



Università degli studi di Roma “Sapienza”
Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia
Sezione di Ematologia
Dottorato di Ricerca in Scienze Ematologiche – XXI ciclo

TESI

**Valutazione del profilo di espressione genica nello
studio della leucemia linfatica cronica**

Relatore
Dott.ssa Sabina Chiaretti

Dottoranda
Dott.ssa Simona Tavolaro

Coordinatore
Prof. Robin Foà

Anno Accademico 2008-2009

INDICE

CAPITOLO 1: La Leucemia Linfatica Cronica

1.1. Introduzione	5
1.2. Meccanismi patogenetici	6
1.3. Criteri diagnostici	8
1.4. Fattori prognostici	15
1.5. Cenni di terapia	25

CAPITOLO 2: I microarrays

2.1. Metodica dei microarrays	29
2.2. Ruolo dei microarrays nello studio della LLC	34

CAPITOLO 3: STUDIO 1 - Analisi genomica di cellule di leucemia linfatica cronica stimulate con immunoglobuline anti-IgM e anti-IgD -

3.1. INTRODUZIONE	41
3.1.1. Maturazione dei linfociti B e ruolo fisiologico del BCR	41
3.1.2. Signaling del BCR nella LLC	43
3.2. SCOPO DELLO STUDIO	47
3.3. RISULTATI	49
3.3.1. Analisi del profilo di espressione genica delle cellule di LLC in seguito a stimolazione delle IgM	49
3.3.2. Identificazione dei geni modulati in seguito a cross-linking del BCR nelle cellule di LLC	52
3.3.3. Analisi del profilo di espressione genica associato alla stimolazione	

del BCR in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV nella LLC	53
3.3.4. Correlazione tra la stimolazione del BCR e alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della LLC	59
3.3.5. Valutazione dell'espressione di <i>SYK</i> e <i>ZAP-70</i> tramite RT-Q-PCR in seguito a stimolazione del BCR	60
3.3.6. Analisi del profilo di espressione genica delle cellule di LLC in seguito a stimolazione delle IgD	62
3.3.7. Identificazione dei geni modulati in seguito a cross-linking delle IgD nelle cellule di LLC	65
3.3.8. Analisi del profilo di espressione genica associato alla stimolazione delle IgD in relazione ad alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della LLC	68
3.3.9. Confronto tra l'effetto della stimolazione delle IgM e l'effetto della stimolazione delle IgD sull'espressione genica delle cellule di LLC	71
3.4. DISCUSSIONE	73

CAPITOLO 4: STUDIO 2 - Valutazione del profilo di espressione genica associato alle protein chinasi nella leucemia linfatica cronica -

4.1. INTRODUZIONE	81
4.1.1. Ruolo fisiologico delle protein chinasi	81
4.1.2. Meccanismi di deregolazione delle protein chinasi nelle neoplasie ematologiche	83
4.2. SCOPO DELLO STUDIO	88
4.3. RISULTATI	90
4.3.1. Caratteristiche dei pazienti	90

4.3.2. Analisi del profilo di espressione genica delle PK in diverse neoplasie linfoidi	92
4.3.3. Identificazione di un gruppo di geni codificanti PK più altamente espressi nella LLC	94
4.3.4. Validazione dei risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica delle PK nella LLC	98
4.3.5. Analisi del profilo di espressione genica associato alle PK in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV nella LLC	99
4.3.6. Analisi del profilo di espressione genica associato alle PK in relazione all'espressione del CD38 e di ZAP-70 nella LLC	101
4.3.7. Convalida dei risultati di espressione genica mediante RT-Q-PCR	103
4.4. DISCUSSIONE	107
CAPITOLO 5: Materiali e Metodi	
5.1. Estrazione dell'RNA	113
5.2. Oligonucleotide microarrays	114
5.3. Metodi statistici per le analisi dei microarrays	115
5.4. RT-Q-PCR e analisi dei risultati	116
BIBLIOGRAFIA	118

CAPITOLO 1

La Leucemia Linfatica Cronica

1.1. Introduzione

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è una neoplasia ematologica caratterizzata dall'espansione clonale e dall'accumulo di linfociti B maturi nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfoidei secondari (linfonodi e milza) (1).

La LLC è la leucemia dell'adulto più diffusa nei Paesi occidentali, dove rappresenta circa il 25-30% di tutte le leucemie (2). L'indice di incidenza varia da 2 a 6 nuovi casi ogni 100000 individui per anno ed aumenta con l'età (3).

L'età mediana dei pazienti alla diagnosi è di 65 anni (4) anche se, recentemente, è stato riportato un incremento dell'incidenza della LLC tra gli individui "giovani", con circa 1/3 dei nuovi casi diagnosticati prima dei 55 anni di età (5). Alla luce di una più frequente esecuzione dei controlli emocromocitometrici nella popolazione, questo fenomeno è probabilmente dovuto al progressivo aumento, nel corso degli anni, della proporzione di casi di LLC diagnosticati in una fase asintomatica.

La LLC colpisce più comunemente gli individui di sesso maschile, in un rapporto di 2:1 rispetto alle femmine (4).

Per quanto riguarda l'eziologia della malattia, finora non sono stati individuati fattori ambientali, quali radiazioni ionizzanti o altri agenti fisici e chimici, che rappresentino un fattore di rischio per lo sviluppo della LLC (4); al contrario, diverse osservazioni rilevano una predisposizione genetica e familiare alla patologia. La LLC è, infatti, estremamente frequente negli individui di razza bianca, mentre è rara in Cina e Corea e virtualmente assente in Giappone (6, 7). Secondariamente, evidenze epidemiologiche indicano che nel 5-10% dei casi c'è una suscettibilità familiare alla LLC e ad altre sindromi linfoproliferative, con due o più

individui affetti nella stessa famiglia (8). Tale predisposizione familiare è inoltre accompagnata dal cosiddetto fenomeno di anticipazione (9), ovvero un esordio più precoce ed un decorso più severo della malattia nella progenie dei pazienti affetti da LLC.

Dal punto di vista clinico, molecolare e biologico, i casi di LLC familiare sono indistinguibili da quelli di LLC sporadica.

1.2. Meccanismi patogenetici

Nonostante la rilevanza rivestita dai fattori ereditari nello sviluppo della LLC, attualmente non sono ancora state individuate le cause implicate nell'insorgenza di tale neoplasia. Ciononostante, nell'ambito di vari studi sono emersi diversi potenziali meccanismi patogenetici coinvolti nella progressione della malattia.

In passato, si riteneva che la maggior parte dei linfociti B leucemici fossero cellule arrestate in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare, scarsamente proliferanti e con prolungata sopravvivenza in circolo (1).

Sulla base di queste osservazioni, la LLC è stata descritta per diversi anni come una patologia dell'accumulo, considerando il difetto del meccanismo apoptotico come una delle principali cause della patologia (10, 11).

Tra i fattori di inibizione dell'apoptosi da parte del clone leucemico, indipendentemente dalla presenza di rare traslocazioni come la $t(14;18)(q32;q21)$, nelle cellule di LLC è stata riportata una overespressione della proteina bcl-2 rispetto a cellule B CD19+ purificate da donatori sani (12). A tale riguardo, nella LLC è stata recentemente evidenziata una correlazione inversa tra l'aumento dei livelli di espressione di bcl-2 e la down-modulazione di miR-15 e miR-16 (13), due microRNA localizzati nella regione cromosomica 13q14.3, frequentemente deleta nella LLC (14). Analizzando l'omologia di sequenza tra il miR-15 e il miR-16 e l'mRNA di *BCL-2* è stato infatti dimostrato che il gene *BCL-2* viene represso post-

trascrizionalmente dai suddetti miR, suggerendo un possibile ruolo patogenetico da parte di queste molecole nella malattia (13, 14).

In modo analogo, l'espressione del prodotto dell'oncogene *TCL1* viene regolata dal miR-29 e dal miR-181 (15); in modelli murini transgenici, i cui linfociti B overesprimono *TCL1*, è stato possibile documentare un fenotipo simile a quello di una LLC umana più aggressiva o resistente al trattamento (16).

Anche la presenza di alcune lesioni citogenetiche nelle cellule di LLC è stata messa in relazione con alterazioni del meccanismo apoptotico. Esempi in tal senso sono rappresentati dalla delezione coinvolgente la regione cromosomica 11q22-23 (del11q22-q23), dove risiede il gene mutato nell'ataxia-telangiectasia (*ATM*), e dalla delezione coinvolgente la regione cromosomica 17p13 (del17p13), dove è localizzato il gene *TP53* (17); infatti, sia ATM che p53 sono proteine attivate in seguito ad un danno indotto al DNA e coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale che regolano la morte cellulare programmata e la sopravvivenza.

Attualmente, nuove acquisizioni biologiche stanno dimostrando che la LLC non può essere considerata esclusivamente una patologia dell'accumulo. Infatti, la LLC non è più vista come una malattia statica, bensì come un processo dinamico sostenuto sia da cellule che vanno in apoptosi che da cellule proliferanti, come riportato anche da saggi di misurazione *in vivo* della cinetica cellulare (18).

A supporto di ciò, un'accurata revisione morfologica e immunofenotipica ha evidenziato che il clone leucemico non è uniforme in grandezza e struttura ed è spesso composto da cellule metabolicamente attive (19). Inoltre, nei linfonodi e, in maniera minore, nel midollo osseo dei pazienti affetti da LLC sono stati identificati aggregati di cellule leucemiche più grandi, esprimenti marcatori del ciclo cellulare, come il Ki-67 e la ciclina D1, e la molecola anti-apoptotica survivina (20, 21). Tali aree, denominate come pseudofollicoli o centri di proliferazione (22), rappresentano un "compartimento proliferante", che rifornisce in modo

continuo un “compartimento di accumulo” (21): un disequilibrio tra proliferazione e morte cellulare, causato da un aumento della proliferazione, da una diminuzione della morte, o dalla combinazione dei due fenomeni, può produrre un accumulo dei linfociti B anormali. Questa interazione dinamica che si verifica negli pseudofollicoli controlla la taglia del clone leucemico e l’evoluzione clinica della malattia (23).

Alla luce di tali osservazioni, una questione ancora irrisolta è se la regolazione di questo meccanismo dipenda esclusivamente da caratteristiche intrinseche della LLC o dall’influenza di fattori derivanti dal microambiente. Infatti, se l’inibizione dell’apoptosi può avvenire con le modalità precedentemente descritte, recentemente è sempre più evidente come la proliferazione del clone leucemico sia mantenuta dalla stimolazione antigenica del BCR (recettore delle cellule B) o da citochine secrete dalle cellule accessorie.

1.3. Criteri diagnostici

La diagnosi di LLC è basata su un insieme di caratteristiche che includono manifestazioni cliniche, morfologia cellulare ed immunofenotipo.

Il primo parametro utilizzato per l’inquadramento diagnostico viene valutato mediante l’emocromo e, in accordo con i criteri stabiliti dal National Cancer Institute-Working group (NCI-WG), è rappresentato dall’accumulo di linfociti B clonali ($>5 \times 10^9/L$) (24).

A tale proposito, ci sono tuttavia due condizioni che vanno comunque tenute in considerazione laddove la conta linfocitaria risulti normale. La prima è il caso del linfoma a piccoli linfociti (SLL), in cui la patologia resta confinata nei tessuti linfoidi e/o nel midollo osseo, con infiltrati indistinguibili da quelli della LLC ma senza linfocitosi. La seconda è il caso della linfocitosi B monoclonale (MBL), una situazione in cui è possibile individuare in una certa percentuale di soggetti sani, con una normale conta linfocitaria, un clone di cellule B monoclonali con fenotipo tipico della LLC (25, 26). In vista della frequenza relativamente alta

(più del 4%) di tale condizione nella popolazione normale in confronto al numero relativamente ridotto di individui affetti da LLC, il rischio di sviluppare una malattia conclamata in questi soggetti resta ancora da determinare; studi longitudinali saranno infatti necessari per determinare se la MBL è lo stadio precursore della LLC, in maniera analoga a quanto avviene nelle gammopatie monoclonali di significato sconosciuto (MGUS) in relazione al mieloma (27).

Per distinguere la LLC dagli altri disordini linfoproliferativi è di primaria importanza lo studio della morfologia cellulare, tramite l'esame dello striscio di sangue periferico.

I criteri morfologici attualmente adottati sono stati raccomandati dalla classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica) e permettono di distinguere due varianti morfologiche di LLC (19, 28, 29):

1) la LLC a morfologia "tipica". Rappresenta l'80% dei casi ed è quindi la forma morfologica più comune di LLC. In questa variante, la maggior parte dei linfociti sono di piccola o media dimensione con cromatina condensata e alto rapporto nucleo-citoplasma; generalmente mancano nucleoli prominenti (Figura 1A). Una caratteristica peculiare della LLC è la fragilità della membrana cellulare che spesso può provocare la rottura dei blasti leucemici durante la preparazione dello striscio, generando le cosiddette "ombre di Gumprecht", tipiche di questa patologia. In alcuni casi è possibile riscontrare anche una piccola proporzione di cellule di dimensioni maggiori aventi caratteristiche prolinfocitoidi, ma questa quota non supera generalmente il 10% del totale delle cellule (19).

2) la LLC a morfologia "atipica". Questa variante rappresenta circa il 15% dei casi di LLC e comprende, a sua volta, due sottotipi (19, 28):

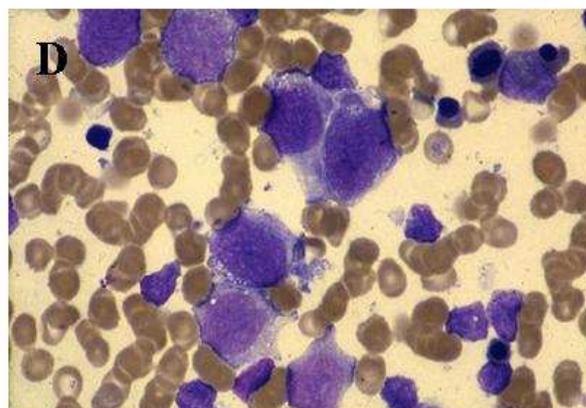
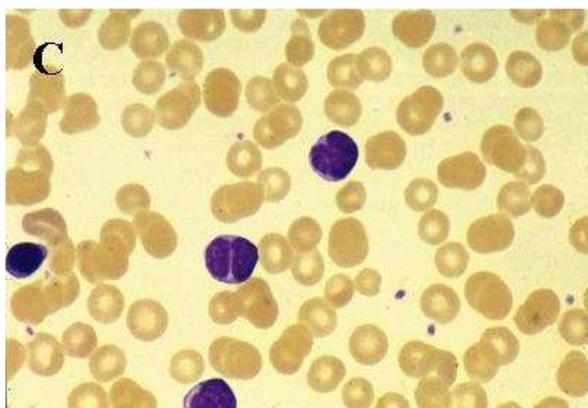
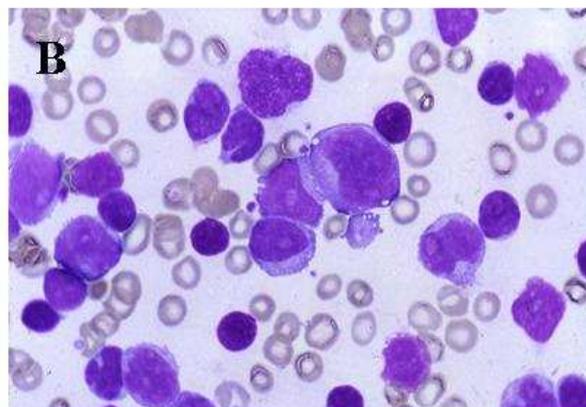
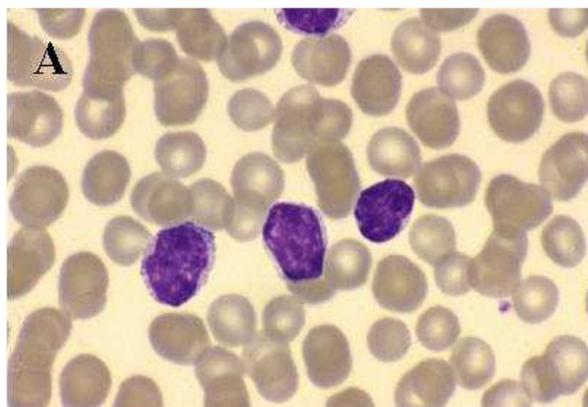
i) la LLC/prolinfocitica (LLC/PL), caratterizzata dalla presenza di una percentuale compresa tra il 10% e il 55% di cellule di dimensione più grande e nucleolate,

chiamate prolinfociti (Figura 1B). Questo tipo cellulare è distintivo di un'altra patologia, denominata leucemia prolinfocitica a cellule B (B-PLL). In effetti, la LLC/PL può essere considerata come una variante della LLC in cui la malattia spesso si presenta in maniera più aggressiva rispetto alla forma tipica e con caratteristiche intermedie tra la LLC e la B-PLL.

ii) la LLC a cellularità mista, in cui le cellule tipiche della LLC sono frammiste a più di un 15% di cellule che presentano citoplasma più abbondante e spesso basofilo (elementi linfoplasmacitoidi) e/o cellule con irregolarità nucleari (elementi a nucleo clivato) (Figura 1C).

Molto raramente, l'esame morfologico può mostrare la presenza di un numero variabile di blasti di grandi dimensioni con cromatina reticolare, diversi nucleoli e citoplasma basofilo; questo tipo cellulare spesso si ritrova insieme a piccoli linfociti di LLC (Figura 1D). Questa situazione può essere indicativa di una trasformazione in linfoma a grandi cellule B, chiamata sindrome di Richter. Sebbene la sindrome di Richter a livello morfologico non sia assimilabile alla LLC, fenotipicamente mostra delle caratteristiche simili, rendendo lo screening immunologico importante per una corretta diagnosi; in questi casi, inoltre, viene richiesto l'esame istologico del linfonodo per confermare la trasformazione.

