

prevenute attraverso l'inoculo di nTreg [105]. Ulteriori studi su modelli murini hanno dimostrato come i linfociti  $CD4^+CD25^+$  rappresentino il sottotipo cellulare FOXP3<sup>+</sup> predominante e come sia possibile riprogrammare le cellule T effettrici  $CD4^+$  o  $CD8^+$ , in cellule con funzioni soppressorie, mediante trasferimento del gene codificante FOXP3 [106]. La trasfezione retrovirale di linfociti T naive con l'mRNA di FOXP3 li rende anergici e soppressori *in vitro*, con acquisizione di caratteristiche fenotipiche sovrapponibili a quelle delle nTreg, sia in termini di molecole di superficie che di citochine secrete. FOXP3 ha quindi un ruolo fondamentale sia nei processi di sviluppo che nell'esplicazione delle funzioni regolatorie delle nTreg e non rappresenta, come il CD25 o GITR, un mero marcatore di attivazione, in quanto la stimolazione delle cellule T linfoidi con anticorpi anti-TCR o anti-CD28 non si traduce nell'upregolazione del suo mRNA [107].

In realtà, quando si prende in considerazione l'uomo, esistono svariate differenze rispetto a quanto rilevato nei modelli murini. In primo luogo, l'espressione di FOXP3 nell'uomo, diversamente da quanto accade nel topo, risulta caratteristica anche di cellule T effettrici, sebbene a livelli ridotti. Nell'uomo esistono, inoltre, 2 isoforme del gene FOXP3, una codificante la forma "full length" della proteina, l'altra codificante per un'isoforma più corta, mancante degli aminoacidi 71-105, e l'overespressione di una o entrambe le isoforme umane di FOXP3 in cellule T linfoidi naive non risulta efficace nella generazione di nTreg. E' stato supposto che tali differenze dipendano principalmente dalla stretta correlazione presente nelle cellule T  $CD4^+$ , tra l'espressione di FOXP3 e l'attivazione del TCR. La regione promotrice del gene codificante FOXP3 contiene, infatti, diversi siti di legame per i fattori AP-1 e NF-AT, entrambi coinvolti nella trasduzione dei segnali a valle del TCR, e la formazione del complesso NF-AT/FOXP3 è indispensabile per l'attività soppressoria delle nTreg [108]. Comunque, anche nell'uomo è stata identificata una patologia, nota con il termine di sindrome "IPEX", correlata, nella maggior parte dei casi, alla presenza di mutazioni del gene codificante FOXP3. I soggetti che ne sono affetti mostrano, come accade nei topi "scurfy", disordini autoimmuni quali diabete mellito insulino-dipendente, anemia emolitica e lesioni cutanee infiammatorie [109]. Di conseguenza, sia il modello murino che umano rendono ampiamente chiaro come i difetti a carico di FOXP3 si traducano nella compromissione delle funzioni delle nTreg e nell'autoimmunità multisistemica, rendendo il suo studio un approccio indispensabile per la comprensione dei meccanismi alla base della soppressione mediata dalle nTreg e per l'identificazione di nuovi marcatori specifici di questa popolazione cellulare.

### 1.2.2 Peculiarità intrinseche delle cellule T regolatorie “naturali” in vitro e in vivo

I primi studi *in vitro* hanno evidenziato una fondamentale caratteristica distintiva delle nTreg rispetto ai linfociti T convenzionali. Tali cellule, infatti, non proliferano in risposta alla stimolazione del TCR in coltura, ma possono essere indotte a dividersi in presenza di anticorpi anti-CD3 e IL-2 esogena [110]. Lo stato anergico delle nTreg osservato *in vitro* può essere in parte spiegato sulla base della tipologia di APC impiegata nei differenti studi. Generalmente, le cellule spleniche sono impiegate come fonte di APC, e tale popolazione è relativamente debole nell'induzione dell'espansione di nTreg antigene-specifiche anche in presenza di IL-2, molto probabilmente a causa di uno stato funzionale immaturo [111]. Al contrario, le nTreg vanno incontro a estensivi cicli di proliferazione *in vitro* se stimolate da DC mature, specialmente in presenza di IL-2. Tale effetto non va inoltre a scapito della loro attività, in quanto le nTreg espansive mostrano un'abilità di soppressione uguale o addirittura superiore a quella delle cellule pre-espansione [112]. Naturalmente, la stimolazione della proliferazione delle nTreg così come della loro funzione è, almeno nella prima fase, antigene specifica. Infatti, in una co-coltura di cellule T effettrici e nTreg dotate di una differente specificità, la soppressione non si verifica sino al momento in cui l'antigene per cui le nTreg sono specifiche viene aggiunto, sebbene una volta attivate, le nTreg, come vedremo in seguito, possono sopprimere anche risposte immuni dirette contro antigeni non correlati. Allo stesso tempo, le nTreg policlonali sono in grado di sopprimere l'attività di linfociti T convenzionali anch'essi policlonali quando entrambe le popolazioni sono stimolate con anticorpi anti-CD3, nonostante si tratti di una forma di soppressione meno efficace rispetto a quella antigene-specifica [113].

Le nTreg proliferano in risposta all'IL-2 anche *in vivo*, come dimostrato in topi trattati con anticorpi neutralizzanti anti-IL-2, che manifestano una riduzione del numero di nTreg, o in topi con un deficit genetico di IL-2 o del suo recettore, che sviluppano patologie autoimmuni [114]. La riduzione quantitativa delle nTreg in assenza di IL-2 evidenzia il ruolo di tale citochina non solo nell'induzione dell'espansione delle nTreg durante il corso della risposta immune, ma anche nel mantenimento di tali cellule in condizioni omeostatiche. Inoltre, anche *in vivo* così come accade *in vitro*, lo stato maturativo delle DC influenza in misura differenziale la capacità di espansione e la funzionalità delle nTreg. L'attività proliferativa delle nTreg è stata seguita *in vivo* iniettando nTreg CD62L<sup>hi</sup> singeniche in topi esponenti un diverso allele thy1. In tali condizioni sperimentali, un subset di nTreg appare quiescente, mentre un altro, contraddistinto dalla forte positività per l'antigene CD44, va incontro a espansione, con acquisizione di un fenotipo attivato, per poi diminuire numericamente [115].

Inoltre, quando nTreg HA-specifiche sono iniettate in topi esprimenti l'antigene HA sotto il controllo del promotore dell'insulina, tali cellule si dividono esclusivamente nei linfonodi pancreatici, noti per contenere le DC presentanti gli antigeni di derivazione dalle cellule delle isole  $\beta$  pancreatiche [116]. L'espansione delle nTreg osservata *in vivo* viene quindi molto probabilmente indotta da DC mature presentanti l'antigene. La correlazione tra lo stadio maturativo delle DC e l'effetto proliferativo indotto nelle nTreg può essere attribuito al fatto che la risposta di quest'ultime è maggiormente dipendente dalle molecole costimolatorie CD80 e CD86 rispetto a quella dei linfociti T effettori. Infatti, l'espansione delle nTreg indotta da DC isolate da topi CD80<sup>-/-</sup> e CD86<sup>-/-</sup> risulta inibita in misura superiore quando le cellule rispondenti sono rappresentate *in vitro* dalle nTreg piuttosto che dai linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [117]. Il ruolo delle DC mature *in vivo* è stato inoltre chiarito da un recente modello murino basato sul trasferimento adottivo di cellule T CD4<sup>+</sup> transgeniche per il TCR e sull'internalizzazione guidata dell'antigene corrispondente, attraverso l'impiego di anticorpi specifici per DEC205, un recettore endocitico espresso ad alti livelli sulle DC [118]. Il direccionamento dell'antigene a livello delle DC causa, infatti, un incremento di tutta la popolazione T transgenica, ma la frazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aumenta preferenzialmente. È stato ipotizzato che la proliferazione indotta nelle nTreg da parte delle DC mature sia indispensabile a bloccare l'autoimmunità e lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico, durante le risposte immuni anti-microbiche. Infatti, durante le infezioni, le DC sia di natura mieloidi che plasmacitoide, attivate e indotte a maturare in presenza degli stimoli infiammatori, presentano un insieme di peptidi antigenici sia di derivazione esogena, potenzialmente cross-reagenti con molecole self, che endogena. Il repertorio delle nTreg è specifico per i suddetti antigeni endogeni e si espande in concomitanza con l'espansione dei linfociti T effettori microbo-specifici per garantire un fine controllo della risposta immune. Un ruolo diverso è attribuibile invece alle DC immature o semi-mature, caratterizzate da livelli intermedi di molecole costimolatorie ma prive di altre funzioni specifiche di DC mature, che in condizioni omeostatiche trasportano gli antigeni self periferici a livello dei linfonodi drenanti. E' stato ipotizzato che tali cellule, principalmente rappresentate dal sottotipo mieloidi, favoriscano il mantenimento della tolleranza al self attraverso il reclutamento preferenziale delle nTreg mediato dall'elevata produzione delle chemochine CCL17 e CCL22, garantendone l'espansione in condizioni di omeostasi [119].

Nel complesso le osservazioni effettuate suggeriscono che le nTreg vanno incontro a un costante rinnovamento *in vivo* sia in condizioni di omeostasi, in risposta all'IL-2 e alle DC immature, sia in presenza di uno stato infiammatorio, attraverso il riconoscimento di antigeni

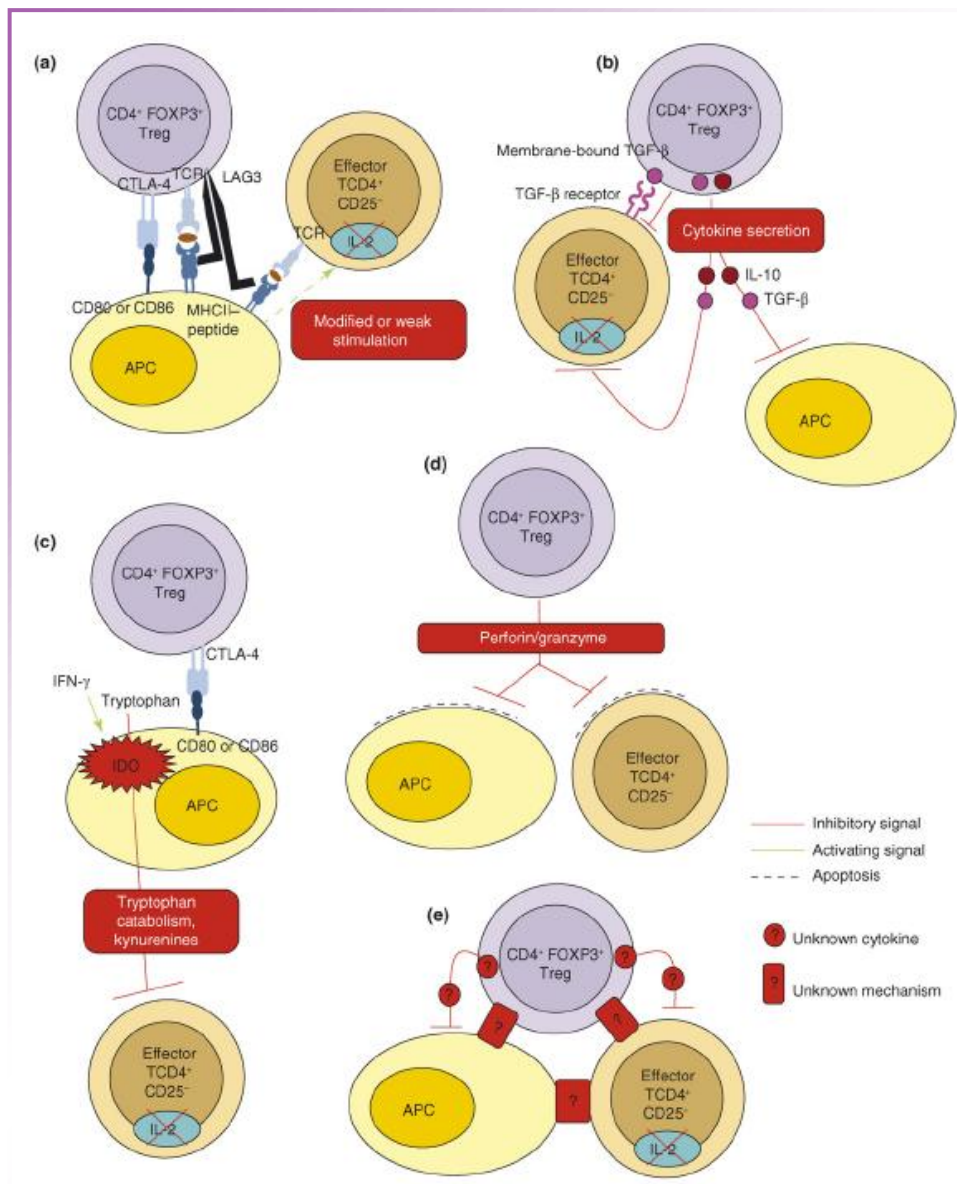
self endogeni presentati da DC mature. Quindi, le nTreg antigene-specifiche non sono anergiche *in vivo*, ma possono proliferare e tale processo si verifica preferenzialmente negli organi linfoidi che drenano il sito di accumulo antigenico.

### 1.2.3 Meccanismi di soppressione della risposta immune mediati dalle cellule T regolatorie “naturali”

Studi effettuati principalmente *in vitro* hanno rivelato che le nTreg sono in grado di esercitare effetti soppressivi nei confronti di multiple popolazioni cellulari coinvolte nell'immunità e nei processi infiammatori. In principio è stata osservata la capacità delle nTreg di inibire l'attivazione e l'espansione delle cellule T CD4<sup>+</sup> attraverso esperimenti in cui la deplezione delle nTreg risultava associata allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, mentre la loro inoculazione comportava l'inibizione di tali manifestazioni [120]. In realtà è stato in seguito dimostrato che l'azione soppressoria delle nTreg interessa l'induzione così come le funzioni effettrici dei linfociti T sia CD4<sup>+</sup> che CD8<sup>+</sup> naive e memoria e si estende all'inibizione della proliferazione, della produzione di Immunoglobuline e dello scambio isotipico dei linfociti B, all'inibizione dell'attività citotossica delle cellule NK e NK-T, al controllo della funzione e maturazione delle DC e dell'attività, quindi della sopravvivenza, dei neutrofili. L'attività soppressoria delle nTreg manifesta una peculiarità unica, identificabile con il termine di “linked suppression”. Le nTreg possono essere infatti attivate attraverso una modalità antigene-specifica e successivamente sopprimere le risposte immuni dirette contro antigeni non correlati [121]. Tale forma di soppressione può essere osservata *in vitro* così come *in vivo* solo in presenza di particolari condizioni e, dal momento che l'attivazione delle nTreg *in vivo* è sotto il controllo stringente dell'antigene per cui sono specifiche, potrebbe verificarsi solo in circostanze altamente specializzate come nel caso di infezioni virali organo-specifiche. In condizioni normali, la specificità della soppressione potrebbe quindi essere ottenuta grazie alla prossimità spazio-temporale delle cellule T effettrici, delle nTreg e delle APC [122]. Diversi studi hanno dimostrato che il pool delle nTreg è spazialmente organizzato, con cellule reclutate o trattenute nei siti di incontro del loro antigene self target. I linfociti B e le APC professionali esprimono diverse citochine in condizioni fisiologiche di attivazione antigene-mediata; tra di esse, il CCL4 sembra mediare il reclutamento preferenziale delle nTreg nel sito interessato, di conseguenza la sua deplezione sistemica causa un'accelerazione della risposta immune e la comparsa di fenomeni autoimmuni generalizzati.