Figura 1. (A) Colorazione May-Grumwald-Giemsa su sangue periferico di un caso di LLC tipica che mostra linfociti di piccola/media grandezza con cromatina condensata e scarso citoplasma; (B) colorazione May-Grumwald-Giemsa su sangue periferico di un caso di LLC con aumento dei prolinfociti (LLC/PL) che mostra un insieme di piccoli linfociti e prolinfociti; (C) colorazione May-Grumwald-Giemsa su sangue periferico di un caso di LLC atipica che mostra piccoli linfociti con nucleo clivato; (D) colorazione May-Grumwald-Giemsa su midollo osseo di un caso di LLC con sindrome di Richter che mostra grandi immunoblasti con cromatina reticolare e citoplasma basofilo; è presente anche un piccolo residuo di linfociti.



L'analisi immunofenotipica, effettuata mediante citofluorimetria, è una metodologia particolarmente attendibile per confermare la diagnosi di LLC raggiunta con l'esame morfologico e per escludere altri disordini linfoproliferativi.

Secondo i criteri stabiliti dal NCI-WG (24), l'immunofenotipo tipico della LLC è caratterizzato da (30, 31):

- coespressione degli antigeni di superficie CD19, CD5 e CD23;
- restrizione della catena leggera;
- bassa espressione delle immunoglobuline di superficie (sIg) e assenza o bassa espressione del CD79b.

Sulla base di questi parametri, le cellule di LLC esprimono i marcatori immunologici distintivi di un linfocita B maturo attivato.

Considerando gli antigeni di superficie specifici di una cellula B matura, una caratteristica peculiare della LLC, oltre all'espressione del CD19, è la bassa intensità del CD20, la quale è significativamente più bassa rispetto alle altre sindromi linfoproliferative (32). Sebbene a livello diagnostico non sia strettamente necessaria, la valutazione dell'espressione di questo antigene viene comunque inserita nel pannello citofluorimetrico dei marcatori della LLC dal momento che esiste un anticorpo monoclonale anti-CD20 già utilizzato nella pratica clinica.

Nell'ambito dell'analisi immunofenotipica, l'FMC7, un epitopo del CD20, può risultare particolarmente utile per la diagnosi differenziale con la B-PLL: infatti, anche nei casi in cui la B-PLL sia CD5+, l'FMC7 è espresso ad alta intensità, contrariamente a quanto si riscontra nelle cellule di LLC, che sono generalmente FMC7-.

Il CD10, in accordo con il fatto che è un antigene la cui espressione viene persa dalla cellula B matura, non è espresso nelle cellule di LLC.

Il CD5 è un antigene normalmente presente nella linea linfoide T; l'espressione aberrante di questa molecola sui linfociti B, in coespressione con il CD19, è patognomica della malattia e permette la diagnosi differenziale con la leucemia a cellule capellute (HCL), il linfoma follicolare in fase leucemica (FL) e il linfoma della zona marginale (MZL), tutti disordini generalmente CD5-. È stato suggerito, infatti, che la LLC derivi da una sottopopolazione di linfociti B CD5+ della zona mantellare dei follicoli linfoidi secondari che producono autoanticorpi (33) ed hanno il fenotipo di una cellula B attivata.

La positività per il CD23, un altro marcatore di attivazione della linea B, fornisce uno dei principali parametri per la diagnosi differenziale tra la LLC e il linfoma mantellare (MCL), anch'esso CD5+ ma costantemente negativo per il CD23 (34).

La natura clonale della patologia viene identificata dalla restrizione della catena leggera (κ o λ); inoltre, le cellule della LLC esprimono sIg a bassa intensità, generalmente IgM e/o IgD e, solo in una piccola proporzione di casi, IgG o IgA (30, 31).

L'espressione bassa o assente del CD79b nella LLC riveste un ruolo peculiare. Infatti, il CD79b e il CD79a, conosciuti anche come $Ig\beta$ e $Ig\alpha$, sono due molecole associate in maniera non covalente al BCR e necessarie per la regolazione della sua espressione in membrana. Come conseguenza di ciò, nelle cellule di LLC le sIg sono poco espresse; al contrario, negli altri disordini linfoproliferativi cronici a cellule B, dove è presente il CD79b, l'espressione delle sIg è forte. A livello funzionale, i ridotti livelli di BCR sulla superficie delle cellule di LLC sono responsabili di una difettiva trasduzione del segnale in maniera simile a quanto avviene nel caso di linfociti B anergici.

Infine, anche il CD22, un'altra molecola collegata al BCR in quanto ne amplifica il segnale, è debolmente espressa dalle cellule di LLC; la sua valutazione può risultare utile per la diagnosi differenziale con gli altri disordini linfoproliferativi, che esprimono questo antigene.

Le caratteristiche immunofenotipiche specifiche della LLC e distintive dagli altri disordini

linfoproliferativi cronici a cellule B sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratterizzazione immunofenotipica dei disordini linfoproliferativi cronici a cellule B.

	CLL	PLL	HCL	SLVL	MCL	FL
sIg	-/+	+++	++	++	++	++
CD5	+	-	-	-	+	-
CD23	+	-	-/+	-	-	-/+
FMC7	-	+	+	+	+	+
CD22	-/+	+	+	+	+	+
CD10	-	-	-	-	-(+)	+
CD79b	-	+	-/+	+	+	+

Abbreviazioni. PLL: leucemia prolinfocitica; HCL: leucemia a cellule capellute; SLVL: linfoma splenico con linfociti villosi; MCL: linfoma mantellare; FL: linfoma follicolare; -: l'antigene non è espresso; -/+: debole espressione; +: espressione; ++: forte espressione; +++: espressione molto forte.

L'analisi morfologica e immunofenotipica permette di distinguere la LLC dagli altri disordini linfoproliferativi cronici a cellule B in più dell'85% dei campioni. Nei restanti casi, in cui la diagnosi di LLC risulti incerta o per la presenza di una morfologia cellulare atipica e/o per un immunofenotipo dubbio, possono essere effettuate ulteriori indagini, quali l'esame istologico (eseguibile su midollo osseo, linfonodo e milza) e l'analisi citogenetica o l'ibridazione in situ fluorescente (FISH).

In particolare, la FISH permette l'identificazione di traslocazioni cromosomiche che, essendo rare nella LLC, agevolano l'inquadramento diagnostico del paziente. Ad esempio, la presenza della traslocazione t(11;14)(q13;q32), che provoca il riarrangiamento del gene *BCL-1*, e la traslocazione t(14;18)(q32;q21), che provoca il riarrangiamento del gene *BCL-2*, sono utili

per la distinzione della LLC dall'MCL e dal FL, rispettivamente (35). Infine, la presenza della traslocazione t(14;19)(q32;q13), che coinvolge il gene *BCL-3*, è stata riportata nei casi di LLC con morfologia atipica (36).

1.4. Fattori prognostici

In relazione alla storia naturale della patologia, la LLC ha un decorso clinico estremamente variabile, con un intervallo di sopravvivenza che va da mesi a decenni e una mediana di sopravvivenza di 7.5 anni (37). In linea con queste osservazioni, alcuni individui presentano una malattia indolente e, almeno per lunghi periodi, non necessitano di terapia poiché la loro prospettiva di vita può essere simile a quella di individui non affetti. Altri soggetti, invece, mostrano un andamento clinico più aggressivo e una ridotta sopravvivenza, richiedendo trattamenti terapeutici precoci e frequenti (1, 4).

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che l'eterogeneità clinica della LLC è correlata con diversi parametri di rilevanza prognostica indipendente: questi fattori sono utili sia nella stratificazione dei pazienti alla diagnosi che nel predire la progressione della malattia o la sopravvivenza (38-40).

Tra i fattori prognostici clinici tradizionali troviamo:

i) la stadiazione clinica.

Attualmente, per la stratificazione dei pazienti con LLC in base a specifiche fasce di rischio, vengono utilizzati due sistemi di stadiazione, il Binet e il Rai. Entrambe le classificazioni tengono conto di alcuni parametri clinici che possono influenzare il decorso della malattia, quali la presenza di linfocitosi, anemia e piastrinopenia nel sangue venoso periferico ed il numero o le dimensioni di organi linfoidi secondari eventualmente coinvolti. I casi con malattia a stadi più precoci, come il basso rischio

per il sistema Rai e lo stadio A per il sistema Binet, hanno una prognosi migliore rispetto ai casi con stadi più avanzati di malattia e, generalmente, non richiedono trattamento (24).

ii) il tempo di raddoppiamento dei linfociti (LDT).

Questo parametro è valutato mediante emocromo ripetuto nel tempo e rappresenta un metodo semplice per valutare l'indice di proliferazione della malattia. Secondo i criteri dell'NCI-WG, un LDT inferiore a 6 mesi è indicativo di progressione della malattia (24).

iii) il grado di infiltrazione midollare.

In alcuni soggetti si può riscontrare un'espansione del clone leucemico a livello del midollo osseo con effetti dannosi anche sul compartimento ematopoietico normale. Il grado di infiltrazione viene valutato mediante aspirato midollare. In passato, la presenza di una quota $\geq 30\%$ di linfociti leucemici nel midollo osseo veniva inclusa tra i criteri diagnostici della LLC. Attualmente, la valutazione del midollo non è ritenuta strettamente necessaria nei casi di indubbio inquadramento diagnostico, mentre può risultare utile nei casi con morfologia o immunofenotipo atipici. In ogni caso, un'infiltrazione diffusa correla con una prognosi peggiore (41-43).

Tra i fattori prognostici biologici tradizionali troviamo:

i) la percentuale di prolinfociti nel sangue periferico.

E' valutata mediante analisi morfologica. Una percentuale di prolinfociti $>10\%$ indica progressione della malattia. La presenza alla diagnosi di una morfologia atipica è

quindi associata ad una prognosi sfavorevole (44).

ii) alcuni marcatori sierici.

Diversi parametri sierologici, come la β 2-microglobulina (β 2M), la timidina-chinasi (TK) e il CD23 solubile (sCD23), possono essere indicativi dello stato di progressione della malattia o dell'indice di sopravvivenza dei pazienti.

La β 2M è una proteina associata in maniera non covalente alla catena α delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I sulla superficie cellulare. I suoi livelli sierici correlano inversamente con la risposta alla chemioterapia e con la sopravvivenza (45).

La TK è un enzima cellulare coinvolto nella sintesi del DNA e quindi presente nella fase G₁/S di cellule in divisione. I livelli sierici della TK sono probabilmente associati con la percentuale di cellule neoplastiche proliferanti, come indicato anche dalla sua relazione con la grandezza della massa tumorale e con l'attività proliferativa delle cellule di LLC. Questo parametro risulta, infatti, predittivo della progressione della malattia, anche nei casi a basso rischio e correla inversamente con la sopravvivenza (46, 47).

Infine, il sCD23 rappresenta la forma clivata della molecola di superficie presente sui linfociti B leucemici. I suoi livelli si associano al grado di infiltrazione midollare, ad un LDT breve e alla progressione della malattia, oltre a correlare inversamente con la sopravvivenza (48, 49).

iii) l'espressione della proteina p53.

Il gene soppressore tumorale *TP53* codifica per un fattore di trascrizione coinvolto nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione dell'apoptosi di cellule che hanno

subito un danno al DNA. La proteina p53 wild-type ha un'emivita molto breve ed in condizioni normali la sua concentrazione cellulare è così bassa da non poter essere individuata con metodiche immunologiche. Mutazioni a carico di *TP53* possono indurre un cambiamento nella sequenza aminoacidica della proteina che, non essendo più rapidamente degradata, si accumula nella cellula. La forma mutata della p53 è perciò più stabile nel tempo e l'aumento della sua concentrazione intracellulare la rende rilevabile mediante anticorpi monoclonali anti-p53 e tecniche di immunocitochimica. La positività per l'espressione di p53 è associata ad una prognosi sfavorevole e correla con la trasformazione prolinfocitica (50).

Tra i fattori prognostici biologici di più recente acquisizione troviamo:

i) lo stato mutazionale dei geni codificanti la porzione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV).

Le regioni ipervariabili della catena pesante delle Ig presenti sulla superficie cellulare di una cellula B sono generalmente coinvolte nel fenomeno dell'ipermutazione somatica, un processo che rientra nella normale fisiologia del linfocita B e che prevede la generazione di mutazioni puntiformi a carico di queste regioni immunoglobuliniche al fine di aumentare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene (maturazione per affinità).

Nel 1999, diversi lavori hanno riportato, in maniera indipendente, l'impatto prognostico dello stato mutazionale delle IGHV nella LLC. Infatti, sulla base della presenza o assenza di mutazioni a carico dei geni IGHV, i casi di LLC sono stati suddivisi in due sottogruppi che correlano con decorsi clinici differenti: pazienti con geni IGHV non mutati mostrano una malattia più aggressiva e una sopravvivenza

media inferiore rispetto a pazienti con geni IGHV mutati (8 anni vs 24 anni) (51, 52). L'analisi dello stato mutazionale delle IGHV viene eseguita mediante la metodica del sequenziamento e i geni sono considerati non mutati quando mostrano una similarità $\geq 98\%$ con la corrispondente sequenza germline e mutati quando presentano omologia $< 98\%$ (38, 52).

A differenza degli altri fattori prognostici descritti, lo stato mutazionale è una caratteristica biologica che non si modifica nel tempo.

Dal punto di vista biologico, nell'ambito della comunità scientifica in passato si è fortemente dibattuto se la presenza di due sottoclassi di LLC, divise sulla base dello stato mutazionale delle IGHV, fosse indicativa di un'unica patologia ma con caratteristiche differenti o di due malattie diverse ma con immunofenotipo simile. I dubbi maggiori in relazione a queste ipotesi venivano sollevati dal fatto che si riteneva che i casi di LLC con geni IGHV mutati derivassero da linfociti B già passati per il centro germinativo e, quindi, già sottoposti al processo di ipermutazione somatica in seguito all'incontro con l'antigene; viceversa, si riteneva che i casi di LLC con geni IGHV non mutati derivassero da linfociti B non ancora passati per il centro germinativo e che, di conseguenza, non avevano ancora subito la maturazione per affinità da parte dell'antigene.

Nel 2001, mediante studi di analisi del profilo di espressione genica è stato dimostrato chiaramente che la LLC è un'unica entità con fenotipo correlato a quello delle cellule B della memoria (53). Infatti, nonostante le differenze emerse in rapporto allo stato mutazionale delle IGHV, il linfocita coinvolto nella patogenesi della LLC mostra sempre la "signature" di una cellula B matura, indicando un comune meccanismo di trasformazione alla base della patologia (53, 54).

ii) l'espressione dell'antigene CD38.

Il CD38 è una glicoproteina normalmente espressa sulla membrana dei linfociti B come marcatore di attivazione.

Nella LLC, dove l'espressione di questo antigene viene valutata mediante citofluorimetria, è possibile distinguere casi CD38 positivi (CD38+) e casi CD38 negativi (CD38-). A livello biologico, la presenza del CD38 nella LLC sembra essere quella di indurre, quando stimolato dal suo ligando, il CD31, la cascata di trasduzione del segnale che porta alla proliferazione delle cellule leucemiche e ne aumenta la sopravvivenza (55).

In accordo con queste osservazioni, il CD38 è stato il primo parametro ad essere correlato con lo stato mutazionale delle IGHV; in particolare, la positività per il CD38 nei linfoblasti di LLC è stata associata alla presenza di geni IGHV non mutati (51). Studi successivi hanno confermato il valore prognostico di questo antigene dimostrando, nella maggior parte dei casi CD38+, un andamento progressivo della malattia ed un tempo di sopravvivenza più breve rispetto ai casi CD38-, caratterizzati, invece, da un decorso clinico più favorevole e stabile nel tempo. Ciononostante, vi sono alcuni aspetti ancora dibattuti riguardo alla validità del CD38 come fattore prognostico indipendente: infatti, contrariamente allo stato mutazionale dei geni IGHV, l'espressione del CD38 può variare nel tempo e le cause di tale variazione devono ancora essere completamente definite (56). Inoltre, l'impiego di questo antigene come fattore prognostico solleva una problematica di tipo metodologico, in quanto resta controverso quale sia il valore soglia di espressione più appropriato da usare. Allo stato attuale, autori diversi hanno preso in considerazione valori soglia di positività differenti: 30% (51), 20% (57) e 7% (58); tutti i valori sono risultati potenzialmente validi per identificare gruppi di pazienti maggiormente a rischio di

progressione della malattia.

iii) l'espressione intracellulare della proteina ZAP-70 (70-kDa ζ -chain associated protein).

ZAP-70 è una tirosin chinasi che media la via di trasduzione del segnale attraverso il TCR (recettore delle cellule T) ed è, infatti, normalmente espressa nelle cellule T e nelle cellule natural killer (NK).

Sebbene l'espressione di ZAP-70 sia bassa o del tutto assente nei linfociti B, tale proteina risulta espressa e funzionalmente attiva in alcuni casi di LLC, dove svolge un ruolo anche nella regolazione del segnale attraverso il BCR (59, 60). In linea con queste osservazioni, è stato riportato che il gene codificante per tale proteina fa parte di un gruppo di trascritti maggiormente discriminativi tra casi di LLC con geni IGHV mutati e non mutati (54); infatti, l'espressione di ZAP-70 correla con l'assenza di mutazioni a livello dei geni IGHV, tanto da far considerare inizialmente questo parametro come un surrogato dello stato mutazionale (61, 62). Attualmente, ZAP-70 può essere considerato come un fattore prognostico indipendente, perfino più utile dello stato mutazionale delle IGHV nel predire il tempo alla progressione di malattia dei pazienti affetti da LLC (63). Inoltre, la valutazione di ZAP-70 può fornire informazioni prognostiche aggiuntive quando abbinata con altri parametri, come ad esempio il CD38: è stato infatti riportato che lo screening prospettico combinato di ZAP-70 e del CD38 è particolarmente informativo in casi di LLC con stadi precoci di malattia in relazione al tempo al primo trattamento (64).