A seconda del sistema sperimentale utilizzato, sono stati proposti vari modelli *in vitro* per spiegare il meccanismo attraverso cui le nTreg regolano le risposte immuni. Questi vedono

coinvolti il contatto cellula-cellula e la secrezione di citochine, come l'IL-10 e il TGF- $\beta$ , o di molecole ad attività citotossica, come la perforina e il granzima A [Figura 3]. Tra le molecole espresse dalle nTreg con un ruolo chiave nel meccanismo di inibizione da contatto, una delle principali è rappresentata dal CTLA-4, che possiede un'elevata affinità per le molecole costimolatorie CD80 e CD86 espresse sulle DC. Le nTreg esprimono il CTLA-4 costitutivamente, mentre le cellule T effettrici lo esprimono solamente in seguito ad attivazione, grazie anche all'interazione con le nTreg [123]. L'inibizione dell'attività del CTLA-4 in topi sani causa lo sviluppo di patologie autoimmuni grazie all'abrogazione della soppressione mediata dalle nTreg sui linfociti T effettrici. Inoltre, l'induzione dell'espressione di FOXP3 all'interno di cellule T naive si traduce nell'upregolazione del CTLA-4 attraverso una modalità FOXP3-dipendente [124]. È stato dimostrato che il CTLA-4, media sia indirettamente che direttamente l'attività soppressoria delle nTreg. Interagendo con i suoi ligandi sulle DC, trasduce segnali costimolatori che a loro volta inducono, in concomitanza con i segnali trasmessi dal TCR, l'attivazione delle nTreg grazie alla competizione del legame CD28-CD80/86 e all'upregolazione dell'antigene associato alla funzione linfoide (LFA)-1, che favorisce l'interazione fisica tra le nTreg e le APC. Una volta attivate, le nTreg agiscono anche reprimendo l'espressione del CD80 e del CD86 sulle DC, che vengono quindi rese meno efficienti in termini di presentazione antigenica, e inducendo l'espressione dell'enzima IDO con conversione del triptofano in metaboliti, come la kinurenina, dotati di potenti effetti immunosoppressivi nel microambiente locale delle DC. In realtà, il CTLA-4 presente sulla superficie delle nTreg è altresì in grado di interagire con le molecole CD80 e CD86 espresse dai linfociti T effettrici target della loro attività soppressoria, con trasmissione diretta di segnali inibitori che convergono nel controllo negativo della trascrizione del gene per l'IL-2, il principale fattore proliferativo delle cellule T linfoidi [125]. Un altro fattore coinvolto nella soppressione contatto-dipendente è rappresentato da LAG3, una molecola di adesione CD4-associata espressa sulle nTreg in seguito ad attivazione, che lega le molecole MHC di classe II presenti sia sulle cellule APC che sui linfociti T effettrici. Il suo meccanismo d'azione è poco noto, ma anticorpi anti-LAG3 sopprimono l'attività delle nTreg *in vivo* e *in vitro*, sebbene topi LAG3<sup>-/-</sup> non esibiscano la comparsa di alcuna manifestazione autoimmune, diversamente da quanto accade nel caso del deficit di CTLA-4 [126]. Le nTreg sono in realtà in grado di svolgere la loro funzione anche in assenza di contatto con i rispettivi target cellulari, come dimostrato *in vitro* dall'integrità delle loro funzioni quando separate dai linfociti T effettrici da una membrana semipermeabile. Per quanto riguarda i meccanismi di soppressione contatto-indipendente, numerose citochine sono coinvolte nel mediare l'attività *in vivo* delle nTreg.



M Miyara. Trends Mol Med 13, 2007

**Figura 3. Meccanismi di soppressione mediati dalle nTreg.** Vari eventi molecolari e cellulari sono stati descritti per spiegare come le nTreg possano sopprimere la risposta immune. Essi includono l'inibizione dell'espressione del gene per l'IL-2, la modulazione delle molecole costimolatorie sulla superficie delle APC e l'interazione di LAG-3 con le molecole MHC di classe II (a); la secrezione di citochine immunosoppressive (b); l'induzione del catabolismo del triptofano attraverso il CTLA-4 (c) e la citotossicità (d). E' anche possibile che vi siano meccanismi chiave non ancora noti (e).

L'IL-10 viene descritta come una citochina inibitoria, con un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi immunologica. E' richiesta per il mantenimento del numero delle cellule T linfoidi da parte delle nTreg; infatti, nTreg isolate da topi knock-out per il gene dell'IL-10 perdono la suddetta funzione. Allo stesso modo, il trasferimento adottivo di nTreg

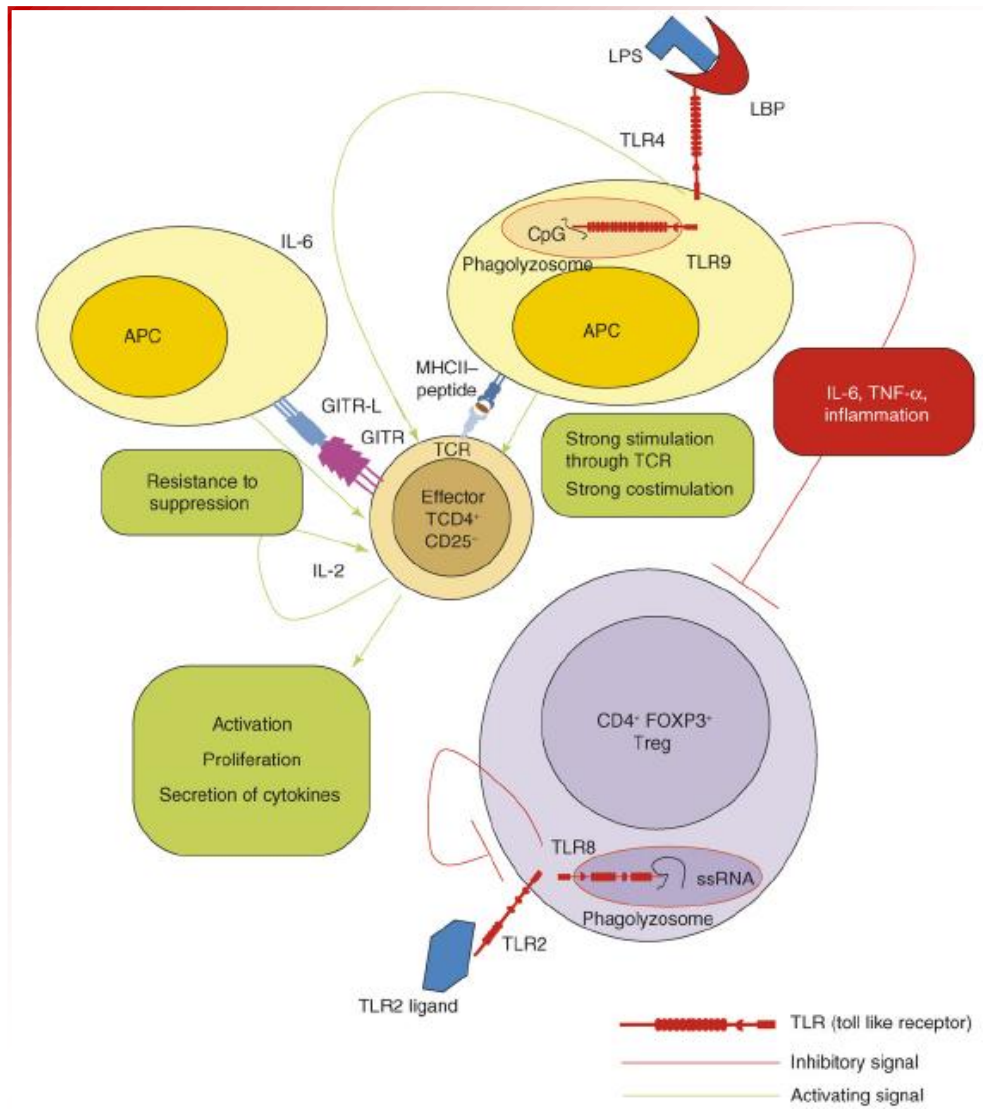


in topi sottoposti a trapianto allogenico cutaneo induce allotolleranza, ma l'iniezione di bloccanti del recettore per tale citochina accelera il rigetto, confermando il ruolo fondamentale dell'IL-10 nel contesto dell'allotrapianto [127]. Esperimenti condotti *in vitro* hanno anche dimostrato un'azione inibitoria, mediata dall'IL-10 prodotta dalle nTreg, nei confronti dell'espressione delle molecole MHC di classe II e delle molecole costimolatorie presenti sulle DC. Allo stesso modo, il TGF- $\beta$  gioca un ruolo chiave nella funzione soppressoria e nell'omeostasi delle nTreg periferiche, principalmente attraverso l'induzione e il mantenimento dell'espressione di FOXP3. Topi TGF- $\beta^{-/-}$  mostrano numeri ridotti di nTreg e l'espressione di FOXP3 può essere indotta nelle cellule T CD4<sup>+</sup> naive quando coltivate in presenza di TGF- $\beta$ . Le cellule T FOXP3 indotte risultano inoltre efficaci nella soppressione della proliferazione T come le nTreg [128]. Esistono in realtà diversi dati sull'espressione di membrana del TGF- $\beta$  sulle cellule nTreg sia murine che umane. Questo renderebbe possibile un suo coinvolgimento anche nella modalità di soppressione contatto-dipendente. Secondo una delle ipotesi più accreditate, l'espressione di membrana del TGF- $\beta$  sarebbe indispensabile per la sintesi di NOTCH1, una molecola utile al commissionamento della linea T, il cui legame con il rispettivo ligando HES1 sui linfociti effettori favorisce la trasmissione di segnali inibitori [129]. Come già anticipato, anche l'IL-2 è importante per il mantenimento e la funzione delle nTreg. Oltre al fatto che tali cellule esprimono costitutivamente il recettore per l'IL-2, il loro numero risulta sostanzialmente ridotto in topi IL-2<sup>-/-</sup> [130]. Lo stesso si verifica con la neutralizzazione dell'IL-2 circolante. Nella soppressione mediata dalle nTreg è stato supposto che il recettore ad alta affinità per l'IL-2 presente sulla loro membrana compete per l'IL-2 con i linfociti T effettori, riducendo l'effetto di tale citochina sulla loro proliferazione. Inoltre nell'uomo l'iniezione di IL-2 in pazienti linfopenici incrementa l'espansione delle nTreg e l'IL-2 è in grado di indurre l'espressione di FOXP3 nelle nTreg umane attraverso l'azione di STAT3 e STAT5 [131]. Le nTreg possono infine esercitare la loro funzione attraverso il rilascio di Perforina e Granzima A, che inducono morte cellulare non solo nei linfociti T effettori ma anche nei monociti e nelle DC. Anticorpi diretti contro il CD18 interferiscono con tale meccanismo di uccisione, suggerendo il suo coinvolgimento nell'interazione delle nTreg con i rispettivi target [132].

Nello studio del meccanismo d'azione delle nTreg *in vivo* è importante considerare l'abilità di localizzazione di tali cellule nei siti di induzione della risposta immune, in modo tale che vi sia uno stretto contatto con i target da inibire. Di conseguenza, le molecole mediatrici dei processi di migrazione e homing linfoide diventano di grande importanza per garantire il funzionamento delle nTreg. Esse, infatti, ricircolano dal sangue ai tessuti linfoidei secondari in

quanto, come accade per i linfociti T effettori, le nTreg, in seguito alla loro stimolazione, si localizzano, grazie all'espressione del CD62L, a livello dei linfonodi drenanti l'antigene dove vanno incontro a molteplici cicli di proliferazione [133]. Anche i recettori per chemochine quali CCR4, CCR5 e CCR8 sono importanti per il traffico delle nTreg. I loro ligandi CCL17/22, CCL4 e CCL1, sono prodotti principalmente dalle DC, dai monociti e dai macrofagi e consentono di direzionare le nTreg verso i loro target. Al tempo stesso, durante il corso della stimolazione antigenica le nTreg cambiano la loro attività migratoria e abbandonano i tessuti infiammati, un processo cruciale nel controllo di quelle popolazioni T linfoidi che non ricircolano più dal sangue ai tessuti linfoidi secondari ma si localizzano nei tessuti non-linfoidi. Nel topo, le nTreg acquistano ad esempio la positività per l'integrina  $\alpha_E\beta$ , perdendo quella per il CD62L, che ne permette l'allontanamento dai siti di infiammazione [134].

Indipendentemente da quali meccanismi siano utilizzati dalle nTreg per svolgere la loro funzione, il controllo della magnitudine della risposta soppressoria mediata da tali cellule risulta indispensabile, in quanto un eccesso di soppressione renderebbe l'ospite suscettibile non solo allo sviluppo di infezioni e tumori ma anche alla comparsa di manifestazioni autoimmuni e allergie. Sono diversi i meccanismi di controllo dell'attività delle nTreg [Figura 4]. In primo luogo, la modulazione della forza del segnale attraverso il TCR permette di modulare la suscettibilità dei linfociti T effettori alla soppressione nTreg-mediata. Una debole stimolazione policlonale del TCR con anticorpi anti-CD3 a basso dosaggio rende i linfociti T effettori resistenti alle nTreg, mentre il contrario si verifica in presenza di anticorpi anti-CD3 ad elevato dosaggio. Lo stesso effetto hanno una forte costimolazione attraverso il CD80 e il CD86, espressi sulle cellule T convenzionali, e la secrezione di IL6 [135]. Altri due fattori implicati nel controllo negativo delle nTreg sono rappresentati da GITR e i TLR. L'inibizione di GITR favorisce la risposta immune attenuando sia *in vitro* che *in vivo* la soppressione mediata dalle nTreg. Inoltre, l'iniezione di agonisti di GITR in topi affetti da tumore si associa a un incremento della magnitudine della risposta immune, con eradicazione del tumore. Il ligando di GITR è espresso su tutte le ACP nel topo e sulle DC plasmacitoidi nell'uomo ma anche sui linfociti T effettori attivati [136]. La proliferazione di cellule T convenzionali con un deficit a carico di GITR può essere inibita dalle nTreg anche in presenza di agonisti di GITR, mentre nTregs GITR<sup>-/-</sup> non riescono a sopprimere la proliferazione di linfociti T effettori normali in presenza dei suddetti anticorpi, a conferma del ruolo della stimolazione attraverso GITR nell'induzione di resistenza alla soppressione mediata dalle nTreg, nelle cellule T convenzionali [137].