Per evitare una contaminazione da parte dei linfociti T, dove ZAP-70 è generalmente presente, l'espressione di questa proteina viene valutata nella frazione CD19⁺ delle cellule leucemiche utilizzando varie metodiche, quali il Western Blotting, la PCR

quantitativa Real time (RT-Q-PCR), l'immunoistochimica e la citofluorimetria. In relazione a questa ultima tecnica, in maniera analoga a quanto già descritto per il CD38, nei diversi lavori vengono riportati valori soglia di espressione differenti, anche se, in questo caso, quello più appropriato per distinguere tra le LLC ZAP-70 positive (ZAP-70+) e le LLC ZAP-70 negative (ZAP-70-) è risultato essere il 20% (61).

Non è ancora del tutto chiaro se l'espressione di ZAP-70 sia stabile nel tempo, anche se probabilmente variazioni di questo parametro sono riscontrabili solo in una piccola percentuale di casi.

iv) le anomalie cromosomiche.

La valutazione delle alterazioni cromosomiche di una cellula può essere effettuata sia mediante l'analisi citogenetica che per mezzo della FISH. In realtà, lo studio del cariotipo convenzionale è risultato di poca utilità nella LLC poiché le cellule del clone neoplastico hanno una bassissima capacità mitotica e sono poco rispondenti a sostanze mitogene, quali la fitoemoagglutinina; diversamente, l'introduzione della metodica della FISH, che non necessita della presenza di metafasi, ha consentito di ampliare le conoscenze relative a questa malattia.

Sebbene la LLC non sia caratterizzata da una singola e specifica alterazione cromosomica, le cellule di questa neoplasia hanno diverse alterazioni genomiche ricorrenti, che spesso appaiono durante il corso della malattia e rivestono una valenza prognostica (17).

Mentre le traslocazioni sono raramente osservate nella LLC, le aberrazioni maggiormente riscontrate sono perdite o acquisti di materiale genetico. Tra queste, l'alterazione più frequente è rappresentata dalla delezione del braccio lungo del

cromosoma 13 (del13q14), presente in circa il 50% dei casi. In questa regione cromosomica risiedono il miR-15 e il miR-16 (14), che controllano geni antiapoptotici come *BCL-2*; la perdita o la down-modulazione di questi due microRNA a causa della delezione viene ritenuto come uno dei principali fattori nel prevenire l'apoptosi (13). Inoltre, nella stessa regione cromosomica, è localizzato anche *DLEU2*, un gene la cui delezione, come recentemente riportato, sembra svolgere un ruolo nella patogenesi della LLC (65). Dal punto di vista clinico, pazienti con del13q14 come unica alterazione hanno una buona prognosi, addirittura migliore rispetto ai casi con cariotipo normale (133 mesi di sopravvivenza media vs 111 mesi dei pazienti senza alterazioni).

La seconda anomalia cromosomica più comune nella LLC è la trisomia del cromosoma 12 (tris12), riscontrata circa nel 25% dei casi. Quando presente insieme ad una morfologia atipica e geni IGHV non mutati può essere associata ad una prognosi peggiore, altrimenti non sembra influenzare significativamente la sopravvivenza (114 mesi di sopravvivenza media).

Tra le alterazioni a prognosi sfavorevole troviamo la del11q22-q23 e la del17p13. La prima è riscontrata nel 10-20% dei casi e coinvolge il gene soppressore tumorale *ATM* (66). Tale anomalia si associa spesso ad una marcata linfadenopatia e correla con una sopravvivenza media breve (79 mesi).

La del17p13, presente in circa il 7% dei casi di LLC non trattati, coinvolge il gene *TP53* ed è l'aberrazione a prognosi peggiore, correlando con la sopravvivenza media più breve (32 mesi). Questa alterazione citogenetica è, infatti, un importante fattore indipendente per la predizione della progressione di malattia e della sopravvivenza (17) e risulta frequentemente associata alla resistenza al trattamento con agenti chemioterapici convenzionali (67), come gli alchilanti, e alla Fludarabina.

In generale, le perdite o gli acquisti di materiale genetico sono correlati ad alterazioni nei livelli di espressione dei geni localizzati nella regione interessata, indicando un effetto di dosaggio genico (68).

Inoltre, il numero di aberrazioni genomiche può variare nel tempo: alcune delle anomalie cromosomiche sopra descritte possono essere già presenti alla diagnosi mentre altre, come la del11q22-q23 e la del17p13, sono piuttosto acquisite durante il corso della malattia o addirittura selezionate dal trattamento chemioterapico.

Infine, le aberrazioni genomiche con impatto prognostico sfavorevole, si riscontrano più frequentemente in pazienti con i geni IGHV non mutati mentre quelle con impatto prognostico favorevole sono più frequenti in pazienti con i geni IGHV mutati (58). In relazione a queste considerazioni, lo stato mutazionale dei geni IGHV e le alterazioni citogenetiche sono tra i più potenti parametri prognostici disponibili attualmente, pur mantenendo un valore indipendente nella predizione dell'andamento clinico della malattia.

Oltre ai fattori sopra citati, che rappresentano quelli maggiormente accreditati e studiati per la stratificazione dei pazienti con LLC, negli anni più recenti si sta continuando ad individuare nuovi fattori prognostici, nell'intento sia di migliorare la ripartizione dei pazienti nelle diverse fasce di rischio o nei vari regimi di trattamento che di approfondire le conoscenze biologiche nell'ambito di questa patologia.

Se da un lato questi parametri sono estremamente utili per la gestione del paziente con LLC, restano ancora bene da definire i criteri riguardanti la standardizzazione delle metodologie utilizzate per tali indagini, l'interpretazione di eventuali discordanze tra i risultati di diversi fattori prognostici e, infine, il numero minimo di marcatori indispensabili da esaminare.

1.5. Cenni di terapia

Negli anni passati, la gestione del paziente con la LLC consisteva nell'approccio del "*watch and wait*", ovvero il paziente veniva sottoposto ad una serie di controlli emato-clinici periodici, procedendo ad un trattamento chemioterapico solo qualora vi fosse una progressione della malattia. Attualmente, lo scenario terapeutico è drasticamente cambiato per motivi che includono l'età e lo stato fisico dei pazienti, l'introduzione di nuovi farmaci e/o regimi terapeutici e, infine, l'identificazione di diversi fattori prognostici, correlati sia alla progressione che all'andamento clinico della malattia.

Tra le varie opzioni terapeutiche nella LLC troviamo:

i) la chemioterapia.

Per molti anni, la terapia normalmente somministrata ai pazienti con LLC è stata basata sull'uso monoterapico di agenti alchilanti, quali il Clorambucil e la Ciclofosfamida. Tali farmaci hanno un'azione citotossica in quanto, introducendo errori o danno a livello della catena di DNA, sono in grado di bloccare la replicazione cellulare. Sulla base dei risultati ottenuti da vari studi clinici, è stato messo in evidenza che il trattamento in prima linea solo con agenti alchilanti non apporta significativi vantaggi sulla sopravvivenza dei pazienti (3). Attualmente, infatti, il Clorambucil trova indicazione solo nel trattamento di pazienti anziani, non eleggibili per terapie più aggressive.

Dalla metà degli anni '80, nella pratica clinica della LLC sono stati introdotti gli analoghi delle purine, una classe di farmaci che interferiscono con la via biosintetica del DNA. Alla luce dei risultati ottenuti, questi agenti sono diventati lo standard per il trattamento in prima linea della LLC. In particolare, nell'ambito di questa categoria di composti, la Fludarabina è il farmaco maggiormente utilizzato in questa neoplasia:

infatti, quando usato in regimi monoterapici, consente di ottenere una maggiore percentuale di risposte al trattamento mentre, quando usato in combinazione con agenti alchilanti, induce una più elevata percentuale di risposte al trattamento ed un prolungato intervallo libero da malattia (3). Sia gli agenti alchilanti che la Fludarabina non sono attivi in casi di LLC con perdita di p53 dovuta a del17p13 e/o a presenza di mutazioni a livello del gene (67).

ii) gli anticorpi monoclonali.

La tecnologia degli anticorpi monoclonali si è sviluppata negli anni '70, e la loro specificità, unita alla loro relativamente facile produzione, li rende interessanti strumenti in campo terapeutico. Infatti, gli anticorpi monoclonali sono in grado di riconoscere ed eliminare le cellule tumorali, legandosi ad uno specifico determinante antigenico contro cui sono diretti e presente, al tempo stesso, sulle cellule neoplastiche; l'attività linfocitolitica di questi agenti è basata sulla citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente e sull'attivazione del complemento.

Il Rituximab è un anticorpo monoclonale anti-CD20, che è un antigene generalmente espresso sia sui linfociti B normali che su quelli neoplastici. Questo composto viene utilizzato soprattutto nei linfomi non-Hodgkin, anche se il suo impiego è stato esteso alla LLC, sebbene in questa patologia il CD20 sia espresso caratteristicamente a bassi livelli. Il Rituximab non risulta particolarmente efficace nella LLC quando usato come singolo agente, ma rappresenta attualmente il miglior regime chemioterapico se utilizzato in combinazione con gli analoghi delle purine, consentendo di ottenere remissioni complete non solo cliniche, ma anche fenotipiche e molecolari (69).

L'Alemtuzumab o Campath è un anticorpo monoclonale anti-CD52, un antigene espresso su monociti, macrofagi e su tutti i linfociti, inclusi quelli neoplastici.

Nonostante la sua efficacia, il limite maggiore nell'utilizzo di questo anticorpo è rappresentato dalla tossicità ematologica ed immunitaria dovuta alla diffusa espressione di questo antigene. L'uso dell'Alemtuzumab, oltre alla combinazione con la chemioterapia, può risultare utile nelle LLC resistenti alla fludarabina, e/o con presenza di alterazioni del gene *TP53*, caratteristiche che conferiscono una prognosi altamente sfavorevole.

iii) il trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Grazie al miglioramento della qualità della risposta alla terapia, all'incremento del numero di pazienti giovani (<65 anni) ed al miglioramento delle condizioni fisiche degli stessi pazienti ("*fit patients*"), le procedure trapiantologiche autologhe o allogeniche sono oggi applicabili anche a pazienti con la LLC. Il trapianto autologo può offrire lunghi periodi liberi da malattia, ma le recidive sono invariabilmente presenti. Al contrario, il trapianto allogenico che sfrutta l'effetto di controllo/eradicazione della malattia da parte della *graft-versus-leukemia* (GVL) dei linfociti del donatore, è l'unica procedura che potenzialmente consente la guarigione. L'elevata tossicità dimostrata dal trapianto allogenico convenzionale è stata ridimensionata grazie all'introduzione dei trapianti con regimi a condizionamento ridotto, da riservare a pazienti con caratteristiche prognostiche sfavorevoli e di giovane età.

Sebbene i recenti miglioramenti nei regimi terapeutici e nell'uso di trattamenti più avanzati e meno tossici abbiano permesso il raggiungimento di un'alta percentuale di remissioni complete dopo la terapia, molti pazienti sono ancora soggetti a ricadute. Infatti, le terapie disponibili allo stato attuale, ad eccezione del trapianto allogenico, permettono un

contenimento ma non l'eradicazione della malattia.

Alla luce di queste osservazioni, l'obiettivo futuro nella terapia della LLC consisterà nel duplice sforzo, da un lato, di eliminare totalmente il clone neoplastico, mediante il raggiungimento della remissione completa anche a livello molecolare, dall'altro, di aumentare le aspettative di vita anche nei casi che, ad oggi, risultano refrattari ai vari trattamenti. Lo studio di nuovi potenziali bersagli terapeutici risulta utile in tale contesto per l'eventuale disegno di farmaci mirati ad una personalizzazione della terapia nei vari pazienti.

CAPITOLO 2

I microarrays

2.1. Metodica dei microarrays

Tradizionalmente, gli studi di genetica umana si sono incentrati sullo studio intensivo di uno o pochi geni alla volta. A partire dal sequenziamento completo del genoma umano, si è cominciato a pensare allo sviluppo di tecnologie che permettessero un'analisi di geni su vasta scala; in questo contesto, l'introduzione della metodica dei microarrays, o genechips, ha rappresentato una rivoluzione nel mondo scientifico.

I microarrays rappresentano un affinamento della tecnica del northern-blotting, in cui una sonda radiomarcata viene ibridata con l'mRNA, consentendo la quantificazione del trascritto. Sebbene il northern-blotting sia un metodo affidabile, ha lo svantaggio di valutare un gene alla volta e implica l'uso di grandi quantità di RNA di partenza. Anche la RT-Q-PCR, nonostante sia una metodica più rapida e sensibile oltre a necessitare di una quantità di RNA decisamente inferiore, consente di valutare soltanto un ristretto numero di geni alla volta. Al contrario, tramite microarrays si può quantificare l'espressione di un ingente numero di geni in un singolo esperimento, partendo da una minima quantità di RNA isolato da cellule o da tessuti. Su appositi supporti, denominati arrays o chip, sono contenute infatti decine di migliaia di sonde che servono a valutare la quantità degli mRNA presenti in un dato campione e consentono, quindi, di definire un profilo di espressione genica caratteristico.

La metodica dei microarrays sfrutta la caratteristica tipica degli acidi nucleici, ovvero la complementarità tra le basi azotate, che permette l'ibridazione di due sequenze complementari; le sequenze complementari, in questo caso, sono le sonde adese sul chip e le sequenze target generate a partire dall'RNA estratto dal campione.

Da un punto di vista tecnico, si possono riconoscere 2 tipi principali di microarrays: 1) i DNA microarrays (70) e 2) gli oligonucleotide arrays (71).

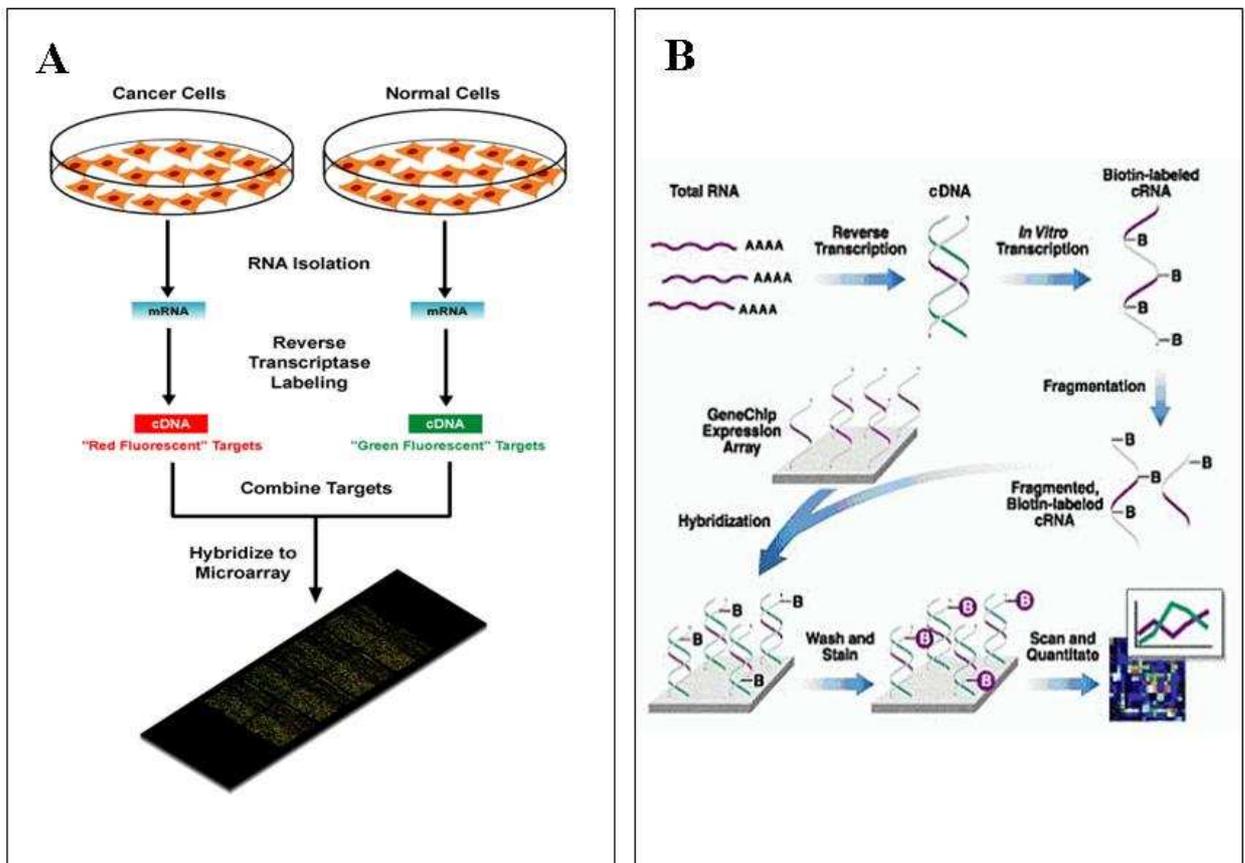
- 1) I DNA microarrays sono costruiti su una piccola superficie, generalmente di vetro, nylon o silicio, dove vengono adese sequenze di DNA complementare, che costituiscono le sonde. Il target è rappresentato da DNA complementare (cDNA), che viene generato retrotrascrivendo l'RNA totale estratto dalle cellule del campione di interesse e dalle cellule di un campione di riferimento – di solito rappresentato da un campione di cellule normali o da un pool di linee cellulari –; tali cDNA vengono marcati con fluorocromi diversi: generalmente viene utilizzato il Cy5 (che emette una lunghezza d'onda nel campo del rosso) per il cDNA in esame e il Cy3 (che emette nel campo del verde) per il cDNA di riferimento (Figura 2A). In seguito alla marcatura, all'ibridazione sull'array sia del cDNA di interesse che del cDNA di controllo e alla scannerizzazione, l'analisi dei dati tramite appositi software fornisce una misura che deriva dal rapporto tra la quantità del cDNA di interesse e quello del campione di riferimento, ed è quindi una misurazione relativa e non assoluta.

- 2) Gli oligonucleotide arrays sono costituiti da un vetrino su cui sono adesi degli specifici oligonucleotidi sintetici della lunghezza di 25-60 nucleotidi, denominati probesets. Ogni probeset è più o meno specifico per un trascritto e per ogni trascritto esiste più di un probeset. Ogni probeset, inoltre, è composto da due sequenze: la prima, definita *perfect match* (PM), è complementare alla sequenza in analisi, mentre la seconda, definita *mismatch* (MM), è caratterizzata dalla sostituzione di un nucleotide in posizione centrale. La presenza di una sequenza MM ha il fine di incrementare la specificità del segnale ottenuto, poichè le condizioni che consentono l'ibridazione

sono state studiate al fine di minimizzare l'interazione con le sequenze MM, esaltando nel contempo la capacità di interazione con quelle PM. A differenza dei DNA microarrays, negli oligonucleotide arrays il target non è rappresentato da DNA, bensì da RNA complementare (cRNA), che viene così generato: l'RNA totale estratto dal campione viene retrotrascritto in cDNA a singola e successivamente a doppia catena; il cDNA viene utilizzato come stampo per una reazione di trascrizione *in vitro* per la sintesi del cRNA. La sintesi del cRNA consente, allo stesso tempo, sia di incrementare la quantità del prodotto da analizzare, sia di marcarlo con biotina. In seguito, il cRNA viene frammentato, per permettere un'ibridazione più efficiente, e, dopo l'ibridazione, vengono effettuati dei lavaggi per eliminare tutto ciò che non si è legato ai probesets, che potrebbe altrimenti aumentare il rumore di fondo, inficiando quindi il risultato. Successivamente, il chip viene marcato con una molecola fluorescente in grado di legarsi alla biotina presente sul cRNA e il segnale così generato viene infine rilevato mediante la scannerizzazione del chip. Un'ulteriore differenza con i DNA microarrays consiste nel fatto che, negli oligonucleotide arrays, ogni esperimento prevede l'ibridazione di un solo campione, e di conseguenza la quantificazione che ne deriva è assoluta e non relativa (Figura 2B).

I diversi livelli di fluorescenza generati con la metodica dei microarrays corrispondono a diversi livelli di ibridazione e, quindi, di espressione genica. Per poter passare all'elaborazione dei dati è però necessario che il segnale rilevato dallo scanner venga convertito in valori numerici e successivamente sottoposto ad algoritmi di filtrazione e di pulizia.

Figura 2. Rappresentazione schematica della tecnica dei DNA microarrays (A) e degli oligonucleotidi arrays (B).



A tale proposito, sono disponibili appositi software capaci di convertire, appunto, i segnali luminosi in matrici numeriche dove, ad ogni numero, corrisponde il valore di espressione di ciascun probesets. Inoltre, gli stessi software sono in grado di effettuare la normalizzazione dei dati, un processo in base al quale è possibile eliminare le variabili che possono influenzare i singoli esperimenti, permettendo la valutazione di più campioni contemporaneamente. Solo dopo questa serie di operazioni è possibile procedere all'analisi dei dati (Figura 3).

Per quanto riguarda l'analisi dei dati, vi sono due tipi principali di approcci statistici: l'analisi *unsupervised* e l'analisi *supervised*.

L'analisi *unsupervised* (72) valuta la somiglianza di un campione ad un altro, ed è basata esclusivamente sull'analisi del profilo genico: è quindi un'analisi *a priori*, dove le conoscenze

biologiche acquisite mediante altri approcci non vengono tenute in considerazione. Questo tipo di analisi può, ad esempio, essere utile nell'identificazione di sottogruppi non precedentemente rilevati. I geni individuati mediante questo approccio vengono selezionati usando criteri non specifici, quali l'esclusione dei trascritti che sono considerati non espressi in alcun campione oppure che non presentano alcuna variazione nel set sperimentale analizzato.

Tra i vari metodi utilizzati per questo tipo di analisi, meritano un cenno lo *hierarchical clustering* e la *principal component analysis (PCA)*. Il primo approccio consente di visualizzare un dendrogramma, che si basa sulla similarità dell'espressione genica all'interno di un gruppo di campioni, mentre il secondo approccio è un metodo di analisi multivariato, in cui è possibile raggruppare i campioni proiettando i dati su varie dimensioni spaziali.

L'analisi *supervised* (73), al contrario, si basa sull'impiego di informazioni clinico/biologiche già precedentemente acquisite (presenza di alterazioni molecolari note, stadio differenziativo della cellula, decorso clinico, ecc.), e consente di individuare geni, o gruppi di geni che sono correlati con tali caratteristiche, selezionando quindi i trascritti che discriminano meglio due patologie o due gruppi a confronto. Anche in questo tipo di analisi, i geni vengono identificati utilizzando diversi criteri di selezione: oltre a tenere in considerazione che un gene sia espresso nei campioni d'interesse, è necessario valutare che vi sia una correlazione significativa tra un determinato gene e il fenotipo in esame.

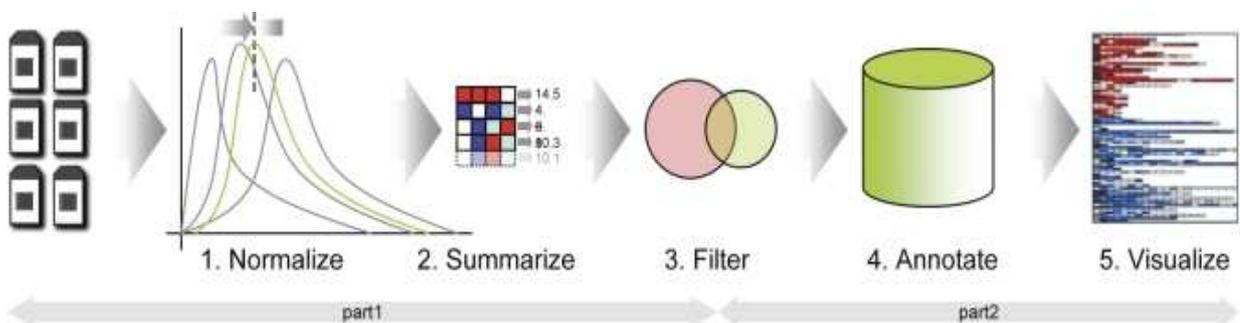
Tra i vari metodi statistici utilizzati nell'ambito dell'approccio *supervised* ricordiamo l'analisi della varianza (ANOVA), che permette di paragonare più di due gruppi contemporaneamente, ed il t-test, che permette di confrontare un gruppo verso l'altro.

Inoltre, in questo tipo di analisi è generalmente utile ripartire i campioni in esame in due gruppi, un *training set*, che consente l'identificazione dei trascritti che meglio discriminano

uno o più gruppi, e il *test set*, a cui viene applicata la lista di geni precedentemente ottenuta e che permette di valutare il potere predittivo dei geni così identificati.

Infine, nonostante la statistica sia in grado di identificare in maniera affidabile i geni che producono cambiamenti in determinate condizioni sperimentali, dare un senso biologico al profilo di espressione dipende dalla funzione svolta dalle proteine codificate dai geni selezionati nel corso delle diverse analisi. A tale riguardo, risultano utili i database disponibili on-line che, attualmente, oltre a riportare le annotazioni dei diversi geni, forniscono una serie di ulteriori informazioni (come ad esempio la localizzazione cromosomica dei trascritti o le caratteristiche funzionali delle proteine codificate dagli stessi) che possono essere utilizzate dallo sperimentatore ai fini della propria ricerca.

Figura 3. Schematizzazione dei passaggi compresi tra la scannerizzazione di un chip e l'analisi dei dati.



2.2. Ruolo dei microarrays nello studio della LLC

La possibilità di quantificare simultaneamente un ingente numero di trascritti, rappresenta un contributo importante per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della trasformazione neoplastica e per l'identificazione di potenziali targets terapeutici.

Le leucemie rappresentano tumori relativamente semplici da analizzare mediante la metodica dei microarrays grazie all'accessibilità delle cellule neoplastiche, che sono infatti facilmente reperibili mediante prelievi di sangue periferico e/o midollare. Lo studio delle neoplasie ematologiche mediante questa metodica è ulteriormente facilitato dalla purezza della popolazione di interesse, data la bassa percentuale di altri tipi cellulari contaminanti in un campione leucemico. Al contrario, nei tumori solidi lo studio delle cellule di interesse è limitato dalla commistione delle cellule tumorali con altri tipi cellulari.

Proprio per questi motivi, la metodica dei microarrays è stata fortemente utilizzata nello studio delle neoplasie ematologiche, dove è risultata particolarmente informativa. Infatti, nell'ambito della LLC, l'analisi del profilo di espressione genica ha dato un contributo importante alla comprensione di alcune caratteristiche biologiche della malattia.

Come già menzionato, la LLC è costituita da due sottogruppi di pazienti, suddivisi sulla base dello stato mutazionale dei geni IGHV, che presentano andamento clinico differente. Alla luce di queste osservazioni, si è a lungo dibattuto se la LLC rappresentasse un'unica patologia con caratteristiche diverse o se, al contrario, fosse caratterizzata da due diverse entità con aspetti immunofenotipici simili. Più nello specifico, non era chiaro se i casi con geni IGHV mutati derivassero da una cellula che aveva attraversato il centro germinativo mentre i casi con geni IGHV non mutati derivassero da una cellula B non ancora passata per il centro germinativo e che, di conseguenza, non aveva ancora subito il processo di ipermutazione somatica. Due lavori hanno permesso di chiarire questo punto (53, 54).

Nel primo lavoro, Rosenwald e colleghi (54) hanno analizzato il profilo di espressione genica delle cellule di LLC e di altri disordini linfoproliferativi, dimostrando che la LLC presenta una "signature" caratteristica e assolutamente distintiva rispetto agli altri disordini (Figura 4A). Ciò ha permesso di chiarificare che la LLC è costituita da un'unica neoplasia con un profilo genico univoco tanto nei casi con geni IGHV mutati che nei casi con geni IGHV non

mutati. Solo attraverso un'analisi *supervised* è stato infatti possibile individuare un set di circa 175 geni correlati allo stato mutazionale dei geni IGHV (Figura 4B). Tra questi, *ZAP-70* è stato identificato come il gene più discriminativo tra i due sottogruppi. L'espressione differenziale di *ZAP-70* è stata confermata dallo stesso gruppo di autori (74) in una coorte di circa 100 pazienti, mediante RT-Q-PCR, Western blotting e immunistoichimica, dimostrando la validità dei risultati ottenuti con la metodica dei microarrays. La stretta associazione tra l'espressione della proteina e l'assenza di mutazioni è stata ulteriormente confermata da studi successivi (61), dove è stato anche dimostrato il valore prognostico rivestito da *ZAP-70* nella LLC (63).

Infine, nell'ambito dello stesso studio (54) sono emerse alcune differenze biologiche tra i casi di LLC con geni IGHV mutati e casi con geni IGHV non mutati. Infatti, tra i geni maggiormente espressi nei casi con geni IGHV non mutati, un gruppo è coinvolto nell'attivazione della cellula B, suggerendo che il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale attraverso il BCR possa contribuire al fenotipo più aggressivo di questa sottoclasse di pazienti.

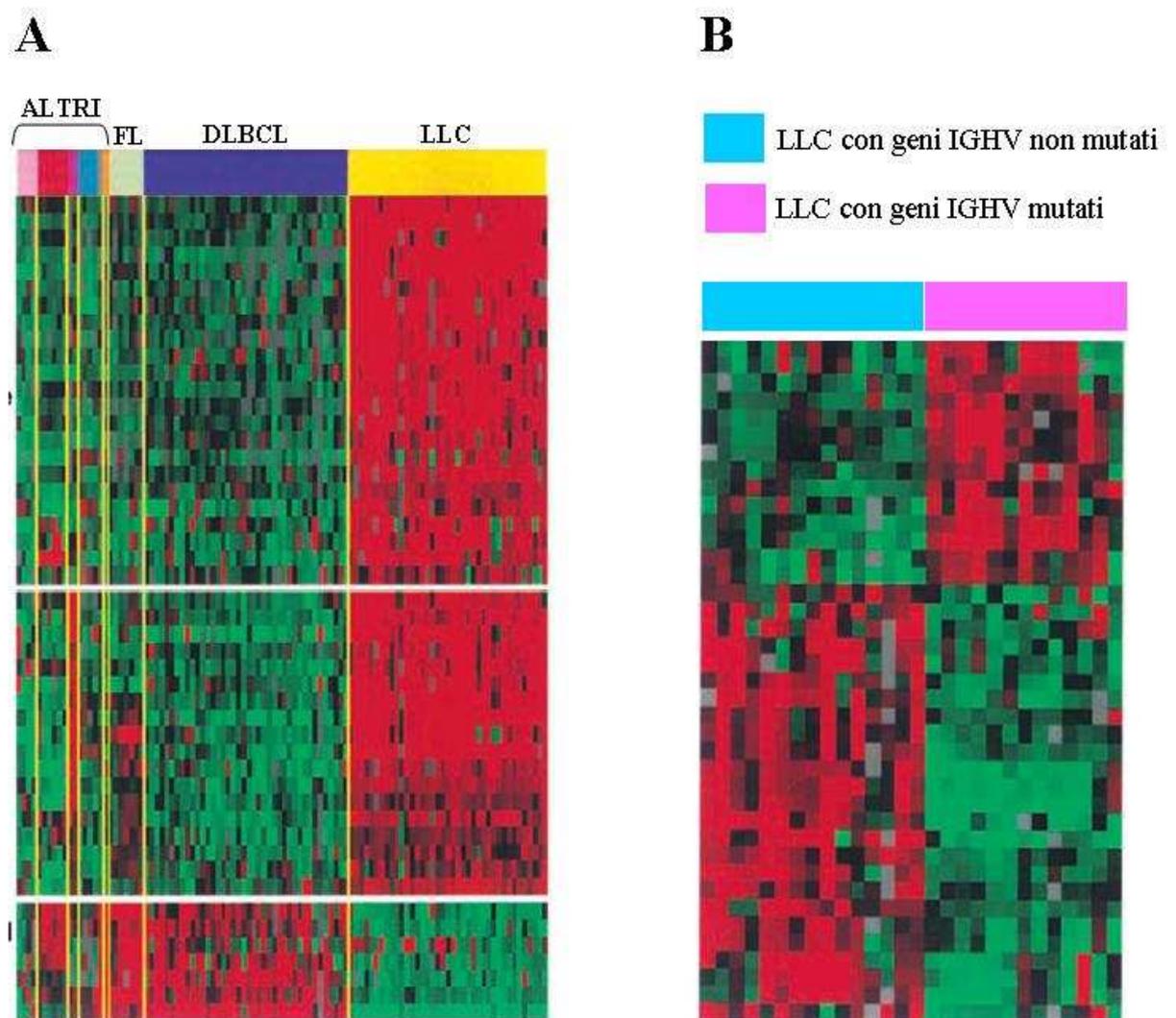
Nel secondo lavoro, Klein e colleghi (53) hanno ottenuto risultati confrontabili a quelli già descritti. Inoltre, paragonando le cellule di LLC con diverse sottopopolazioni di cellule B provenienti da donatori sani (cellule B del centro germinativo, cellule B naïve, cellule B della memoria e cellule B CD5+), gli stessi autori hanno incontestabilmente chiarito che le cellule di LLC, indipendentemente dal loro stato mutazionale, hanno un profilo di espressione genica correlato a quello delle cellule B della memoria mentre sono diverse rispetto alle cellule CD5+.

Ciononostante, mediante un'analisi *supervised* è stato evidenziato che le cellule di LLC differiscono dalle cellule B della memoria per l'espressione di numerosi geni, che sembrano indurre nelle cellule neoplastiche un fenotipo più quiescente, antiapoptotico e con diverse

proprietà di adesione e di risposta a chemochine e citochine rispetto alle cellule B della memoria.

Complessivamente, questi due studi hanno fornito risultati fortemente concordanti sebbene siano state usate piattaforme e approcci statistici differenti e la preparazione dei campioni abbia previsto, nel primo studio, l'arricchimento di cellule CD19+, mentre, nel secondo studio, non sia stata effettuata alcuna purificazione.

Figura 4. A-B: profilo di espressione genica nella LLC. **(A)** Identificazione del profilo caratteristico della LLC e distintivo rispetto agli altri disordini linfoproliferativi; **(B)** analisi *supervised* con geni differenzialmente espressi tra casi di LLC con geni IGHV mutati e non mutati. Abbreviazioni. DLBCL: linfoma diffuso a grandi cellule B; FL: linfoma follicolare.



Negli anni seguenti, con l'emergere del ruolo dei fattori prognostici nella LLC, anche gli studi di microarrays si sono focalizzati su questo aspetto della malattia.