M Miyara. *Trends Mol Med* 13, 2007

**Figura 4. Inibizione della soppressione mediata dalle nTreg.** Il numero e la funzione delle nTreg deve essere necessariamente controllato per garantire l'appropriata magnitudine della risposta immune. Una forte costimolazione attraverso il TCR, l'IL-6, alte dosi di IL-2 e l'attivazione di GITR sulle cellule T effettrici le rende resistenti alla soppressione nTreg-dipendente. Altri meccanismi inibitori dell'attività delle nTreg sono rappresentati dall'attivazione di TLR-4 e TLR-9 sulle APC, che si traduce nell'induzione della secrezione di citochine pro-infiammatorie come l'IL-6 e il TNF- $\alpha$ .

Per quanto riguarda i TLR, è stato osservato che le nTreg ne esprimono alcuni sottotipi, come il TLR2 e il TLR8, in maniera costitutiva. Il ligando del TLR-8 (CpG-A) è in grado di inibire le nTreg, incrementando la risposta immune; mentre l'attivazione delle nTreg attraverso il TLR2 induce la proliferazione di tali cellule con concomitante sospensione transiente dell'attività soppressoria [138]. Di conseguenza, durante la fase acuta del processo infettivo,

le nTreg potrebbero essere rese silenti attraverso la segnalazione del TLR2 per poi riacquisire la loro abilità soppressiva con la riduzione ma persistenza del patogeno nel sito interessato. Questo spiegherebbe come le nTreg siano in grado di prevenire la totale eliminazione del patogeno per garantire il mantenimento di un'efficace memoria immunologica [139].

Nonostante numerosi progressi nella conoscenza dei meccanismi d'azione delle nTreg, rimane ancora controverso la modalità attraverso la quale tali cellule sopprimono la risposta immune a livello molecolare. Molto probabilmente, più di un meccanismo di soppressione risulta operativo nel controllo della risposta immune nTreg-mediata e vari fattori, tra cui la forza e la natura dello stimolo antigenico, contribuiscono a determinare la magnitudine della soppressione.

#### *1.2.4 Ruolo delle cellule T regolatorie "naturali" nel TCSE*

Evidenze relative al ruolo dell'immunoregolazione CD4<sup>+</sup>-mediata, specialmente nella sfera trapiantologica, risalgono a più di due decenni fa. Nel 1985, è stata dimostrata l'induzione di attività soppressoria in cellule T CD4<sup>+</sup> di ratti riceventi un trapianto di cuore in associazione a una terapia a base di ciclosporine e nel 1989 è stata riportata, sempre in modelli murini, la comparsa di attività soppressoria in seguito a trasfusioni donatore-specifiche (TDS) [140]. Qualche anno più tardi è stato invece provato che l'induzione di tolleranza allospecifica attraverso l'impiego di anticorpi anti-CD4 e anti-CD8, dipende dall'attività di linfociti CD4<sup>+</sup> soppressori e che sono tali cellule a garantire il prolungamento della sopravvivenza in seguito a TDS [141]. Malgrado la pleora di indicazioni sperimentali, l'importanza critica delle nTreg in tale ambito è però emersa solo quando, grazie all'impiego di un modello di trasferimento adottivo di autoimmunità, è stato possibile identificare nel sottotipo T linfoide CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, la proprietà di soppressione della risposta immune. Queste osservazioni hanno quindi rappresentato il presupposto per lo sviluppo dell'ipotesi secondo cui l'induzione di allotolleranza nel contesto di un TCSE potesse dipendere dagli stessi meccanismi tipici della tolleranza "dominante", diretta verso gli antigeni self. I primi esperimenti a conferma della suddetta ipotesi sono stati basati sull'impiego della procedura di xenotrapianto all'interno del sistema pollo-quaglia e hanno condotto a dimostrare l'induzione di tolleranza dopo infusione di xeno-trapianti di cellule epiteliali allo stadio embrionale. Lo stesso è stato dimostrato in modelli murini [142].

Nell'ambito delle emopatie maligne, l'allorreattività rappresenta, in termini di GvL, un cardine essenziale della procedura trapiantologica, in quanto, attraverso i sofisticati meccanismi cellulari della competenza immunologica, rende possibile l'aggressione e la distruzione di

eventuali cellule neoplastiche sfuggite ai trattamenti chemioterapici e ai farmaci utilizzati nel regime di condizionamento pre-trapianto [143]. Tuttavia, tale alloreattività si traduce anche nello sviluppo di GvHD, che, di fatto, rappresenta una delle principali complicanze del decorso post-trapiantologico, in quanto si caratterizza per l'induzione di una risposta immune contro i tessuti sani del ricevente. Di conseguenza, lo stato ideale di tolleranza nel contesto di un allotrapianto dovrebbe favorire la GvL inibendo al contempo la GvHD. A tal proposito, diversi studi sperimentali, condotti su modelli animali e sull'uomo, hanno confermato l'importanza delle nTreg nel controllo dell'alloimmunità e nella prevenzione della GvHD, dopo TCSE allogenico, apparentemente senza alcuna influenza sulla GvL [144].

L'iniezione di colture linfocitarie miste C57BL/6-anti-B6.CH2<sup>bm12</sup> in topi bm12 irradiati subletalmente causa induzione di una forma letale di GvHD. Al contrario, l'iniezione di colture in presenza di anticorpi anti-CD154 o anti-CD80/86 non induce la patologia. Quando le nTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono depletate da tali colture prima dell'iniezione, lo sviluppo della GvHD continua ad aver luogo [145]. Questa ha rappresentato la prima reale dimostrazione che le nTreg sono in grado di inibire la GvHD. E' stato in seguito dimostrato che l'infusione di linfociti allogenici in topi irradiati letalmente e sottoposti ad un TCSE T-depleto, non si associa all'induzione di GvHD. Questo fenomeno può essere spiegato ipotizzando lo sviluppo di nTreg del donatore all'interno del timo dell'ospite, con conseguente protezione nei confronti della GvHD mediata dai linfociti T infusi del donatore. Il fenotipo delle cellule ad attività protettiva nei confronti della GvHD è, infatti, CD4<sup>+</sup>, in quanto lo stesso TCSE depleto dei linfociti CD4<sup>+</sup> è associato a GvHD letale dopo DLI [146]. In un modello murino simile, la deplezione di cellule CD25<sup>+</sup> comporta l'accelerazione della GvHD letale, mentre l'infusione di linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> del donatore ritarda la GvHD, specialmente nel caso in cui il rapporto nTreg/T effettori risulta elevato [147]. Nell'uomo, è stato dimostrato che la scarsa ricostituzione delle nTreg comporta uno sbilanciamento immunitario persistente, che favorisce l'insorgenza della GvHD. E' stata osservata una correlazione inversa tra l'espressione del gene codificante FOXP3 e il grado di GvHD in pazienti con GvHD acuta; l'espressione di FOXP3 risulta infatti consistentemente ridotta quando la malattia è attiva, mentre normali livelli di FOXP3 garantiscono la risoluzione della GvHD [148]. Questi dati sono stati ulteriormente confermati dall'osservazione dell'esistenza di un'associazione tra la presenza di bassi livelli di nTreg e la fase iniziale della GvHD acuta, suggerendo un potenziale coinvolgimento di tali cellule nella patogenesi di questa forma patologica di alloreattività [149]. Dati conflittuali sono stati invece ottenuti in relazione al ruolo delle nTreg nello sviluppo della GvHD cronica. In due recenti studi è stato riportato che pazienti con

GvHD cronica presentano un significativo aumento delle cellule T con fenotipo e funzionalità regolatoria, rispetto a pazienti senza segni di GvHD cronica, mentre in un altro lavoro condotto sempre su pazienti affetti da GvHD cronica, è stata segnalata una ridotta frequenza di cellule Treg  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  [150]. Questi dati suggeriscono che una difettosa normalizzazione dei livelli di nTreg durante la ricostituzione immunitaria successiva al trapianto, potrebbe contribuire allo sviluppo di GvHD cronica; o, in alternativa, che la GvHD cronica potrebbe causare un danno alla funzionalità del timo con possibile diminuzione della produzione di nTreg.

Ma quali sono i meccanismi effettori attraverso cui le nTreg garantiscono la protezione dalla GvHD? L'osservazione che le nTreg esprimenti alti livelli dell'antigene CD62L inibiscono la letalità della GvHD indica che tali cellule agiscono inizialmente all'interno degli organi linfoidi secondari [151]. Allo stesso tempo, è stato dimostrato che le nTreg sono presenti anche all'interno dei tessuti target di GvHD come la cute, il fegato, l'intestino e i polmoni. Questo è reso possibile grazie all'attività del recettore per chemochine CCR5, coinvolto nella localizzazione delle nTreg nei tessuti infiammati [152]. In modelli sperimentali di colite, è stato invece evidenziato il coinvolgimento di fattori solubili come l'IL-10 e il TGF- $\beta$ . L'infusione di nTreg IL-10<sup>-/-</sup> garantisce un ritardo nella comparsa di GvHD, nonostante ciò, solo il 40% degli animali sopravvive a 100 giorni dal trapianto e quelli che sopravvivono mostrano segni di GvHD. Il ritardo nella comparsa di GvHD può essere giustificato dall'attività ridondante del TGF- $\beta$  e del CTLA-4, che indica come le nTreg utilizzino meccanismi effettori multipli. Alcuni studi riportano che l'effetto di prevenzione della GvHD ottenuto dall'infusione delle nTreg, si realizza senza influenzare l'effetto benefico della GvL, per cui le nTreg sarebbero in grado di discriminare le due componenti dei meccanismi alloreattivi [153]. La spiegazione dei meccanismi alla base di tale capacità risulta tuttora poco nota. Una delle più recenti ipotesi nasce dall'osservazione che la GvHD dipendente da molecole MHC di classe II e quindi mediata dai linfociti T  $CD4^+$ , risulta più severa rispetto quella indotta da molecole MHC di classe I e quindi mediata dai linfociti T  $CD8^+$ , e che le nTreg hanno la capacità intrinseca di inibire maggiormente linfociti T  $CD4^+$ . Su tali basi, le nTreg, potrebbero garantire la protezione dalla GvHD, direzionando la loro attività soppressoria sulle cellule T  $CD4^+$  piuttosto che  $CD8^+$ , che rappresentano i linfociti preferenzialmente deputati all'eliminazione dei blasti leucemici residui e quindi responsabili della GvL [154]. Come anticipato, un rapporto relativamente elevato nTreg/T effettori è richiesto per la protezione dalla GvHD. Questo potrebbe imporre un serio limite sull'impiego clinico delle nTreg. Per tale motivo, è stata valutata la possibilità di espandere nTreg *ex-vivo*

preservandone l'attività regolatoria. Sono stati proposti diversi protocolli di espansione, basati sull'impiego di APC o anticorpi anti-CD3 e/o anti-CD28 immobilizzati, sempre in presenza di elevate concentrazioni di IL-2. Il loro impiego consente di ottenere un fold di espansione fino a  $10^4$  in colture di 6 settimane, e l'infusione delle nTreg espanse *in vitro*, protegge dall'insorgenza della GvHD in diversi modelli murini [155-159]. In realtà, la capacità di espansione così come di soppressione delle nTreg, risulta maggiore *in vivo*, caso in cui la stimolazione *ex-vivo* viene effettuata mediante l'impiego delle APC del ricevente del TCSE, piuttosto che degli anticorpi anti-CD3 e/o anti-CD28, molto probabilmente a causa della specificità delle nTreg espanse infuse. Tuttavia, nell'uomo, la bassa frequenza delle nTreg e la presenza di contaminanti  $CD4^+CD25^{low}$  nel sangue periferico umano pongono dei problemi tecnici per l'isolamento e la successiva espansione *in vitro* della popolazione cellulare di interesse. Una valida alternativa al sangue periferico come fonte di nTreg per l'espansione *ex-vivo* delle nTreg è rappresentata dal sangue di cordone ombelicale. Diversi studi hanno indicato la possibilità di generare *in vitro* delle linee cellulari di nTreg umane da sangue placentare dopo stimolo con anticorpi monoclonali anti-CD3, anti-CD28 e IL-2. La popolazione nTreg predominante nel SCO è rappresentata da cellule con fenotipo immaturo,  $CD45RA^+CD45RO^-$  e tale caratteristica è confermata anche da una minore espressione di FOXP3 [160-162]. A questo proposito, alcuni studi hanno dimostrato una potente capacità immunosoppressiva delle nTreg isolate dal SCO, in grado di persistere per diverse settimane e probabilmente strettamente correlata al loro fenotipo immaturo [163-164]. Ciò potrebbe spiegare la più bassa incidenza di GvHD che si osserva dopo trapianto di CSE da SCO, piuttosto che da MO o SVP. Sulla base di questi risultati preliminari si apre quindi la prospettiva per l'utilizzo delle banche di cordone ombelicale come fonte di pronta disponibilità di nTreg a scopo immunoterapico.

Per il ruolo cruciale che svolgono nella regolazione della risposta immune, nel mantenimento della tolleranza immunitaria e nel controllo dei fenomeni autoimmuni, le nTreg rappresentano quindi una potenziale terapia alternativa nell'ambito di un TCSE allogenico che mira alla prevenzione o al controllo della GvHD e alla promozione dell'attecchimento e del chimerismo, attraverso l'induzione di allotolleranza. Per questo motivo, tali cellule, costituendo una popolazione di linfociti T fenotipicamente e molecolarmente distinta, sono diventate, negli ultimi anni, oggetto di studio di numerosissime ricerche applicate alla clinica.

### 1.3 Scopo del progetto di ricerca

Le nTreg rappresentano una sottopopolazione T linfoide CD4<sup>+</sup> di derivazione timica con un ruolo cruciale nel mantenimento della tolleranza immunologica al self e nel controllo della risposta immune fisiologica e patologica. Nell'ambito dell'immunoterapia, una delle applicazioni più promettenti delle nTreg è rappresentato dal tentativo di ridurre la tossicità associata al trapianto allogenico di CSE, impiegato principalmente per la cura delle neoplasie ematologiche. Le recenti scoperte sulla biologia delle nTreg e gli studi effettuati su modelli murini, suggeriscono, infatti, un loro ruolo nella modulazione della prognosi post-trapianto, in particolar modo attraverso la possibilità di controllare la GvHD senza interferire con l'effetto della GvL. In tale ambito si inserisce il nostro studio, volto ad indagare il ruolo delle nTreg nella patogenesi e nel controllo della GvHD acuta e cronica post trapianto allogenico, per il successivo disegno di un protocollo di Immunoterapia basato sull'utilizzo delle nTreg e destinato a pazienti allotrapiantati con complicanze di GvHD.

A tale scopo è stata analizzata dapprima la possibilità di isolare le nTreg da pazienti sottoposti a TCSE allogenico, in assenza o presenza di GvHD, ed espanderle *in vitro* in presenza di anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 e IL-2. Sono state quindi esaminate le caratteristiche fenotipiche delle nTreg espanse e la loro funzionalità in termini di attività immunosoppressoria e produzione di citochine immunoregatorie. La valutazione della soppressione nTreg-mediata è stata effettuata attraverso una co-coltura di cellule T effettrici CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologhe e DC allogeniche, in presenza o assenza di nTreg, finalizzata a mimare la risposta allogenica che si verifica *in vivo* nel corso della GvHD. Nell'ambito di tale studio è stata anche avviata un'analisi comparativa tra le nTreg isolate da pazienti sottoposti a TCSE allogenico e quelle isolate da SVP e SCO, con lo scopo di evidenziare la possibile presenza di differenze nelle peculiarità di tali cellule, in relazione alla fonte di origine.