Ad esempio, Haslinger e colleghi (68) hanno identificato nella LLC un gruppo di geni correlati alle diverse anomalie cromosomiche; inoltre, tra i geni che sono risultati più fortemente associati a ciascuna aberrazione citogenetica, una frazione è localizzata precisamente nella regione cromosomica coinvolta nell'anomalia analizzata, dimostrando quindi la presenza di un effetto di dosaggio genico.

Molti degli studi successivi di microarrays nella LLC si sono concentrati, invece, sulle differenze di espressione genica correlate al diverso andamento clinico dei pazienti, con l'obiettivo di individuare potenziali marcatori di progressione della malattia. A partire dallo studio di Dürig e colleghi (75), in cui il confronto tra pazienti CD38+ e CD38- ha consentito di evidenziare che l'iperespressione di alcuni membri dei geni ribosomali si associa ad un decorso clinico favorevole, altri lavori hanno riportato la presenza di geni correlati alla prognosi. In particolare, nell'ambito di uno studio sul profilo di espressione genica è stata identificata una "signature" di trascritti considerati come quelli maggiormente discriminativi tra pazienti con malattia stabile e pazienti con malattia progressiva (76). Anche nell'ambito di un altro lavoro, l'eterogeneità clinica della LLC è stata correlata con un gruppo di geni specifici ma, in aggiunta, è stata dimostrata un'associazione tra una minore sopravvivenza libera da trattamento (TFS) e la deregolazione di geni coinvolti nella trasduzione del segnale attraverso il BCR (77). In linea con queste osservazioni, da un'analisi effettuata su un ristretto numero di casi di LLC con regressione spontanea di malattia, il nostro gruppo ha recentemente riscontrato un'overespressione di geni codificanti proteine ribosomali (78), confermando, come già riportato, l'associazione tra questi geni e la presenza di una prognosi favorevole (75). Inoltre, negli stessi casi, è stata identificata una overrappresentazione di geni

correlati al signaling della cellula B (78), rimarcando, anche in questo caso, l'influenza svolta dal BCR sulle cellule del clone neoplastico.

Attualmente, nell'ambito degli studi di microarrays nella LLC, un interesse sempre maggiore sta avendo la farmacogenomica, in quanto, permettendo di valutare direttamente gli effetti *in vitro* o *in vivo* di un trattamento sulla cellula neoplastica, rende sempre più vicina la possibilità di disegnare terapie mirate o personalizzate.

Se da un lato, infatti, i lavori più recenti mirano ad individuare algoritmi di geni in grado di predire la risposta dei pazienti affetti da LLC a determinati trattamenti (79), dall'altro, una serie di lavori hanno l'obiettivo di identificare i geni che sono responsabili della resistenza ai farmaci usati nella pratica clinica. In un simile contesto, infatti, Rosenwald e colleghi (80) hanno dimostrato il ruolo di *TP53* nella risposta al trattamento con Fludarabina, un farmaco correntemente usato nella terapia della LLC.

In conclusione, quindi, la metodica dei microarrays applicata allo studio della LLC ha consentito di chiarire che:

- i) la LLC è un'unica patologia, indipendentemente dallo stato mutazionale dei geni IGHV;
- ii) un ristretto numero di geni è differenzialmente espresso tra casi con geni IGHV mutati e casi con geni IGHV non mutati;
- iii) il clone leucemico presumibilmente deriva dal linfocita B della memoria, e non dal linfocita B CD5+;
- iv) è documentabile un effetto di dosaggio genico, con un'alterata espressione dei geni localizzati nelle regioni più frequentemente coinvolte da aberrazioni cromosomiche, in questa patologia;
- v) alcuni geni ribosomali e geni correlati al BCR potrebbero avere un ruolo nel decorso clinico della malattia;

vi) studi di farmacogenomica renderanno possibile l'identificazione dei geni correlati alla risposta o alla resistenza a determinati trattamenti.

CAPITOLO 3

STUDIO 1: Analisi genomica di cellule di leucemia linfatica cronica stimulate con immunoglobuline anti-IgM e anti-IgD

3.1. INTRODUZIONE

3.1.1. Maturazione dei linfociti B e ruolo fisiologico del BCR

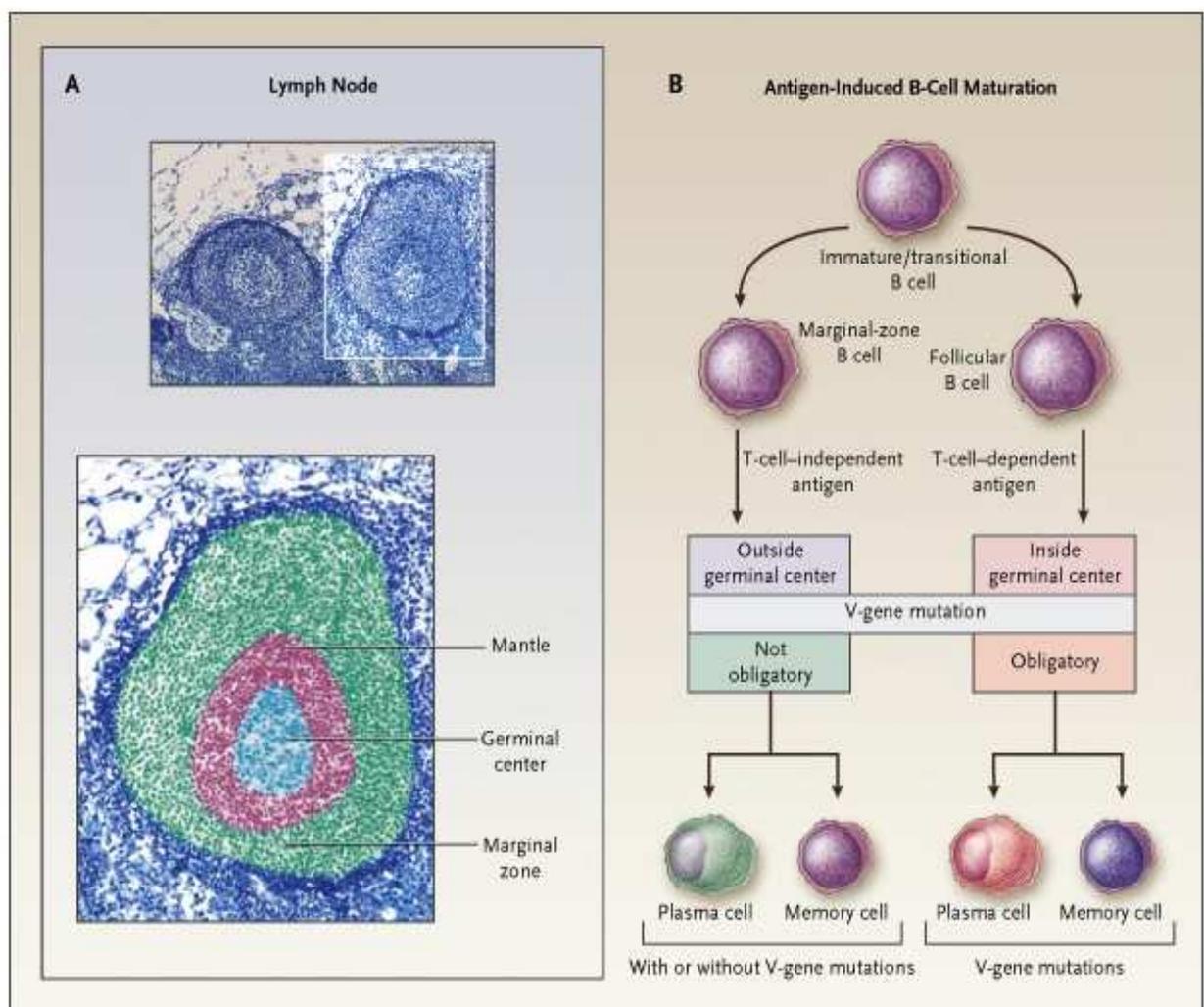
Il processo differenziativo che porta alla produzione di plasmacellule e linfociti B della memoria può essere suddiviso principalmente in tre fasi: la generazione dei linfociti B maturi e immunocompetenti, l'attivazione dei linfociti B maturi e, infine, il differenziamento dei linfociti B attivati in plasmacellule e linfociti B della memoria.

La maturazione del linfocita B avviene nel midollo osseo, dove i geni delle catene pesanti e leggere delle Ig vengono riarrangiati per formare il BCR. Il linfocita B maturo lascia, quindi, il midollo osseo esprimendo IgM e IgD di membrana con una singola specificità antigenica. Fisiologicamente, infatti, ogni linfocita B possiede un BCR diverso per favorire, potenzialmente, il riconoscimento di tutte le diverse tipologie di antigeni presenti nell'ambiente. Le mutazioni dei geni delle Ig derivano dal processo fisiologico che segue l'incontro *in vivo* con l'antigene e che si verifica nel microambiente dei follicoli negli organi linfoidi secondari (Figura 5A). Questo processo, chiamato ipermutazione somatica, è necessario alla produzione di Ig che presentano maggiore affinità per l'antigene stesso.

In realtà, l'attivazione di un linfocita B maturo all'interno dei tessuti linfoidi secondari può avvenire con due modalità diverse, riassunte nella Figura 5B. Nel primo caso, la stimolazione da parte dell'antigene avviene a livello del centro germinativo e richiede il contatto con i linfociti T helper (T_H); nel secondo caso, l'attivazione della cellula B avviene e al di fuori del

centro germinativo, nella zona marginale dei follicoli, senza la partecipazione dei linfociti T, molto spesso in risposta a polisaccaridi presenti sulla membrana di batteri e virus capsulati. Mentre la stimolazione antigenica T-dipendente induce, in ogni caso, l'ipermutazione somatica a livello dei geni delle Ig nella cellula B, la stimolazione antigenica T-indipendente non necessariamente provoca mutazioni a livello degli stessi geni. In entrambi i casi, il linfocita B si differenzia in plasmacellule e linfociti B della memoria (81).

Figura 5. (A) Rappresentazione di un follicolo presente a livello linfonodale, all'interno del quale è possibile distinguere il centro germinativo, la zona mantellare e la zona marginale; (B) schema raffigurante le due modalità di attivazione di un linfocita B maturo nei tessuti linfoidi periferici.



Il BCR è altresì un componente fondamentale per l'attivazione della trasduzione del segnale nelle cellule B.

Il BCR è un complesso presente sulla superficie cellulare dei linfociti B, costituito da una molecola della famiglia delle Ig, legante l'antigene, in associazione ad altre molecole accessorie, il CD79a (Ig α) e il CD79b (Ig β). Queste due proteine, oltre ad essere necessarie per il trasporto e l'espressione delle Ig sulla membrana delle cellule B, sono anche indispensabili per la trasduzione del segnale attivata dal legame con l'antigene. Infatti, le porzioni citoplasmatiche del CD79a e del CD79b contengono i motivi ITAM (motivi attivatori contenenti tirosina dell'immunorecettore), in grado di reclutare e attivare, in seguito a stimolazione da parte dell'antigene, diverse tirosin chinasi della famiglia Src (SFK), quali Syk o Lyn.

Mediante l'azione di Syk i segnali che partono dal BCR possono essere in grado di attivare diverse vie di trasduzione del segnale: i) la produzione dei secondi messaggeri IP₃ e DAG, che inducono, da un lato, il rilascio di Ca⁺⁺ dai depositi intracellulari, dall'altro, l'attivazione della PKC (Protein Kinases C); ii) l'attivazione di Ras e della cascata delle MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases); iii) la fosforilazione di I κ B, con conseguente rilascio della proteina NF κ B. Tutte queste vie di segnalazione, inducono l'attivazione di fattori che stimolano o inibiscono la trascrizione di specifici geni all'interno della cellula (82).

3.1.2. Signaling del BCR nella LLC

In passato, si riteneva che le cellule della LLC derivassero da linfociti B immaturi e immunologicamente incompetenti, con una minima capacità proliferativa e con una resistenza all'apoptosi, che ne comportava un accumulo passivo. La LLC, infatti, è stata tradizionalmente descritta come una patologia legata all'accumulo piuttosto che alla

proliferazione poichè più del 99% dei linfociti leucemici circolanti risultano arrestati in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare (1).

Negli ultimi anni, i dogmi sulle caratteristiche biologiche della LLC stanno cambiando rapidamente. Attualmente, diverse evidenze hanno dimostrato, infatti, che le cellule di LLC derivano da linfociti B maturi - che hanno incontrato l'antigene - e che risultano immunologicamente competenti.

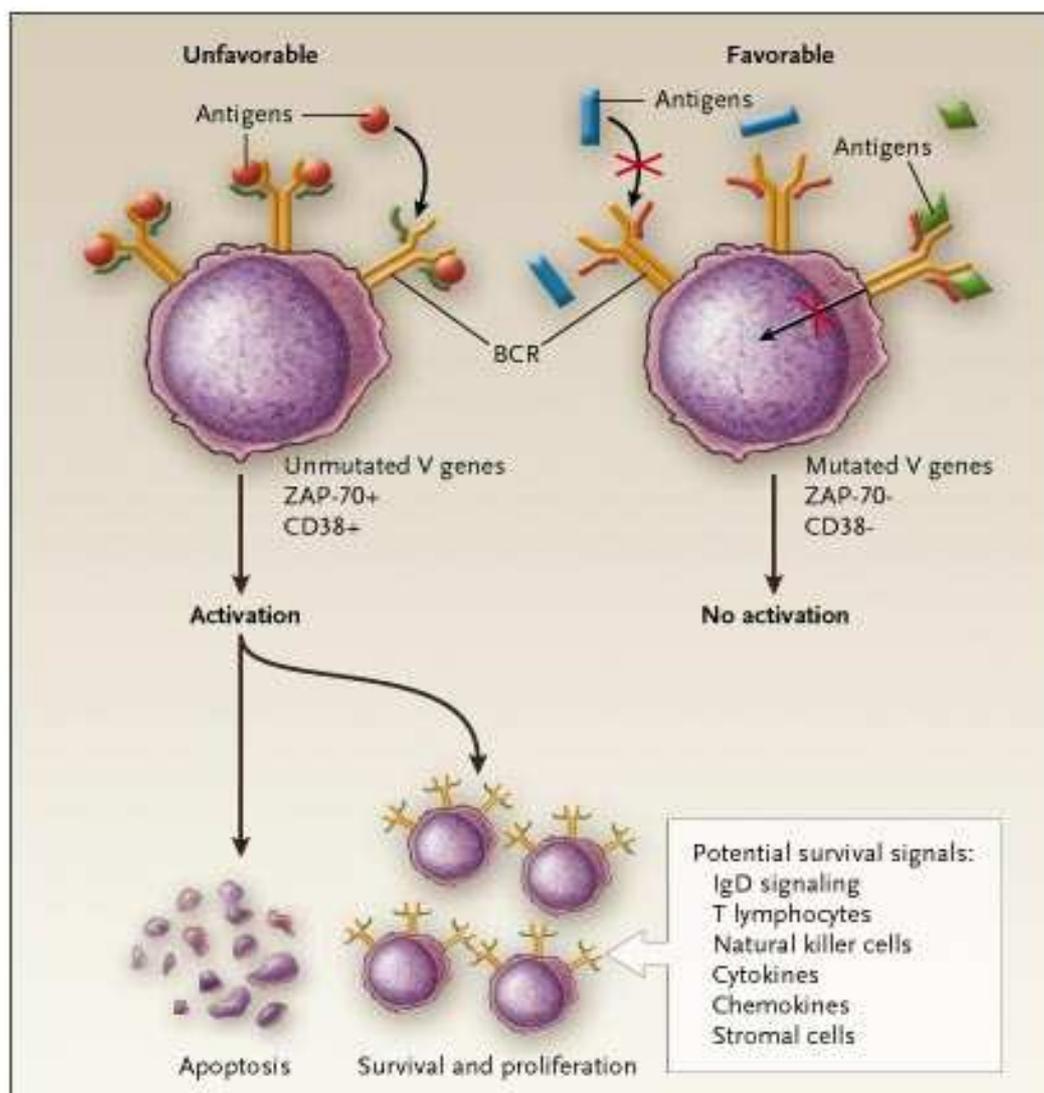
Sebbene il linfocita coinvolto nella patogenesi della LLC sia sempre maturo, i geni IGHV possono aver subito il processo di ipermutazione somatica oppure possono essere rimasti in configurazione germline, pur avendo incontrato l'antigene. La presenza/assenza di mutazioni somatiche nei geni IGHV suggerisce quindi un ruolo della stimolazione antigenica nella storia naturale della patologia (83), indicando una possibile selezione del clone leucemico da parte di un antigene self o non-self. Un'aumentata stimolazione del signaling del BCR potrebbe influenzare la proliferazione e la sopravvivenza cellulare con il risultato di una maggiore tendenza alla progressione della malattia.

Vi sono, in effetti, numerose evidenze che sottolineano l'importanza del ruolo del BCR e delle proteine ad esso connesse nella LLC: infatti, i) almeno la metà dei casi di LLC può essere stimolata *in vitro* attraverso le sIg (59, 84); ii) i casi di LLC con geni IGHV non mutati, che presentano generalmente una prognosi sfavorevole, sono maggiormente responsivi alla stimolazione del BCR (85); iii) un signaling attivo del BCR potrebbe contribuire ad una prognosi sfavorevole (86); iv) l'espressione di ZAP-70 è caratteristica dei casi di LLC con geni IGHV non mutati (61) e ZAP-70 amplifica il signaling, sostenuto prevalentemente da Syk, in risposta alla stimolazione del BCR (59); v) numerose chinasi correlate al BCR sono maggiormente espresse nella LLC rispetto ad altre neoplasie ematologiche, quali le leucemie acute linfoide di tipo B e T (87).

In concomitanza ad una sollecitazione del BCR per via della stimolazione antigenica, altri segnali provenienti dal microambiente possono rivestire un ruolo nel supportare la sopravvivenza o la crescita del clone leucemico. Tali segnali possono essere trasmessi o mediante contatto diretto con altri tipi cellulari, come cellule stromali, cellule nutrici e cellule T attivate, o mediante fattori solubili, come chemochine, citochine e fattori di crescita.

Quindi, come riassunto in Figura 6, quando le cellule di pazienti con LLC a prognosi sfavorevole sono stimulate dal legame di un antigene self al BCR, il bilancio tra i segnali trasmessi dal BCR e i segnali di sopravvivenza indotti da altre cellule o da fattori solubili, determineranno se le cellule neoplastiche prolifereranno o andranno incontro ad apoptosi. Al contrario, le cellule di pazienti con LLC a prognosi favorevole hanno minore capacità di attivare un programma apoptotico o proliferativo, sia a causa dell'inabilità di legare l'antigene per via delle mutazioni presenti sui geni IGHV, sia a causa di una difettiva trasduzione del segnale a livello del BCR. Questa perdita di stimolazione da parte del recettore può associarsi ad una minore aggressività della malattia.

Figura 6. Ruolo della stimolazione antigenica e dei segnali provenienti dal microambiente nelle LLC a diversa prognosi.



3.2. SCOPO DELLO STUDIO

La LLC è una patologia caratterizzata dall'espansione di linfociti B monoclonali, bloccati ad uno stadio differenziativo relativamente maturo. Tra le possibili cause di accumulo delle cellule leucemiche si possono annoverare sia un'alterata responsività della cellula neoplastica a segnali provenienti dal microambiente circostante, sia difetti nel meccanismo di trasduzione del segnale attraverso il BCR.

Considerato il ruolo della stimolazione antigenica nella LLC, lo scopo principale di tale studio è stato quello di caratterizzare la risposta delle cellule neoplastiche a due diverse tipologie di stimolazione - l'attivazione via cross-linking delle IgM e l'attivazione via cross-linking delle IgD - paragonando i campioni stimolati con le loro controparti non stimolate.

Per analizzare le eventuali variazioni riscontrate a livello trascrizionale in seguito alle suddette stimolazioni, è stata utilizzata la metodica dei microarrays in quanto consente di valutare, in un singolo esperimento, un ingente numero di geni. In particolare, per quanto riguarda lo studio del cross-linking delle IgM, sono state valutate principalmente le 24 ore post-stimolo, mentre, per quanto riguarda lo studio del cross-linking delle IgD, sono stati valutati due tempi, 24 e 48 ore dopo lo stimolo, in quanto i dati sperimentali attualmente disponibili sembrano mostrare un'attivazione più tardiva per questo tipo di stimolazione.

Alla luce di un probabile coinvolgimento del BCR anche nella progressione della malattia, un ulteriore obiettivo del progetto è stato quello di individuare possibili alterazioni del signaling cellulare in corso di stimolazione IgM e IgD nella LLC, allo scopo di trovare una possibile associazione tra alterazioni del meccanismo di trasduzione del segnale e specifiche caratteristiche clinico-biologiche; a tal fine, l'analisi del profilo di espressione genica è stata effettuata anche suddividendo i campioni in relazione ad alcuni importanti fattori prognostici.

Successivamente, i risultati ottenuti dallo studio della stimolazione delle IgM e delle IgD sono stati confrontati per l'identificazione di un pattern di geni comuni alla stimolazione e, allo

stesso tempo, per l'individuazione di quei trascritti che fanno invece la differenza nella trasduzione del segnale mediata dalle IgM e dalle IgD, soprattutto nell'intento di dare un contributo nella definizione del ruolo, ancora poco chiaro, svolto dalle IgD nella LLC.

Inoltre, tramite RT-Q-PCR sono stati analizzati i livelli di espressione di *SYK* e *ZAP-70* in seguito a cross-linking delle IgM, da un lato, per convalidare i dati ottenuti con i microarrays, dall'altro, per valutare gli effetti di questo tipo di stimolazione su alcune delle chinasi maggiormente coinvolte nel signaling del BCR.

Infine, per confermare il significato dei risultati ottenuti mediante il profilo di espressione genica nel corso di questo studio, sono stati effettuati test funzionali *in vitro* valutando, in seguito a stimolazione, la distribuzione del ciclo cellulare, la proliferazione e i livelli di apoptosi (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo).

3.3. RISULTATI

3.3.1. Analisi del profilo di espressione genica delle cellule di LLC in seguito a stimolazione delle IgM

Per valutare gli effetti della stimolazione del BCR nella LLC, dopo 24 ore di incubazione è stata eseguita un'analisi del profilo di espressione genica su cellule CD19+ isolate da 10 campioni di LLC non stimolate e stimolate con immunoglobuline anti-IgM. Le principali caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti analizzati sono riportate nella Tabella 2.

Il primo approccio utilizzato è stato quello dell'analisi *unsupervised*, nell'ambito della quale, applicando dei criteri di filtro non specifici su tutti i campioni (come indicato nei Materiali e Metodi), sono stati selezionati 673 probesets, corrispondenti a 635 geni. Come mostrato in Figura 7, l'*unsupervised hierarchical clustering* basato sull'espressione di questo set di geni ha identificato due cluster principali: il primo include esclusivamente pazienti di LLC con geni IGHV non mutati, mentre il secondo è costituito da tutti i casi di LLC con geni IGHV mutati e da un unico caso con geni IGHV non mutati (CLL-5).

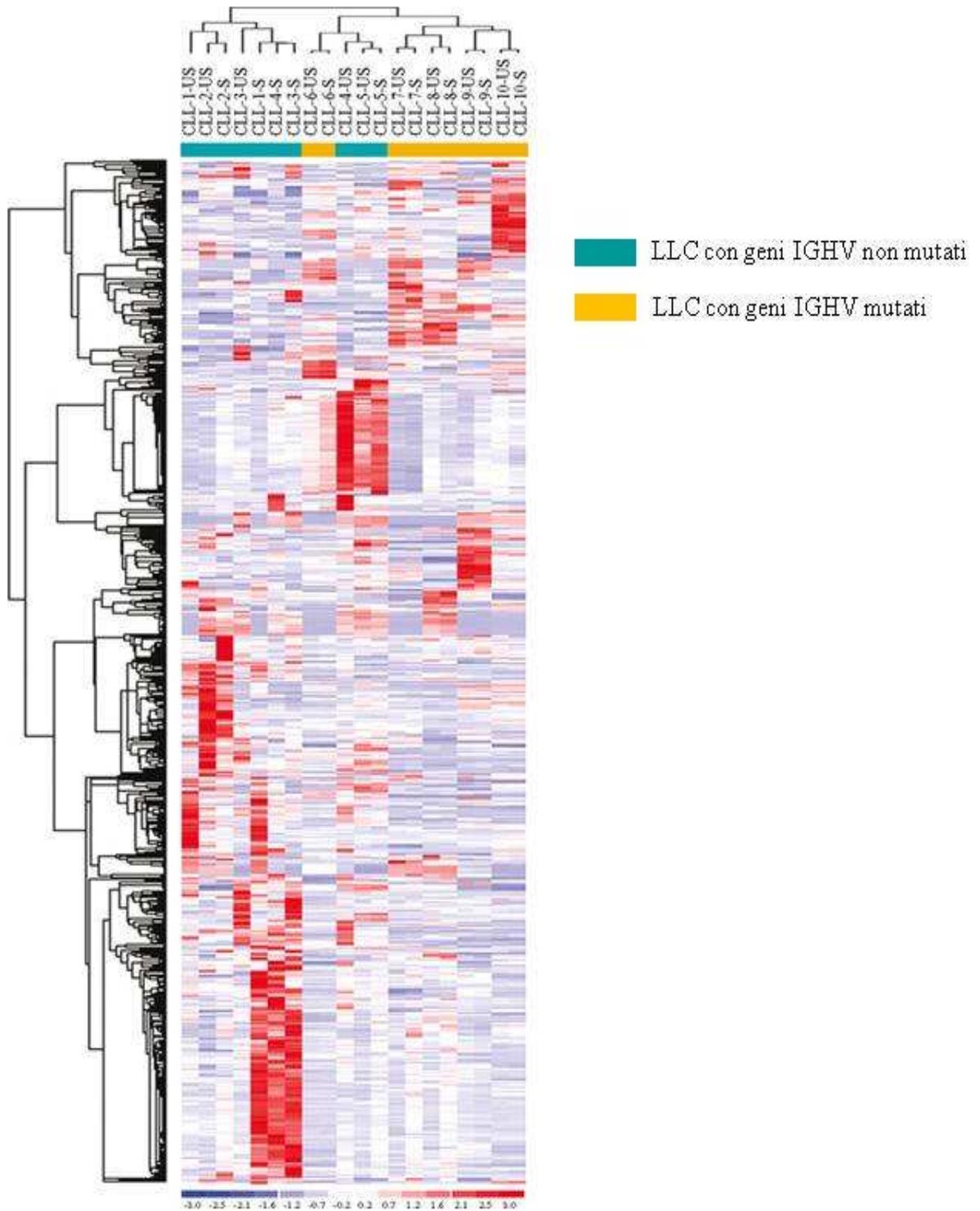
E' interessante notare che, in linea generale, per ciò che concerne i casi IGHV mutati, ciascun campione stimolato clusterizza strettamente con la propria controparte non stimolata. Al contrario, nell'ambito dei casi IGHV non mutati, i casi stimolati sono più strettamente associati agli altri campioni stimolati, piuttosto che alle proprie controparti non stimolate, indicando un forte effetto della stimolazione sul profilo trascrizionale dei casi IGHV non mutati.

Tabella 2. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti con LLC analizzati in seguito a stimolazione delle IgM.

Codice pazienti	Sesso	Età allo studio	Stadio Binet	Stato di malattia	IGHV status	Geni IGHV	ZAP-70 (%)	CD38 (%)	Analisi FISH
CLL-1	F	59	B	Progressiva	NM	3-33	90	3	Negativa
CLL-2	M	59	A	Follow-up breve	NM	1-69	65	76	del13q, del11q
CLL-3	M	45	A	Follow-up breve	NM	3-09	74	0	N.V.
CLL-4	M	49	B	Stabile	NM	1-69	76	1	del11q
CLL-5	M	59	B	Progressiva	NM	3-73	10	8	del13q, del14q, del6q
CLL-6	F	45	A	Stabile	M	4-34	0	1	del13q
CLL-7	F	41	B	Progressiva	M	2-05	4	0	del13q
CLL-8	M	34	A	Follow-up breve	M	3-72	0	0	del13q, del14q
CLL-9	F	39	B	Progressiva	M	4-34	19	1	del11q
CLL-10	M	58	A	Stabile	M	4-34	0	3	Negativa

Abbreviazioni. NM: non mutati; M: mutati; N.V.: non valutato.

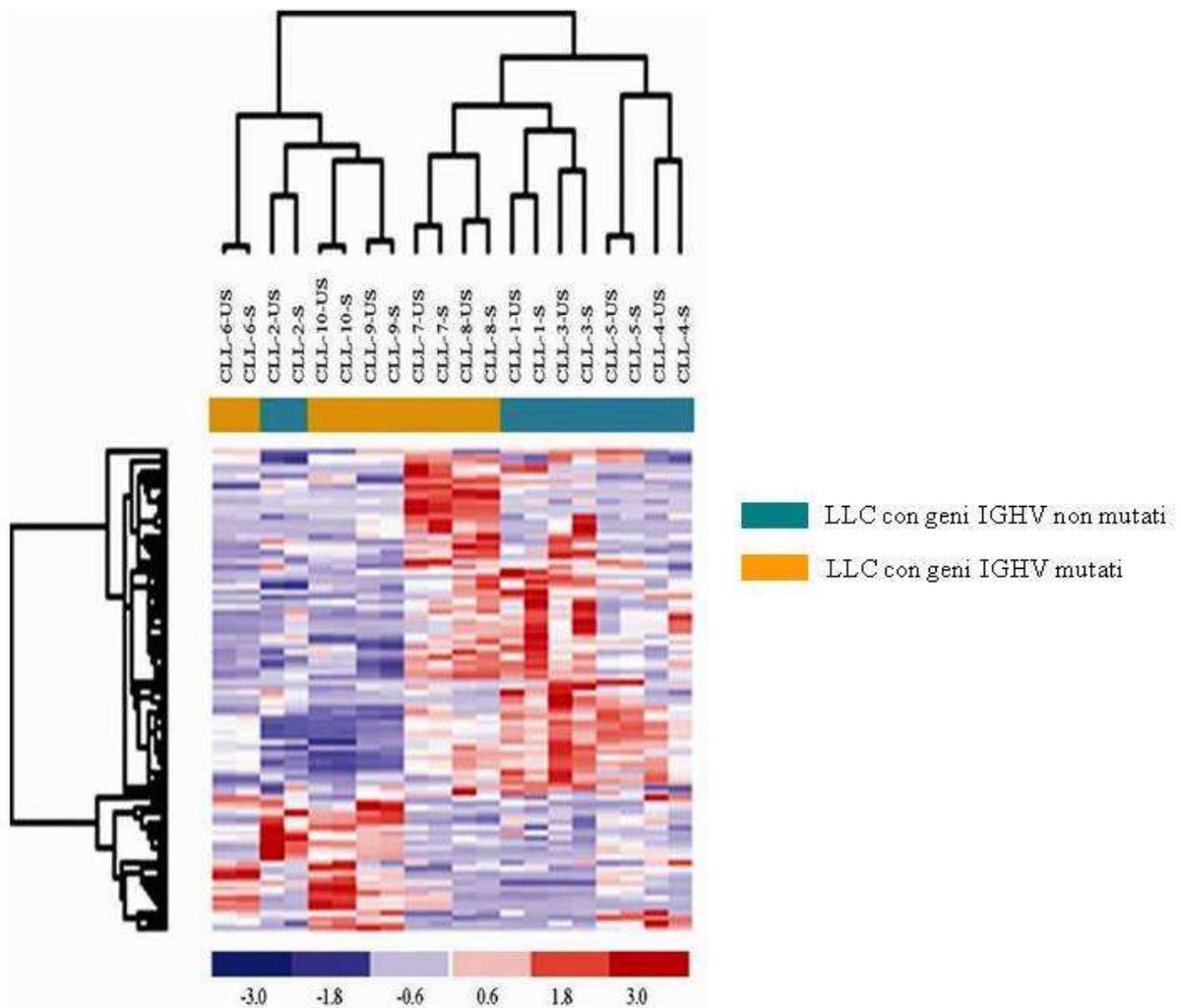
Figura 7. *Unsupervised hierarchical clustering* dei casi di LLC non stimolate (US) e stimolate (S) con immunoglobuline anti-IgM. I livelli di espressione genica sono rappresentati mediante una scala di colori: il rosso e il blu rappresentano, rispettivamente, livelli di espressione più alti e più bassi.



3.3.2. Identificazione dei geni modulati in seguito a cross-linking del BCR nelle cellule di LLC

Al fine di identificare i geni che vengono modulati in seguito a stimolazione del BCR, è stata effettuata, su tutti i campioni, un'analisi *supervised* in cui sono state confrontate le cellule di LLC stimolate rispetto alle loro controparti non stimolate. Utilizzando un t-test, 71 geni sono risultati differenzialmente espressi tra i due sottogruppi considerati. Inoltre, la stessa analisi ha evidenziato come la stimolazione del BCR induca dei cambiamenti rilevanti principalmente nell'ambito dei casi di LLC con geni IGHV non mutati (Figura 8).

Figura 8. Identificazione di 71 geni differenzialmente espressi tra casi di LLC non stimolate (US) e stimolate (S) con immunoglobuline anti-IgM.



3.3.3. Analisi del profilo di espressione genica associato alla stimolazione del BCR in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV nella LLC

Sia l'analisi *unsupervised* che l'analisi *supervised* hanno evidenziato delle differenze nel profilo di espressione genica associato al cross-linking delle IgM in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV dei campioni analizzati.

Sulla base di queste osservazioni, è stato nuovamente eseguito un confronto tra cellule di LLC stimolate e non stimolate nell'ambito dei casi con geni IGHV non mutati e mutati, rispettivamente.

Nell'ambito dei casi con geni IGHV non mutati, tale analisi ha identificato 197 geni differenzialmente espressi in corso di stimolazione del BCR, la maggior parte dei quali sono risultati altamente espressi nelle cellule stimolate (Figura 9A). Come riportato in Tabella 3, un vasto numero di tali geni codificano per proteine coinvolte principalmente nella via di trasduzione del segnale e/o nell'attivazione del BCR; in particolare, nell'ambito dei gruppi funzionali più rappresentati, vengono selezionati numerosi geni coinvolti nella trasduzione del segnale (*TNFAIP3*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP10*, *NPM1*, *SYK*, *CXCR4*, *CCL3*, *CCL4*, *HOMER1*), nella regolazione della trascrizione (*EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *NME1*, *NME2*, *ZNF238*, *TOP1MT*) e nel metabolismo (*LDHB*, *HSP90AB1*, *PMSCs*, *ATP2A3*). Diversi livelli di espressione vengono identificati anche in un set di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (*CCND2*, *CDK4*, *PTPN6*, *CHES1*) e nella riorganizzazione del citoscheletro (*ACTB*, *ACTG1*, *K-ALPHA1*, *TUBB*, *BICD2*).