Il fine ultimo del suddetto studio è rappresentato dalla possibilità di migliorare la comprensione della biologia delle nTreg per lo sviluppo di un progetto immunoterapeutico, basato sull'utilizzo di tali cellule, che possa tradursi in un beneficio clinico attraverso la riduzione del fabbisogno della terapia convenzionale immunosoppressiva nel TCSE allogenico. Inoltre, le implicazioni funzionali di tale terapia potrebbero rappresentare il razionale per un ulteriore approfondimento della comprensione della biologia del trapianto, per la prevenzione e il trattamento della GvHD e per la ricostituzione immunologica.



## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Pazienti e Controlli**

Nel nostro studio sono stati inclusi 18 pazienti affetti da neoplasie ematologiche di differente natura, sottoposti, presso il nostro Istituto, a TCSE allogenico. Il prelievo dei campioni di SVP di tali pazienti è stato effettuato a circa un anno dal momento del trapianto. Quattordici pazienti erano di sesso maschile e 4 di sesso femminile, con un'età mediana di 36 anni (intervallo: 10-61 anni). Cinque pazienti risultavano affetti da Leucemia Linfoide Acuta (LLA), 3 da Leucemia Mieloide Acuta (LMA), 3 da Leucemia Mieloide Cronica (LMC), 3 da Leucemia Linfatica Cronica (LLC), 2 da Mieloma Multiplo (MM), 1 da Linfoma di Hodgkin (LH) ed 1 da Trombocitemia Essenziale (TE). Quindici pazienti sono stati sottoposti a trapianto allogenico da donatore familiare HLA-compatibile, 3 pazienti a trapianto allogenico da donatore non correlato HLA-compatibile. Il SVP è stato impiegato come fonte di cellule staminali emopoietiche in 11 casi, il MO in 6 casi e il SCO in un caso. In 13 pazienti è stato eseguito un regime di condizionamento di tipo mieloablativo e in 5 pazienti di tipo non mieloablativo.

Le 18 unità di SCO incluse nello studio sono state ottenute dalla Banca del Cordone Ombelicale dell'Università degli studi di Roma " Sapienza". Tali unità comprendono quelle sacche di SCO che non soddisfano i criteri di sicurezza che ne permettono l'immissione nella rete della banca. In qualità di controllo sono stati utilizzati, previo consenso informato, 13 campioni di SVP, prelevati da donatori sani adulti, ottenuti dal Centro Trasfusionale della stessa Università.

Le cellule mononucleate di SCO (CBMC) e di SVP (PBMC) sono state ottenute mediante separazione su gradiente di densità e coltivate a 37°C in atmosfera umidificata con un tasso di CO<sub>2</sub> pari al 5%, in terreno colturale RPMI 1640 (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS, HyClone, South Logan, UT), 1% di L-glutammina (EuroClone, Europe) e 1% di Pen-Strepto (EuroClone, Europe).

### **2.2 Purificazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>**

Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono state isolate dal resto delle CBMC e delle PBMC sia dei pazienti sottoposti a TCSE allogenico che dei donatori sani adulti mediante separazione cellulare magnetica, attraverso l'impiego di un kit di isolamento specifico per cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec Auburn, CA, USA). La procedura di isolamento è stata eseguita

in due passaggi. In primo luogo, allo scopo di arricchire i campioni in cellule T CD4<sup>+</sup>, è stata effettuata una marcatura indiretta delle cellule T CD4<sup>+</sup> con una miscela di anticorpi biotinilati diretti contro gli antigeni CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , Glicoforina A, e biglie magnetiche anti-biotina. A questo punto, i campioni arricchiti in cellule T CD4<sup>+</sup>, sono stati sottoposti a una selezione positiva delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediante l'uso di specifici anticorpi anti-CD25 coniugati a biglie magnetiche.

### **2.3 Espansione dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolati**

Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute dopo isolamento immunomagnetico, sono state espanse per 6 giorni in piastre da 96 pozzetti con fondo ad U, coniugate ad anticorpi monoclonali anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) e anti-CD28 (5  $\mu$ g/ml), in presenza di IL-2 (100 U/ml), aggiunta al 1° e 3° giorno di coltura. La frazione negativa ottenuta dopo purificazione, ovvero i linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, è stata risospesa in una soluzione di FBS al 10% di DMSO e criopreservata in azoto liquido per il successivo impiego come popolazione cellulare T effettrice autologa.

### **2.4 Analisi Immunofenotipica delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse**

Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse sono state caratterizzate immunofenotipicamente mediante la valutazione dell'espressione di superficie degli antigeni CD4, CD25, CD62L e dell'espressione intracellulare delle molecole CTLA-4 e FOXP3. Per la determinazione dell'espressione degli antigeni di superficie, le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali (mAbs) di topo coniugati con i fluorocromi FITC, PE e PerCP e incubate per 20 minuti al buio a 4°C in PBS, privo di ioni Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (DPBS, Cambrex Bio Science Verviers, Belgium). In particolare, nel nostro sistema sperimentale sono stati impiegati i seguenti mAbs di superficie: CD4<sub>FITC</sub>, CD25<sub>PE</sub>, CD3<sub>PERCP</sub>, (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California), CD62L<sub>FITC</sub> (EBioscience). In tutti gli esperimenti, oltre agli mAbs diretti contro antigeni di superficie caratteristicamente espressi dalle cellule Treg, sono stati utilizzati isotipi aspecifici di Ig (IgG1, IgG2) coniugati con i fluorocromi FITC, PE e PerCP, come controllo negativo. Per la valutazione dell'espressione degli antigeni intracellulari CTLA4 e FOXP3 è stato, invece, effettuato un test di marcatura intracitoplasmatica, basato sull'utilizzo del kit di permeabilizzazione cellulare "Fix&Perm" (Caltag Laboratories, Hamburg, Germany). L'acquisizione dei dati è avvenuta, in entrambi i casi, mediante

l'utilizzo di un citofluorimetro "FACScan" e la loro analisi è stata realizzata utilizzando il programma "CellQuest" (Becton Dickinson).

## **2.5 Valutazione delle capacità soppressorie delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse**

Per valutare le capacità soppressorie delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse nei confronti dell'attività proliferativa dei linfociti T autologhi è stato allestito un test di proliferazione. A tale scopo, le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate da SCO e da SVP di pazienti trapiantati o donatori sani sono state coltivate, in piastre da 96 pozzetti a fondo a U, secondo un rapporto 1:1 con cellule T effettrici CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologhe a loro volta stimulate con DC generate da monociti di donatori sani e caricate con corpi apoptotici originati da blasti leucemici allogeni, come descritto in precedenza [165]. Allo scadere del 6° giorno di coltura, è stata introdotto all'interno di ciascun pozzetto 1 µCi di Timidina triziata (<sup>3</sup>H-TdR; Amersham, Arlington Heights, IL) e, dopo un'incubazione di circa 18 h a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, la capacità soppressoria delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> è stata valutata mediante l'analisi dell'incorporazione di <sup>3</sup>H-TdR da parte dei linfociti T effettrici, in presenza o assenza di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse, effettuata mediante l'ausilio di un Beta-counter (Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands). I risultati sono stati riportati come media dei colpi per minuto (Cpm) ± deviazione standard.

## **2.6 Valutazione della produzione di IL-10 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse**

La valutazione della produzione di IL-10 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> è stata effettuata, mediante ELISA (Saggio di Immunoassorbimento con Enzima Coniugato), su campioni di surnatanti prelevati al 6° giorno della coltura allestita per l'espansione delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di SCO e di SVP di pazienti trapiantati o donatori sani, dopo isolamento immunomagnetico.

In particolare, il test ELISA è stato realizzato attraverso l'impiego di un kit per la determinazione della concentrazione dell'IL-10 (Quantikine®, R&D Systems) nei surnatanti della coltura delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse da 3 unità di SCO, 3 campioni di SVP di pazienti senza segni di GvHD, 3 con segni di GvHD e infine 3 campioni di SVP di donatori sani. Sono state impiegate come controllo diluizioni seriali di IL-10 umana ricombinante a concentrazione nota, utili per la realizzazione di una curva standard necessaria a risalire alla quantità di IL-10 presente nei campioni. Come standard più elevato è stata utilizzata una

diluizione di IL-10 pari a 1000 pg/ml, mentre il diluente fornito all'interno del kit è stato scelto come controllo negativo. L'analisi dei dati è stata effettuata rilevando l'assorbanza di ciascun campione a 450 nm mediante l'impiego di uno spettrofotometro.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Capacità di espansione e caratteristiche immunofenotipiche delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate

Allo scopo di studiare le caratteristiche molecolari e funzionali delle cellule T regolatorie, è stata in primo luogo esaminata la possibilità di purificarle ed espanderle *in vitro* a partire da cellule mononucleate. Lo studio è stato condotto su 18 campioni di SVP prelevato da pazienti affetti da neoplasie ematologiche ad almeno un anno dal trapianto allogenico di CSE, in assenza (9 pazienti) o in presenza di GvHD (9 pazienti: 3 con GvHD acuta, 3 con GvHD cronica e 3 con entrambi i tipi di GvHD); su 13 campioni di SVP prelevato da donatori sani adulti e 18 unità di SCO.

Dai risultati ottenuti in questa prima fase dello studio, è emersa la possibilità di isolare, da tutte le fonti esaminate, cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, con valori di purezza medi complessivamente pari al 99.0% ± 0.1% (intervallo: 98-100%), mediante una primaria delezione dei componenti CD4<sup>-</sup>, seguita da 2 cicli di selezione positiva per CD25. La valutazione della quantità di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute ha evidenziato percentuali medie di resa pressoché simili sia nel caso del SVP dei pazienti allotrapiantati e dei donatori sani che nel caso delle unità di SCO, con valori rispettivamente pari a 0.3% ± 0.4%, 0.6% ± 0.3% e 0.3% ± 0.3%.

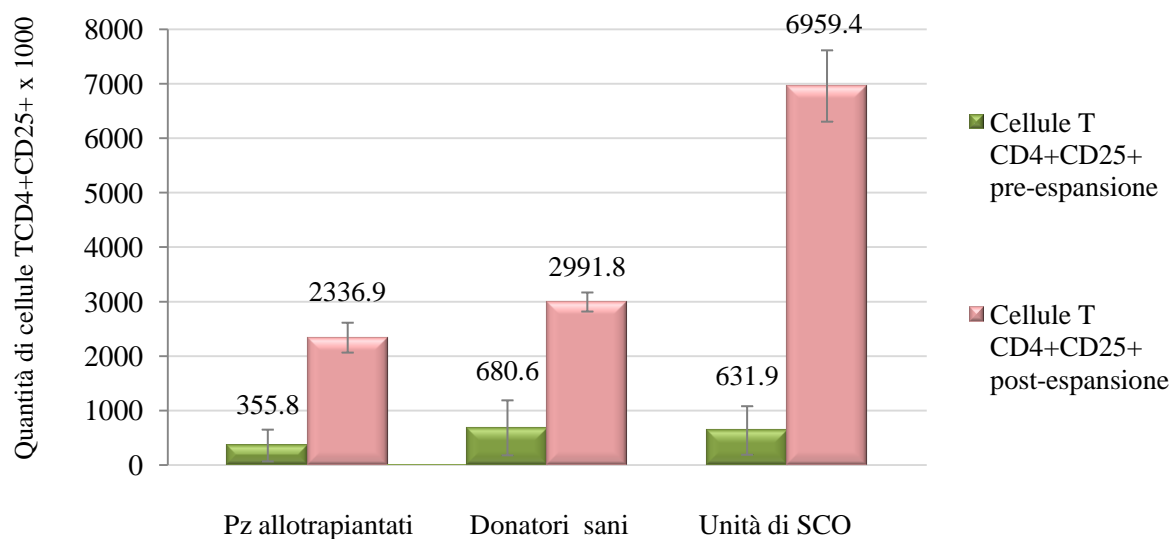
Una volta isolate, le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono state incubate in presenza di fattori stimolanti la crescita e proliferazione delle cellule T linfoidi attraverso una modalità sia TCR-dipendente che indipendente, rappresentati dagli anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 e dall'IL-2, aggiunta al 1° e 3° giorno di coltura. Al termine della 1<sup>a</sup> settimana, sebbene sia stato possibile osservare una responsività alla stimolazione da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute da tutte le tre diverse fonti, è stata rilevata, in tal caso, una risposta quantitativamente diversa in relazione alla tipologia di fonte. Infatti, le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dalle unità di SCO hanno mostrato una capacità di espansione superiore sia rispetto a quelle isolate dal SVP dei pazienti allotrapiantati che dei donatori sani. In particolare, è stato calcolato un valore medio di espansione di 11.0 ± 6.9 volte (631.9x10<sup>3</sup> ± 446.2x10<sup>3</sup> Treg pre- vs 6959.4x10<sup>3</sup> ± 655.4x10<sup>3</sup> Treg post-espansione) nel caso delle unità di SCO, di 6.7 ± 5.4 volte (355.8x10<sup>3</sup> ± 291.4x10<sup>3</sup> Treg pre- vs 2336.9x10<sup>3</sup> ± 274.5x10<sup>3</sup> Treg post-espansione) nel caso dei pazienti allotrapiantati e di 4.4 ± 2.4 volte (680.6x10<sup>3</sup> ± 505.2x10<sup>3</sup> Treg pre- vs 2991.8x10<sup>3</sup> ± 175.1x10<sup>3</sup> Treg post-espansione) nel caso dei donatori sani [Tabella 1; Figura 5].

La differenza nei livelli di espansione è risultata significativa confrontando i valori medi di espansione delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dalle unità di SCO e dal SVP dei donatori sani (P=0.001); al contrario, nessuna differenza significativa è stata osservata paragonando la capacità di espansione delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dai pazienti sottoposti a trapianto, a quella caratteristica della controparte normale. Le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate sono inoltre apparse iporesponsive alla stimolazione sia in presenza di alte dosi di IL-2 in assenza di anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, sia in presenza dei suddetti anticorpi da soli o in combinazione, mostrando invece una normale risposta alla stimolazione mediata da stimoli TCR-indipendenti, rappresentati primariamente dalla fitoemoagglutinina (PHA) (dati non mostrati).

Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse sono state quindi analizzate mediante citometria a flusso per la valutazione delle caratteristiche fenotipiche, finalizzata all'identificazione dell'espressione di specifici marcatori di superficie e intracellulari comunemente associati all'attività regolatoria. In tutti i casi esaminati, indipendentemente dalla fonte di isolamento, la totalità delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate espanse è risultata positiva per l'espressione dei marcatori CD4 e CD25, con valori medi complessivamente pari al 99.0% ± 0.4% (intervallo: 97-100%).

**Tabella 1.** Incremento medio di espansione delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate mediante separazione immunomagnetica dal SVP dei pazienti allotrapiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO e coltivate per 6 giorni *in vitro* in presenza di anticorpi anti-CD3 (5 µg/ml) e anti-CD28 (5 µg/ml) e IL-2 (100 U/ml).