Inoltre, è interessante notare che un ristretto numero di trascritti (*EGR3*, *NR4A1*, *DUSP4*, *LRMP*, *CD39* ed una sequenza sconosciuta) risulta up-regolato nei casi IGHV non mutati stimolati già 6 ore dopo il cross-linking delle IgM (Figura 9B), suggerendo che variazioni nell'espressione genica si verificano precocemente e aumentano nel corso del tempo.

Contrariamente a quanto evidenziato nei casi con geni IGHV non mutati, quando lo stesso approccio viene applicato nell'ambito dei casi IGHV mutati, nessun gene risulta differenzialmente espresso tra le cellule stimulate e non stimulate, indicando una diversa responsività del BCR nelle due sottoclassi di LLC analizzate.

Figura 9. A-B: confronto tra cellule non stimulate (US) e stimulate (S) con immunoglobuline anti-IgM nell'ambito dei casi di LLC con geni IGHV non mutati. **(A)** Identificazione di 197 geni differenzialmente espressi tra campioni US e S 24 ore dopo il cross-linking del BCR; **(B)** identificazione di 6 geni differenzialmente espressi tra campioni US e S dopo 6 ore di stimolazione. Gli stessi geni risultano up-regolati anche a 24 ore.

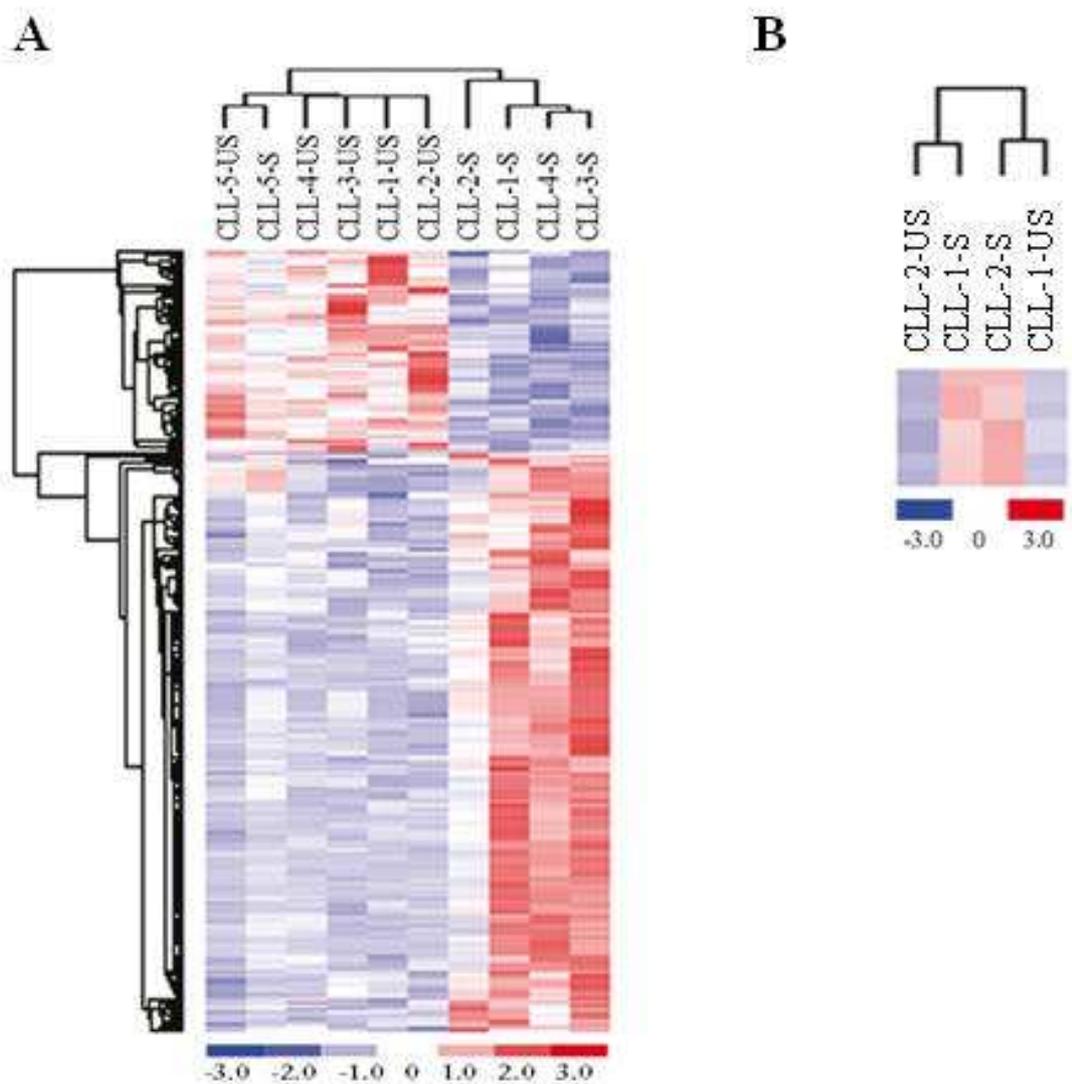


Tabella 3. Lista dei geni differenzialmente espressi tra campioni stimolati e non stimolati nell'ambito delle LLC con geni IGHV non mutati (NM). I geni sono ordinati sulla base del loro p-value.

Probesets	Nomi dei geni	P-value	Fold change	Funzione	Espressione nei casi NM dopo stimolo delle IgM
201030_x_at	LDHB	0.000991	1.57	Metabolismo degli acidi tricarbossilici	Alta
213757_at	Sconosciuto	0.003809	1.80	-	Alta
213214_x_at	ACTG1	0.004293	2.22	Motilità cellulare	Alta
201694_s_at	EGR1	0.006181	9.42	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
202314_at	CYP51A1	0.006241	2.13	Trasporto elettronico	Alta
235122_at	Sconosciuto	0.009106	2.31	-	Alta
209218_at	SQLE	0.010197	1.93	Trasporto elettronico	Alta
200790_at	ODC1	0.010421	2.40	Biosintesi delle poliamine	Alta
217869_at	HSD17B12	0.010843	1.68	Biosintesi degli steroidi	Alta
204440_at	CD83	0.011315	4.77	Risposta immune	Alta
211058_x_at	K-ALPHA-1	0.011423	1.55	Movimento basato sui microtubuli	Alta
209795_at	CD69	0.013146	2.06	Risposta immune	Alta
201064_s_at	PABPC4	0.013508	1.59	Processamento dell'RNA	Alta
219971_at	IL21R	0.014061	2.67	Attivazione delle cellule natural killer	Alta
211724_x_at	FLJ20323	0.014157	1.76	-	Alta
226397_s_at	TBC1D7	0.016011	2.58	-	Alta
221750_at	HMGCS1	0.016182	1.68	Metabolismo lipidico	Alta
217398_x_at	GAPDH	0.016285	1.69	Metabolismo glucidico	Alta
242260_at	MATR3	0.016449	2.68	-	Alta
205249_at	EGR2	0.016882	15.50	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
222062_at	IL27RA	0.017859	1.82	Risposta immune	Alta
201892_s_at	IMPDH2	0.018364	1.93	Metabolismo	Alta
224707_at	C5orf32	0.018427	1.52	-	Alta
212803_at	NAB2	0.018718	1.96	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
206206_at	CD180	0.019024	1.80	Risposta immune	Alta
200801_x_at	ACTB	0.019143	1.57	Motilità cellulare	Alta
208696_at	CCT5	0.019199	1.68	Folding delle proteine	Alta
208057_s_at	GLI2	0.019665	1.79	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
208680_at	PRDX1	0.020446	2.00	Proliferazione cellulare	Alta
204794_at	DUSP2	0.021525	8.42	Defosforilazione delle proteine	Alta
223751_x_at	TLR10	0.021873	1.94	Risposta immune	Alta
201516_at	SRM	0.021912	1.95	Biosintesi della spermidina	Alta
201268_at	NME2	0.022349	1.77	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
208693_s_at	GARS	0.022624	2.58	Biosintesi delle proteine	Alta
212811_x_at	SLC1A4	0.023304	2.10	Trasporto cellulare	Alta
209959_at	NR4A3	0.023377	2.06	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
201587_s_at	IRAK1	0.023912	1.60	Trasduzione del segnale	Alta
202340_x_at	NR4A1	0.023975	1.69	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
237753_at	Sconosciuto	0.024674	2.96	-	Alta
209836_x_at	BOLA2	0.025683	1.81	-	Alta
200953_s_at	CCND2	0.026067	2.72	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
229659_s_at	PIGR	0.026481	1.99	Secrezione delle proteine	Alta
201859_at	PRG1	0.026522	1.99	-	Alta
224406_s_at	FCRL5	0.026633	1.76	-	Alta

226459_at	PIK3AP1	0.02664	1.65	-		Alta
202391_at	BASP1	0.026878	2.62	-		Alta
204621_s_at	NR4A2	0.027282	9.65	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente		Alta
200068_s_at	CANX	0.027581	1.61	Angiogenesi		Alta
213793_s_at	HOMER1	0.028019	6.07	Attivante del pathway della fosfolipasi C		Alta
201577_at	NME1	0.028239	3.22	Ciclo cellulare		Alta
201079_at	SYNGR2	0.028436	2.04	-		Alta
227291_s_at	BOLA3	0.028692	1.80	-		Alta
201013_s_at	PAICS	0.028706	2.38	Biosintesi dei nucleotidi purinici		Alta
212038_s_at	VDAC1	0.029415	2.21	Trasporto		Alta
1568618_a_at	GALNT1	0.029575	1.98	Glicosilazione delle proteine		Alta
213638_at	PHACTR1	0.029576	3.93	-		Alta
217848_s_at	PPA1	0.029577	2.83	Metabolismo		Alta
223361_at	C6orf115	0.030539	3.83	-		Alta
213925_at	C1orf95	0.031242	2.77	-		Alta
224677_x_at	C11orf31	0.031454	1.74	Omeostasi redox della cellula		Alta
225913_at	KIAA2002	0.031498	1.50	Fosforilazione delle proteine		Alta
207668_x_at	PDIA6	0.031599	1.75	Folding delle proteine; omeostasi redox della cellula		Alta
227353_at	Sconosciuto	0.031613	1.67	-		Alta
226167_at	SYT7	0.031877	1.76	Trasporto		Alta
215346_at	CD40	0.031946	1.55	Regolazione della proliferazione della cellula B		Alta
206115_at	EGR3	0.031967	15.41	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente		Alta
200064_at	HSP90AB1	0.032926	1.79	Folding delle proteine		Alta
217850_at	GNL3	0.033195	1.54	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare		Alta
211714_x_at	TUBB	0.033446	1.70	Motilità cellulare		Alta
201585_s_at	SFPQ	0.033736	1.56	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente		Alta
201000_at	AARS	0.03409	2.22	Biosintesi delle proteine		Alta
204674_at	LRMP	0.034098	2.51	Trasporto vescicolare		Alta
236099_at	Sconosciuto	0.034249	7.75	-		Alta
212691_at	NUP188	0.034375	1.54	-		Alta
203880_at	COX17	0.03452	1.52	Folding delle proteine		Alta
202081_at	IER2	0.034837	1.80	-		Alta
200625_s_at	CAP1	0.035129	1.70	Organizzazione e biogenesi dell'actina citoscheletrica		Alta
209441_at	RHOBTB2	0.035578	1.50	Trasduzione del segnale		Alta
212129_at	NIPA2	0.035737	1.56	-		Alta
224468_s_at	C19orf48	0.035754	1.65	-		Alta
200822_x_at	TPI1	0.035772	1.52	Metabolismo		Alta
226034_at	Sconosciuto	0.035922	11.09	-		Alta
222494_at	CHES1	0.036742	1.51	Ciclo cellulare		Alta
206760_s_at	FCER2	0.037033	1.69	-		Alta
202110_at	COX7B	0.037071	1.59	Trasporto elettronico		Alta
205114_s_at	CCL3	0.037327	38.34	Omeostasi del calcio		Alta
200629_at	WARS	0.03735	6.41	Biosintesi delle proteine		Alta
204014_at	DUSP4	0.037407	20.11	Defosforilazione delle proteine		Alta
208758_at	ATIC	0.037561	1.60	Biosintesi dei nucleotidi purinici		Alta
221923_s_at	NPM1	0.037659	1.51	Trasporto intracellulare delle proteine		Alta
202643_s_at	TNFAIP3	0.037665	2.00	Anti-apoptosi		Alta
216323_x_at	H2-ALPHA	0.037869	1.79	Movimento basato sui microtubuli		Alta
223054_at	DNAJB11	0.037956	1.66	Folding delle proteine		Alta
228320_x_at	CCDC64	0.038005	1.81	-		Alta
224903_at	CIRH1A	0.038067	1.56	Trasporto		Alta
221563_at	DUSP10	0.038167	3.70	Defosforilazione delle proteine		Alta
243931_at	CD58	0.038336	1.95	Adesione cellula-cellula		Alta

209473_at	Sconosciuto	0.038355	1.90	-	Alta
209104_s_at	NOLA2	0.038586	1.73	Processamento dell'rRNA	Alta
226264_at	SUSD1	0.038795	4.75	-	Alta
201114_x_at	PSMA7	0.039075	1.54	Movimento basato sui microtubuli	Alta
201263_at	TARS	0.039231	1.95	Biosintesi delle proteine	Alta
220966_x_at	ARPC5L	0.039319	1.69	Regolazione della polimerizzazione dei filamenti di actina	Alta
210162_s_at	NFATC1	0.040334	1.67	Transizione G ₁ /S del ciclo cellulare	Alta
201195_s_at	SLC7A5	0.040748	4.25	Metabolismo degli aminoacidi	Alta
205599_at	TRAF1	0.041067	1.60	Trasduzione del segnale	Alta
1559067_a_at	Sconosciuto	0.04117	4.61	-	Alta
217809_at	BZW2	0.041588	1.65	Regolazione dell'inizio della trascrizione	Alta
209383_at	DDIT3	0.041643	1.96	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
214430_at	GLA	0.041873	1.79	Metabolismo	Alta
226633_at	RAB8B	0.041913	1.60	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
201622_at	SND1	0.042121	1.58	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
208885_at	LCP1	0.042936	2.38	Formazione dei filamenti di actina	Alta
224654_at	DDX21	0.043053	2.11	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Alta
205269_at	LCP2	0.0433	1.79	Risposta immune	Alta
212295_s_at	SLC7A1	0.043431	3.51	Metabolismo degli aminoacidi	Alta
225676_s_at	WDSOF1	0.043538	1.79	-	Alta
244261_at	IL28RA	0.043561	1.52	Regolazione negativa della proliferazione cellulare	Alta
214096_s_at	SHMT2	0.043915	1.98	Metabolismo della glicina	Alta
228238_at	GAS5	0.044115	1.61	-	Alta
201198_s_at	PSMD1	0.044144	1.58	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
202246_s_at	CDK4	0.044914	1.62	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
223058_at	FAM107B	0.044989	1.59	-	Alta
218239_s_at	GTPBP4	0.045048	1.50	Biogenesi dei ribosomi	Alta
212671_s_at	HLA-DQA1	0.045132	1.70	Risposta immune	Alta
200807_s_at	HSPD1	0.045136	1.71	Folding delle proteine	Alta
202149_at	NEDD9	0.045416	2.11	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
217739_s_at	PBEF1	0.045548	2.42	Trasduzione del segnale	Alta
201422_at	IFI30	0.045617	1.84	Risposta immune	Alta
229437_at	BIC	0.04577	2.23	-	Alta
202397_at	NUTF2	0.046168	1.59	Trasporto delle proteine	Alta
201923_at	PRDX4	0.046561	1.92	Fosforilazione di I-kappaB	Alta
204032_at	BCAR3	0.046632	1.68	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
202421_at	IGSF3	0.046643	3.31	-	Alta
201761_at	MTHFD2	0.047715	4.17	Metabolismo	Alta
201947_s_at	CCT2	0.048079	1.52	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Alta
200634_at	PFN1	0.048661	1.56	Organizzazione e biogenesi del citoscheletro	Alta
215967_s_at	LY9	0.0487	1.85	Adesione cellulare	Alta
223207_x_at	PHPT1	0.04877	1.64	Defosforilazione delle proteine	Alta
204103_at	CCL4	0.048873	17.24	Motilità cellulare	Alta
213734_at	Sconosciuto	0.049056	1.84	-	Alta
201762_s_at	PSME2	0.049195	1.86	Risposta immune	Alta
204744_s_at	IARS	0.049613	2.23	Biosintesi delle proteine	Alta
206687_s_at	PTPN6	0.049848	2.02	Defosforilazione delle proteine	Alta