Fonte di isolamento delle cellule T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	Incremento medio di espansione delle cellule T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Unità di SCO (n=18)	11.0 volte ± 6.9 (intervallo: 1.8-24.0)
SVP dei pazienti allotrapiantati (n=18)	6.7 volte ± 5.4 (intervallo: 1.5-23.3)
SVP dei donatori sani (n=13)	4.4 volte ± 2.4 (intervallo: 1.5-13.6)



**Figura 5.** Confronto tra le quantità medie pre- e post-espansione di cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dal SVP dei pazienti (Pz) allotrapiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO.

La quasi totalità delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute, è apparsa inoltre caratterizzata dalla positività per l'espressione del CD62L, una selectina coinvolta nella migrazione delle cellule linfoidi a livello dei linfonodi o dei tessuti infiammatori interessati dalla GvHD, con valori medi di intensità del 76.0% ± 28.0% per le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti allotrapiantati, dell'89.0% ± 1.0% per le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei donatori sani e del 96.0% ± 9.0% per quelle isolate dalle unità di SCO. In ciascuna popolazione di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> è stata quindi evidenziata l'espressione dell'antigene CTLA-4, direttamente coinvolto nel controllo dell'attività regolatoria, con valori medi anche in tal caso paragonabili e complessivamente pari all'85.0% ± 15.0% (intervallo: 81-88%). L'espressione della molecola CTLA-4 è stata valutata a livello intracitoplasmatico, a causa di una debole presenza in superficie, dovuta probabilmente a un processo di rapida endocitosi strettamente correlato all'impiego del CTLA-4 durante la fase attivatoria delle cellule T regolatorie. Sempre all'interno del compartimento intracitoplasmatico, è stata valutata l'espressione di FOXP3, data la sua importanza nell'identificazione della popolazione T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ad attività regolatoria. In tutti i casi studiati, è stata osservata un'elevata espressione di FOXP3, caratterizzata dalla presenza di livelli equivalenti nelle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse ottenute dai pazienti, dai donatori adulti e dalle unità di SCO (SVP dei pazienti: 86.0% ± 15.0%; SVP dei donatori: 80.0% ± 11.0%; Unità di SCO: 85.0% ± 14.0%). E' stata infine confermata, mediante analisi

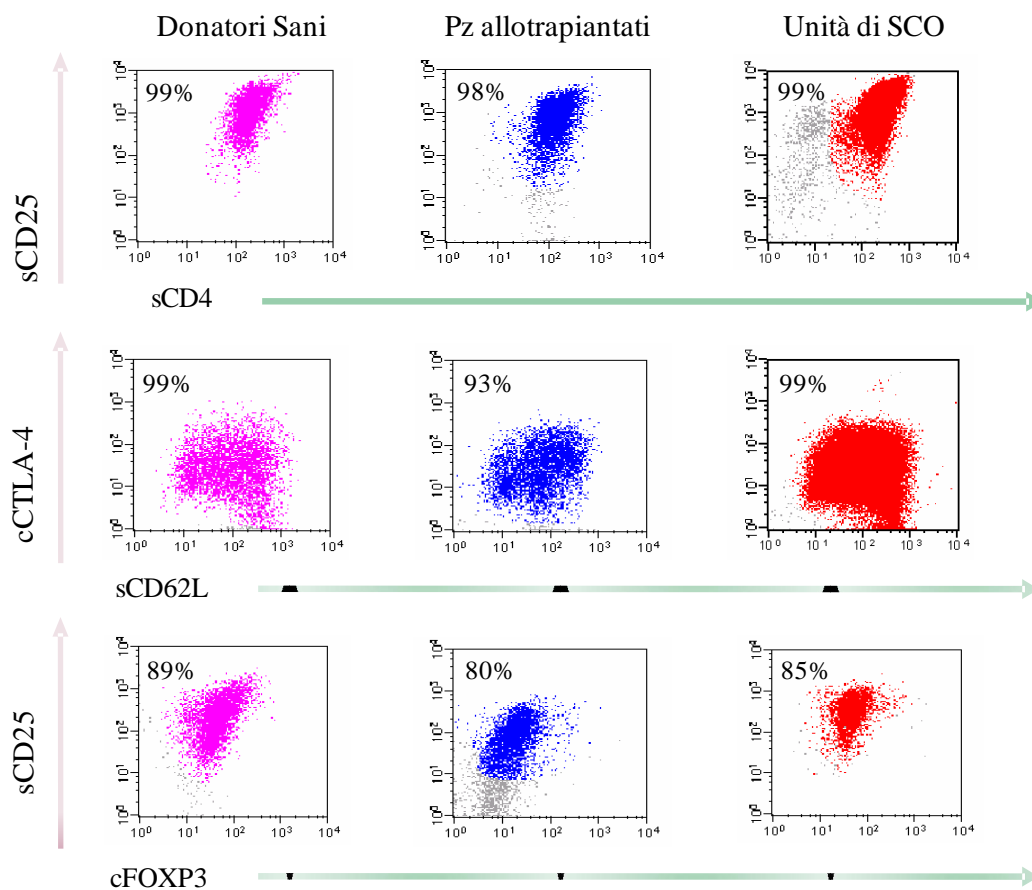
immunofenotipica, la totale assenza di cellule T CD8<sup>+</sup> contaminanti in tutte le popolazioni studiate, un dato a sostegno dell'esclusiva espansione, nel nostro sistema sperimentale, di cellule T a fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [Tabella 2; Figura 6].

Nel complesso, i dati ottenuti hanno rivelato la possibilità di isolare ed espandere cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ad attività regolatoria a partire sia dal SVP di pazienti sottoposti a trapianto e donatori adulti, che da unità di SCO, senza alcuna peculiarità o differenza di espressione degli antigeni di superficie e citoplasmatici, in relazione alla fonte di derivazione. Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dalle unità di SCO hanno inoltre mostrato una maggiore responsività agli stimoli proliferativi forniti *in vitro*, un dato in accordo con le caratteristiche di immaturità tipiche dei componenti cellulari emopoietici presenti all'interno di tale fonte.

**Tabella 2.** Valori percentuali medi di espressione dei marcatori di superficie e intracellulari esaminati per la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate dal SVP dei pazienti allotrapiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO.

Marcatori esaminati	SVP dei pazienti allotrapiantati (n=18)	SVP dei donatori sani (n=13)	Unità di SCO (n=18)
CD4/CD25	98.5% ± 0.3%	99.0% ± 0.2%	98.0% ± 0.5%
CD62L	76.0% ± 28.0%	89.0% ± 1.0%	96.0% ± 9.0%
CTLA-4	87.0% ± 16.0%	84.0% ± 13.9%	86.0% ± 14.0%
FOXP-3	86.0% ± 15.0%	80.0% ± 11.0%	85.0% ± 14.0%



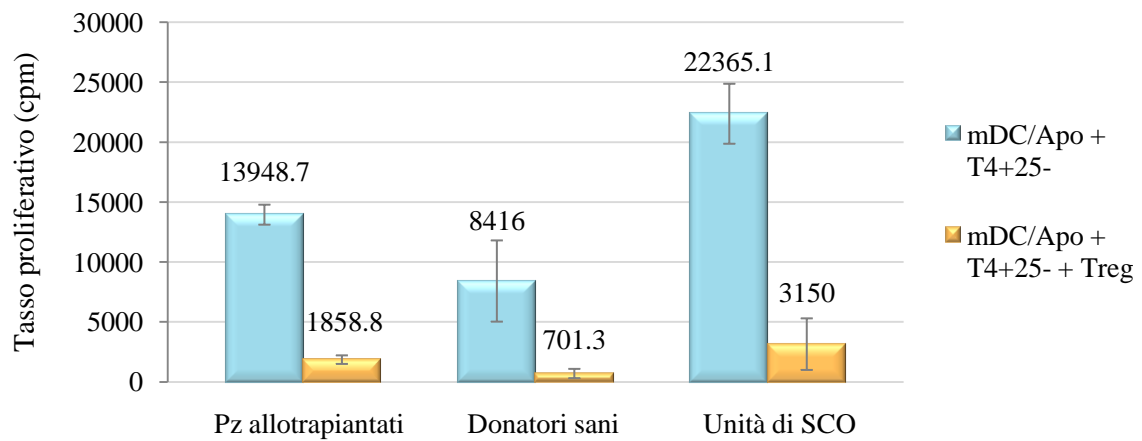


**Figura 6.** Confronto della caratterizzazione immunofenotipica delle cellule T regolatorie  $CD4^+CD25^+$  espanse isolate dal SVP dei pazienti (Pz) allotripiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO. A titolo esemplificativo sono stati riportati i diagrammi relativi a un singolo campione di cellule T regolatorie per ciascuna fonte di isolamento.

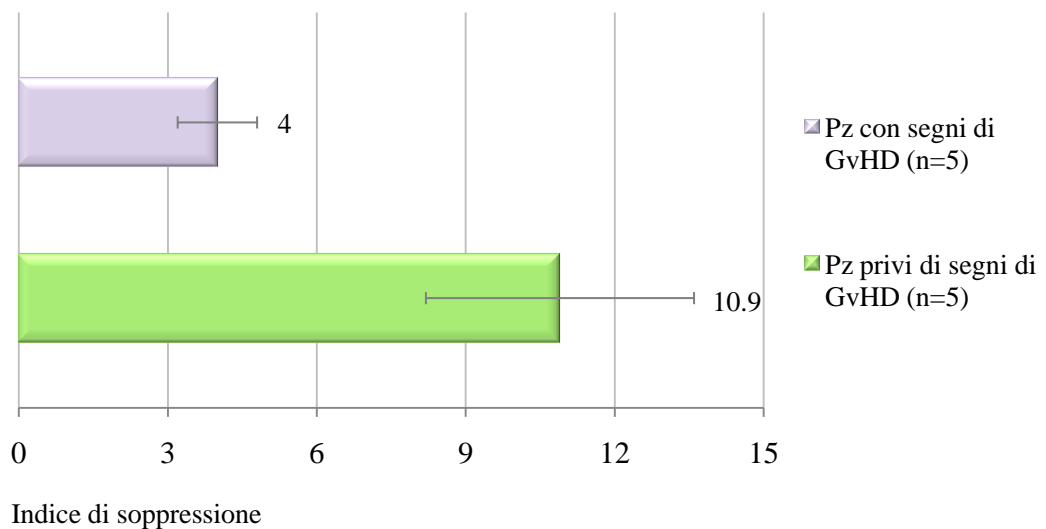
### 3.2 Capacità soppressoria delle cellule T regolatorie $CD4^+CD25^+$ espanse

Per la caratterizzazione delle proprietà funzionali, le cellule Treg  $CD4^+CD25^+$  espanse, sono state coltivate in presenza di cellule T effettrici autologhe  $CD4^+CD25^-$ , stimulate da DC allogeniche caricate con corpi apoptotici leucemici, anch'essi di natura allogenica. E' stata quindi esaminata, al termine del 6° giorno di coltura linfocitaria mista, la capacità delle cellule T regolatorie  $CD4^+CD25^+$  di sopprimere l'attività proliferativa dei linfociti T effettrici autologhi, attraverso la quantificazione del grado di inibizione dell'incorporazione di  $^3H$ -TdR. Le cellule Treg  $CD4^+CD25^+$  espanse isolate da tutte le fonti in esame, hanno manifestato, negli esperimenti di co-cultura, un'efficiente abilità soppressoria nei confronti dei linfociti T effettrici autologhi. L'inibizione della proliferazione è risultata dose-dipendente,

mostrando valori massimi ad un rapporto finale cellule T regolatorie/T effettori di 1:1. In tali condizioni, la più elevata capacità soppressoria è stata osservata da parte delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei donatori sani, a confronto con le altre fonti di derivazione. E' stata, infatti, misurata in tal caso una riduzione media del tasso proliferativo pari a  $12.0 \pm 9.1$  volte (8416.0Cpm  $\pm$  3387.2Cpm in assenza di Treg vs 701.3Cpm  $\pm$  387.2Cpm in presenza di Treg). Al contrario, l'analisi delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> originate dal SVP dei pazienti allotrapiantati e dalle unità di SCO, ha rivelato una riduzione media del tasso proliferativo rispettivamente pari a  $7.5 \pm 5.6$  volte (13948.7Cpm  $\pm$  833.6Cpm in assenza di Treg vs 1859.8Cpm  $\pm$  356.9Cpm in presenza di Treg) e  $7.1 \pm 4.5$  volte (22365.1Cpm  $\pm$  2500.9Cpm in assenza di Treg vs 3150.0Cpm  $\pm$  2151.1Cpm in presenza di Treg) [Figura 7]. Risultati paragonabili sono stati ottenuti sia quando è stata utilizzata la PHA come fattore di stimolazione negli esperimenti di co-cultura sia quando la popolazione complessiva di cellule T linfoidi autologhe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> è stata impiegata come popolazione T effettrice nel test di soppressione della risposta immune alloreattiva (dati non mostrati). Non è stata invece osservata alcuna soppressione della proliferazione dei linfociti T effettori attivati quando le cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse sono state co-coltivate in assenza di DC, impiegate come APC. Lo studio della funzionalità delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dal SVP dei pazienti allotrapiantati ha, inoltre, rivelato la presenza di una correlazione tra la capacità soppressoria e l'occorrenza di GvHD nei suddetti pazienti, al momento dell'isolamento di tali cellule. In particolare, le cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute da pazienti privi di segni clinici di GvHD ( $n=5$ ) hanno manifestato una capacità di inibizione della proliferazione dei linfociti T effettori autologhi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, significativamente maggiore rispetto a quella osservata nei campioni di cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute da pazienti con manifestazioni di GvHD sia acuta che cronica ( $n=5$ ) ( $P=0.04$ ). In media la riduzione del tasso proliferativo indotta nel primo caso è risultata pari a  $10.9 \pm 2.7$  volte (intervallo: 5.3-21.8; 19722.2Cpm  $\pm$  6340.2Cpm in assenza di Treg vs 1809.4Cpm  $\pm$  140.7Cpm in presenza di Treg) mentre, nel secondo caso, a  $4.0 \pm 0.8$  volte (intervallo: 1.5-6.3; 10943.4Cpm  $\pm$  4967.8Cpm in assenza di Treg vs 2735.8Cpm  $\pm$  1012.6Cpm in presenza di Treg) [Figura 8]. I risultati ottenuti mostrano la presenza di una competenza funzionale, in termini di capacità di soppressione della risposta alloigena, delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate ed espanse *ex-vivo*, esplicitata indipendentemente dalla fonte di derivazione. Evidenziano, inoltre, un'alterazione dell'efficienza di tali cellule quando isolate da pazienti con esperienza di GvHD, un dato a sostegno del ruolo primario della scarsa regolazione dei meccanismi alloreattivi nella comparsa e/o nell'esacerbazione di questa immunopatologia infiammatoria.



**Figura 7.** Capacità soppressoria media delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate dal SVP dei pazienti (Pz) allotrapiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO. Le cellule T regolatorie sono state coltivate per 6 giorni in presenza di cellule T effettrici autologhe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, stimulate da DC allogeniche caricate con corpi apoptotici leucemici.



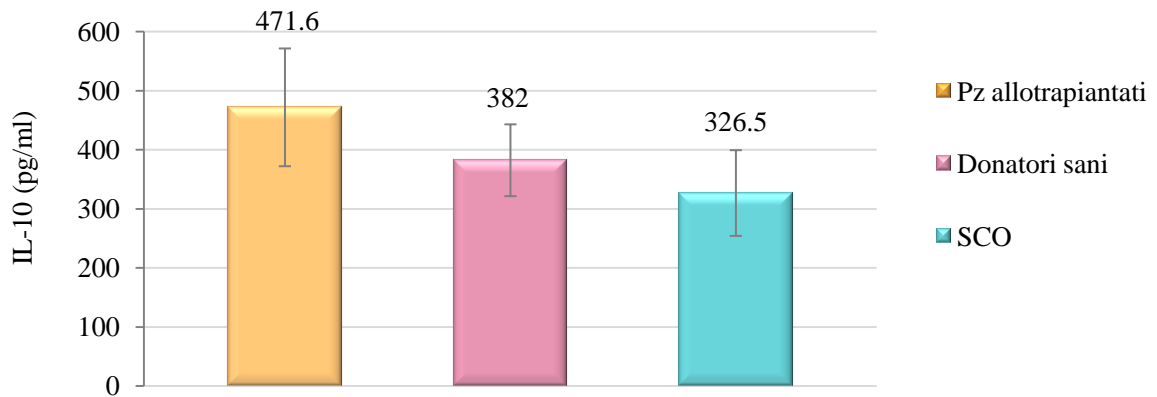
**Figura 8.** Confronto della capacità soppressoria media delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate dal SVP di pazienti (Pz) allotrapiantati in assenza o presenza di segni clinici di GvHD.

### 3.3 Produzione di citochine immunosoppressive da parte delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse

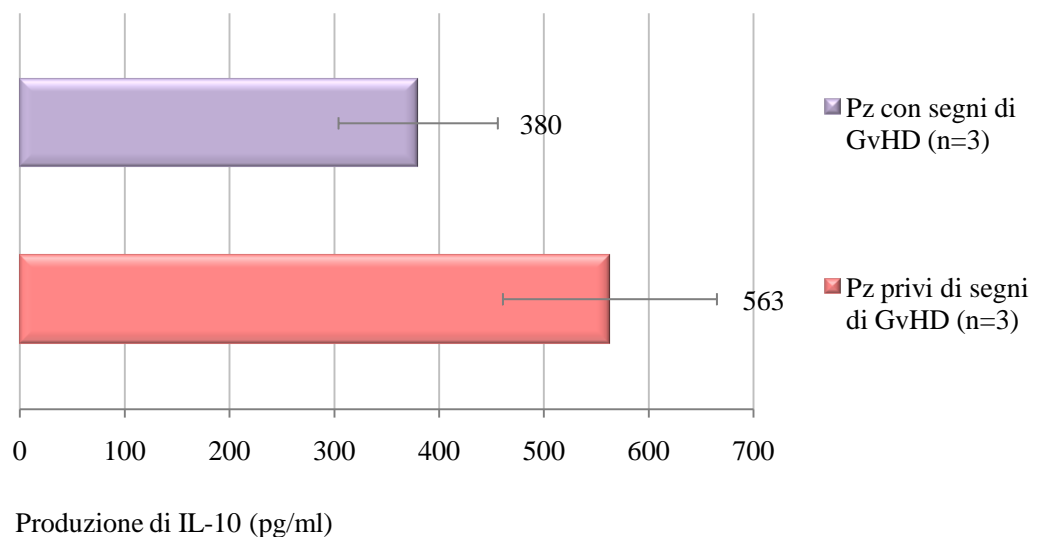
Tra i fattori solubili coinvolti nel controllo dei meccanismi di tolleranza periferica, l'IL-10 svolge un ruolo determinante attraverso l'induzione, nelle cellule T linfoidi, di una forma di anergia antigene-specifica. Tale funzione è resa possibile sia grazie ad un'azione diretta sui linfociti T, che si traduce nella diminuzione della produzione di IL-2 e nella riduzione della proliferazione cellulare, sia grazie ad un'azione indiretta, identificabile nella diminuzione di espressione delle molecole costimolatorie e nell'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle APC professionali. La produzione e secrezione di IL-10 sembra rappresentare uno dei meccanismi effettori contatto-indipendenti mediante i quali le cellule Treg esplicano la loro funzione soppressoria. Allo scopo di verificare tale possibilità, il rilascio di IL-10 da parte delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate, è stato quantizzato *in vitro*, mediante un saggio ELISA, nei surnatanti raccolti al termine dei 6 giorni di coltura in presenza di anticorpi anti-CD3, anti-CD28 e IL-2.

E' stato possibile osservare una produzione quantitativamente simile di IL-10 da parte delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate da tutte le fonti in esame. In particolare, sono stati misurati livelli medi di IL-10 secreta pari a 471.5pg/ml  $\pm$  99.7pg/ml nel caso del SVP dei pazienti allotrapiantati, a 382.0pg/ml  $\pm$  60.8pg/ml nel caso del SVP dei donatori sani e a 326.5pg/ml  $\pm$  72.5pg/ml nel caso delle unità di SCO [Figura 9]. Anche relativamente alla produzione di IL-10 è stata riscontrata una differenza nelle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dal SVP dei pazienti allotrapiantati, in relazione alla presenza o meno di GvHD nei suddetti pazienti al momento dello studio. Nei surnatanti delle colture di cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute dai pazienti senza segni di GvHD ( $n=3$ ), il dosaggio di IL-10 è infatti risultato lievemente maggiore rispetto alle colture di cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ottenute dai pazienti con segni di GvHD ( $n=3$ : 1 paziente con GvHD acuta; 1 con GvHD cronica ed 1 con entrambe le forme) (pazienti senza GvHD vs pazienti con GvHD: 563.0pg/ml  $\pm$  102.1pg/ml vs 380.0pg/ml  $\pm$  76.0pg/ml) [Figura 10].

Questi risultati confermano la normale funzionalità delle cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate ed espanse *ex-vivo*, anche in termini di produzione di citochine immunomodulatorie, a supporto dell'esistenza di meccanismi di soppressione contatto-indipendenti Treg-mediati. Inoltre, mentre la fonte di derivazione non influenza la capacità di secrezione dell'IL-10, questa, come accade per la funzione soppressoria della risposta alloreattiva, risente invece degli effetti negativi che la GvHD esercita sulle componenti del compartimento immunitario.



**Figura 9.** Valutazione della produzione di citochine immunosoppressorie da parte delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate dal SVP dei pazienti (Pz) allotrapiantati e dei donatori sani e dalle unità di SCO. Il rilascio di IL-10 è stato quantizzato *in vitro*, mediante un saggio ELISA, nei surnatanti raccolti al termine dei 6 giorni di coltura.



**Figura 10.** Confronto della produzione di citochine immunosoppressorie da parte delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse isolate dal SVP di pazienti (Pz) allotrapiantati in assenza o presenza di segni clinici di GvHD.

#### 4. DISCUSSIONE

Il TCSE allogenico rappresenta una terapia altamente efficace per la cura delle malattie oncoematologiche, principalmente grazie agli effetti benefici correlati all'abilità dei componenti T linfoidei presenti nell'inoculo, di riconoscere ed eradicare la quota cellulare neoplastica residua. Tuttavia, queste stesse componenti alloreattive contribuiscono all'insorgenza della GvHD, che rappresenta attualmente una delle maggiori cause di morbilità e mortalità post-trapianto. Di conseguenza, la riduzione dell'incidenza e della severità della GvHD, senza perdita dell'effetto GvL, costituisce una delle prerogative più importanti nella sfera trapiantologica, in quanto consentirebbe da un lato il miglioramento della prognosi del paziente, dall'altro l'aumento del numero di pazienti eleggibili al TCSE, come conseguenza di una riduzione dell'importanza del grado di compatibilità HLA donatore/ricevente. La prevenzione e la terapia della GvHD è stata in passato limitata alla delezione e/o all'inattivazione funzionale dei linfociti T alloreattivi mediante l'impiego di farmaci immunosoppressivi [166]. Nonostante l'individuazione di strategie immunosoppressive innovative, il loro impiego risulta comunque limitato dall'incremento del rischio di recidiva tumorale, dall'aumento di incidenza delle infezioni opportunistiche e dalla significativa tossicità correlata agli agenti in uso. Lo sfruttamento delle conoscenze relative ai meccanismi immunoregolatori intrinseci del sistema immune potrebbe evitare alcuni di questi inconvenienti. Le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rappresentano una delle sottopopolazioni T con un ruolo chiave nel mantenimento della tolleranza al self e nel controllo dell'omeostasi del compartimento T linfoide periferico. E' stato recentemente documentato il loro coinvolgimento non solo nell'induzione dell'allotolleranza nel contesto di un trapianto solido, ma anche nella protezione dalla letalità della GvHD in diversi modelli murini di TCSE [167-169]. Quando infuse in presenza di elevate concentrazioni di linfociti T effettori CD25<sup>-</sup>, le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> non inducono di per se la GvHD ma ne impediscono la comparsa. In base alle combinazioni donatore/ricevente, il grado di protezione dalla GvHD può inoltre variare dalla riduzione della severità alla completa inibizione delle manifestazioni cliniche e della letalità GvHD-correlate. Allo stesso modo, la deplezione *ex vivo* delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dall'inoculo comporta un'accelerazione delle cinetiche di comparsa della GvHD post-TCSE, mentre la loro infusione ritardata fornisce il miglioramento della suddetta patologia infiammatoria, suggerendo un loro potenziale impiego non solo per la prevenzione ma anche per la terapia della GvHD, almeno nel caso in cui il decorso non sia esageratamente aggressivo. Inoltre, nello stesso modello sperimentale, l'attività di protezione

dalla GvHD mediata dalle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> non interferisce, almeno apparentemente, con l'attecchimento delle CSE e la capacità dei linfociti T effettori CD8<sup>+</sup> di riconoscere e aggredire le cellule tumorali, un dato indicativo della loro incapacità a mediare una completa paralisi del sistema immune, proprietà indispensabile per preservare la GvL [170]. In base a tali premesse, le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, grazie alla loro capacità di induzione del fenomeno dell'allotolleranza, potrebbero rappresentare una promettente alternativa terapeutica di natura immunomodulatoria all'uso di farmaci immunosoppressivi per il controllo della GvHD. La bassa percentuale, nell'uomo, di tali cellule all'interno della popolazione di cellule mononucleate, ne ha in realtà inizialmente limitato l'impiego nella modulazione della tolleranza post-trapianto, incentivando una serie di ricerche finalizzate al tentativo di superare i suddetti limiti quantitativi. In tale contesto si inserisce il nostro studio, volto da un lato ad indagare il ruolo delle cellule Treg nella patogenesi e nel controllo della GvHD post trapianto, dall'altro ad identificare un protocollo sperimentale ottimale per l'isolamento ed espansione *in vitro* di cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> funzionali, potenzialmente utilizzabili nel contesto di un TCSE allogenico per la modulazione della risposta alloreattiva. E' stata in primo luogo esaminata la possibilità di isolare cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediante l'impiego di una metodica di separazione magnetica basata sulla costitutiva espressione del CD25 sulla superficie delle cellule Treg, per l'arricchimento cellulare. Il presupposto per l'impiego di tale procedura è stato quello di sviluppare una strategia che assicurasse un efficiente e riproducibile sistema di isolamento delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> umane da prodotti di leucoferesi o placentari, con il minimo numero di reagenti e passaggi di selezione. E' stato impiegato un protocollo finale contraddistinto da un primo ciclo di deplezione dei componenti CD4<sup>-</sup>, indispensabile per evitare la presenza di contaminanti nel prodotto finale, rappresentati principalmente dai linfociti B e T effettori, caratteristicamente CD25<sup>+</sup> dopo attivazione antigenica, seguito da 2 cicli di selezione positiva per CD25. Attraverso i suddetti passaggi, è stato possibile isolare cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> umane sia dal sangue periferico di pazienti allotrapiantati e donatori sani che dal sangue placentare. Il prodotto finale è risultato caratterizzato da una purezza assoluta in tutti i casi esaminati; inoltre, la ripetuta selezione positiva per CD25 ha consentito di isolare preferenzialmente quelle cellule ad intensità elevata piuttosto che intermedia del suddetto antigene, risultando nella completa eliminazione dei componenti CD25<sup>-</sup>. Questo è stato realizzato senza sottoporre i campioni ad un ulteriore lavaggio o step di incubazione in presenza di biglie magnetiche, importante per evitare sia il prolungamento della procedura che la perdita di cellule. Le percentuali di resa sono apparse, partendo da campioni

quantitativamente equivalenti per la procedura di isolamento, assolutamente paragonabili in relazione alla fonte di derivazione cellulare.

Indipendentemente dalla tipologia di protocollo sperimentale, il problema principale correlato alle procedure di isolamento è in tal caso rappresentato dal numero esiguo di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolabili, conseguenza della bassa percentuale di tali componenti a livello ematico. Nel nostro studio, sono state ottenute post-isolamento dalle 0.24x10<sup>6</sup> alle 24x10<sup>6</sup> cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, una quantità del tutto insufficiente non solo per l'analisi delle loro proprietà funzionali *in vitro* ma soprattutto per il loro potenziale impiego nel contesto di una terapia adottiva finalizzata al controllo della GvHD. Per questo motivo, il passo successivo è stato quello di identificare un protocollo utile per l'espansione *ex-vivo* delle cellule isolate, tale da garantire quantità clinicamente rilevanti. Nel nostro sistema, è stato calcolato il più elevato tasso settimanale di espansione dopo esposizione delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ad anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 immobilizzati, in presenza di alte dosi di IL-2 (100U); al contrario, tali cellule sono apparse iporesponsive alla stimolazione in assenza di IL-2, o dei suddetti anticorpi da soli o in combinazione, mostrando invece una normale risposta alla stimolazione mediata da stimoli TCR-indipendenti, come la PHA. Questi risultati concordano non solo con quanto noto in letteratura relativamente alle caratteristiche di anergia della popolazione delle cellule Treg *in vitro*, ma anche con i dati riportati da studi precedenti o paralleli [171-172] che dimostrano la mancata responsività di tali cellule ai segnali mediati dal TCR, indipendentemente dalla presenza di costimolazione, e la forte dipendenza nei confronti dell'IL-2 per la loro crescita e sopravvivenza. La possibilità, infatti, di superare la condizione di iporesponsività attraverso l'aggiunta di alte dosi di IL-2, evidenzia come tale citochina sia necessaria a rompere lo stato anergico della popolazione T regolatoria dovuto probabilmente a un difetto nel segnale del TCR, conseguenza di una diminuzione nella mobilitazione del calcio, uno ione indispensabile per l'attivazione dei fattori di trascrizione che inducono la risposta cellulare [173]. Le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dal sangue placentare hanno manifestato, nel nostro sistema sperimentale, la più elevata responsività alla stimolazione *in vitro*. Questo dato, giustificato dall'elevato grado di immaturità delle cellule di cordone ombelicale, che le rende capaci di rispondere più rapidamente a fattori di natura proliferativa, diventa rilevante nella scelta della fonte di cellule Treg da impiegare per lo sviluppo di una terapia immunomodulatoria [174]. La maggiore responsività alla stimolazione garantisce, infatti, la possibilità di ottenere un numero quantitativamente più elevato di cellule nel minor tempo possibile, estendendo l'impiego dei componenti di origine placentare, dopo opportuna



manipolazione *ex-vivo*, anche a pazienti adulti, senza i limiti correlati alla quantità di cellule da infondere per kilogrammo di peso corporeo.

Una volta espanso, le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> policlonali ottenute sono state caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente allo scopo di validare la loro natura regolatoria. L'analisi immunofenotipica ha confermato la presenza, sia a livello superficiale che intracitoplasmatico, di una serie di marcatori caratteristicamente associati al sottotipo T linfoide delle cellule Treg naturali (nTreg), senza differenze in rapporto alla fonte di derivazione. Le cellule T regolatorie espanse *in vitro* sono inoltre risultate assolutamente paragonabili da un punto di vista fenotipico a quelle appena isolate, evidenziando la mancata influenza degli agenti stimolanti e della coltura *ex-vivo*, nella modulazione dell'espressione dei marcatori peculiari di questa popolazione. Sono, infatti, apparse uniformemente caratterizzate dall'espressione di elevati livelli di CD4, CD25, FOXP-3, CTLA-4 e CD62L, un dato indicativo non solo della loro potenziale attività regolatoria ma anche della mancata espansione nel nostro sistema sperimentale di contaminanti T linfoidi di natura effettrice. Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato l'importanza di FOXP-3 e del CTLA-4 nella regolazione dell'attività delle cellule nTreg. In particolare, il ruolo di FOXP-3 risulta evidente dall'esame delle conseguenze della presenza di mutazioni a carico del suo gene codificante in soggetti affetti dalla sindrome IPEX, caratterizzata dallo sviluppo di fenomeni autoimmuni e infiammatori cronici, causati appunto dalla mancanza di cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Allo stesso modo, è stato dimostrato *in vivo* che l'induzione del blocco del CTLA-4 esacerba la risposta immunologica, attraverso l'inibizione della soppressione mediata dalle nTreg, indispensabile per il normale ripristino dell'omeostasi. Tuttavia, in aggiunta alle molecole direttamente coinvolte nella mediazione delle funzioni delle nTreg, è risultata di grande interesse l'elevata positività per il CD62L osservata nella popolazione espansa. Il CD62L è una selectina indispensabile alla migrazione dei linfociti verso gli organi linfoidi secondari e i siti infiammatori, di conseguenza la sua presenza sulla superficie delle cellule T regolatorie espanse potrebbe garantirne la co-localizzazione con i componenti autoreattivi o alloreattivi in corso di GvHD. A tal proposito, è stata recentemente osservata, in un modello murino di allotrapianto, una correlazione tra l'elevata espressione del CD62L sulla superficie delle cellule T regolatorie, e una maggiore capacità di interferenza nei confronti dell'attivazione ed espansione degli effettori T cellulari coinvolti nel fenomeno della GvHD acuta [175]. Una spiegazione plausibile di tale fenomeno è rappresentata dalla necessità che il "priming" dei linfociti T convenzionali così come la loro inibizione avvenga in un sito che richiede l'interazione tra il CD62L e i suoi ligandi endoteliali. Le cellule nTreg CD62L<sup>+</sup> sarebbero

quindi in grado di spostarsi più efficientemente a livello degli organi linfoidi secondari, giungendo in prossimità dei linfociti alloreattivi e inibendone l'espansione in misura maggiore rispetto alla controparte CD62L<sup>-</sup>, dotata solo *in vitro*, dove il fenomeno dell'homing non è riproducibile, delle stesse capacità regolatorie della sottopopolazione CD62L<sup>+</sup>. La presenza di elevati livelli dei marcatori esaminati ci permette quindi di affermare non solo che le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espansse nel nostro sistema sperimentale presentano un fenotipo ad attività regolatoria, ma soprattutto che la loro espressione potrebbe associarsi a un'inibizione ottimizzata degli effetti della GvHD.

A questo punto, è stata esaminata la capacità delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espansse di inibire la risposta dei linfociti effettori autologhi stimolati da DC caricate con alloantigeni, generate *in vitro*, prima della co-coltura, da monociti in presenza di GM-CSF e IL-4. I risultati degli esperimenti di soppressione hanno rivelato una normale funzionalità, identificabile nell'abilità di inibizione della proliferazione dei linfociti T autologhi alloreattivi, delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> derivate da tutte le fonti in esame. Sono stati calcolati valori medi di inibizione del tasso proliferativo dalle 7 alle 12 volte, con valori massimi superiori alle 20 volte, traducibili in un'inibizione media superiore all'85% in tutti i casi esaminati. Questi dati, suffragati da una vasta serie di studi paralleli, implicano in primo luogo che la coltura e la stimolazione delle cellule nTreg *in vitro* non alterano il potenziale immunomodulatorio di tale popolazione, preservandone piuttosto l'attività, e che la soppressione può verificarsi attraverso una modalità, probabilmente non esclusiva, contatto-dipendente [176-178]. Un dato interessante è inoltre rappresentato dalla dimostrazione che le cellule nTreg presenti nel sangue placentare possono diventare, a dispetto della loro immaturità immunologica, dopo isolamento e opportuna stimolazione *in vitro*, una potente popolazione ad attività soppressoria. Tale caratteristica è in accordo con quanto osservato nel lavoro di Wayne R *et al.*, dove il sangue placentare si dimostra essere una fonte di cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> non solo più facilmente isolabili rispetto al sangue venoso periferico ma anche in grado di manifestare una soppressione della risposta alloreattiva nel corso di una reazione linfocitaria mista, superiore al 95% [179].

Diversi aspetti nel modello di soppressione impiegato nel nostro studio, appaiono utili a offrire alcune riflessioni sulla funzione delle cellule nTreg *in vivo*. La regolazione negativa dell'attività dei linfociti T effettori sembra richiedere, infatti, che la popolazione T regolatoria mediatrice sia esposta e presumibilmente attivata attraverso il TCR e, in particolare, secondo una modalità antigene specifica. Questo dato è confermato dall'impossibilità di osservare un effetto soppressorio quando le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono coltivate in presenza

dei target attivati ma in assenza delle APC, nonostante la precedente stimolazione, ai fini dell'espansione, con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28. Al contrario, la risposta della stessa cocoltura alla stimolazione effettuata mediante PHA, risulta efficacemente soppressa. Sebbene nel nostro sistema non sia stato possibile identificare la specificità delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a causa dell'impossibilità di separare le richieste per l'attivazione della popolazione T effettrice e quella T regolatoria, i dati sono consistenti con un modello secondo il quale le due popolazioni competono sulla superficie delle APC per l'antigene e i segnali costimolatori. Quest'osservazione è stata anche confermata dal lavoro di *Lombardi G et al.* [180] in cui la competizione sulla superficie delle APC rappresenta un meccanismo mediante il quale i cloni T anergici antigene-specifici inibiscono l'espansione dei cloni T normali. L'importanza delle DC nel controllo dell'attività soppressoria delle cellule nTreg è stata anche recentemente dimostrata grazie all'osservazione che il blocco delle molecole costimolatorie presenti sulla loro superficie riduce il loro numero e favorisce lo sviluppo di reazioni autoimmuni in topi diabetici non obesi [181]. Le DC sono inoltre in grado di produrre IL-2, un fattore indispensabile per la sopravvivenza ed espansione delle cellule nTreg.

Un dato rilevante osservato nel nostro sistema sperimentale è emerso dalla possibilità di correlare la capacità funzionale delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate dai pazienti allotrapiantati, alla presenza di GvHD al momento del loro isolamento. Le cellule T regolatorie derivate da pazienti con segni di GvHD hanno, infatti, manifestato, *in vitro*, una scarsa efficienza nella soppressione della proliferazione dei linfociti T convenzionali alloreattivi. Tale risultato potrebbe essere giustificato da due differenti osservazioni. La scarsa funzionalità di immunomodulazione negativa della risposta immune mediata dalle cellule nTreg prodotte nel ricevente di un allotrapianto in seguito all'infusione delle CSE, dovuta a un'inefficiente ricostituzione ematologica e immunologica post-trapianto o a un difettivo priming *in vivo* delle nTreg, potrebbe essere una concausa dei fenomeni associati alla GvHD rilevati nei pazienti studiati. Quindi, quanto osservato *in vitro* non sarebbe altro che una conseguenza dei difetti intrinseci della popolazione T regolatoria presente *in vivo*. In alternativa, l'esacerbarsi della GvHD nel decorso post-TCSE potrebbe aver indotto un'alterazione o un'inibizione irreversibile dei meccanismi di soppressione delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in origine perfettamente funzionali; in tal caso, il difetto funzionale registrato *in vitro* sarebbe il risultato degli effetti che la GvHD esercita *in vivo* sulle componenti del sistema immunitario. Naturalmente non è da escludere il verificarsi di una combinazione delle due situazioni sopradescritte. In ambo i casi, il paziente potrebbe trarre beneficio dall'infusione di cellule T

regolatorie isolate dal donatore delle CSE e manipolate *ex-vivo* prima dell'inoculo; quest'ultimo passaggio garantirebbe, infatti, il trasferimento adottivo di una popolazione funzionale potenzialmente in grado di sopperire non solo al deficit di attività ma anche al numero limitato di precursori antigene-specifici dei componenti T regolatori presenti *in vivo*, ipotizzando che l'espansione policlonale *ex-vivo* delle cellule nTreg aumenti anche la frequenza dei componenti alloreattivi. A tal proposito, un recente studio murino ha dimostrato l'efficacia delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse policlionalmente *ex-vivo*, di sopprimere la GvHD e favorire la sopravvivenza in un contesto completamente allogenico [144].

Per verificare la potenziale esistenza di meccanismi di soppressione contatto-indipendenti mediati dalle cellule nTreg, è stata valutata, nell'ultima fase del nostro studio, la capacità delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate ed espanse *ex-vivo*, di produrre e secernere citochine immunomodulatorie. La scelta è stata incentrata sull'IL-10, come conseguenza del suo coinvolgimento nei meccanismi di protezione dalla letalità della GvHD. Attraverso il nostro sistema sperimentale è stato possibile confermare, indipendentemente dalla fonte di derivazione, la normale funzionalità delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolate ed espanse *ex-vivo*, anche in termini di produzione di IL-10. Inoltre, come osservato in precedenza relativamente alla funzione soppressoria della risposta alloreattiva, anche la secrezione di IL-10, è apparsa inversamente correlata alla presenza di GvHD nei pazienti sottoposti a TCSE allogenico. L'importanza di quest'ultimo dato, emerge non solo da un recente studio preclinico nel quale i livelli ematici di IL-10 in pazienti sottoposti ad allotrapianto, sono risultati correlati allo sviluppo della GvHD acuta, ma anche dalla recente dimostrazione dell'influenza, sul decorso della GvHD, della presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) a carico dei geni codificanti citochine infiammatorie tra cui l'IL-10, l'IL-6 e il TNF- $\alpha$  [182-183]. Dal momento che il rilascio di IL-10 influenza e al tempo stesso è influenzato dalla risposta alloreattiva, il trasferimento adottivo di una popolazione di cellule T regolatorie manipolate *ex-vivo* e funzionali nella produzione di IL-10, potrebbe quindi favorire una protezione contatto-indipendente nei confronti della GvHD.

In conclusione, l'abilità di espandere cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in vitro* presenta molteplici implicazioni. In primo luogo, la popolazione espansa rappresenta una fonte cellulare numericamente ampia e manipolabile, potenzialmente indagabile molecularmente, biochimicamente e funzionalmente. In tal senso, la possibilità di identificare nuovi marcatori o meccanismi di soppressione, potrebbe ad esempio migliorare la nostra comprensione delle basi dell'immunoregolazione, sia *in vitro* che *in vivo*, garantendo un utilizzo razionale delle potenzialità di tali cellule. In secondo luogo, le cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> espanse

potrebbero attualmente essere considerate un approccio terapeutico realizzabile per una varietà di indicazioni cliniche, come l'immunoterapia adottiva per il controllo della severità della GvHD nel contesto dell'allogranto. In particolare, la possibilità di utilizzare il sangue placentare come fonte di una popolazione espandibile e funzionale di nTreg, data la pronta disponibilità alla richiesta, offrirebbe numerosi vantaggi per lo sviluppo di una terapia di soppressione del riconoscimento allogenico, suggerendo una possibile applicazione indipendentemente dai limiti imposti dalla scarsa percentuale dei suddetti componenti post-isolamento.

La scoperta di nuovi agenti in grado di prevenire o modulare le risposte allo- e auto-reattive è considerata un passaggio obbligato per lo sviluppo di nuovi protocolli tollerogenici. Di conseguenza, un progetto immunoterapico basato sull'utilizzo delle cellule nTreg espanse *ex-vivo* in condizioni di Good Manufacturing Practice (GMP), potrebbe tradursi in un rilevante beneficio clinico, riducendo il fabbisogno della terapia convenzionale immunosoppressiva nel TCSE allogenico.

## 5. REFERENZE

1. Holland AM, Stanley EG. Stems cells and the price of immortality. *Stem Cell Research* 2009; 2:26-28
2. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 2002; 197:430-440
3. Lorenz E, Congdon C, Uphoff D. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology* 1952; 58:863-877
4. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogenic hematopoietic stem cell trasplantation. *Ann Rev Immunol* 2007; 25:139-158
5. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of haematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Ann Rev Immunol* 2003; 21:759-806
6. Maury S, Mary JY, Rabian C, Schwarzingner M, Toubert A, Scieux C, Carmagnat M, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Guardiola P, Vexiau P, Charron D, Gluckman E, Socié G. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cells transplantation: risk factors and complications in adulte patients. *Br J Haematol* 2001; 115:630-641
7. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373:1550-1561
8. Yunis EJ, Zuniga J, Romero V. Chimerism and tetragametic chimerism in humans: implications in autoimmunity, allorecognition and tolerance. *Immunol Research* 2007; 38:213-236
9. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. CD34+ or CD34-: which is the more primitive? *Leukemia* 2002; 16:1603-1608
10. Lisbeth A, Welniak, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Rev Immunol* 2007; 25:139-170
11. Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell trasplantation: Histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:155-170
12. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 1992; 148:249-258
13. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999; 167:257-274

14. Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Maiers M, Kollman C, Noreen HJ. The HLA Dictionary 2001: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens, *Eur J Immunogenet* 2001; 28:565-596
15. Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 Suppl 2:S71-76
16. Hahn T, McCarthy PL Jr, Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, Gale RP, Hale GA, Horan J, Isola L, Maziarz RT, van Rood JJ, Gupta V, Halter J, Reddy V, Tiberghien P, Litzow M, Anasetti C, Pavletic S, Ringdén O. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol* 2008; 26:5728-5734
17. Kang Y, Chao NJ, Aversa F. Unmanipulated or CD34 selected haplotype mismatched transplants. *Curr Opin Hematol* 2008; 15:561-567
18. Aversa F, Martelli MF. Transplantation of haploidentically mismatched stem cells for the treatment of malignant diseases. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26:155-168
19. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:171-187
20. Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ. Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA. *Nature* 1977; 266:544-545
21. Dickinson AM. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:189-207
22. Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 15:162-168
23. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008; 112:4371-4383
24. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002; 100:406-414
25. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, Liu Y, Kandeel F, Forman S, Strober S, Zeng D. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestation. *Blood* 2006; 107:2993-3001

26. Mineo D, Ricordi C, Xu X, Pileggi A, Garcia-Morales R, Khan A, Baidal DA, Han D, Monroy K, Miller J, Pugliese A, Froud T, Inverardi L, Kenyon NS, Alejandro R. Combined islet and hematopoietic stem cell allotransplantation: a clinical pilot trial to induce chimerism and graft tolerance. *Am J Transplant* 2008; 8:1262-1274
27. Bonnet D. Hematopoietic stem cells. *Birth Def Res (Part C)* 2003; 69:219-229
28. Andrews RE, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of CD33 and CD34 antigen and light scatter. *J Exp Med* 1989; 169:1721-1731
29. Civin CI, Strauss LC, Browall C. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody against KG-1a cells. *J Immunol* 1985; 133:157-164
30. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998; 4:1038-1044
31. Vogel W, Scheduling S, Kanz L, Brugger W. Clinical Applications of CD34+ Peripheral Blood Progenitor Cells (PBPC). *Stem cells* 2000; 18:87-92
32. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:265-280
33. Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, Sureda A, Caballero D, Canizo C, Brunet S, Altes A, Vazquez L, Sierra J, Miguel JF. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102:1108-1113
34. Todd G, Hang JS, Brown R, DiPersio JF. The effects of G-CSF mobilization on lymphocyte subsets, monocytes, NK cells, RBCs, platelets and CD34+/LIN-progenitors in normal allogeneic PBSC donors. *Blood* 2001; 88:679a
35. Hassan HT, Stockschrader M, Schleimer B, Kruger W, Zander AR. Comparison of the content and subpopulation of CD3 and CD34 positive cells in bone marrow harvests and G-CSF-mobilized peripheral blood leukapheresis products from healthy adult donors. *Transpl Immunol* 1996; 4:319-323
36. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (Cord blood Transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:354-371.
37. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002; 30:973-981



38. Larochelle A, Krouse A, Metzger M. Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood* 2006; 107:3772-3778
39. Martínez C, Urbano-Ispizua A, Marín P. Efficacy and toxicity of high dose G-CSF schedule for peripheral blood progenitor cell mobilization in healthy donors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1273-1278
40. Brunstein GC, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2007; 137:20-35
41. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:257-260
42. Ballen KB. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2005; 105:3786-3792
43. Goldstein G, Toren A, Nagler A. Human Umbilical Cord Blood Biology, Transplantation and Plasticity. *Curr Med Chem* 2006; 13:1249-1259
44. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host-disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979; 300:1068-1073
45. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, Pérez-Oteiza J, Ferrá C, Zuazu J, Caballero D, Carvalhais A, Díez JL, Espigado I, Martínez C, Campilho F, Sanz MA, Sierra J, García-Conde J, Montserrat E. The number of donor CD3+ cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood* 2001; 97:383-387
46. Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Ann Rev Med* 2006; 57:403-417
47. de Lima M, Shpall E. Strategies for widening the use of cord blood in hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91:584-587
48. Brunstein CG, Laughlin MJ. Extending cord blood transplant to adults: dealing with problems and results overall. *Semin Hematol* 2010; 47:86-96
49. Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38:83-93
50. Tse W, Laughlin MJ. Umbilical Cord Blood Transplantation: A New Alternative Option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:377-383

51. Mills KC, Gross TG, Varney ML, Heimann DG, Kessinger A. Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2001; 18:53-61
52. Rubinstein P. Why Cord Blood? *Human Immunol* 2006; 67:398-404
53. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39:11-23
54. Aschan J. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Conditioning. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:295-310
55. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956; 2:626-627
56. Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft-versus-tumor, and graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15:765-776
57. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75:555-562
58. Kolb HJ, Simoes B, Schmid C. Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies. *Current Opin Oncol* 2004; 16:167-173
59. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:329-348
60. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 Suppl 1:S53-57
61. Loren AW, Porter DL. Donor leukocyte infusions after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:107-114
62. Kolb HJ, Schmid C, Chen X, Woiciechowski A, Roskrow M, Weber M, Guenther W, Ledderose G, Schleuning M. Adoptive immunotherapy in chimeras with donor lymphocytes. *Acta Haematol* 2003; 110:110-120
63. Drobyski WR, Majewski D. Donor  $\gamma\delta$  T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* 1997; 89:1100-1109
64. Graubert TA, Russell JH, Ley TJ. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996; 87:1232-1237
65. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 1996; 14:473-489

66. Chakraverty R, Côté D, Buchli J, Cotter P, Hsu R, Zhao G, Sachs T, Pitsillides CM, Bronson R, Means T, Lin C, Sykes M. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med* 2006; 203:2021-2031
67. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285:412-415
68. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004; 10:987-992
69. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 2000; 105:1289-1298
70. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, Ordemann R, Clouthier SG, Lowler K, Liu C, Gerard C, Cooke KR, Ferrara JL. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol* 2003; 31:897-902
71. Foster AE, Marangolo M, Sartor MM, Alexander SI, Hu M, Bradstock KF, Gottlieb DJ. Human CD62L-memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood* 2004; 104:2403-2409
72. Iori AP, Torelli GF, De Propriis MS, Milano F, Pupella S, Gozzer M, Mancini F, Milani ML, Intoppa S, Cerretti R, Lucarelli B, Valle V, Malandruccolo L, Iannella E, Arleo E, Guarini A, Foà R. B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 2008; 85:386-390
73. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13:108-116
74. Kolb HJ, Schmidt C, Barret AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukaemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103:767-776
75. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 Suppl 2:S324-335
76. Mastaglio S, Stanghellini MT, Bordignon C, Bondanza A, Ciceri F, Bonini C. Progress and prospects: graft-versus-host disease. *Gene Ther* 2010; May 27 [Epub ahead of print]
77. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100

78. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40:84-90
79. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2006; 203:1851-1858
80. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000; 13:829-840
81. Aluvihare VR, Betz AG. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol Rev* 2006; 212:330-343
82. Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:644-649.
83. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 2007; 317:627-630
84. Rouse BT. Regulatory T cells in health and disease. *J Int Med* 2007; 262:78-95.
85. Nielsen J, Lindebo Holm T, Claesson MH. CD4+CD25+ Regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* 2004; 112:642-650
86. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:139-176
87. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2:301-306
88. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162:5317-5326
89. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati, Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:6216-6221
90. Sakaguchi S. Policing the regulators. *Nat Immunol* 2001; 2:283-284
91. Taams LS, Vukamanovic-Stejjic M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Salmon M, Akbar AN. Antigen-specific cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32:1621-1630

92. Salomon B, Lenschow J, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharp A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12:431-440
93. Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389-400
94. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3+ regulatory T cells: current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006; 36:2832-2836
95. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-142
96. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:4100-4110
97. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:762-774
98. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; 197:403-411
99. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299:1033-1036
100. Daglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204:1257-1265
101. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 1994; 153:3764-3774
102. Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, Wilkinson E. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol* 1996; 26:161-165
103. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:209-226
104. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 8:91-97

105. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 2008; 322:271-275
106. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-336
107. Ramsdell F. Foxp3 and Natural Regulatory T cells: Key to a Cell Lineage? *Immunity* 2003; 19:165-168
108. Jiang, H. and Chess, L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354:1166-1176
109. Le Bras S, Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116:1473-1475
110. Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. The interaction of dendritic cells with antigen-specific regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Sem Immunol* 2006; 18:93-102
111. Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 2004; 103:2187-2195
112. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 2004; 16:1769-1778
113. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287-296
114. Bayer AL, Yu A, Adeegbe D, Malek TR. Essential role for interleukin-2 for CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med* 2005; 201:769-777
115. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 2003; 198:737-746
116. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med* 2003; 198:1527-1537
117. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198:235-247

118. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig, MCSteinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002; 196:1627-1638
119. D'Ambrosio D, Sinigaglia F, Adorini L. Special attraction for suppressor T cells. *Trends Immunol* 2003; 24:122-126
120. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164
121. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:199-210
122. Green EA, Choi Y, Flavell RA. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 2002; 16:183-191
123. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-562
124. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061
125. Paust S, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:10398-10403
126. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21:503-513
127. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168:1080-1086
128. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M. Cutting edge: TGF- $\beta$  signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004; 173:6526-6531
129. Ostroukhova M, Qi Z, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Ray P, Ray A. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF- $\beta$ . *J Clin Invest* 2006; 116:996-1004

130. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:1142-1151
131. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, Frank DA, Ritz J. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006; 108:1571-1579
132. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174:1783-1786
133. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:338-344
134. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; 199:303-313
135. Thornton AM. Signal transduction CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. CD25 and IL2. *Front Biosci* 2006; 11:921-927
136. Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, Shimizu J, Nomura T, Chiba T, Sakaguchi S. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 202:885-891
137. Shevach EM, Stephens GL. The GITR–GITRL interaction: co-stimulation or contra-suppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 2006; 6:613-618
138. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R  $\alpha$  chain controls lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115:313-325
139. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6:353-360
140. Kang SM, Tang Q, Bluestone JA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in transplantation: progress, challenger and prospects. *Am J Transplant* 2007; 7:1457-1463
141. Joffre O, van Meerwijk JPM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocyte in bone marrow transplantation. *Sem Immunol* 2006; 18:128-135



142. Modigliani Y, Thomas-Vaslin V, Bandeira A, Coltey M, Le Douarin NM, Coutinho A, Salaün J. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:7555-7559
143. Nguyen VH, Zeiser R, Negrin RS. Role of Naturally Arising Regulatory T cells in Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:995-1009
144. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favour immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003; 112:1688-1696
145. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4+CD25+ Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. *J Exp Med* 2001; 193:1311-1318
146. Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL. CD25+ immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:525-535
147. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99:3493-3499
148. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GvHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Immunobiology* 2006; 108:1291-1297
149. Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, Begum G, Mahendra P, Craddock C, Moss P, Chakraverty R. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004; 103:2410-2416
150. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J. Reduced frequency of FOXP3 CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 2005; 106:2903-2911
151. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, Negrin RS, Fathman CG, Strober S. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005; 105:2220-2226

152. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, Blazar BR, Serody JS. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106:3300-3307
153. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008; 14:88-92
154. Wing K, Larsson P, Sandstrom K, Lundin SB, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology* 2005; 115:516-525
155. Fisson S, Djelti F, Trenado A, Billiard F, Liblau R, Klatzmann D, Cohen JL, Salomon BL. Therapeutic potential of antigen specific CD4+CD25+ regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol* 2006; 36:817-827
156. Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, Lucas PJ, Gress RE, Levine BL, June CH, Serody JS, Blazar BR. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004; 104:3804-3812
157. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)/CD25(+) Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. *J Exp Med* 2002; 196:401-406
158. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)/CD25(+) Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med* 2002; 196:389-399
159. Blazar BR, Lees CJ, Martin PJ, Noelle RJ, Kwon B, Murphy W, Taylor PA. Host T cell resist graft-versus-host disease mediated by donor lymphocytes infusions. *J Immunol* 2000; 165:4901-4909
160. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25+CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002; 106:190-199
161. Li L, Godfrey WR, Porter SB, Ge Y, June CH, Blazar BR, Boussiotis VA. CD4+CD25+ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy. *Blood* 2005; 106:3068-3073
162. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FOXP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005; 105:750-758

163. Porter SB, Liu B, Rogosheske J, Levine BL, June CH, Kohl VK, Wagner JE, Miller JS, Blazar BR. Suppressor function of umbilical cord blood-derived CD4+CD25+ T-regulatory cells exposed to graft-versus-host disease drugs. *Transplantation* 2006; 82:23-29
164. Randolph DA, Fathman CG. CD4+CD25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 2006; 57:381-402
165. Maggio R, Peragine N, Calabrese E, De Propris MS, Intoppa S, Della Starza I, Ariola C, Vitale A, Foà R, Guarini A. Generation of functional dendritic cells (DC) in adult acute lymphoblastic leukemia: Rationale for a DC-based vaccination program for patients in complete hematological remission. *Leuk Lymphoma* 2007; 48:302-310
166. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cell preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003; 9:1144-1150
167. Vogtenhuber C, Bucher C, Highfill SL, Koch LK, Goren E, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, Farrar MA, Blazar BR. Constitutively active Stat5b in CD4+ T-cells inhibits graft-versus-host disease (GVHD) lethality associated with increased regulatory T-cell (Treg) potency and decreased T effector cell (Teff) responses. *Blood* 2010; May 4 [Epub ahead of print]
168. Paczesny S, Choi SW, Ferrara JL. Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies. *Curr Opin Hematol* 2009; 16:427-436
169. Dutt S, Tseng D, Ermann J, George TI, Liu YP, Davis CR, Fathman CG, Strober S. Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease. *J Immunol* 2007; 179:6547-6554
170. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E, Edinger M. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:267-274
171. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212:60-73
172. Giorgini A, Noble A. Blockade of chronic graft-versus-host disease by alloantigen-induced CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in nonlymphopenic hosts. *J Leukoc Biol* 2007; 82:1053-1061
173. Knoechel B, Lohr J, Zhu S, Wong L, Hu D, Ausubel L, Abbas AK. Functional and Molecular Comparison of Anergic and Regulatory T Lymphocytes. *J Immunol* 2006; 176:6473-6483

174. Escalón MP, Komanduri KV. Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:122-129
175. Feng G, Wood k. Regulatory T cells – an emerging role in transplantation. *Yonsei Med J* 2004; 45:968-977
176. Singh RK, Varney ML, Leutzinger C, Vose JM, Bierman PJ, Buyukberber S, Ino K, Loh K, Nichols C, Inwards D, Rifkin R, Talmadge JE. Immune reconstitution after autologous hematopoietic transplantation with Lin-, CD34+, Thy-1lo selected or intact stem cell products. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:1033-1043
177. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 2010; 107:57-117
178. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S116-123
179. Nakamura S, Suzuki M, Sugimoto A, Tsuji-Takayama K, Yamamoto M, Otani T, Inoue T, Harashima A, Okochi A, Motoda R, Yamasaki F, Orita K, Kibata M. IL-2-independent generation of FOXP3(+)CD4(+)CD8(+)CD25(+) cytotoxic regulatory T cell lines from human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2007; 35:287-296
180. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994; 264:1587-1589
181. Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Dermatol Sci* 2009; 54:69-75
182. Loeffler J, Ok M, Morton OC, Mezger M, Einsele H. Genetic Polymorphisms in the Cytokine and Chemokine System: Their Possible Importance in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; Apr 14 [Epub ahead of print]
183. Resende RG, Correia-Silva JD, Araújo TC, Silva TA, Abreu MH, Bittencourt H, Gomez RS. Investigation of Functional IL-10 Gene Polymorphism and IL-10 Levels in Acute Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Immunol* 2010; 30:465-473