220987_s_at	C11orf17	0.001045	1.53	Fosforilazione delle proteine	Bassa
222150_s_at	LOC54103	0.002479	1.57	-	Bassa
226101_at	PRKCE	0.003573	1.57	Fosforilazione delle proteine	Bassa
235170_at	ZNF92	0.004051	1.74	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Bassa
228762_at	LFNG	0.004085	1.96	Sviluppo	Bassa
212774_at	ZNF238	0.004855	1.52	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Bassa
225768_at	NR1D2	0.005096	1.70	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Bassa
220341_s_at	LOC51149	0.005289	1.66	-	Bassa
33304_at	ISG20	0.005995	1.64	Catabolismo del DNA e dell'RNA	Bassa
225656_at	EFHC1	0.006208	1.72	Omeostasi del calcio	Bassa
229070_at	C6orf105	0.006997	1.61	-	Bassa
213154_s_at	BICD2	0.007141	1.73	Biosintesi delle proteine	Bassa
234725_s_at	SEMA4B	0.007145	1.63	Sviluppo	Bassa
208206_s_at	RASGRP2	0.008167	1.60	Regolazione della crescita cellulare	Bassa
226068_at	SYK	0.010182	1.62	Signaling del BCR	Bassa
228793_at	JMJD1C	0.013647	1.53	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Bassa
225623_at	KIAA1737	0.013923	1.56	-	Bassa
206170_at	ADRB2	0.014119	1.58	Trasduzione del segnale	Bassa
227020_at	YPEL2	0.015549	1.63	-	Bassa
201853_s_at	CDC25B	0.016639	1.85	Regolazione della progressione attraverso il ciclo cellulare	Bassa
228377_at	KLHL14	0.017374	1.55	-	Bassa
219073_s_at	OSBPL10	0.017997	1.61	Trasporto lipidico	Bassa
226106_at	RNF141	0.018644	1.61	Regolazione della trascrizione, DNA-dipendente	Bassa
1562089_at	GLYATL1	0.018686	2.09	-	Bassa
209829_at	C6orf32	0.019374	1.61	-	Bassa
214366_s_at	ALOX5	0.019646	1.64	Trasporto elettronico	Bassa
222557_at	STMN3	0.021285	1.78	Trasduzione del segnale	Bassa
238604_at	Sconosciuto	0.02195	1.51	-	Bassa
205510_s_at	FLJ10038	0.022225	1.55	-	Bassa
230224_at	LOC644353	0.023066	1.77	-	Bassa
211919_s_at	CXCR4	0.02338	1.50	Trasduzione del segnale	Bassa
228549_at	PLEKHG4	0.023396	1.78	Metabolismo	Bassa
219505_at	CECR1	0.025641	1.57	Sviluppo	Bassa
225802_at	TOP1MT	0.026138	1.62	Cambiamenti topologici del DNA	Bassa
238376_at	DEXI	0.027011	1.60	-	Bassa
235432_at	NPHP3	0.02908	1.51	Metabolismo lipidico	Bassa
208914_at	GGA2	0.029542	1.55	Trasporto intracellulare delle proteine	Bassa
208438_s_at	FGR	0.030048	1.53	Fosforilazione delle proteine	Bassa
238429_at	TMEM71	0.030068	1.81	-	Bassa
219574_at	MARCH1	0.030076	1.60	-	Bassa
207522_s_at	ATP2A3	0.036669	1.53	Trasporto degli ioni calcio	Bassa
213839_at	KIAA0500	0.037251	1.85	-	Bassa
239292_at	Sconosciuto	0.037589	1.82	-	Bassa
230997_at	TTC21A	0.038464	1.84	-	Bassa
229383_at	Sconosciuto	0.038954	1.55	-	Bassa
1569703_a_at	CORO1C	0.042998	1.93	Organizzazione e biogenesi dell'actina	Bassa
225051_at	EPB41	0.043796	1.56	Organizzazione e biogenesi dell'actina	Bassa
225360_at	TRABD	0.044374	1.59	-	Bassa
235385_at	Sconosciuto	0.046704	1.80	-	Bassa
228465_at	Sconosciuto	0.046794	1.51	-	Bassa
239533_at	GPR155	0.047321	1.63	Trasduzione del segnale	Bassa
207571_x_at	C1orf38	0.048653	1.54	Adesione cellulare	Bassa
219452_at	DPEP2	0.04955	1.88	Proteolisi	Bassa

3.3.4. Correlazione tra la stimolazione del BCR e alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della LLC

Nonostante l'analisi *supervised* abbia messo in evidenza nella LLC una diversa responsività del BCR in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV, tramite l'*unsupervised hierarchical clustering* è possibile notare il comportamento anomalo di tre campioni (CLL-5, CLL-7 e CLL-8) rispetto alla stimolazione (Figura 7); infatti, mentre due casi di LLC con geni IGHV mutati sembrano mostrare una parziale modulazione di alcuni geni dopo stimolazione del BCR, un caso di LLC con geni IGHV non mutati presenta, invece, una scarsa responsività al cross-linking delle IgM, suggerendo che altri fattori potrebbero influenzare la trasduzione del segnale attraverso il BCR.

Per chiarificare questo aspetto, sono stati analizzati diversi fattori clinico-biologici, di cui alcuni con rilevanza prognostica nella LLC, quali l'espressione del CD38 e di ZAP-70 e la presenza di alcune alterazioni citogenetiche. L'unico parametro che è risultato fortemente correlato con la risposta del BCR alla stimolazione è rappresentato dai livelli di espressione delle IgM, valutato mediante microarrays. Infatti, sebbene l'espressione delle IgM sia rilevabile in tutti i casi di LLC analizzate sia a livello dell'mRNA che a livello proteico (dati non mostrati), i casi non responsivi alla stimolazione del BCR presentano livelli di espressione più bassi delle IgM.

Inoltre, i livelli di espressione delle IgM non subiscono variazioni in seguito alla stimolazione.

3.3.5. Valutazione dell'espressione di *SYK* e *ZAP-70* tramite RT-Q-PCR in seguito a stimolazione del BCR

Come precedentemente descritto, tra le differenti chinasi coinvolte nell'attivazione del BCR, Syk rappresenta un intermediario precoce di tale via di trasduzione del segnale nella cellula B (82). *ZAP-70*, una tirosin chinasi della famiglia di Syk, svolge un ruolo nell'incrementare il signaling attraverso il BCR in seguito a cross-linking delle IgM nella LLC (59).

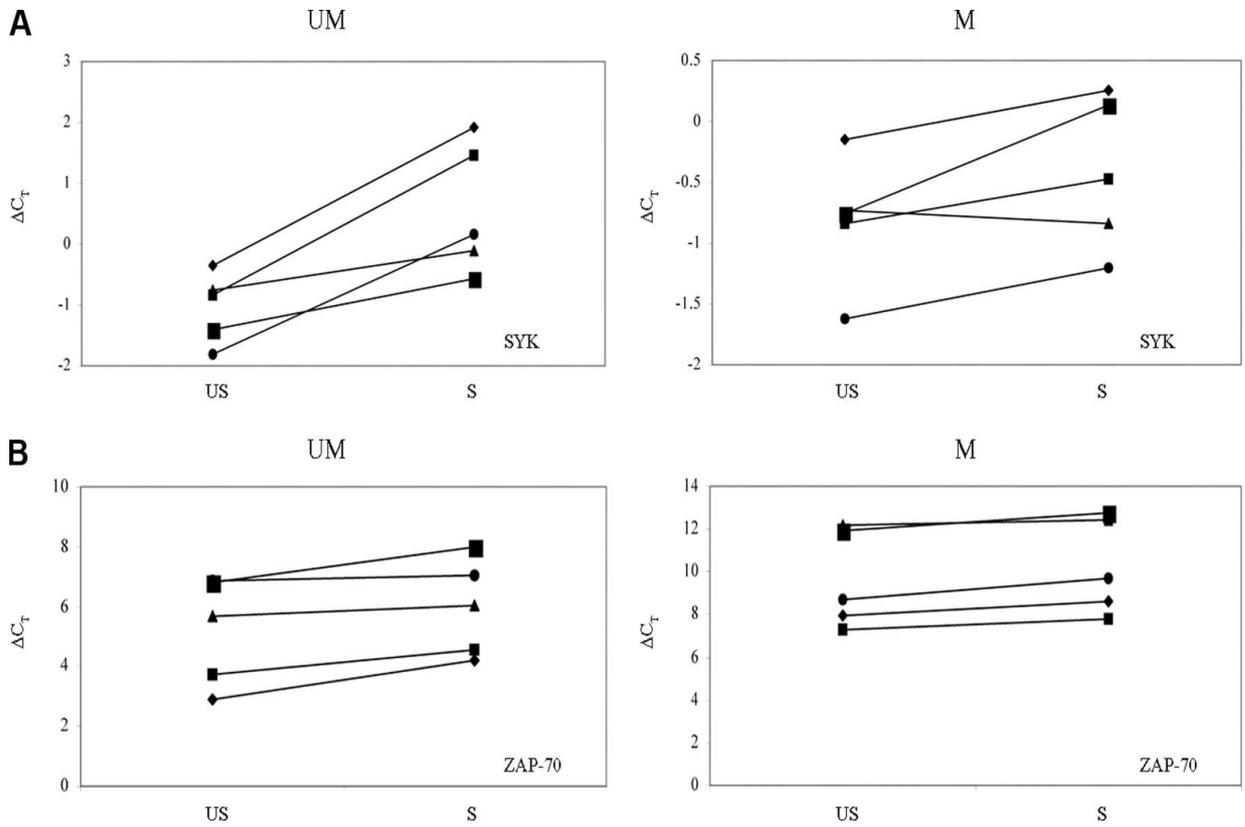
Al fine di analizzare le variazioni di queste due chinasi in seguito a stimolazione del BCR, i livelli di espressione di *SYK* e *ZAP-70* sono stati valutati mediante RT-Q-PCR nelle cellule di LLC non stimolate e stimolate con immunoglobuline anti-IgM. In particolare, l'analisi è stata eseguita su 10 campioni, suddivisi in 5 casi con geni IGHV non mutati e 5 casi con geni IGHV mutati.

Come riportato in Figura 10A, i risultati ottenuti hanno mostrato che l'espressione di *SYK* diminuisce nelle cellule di LLC stimolate rispetto a quelle non stimolate; tale down-modulazione è risultata statisticamente significativa ($p = 0.009$) esclusivamente nei casi con geni IGHV non mutati.

Al contrario, nessuna differenza significativa è stata osservata nei livelli di espressione di *ZAP-70* in seguito a stimolazione tanto nei casi di LLC con geni IGHV non mutati quanto in quelli con geni IGHV mutati (Figura 10B).

Nel complesso questi risultati, oltre a convalidare i dati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica, indicano che *SYK*, ma non *ZAP-70*, è differenzialmente modulata in seguito a stimolazione del BCR in relazione allo stato mutazionale dei campioni.

Figura 10. Livelli di espressione di *SYK* (A) e *ZAP-70* (B) 24 ore dopo il cross-linking delle IgM in cellule non stimolate (US) e stimolate (S) di casi di LLC con geni IGHV non mutati (UM) e casi di LLC con geni IGHV mutati (M). I valori di espressione genica sono espressi in termini di ΔC_T : bassi valori di ΔC_T corrispondono ad alti livelli di espressione genica.



3.3.6. Analisi del profilo di espressione genica delle cellule di LLC in seguito a stimolazione delle IgD

Allo scopo di valutare gli effetti del cross-linking delle IgD nella LLC, rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione, è stata eseguita un'analisi del profilo di espressione genica su cellule CD19+ isolate da 11 campioni di LLC non stimolate e stimolate con immunoglobuline anti-IgD. Le principali caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti analizzati sono riportate nella Tabella 4.

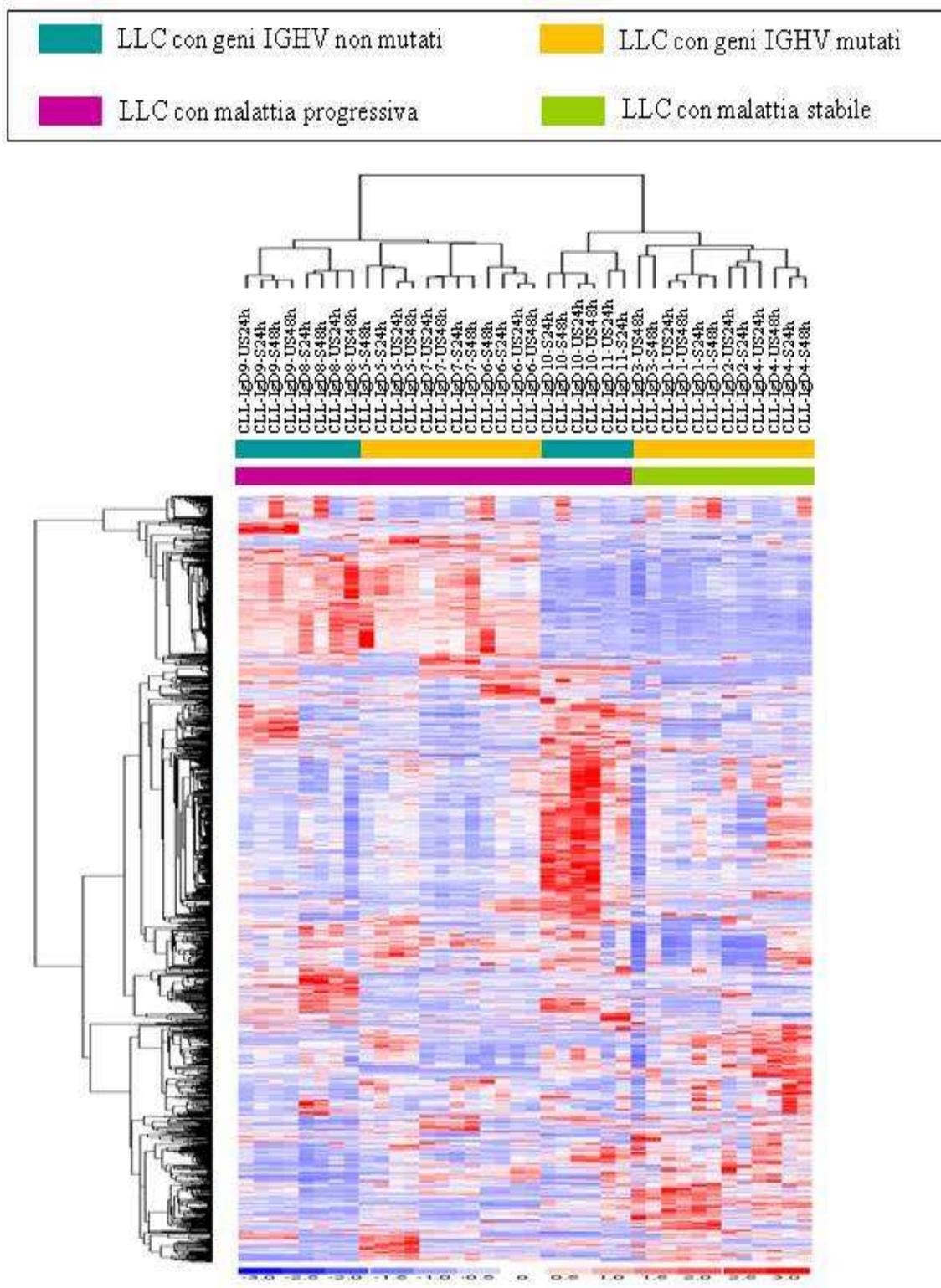
Analogamente allo studio della stimolazione del BCR, anche in questo caso, come primo approccio, è stata effettuata un'analisi *unsupervised* su tutti i campioni, con i criteri indicati nei Materiali e Metodi. L'*unsupervised hierarchical clustering*, basato sull'espressione dei 947 geni selezionati nell'ambito di questa analisi, ha evidenziato che la variabilità intra-campione ha un'influenza maggiore sul profilo di espressione genica rispetto alla stimolazione delle IgD. Inoltre, a differenza di quanto emerso dal cross-linking delle IgM, in questo contesto la clusterizzazione dei campioni risulta indipendente sia dallo stato mutazionale dei geni IGHV che dallo stato di malattia dei casi analizzati (Figura 11).

Tabella 4. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti con LLC analizzati in seguito a stimolazione delle IgD.

Codice pazienti	Sesso	Età allo studio	Stadio Binet	Stato di malattia	IGHV status	Geni IGHV	ZAP-70 (%)	CD38 (%)	Analisi FISH
CLL-IgD1	F	62	A	Stabile	M	4-34	0	1	Negativa
CLL-IgD2	F	50	A	Stabile	M	4-34	0	0	del13q
CLL-IgD3	F	48	A	Stabile	M	4-31	0	1	del13q
CLL-IgD4	F	63	A	Stabile	M	3-07	32	1	del13q
CLL-IgD5	F	48	B	Progressiva	M	2-05	4	0	del13q
CLL-IgD6	M	49	A	Progressiva	M	4-34	0	1	del13q
CLL-IgD7	M	56	B	Progressiva	M	4-59	0	0	Negativa
CLL-IgD8	F	58	A	Progressiva	NM	4-39	0	0	del13q
CLL-IgD9	M	-	B	Progressiva	NM	1-69	21	71	del13q
CLL-IgD10	M	48	A	Progressiva	NM	4-04	44	19	del13q
CLL-IgD11	M	49	A	Progressiva	NM	3-09	74	0	Negativa

Abbreviazioni. NM: non mutati; M: mutati.

Figura 11. *Unsupervised hierarchical clustering* dei casi di LLC non stimolate (US) e stimolate (S) con immunoglobuline anti-IgD. I livelli di espressione genica sono rappresentati mediante una scala di colori: il rosso e il blu rappresentano, rispettivamente, livelli di espressione più alti e più bassi.



3.3.7. Identificazione dei geni modulati in seguito a cross-linking delle IgD nelle cellule di LLC

Al fine di identificare i geni che vengono modulati in seguito alla stimolazione delle IgD, è stato utilizzato, su tutti i campioni, un approccio *supervised* in cui sono state paragonate, rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione, le cellule di LLC stimolate rispetto alle loro controparti non stimolate.

Nell'ambito del t-test eseguito 24 ore dopo il cross-linking delle IgD, dal confronto tra le cellule di LLC stimolate e non stimolate sono risultati differenzialmente espressi 290 geni, la maggior parte dei quali sono down-modulati in seguito a stimolazione (Figura 12A). Inoltre, un vasto numero di geni identificati in questa analisi codifica per proteine implicate nel signaling cellulare e/o nel processamento dell'antigene; infatti, tra le categorie funzionali più significativamente rappresentate, vengono selezionati numerosi geni coinvolti nel differenziamento cellulare (*SYK*, *CD79A*, *CD79B*, *CD24*, *CD27*, *FCRLA*, *PTPN6*, *S100A4*, *S100A6*, *PAFAH1B1*, *CEBPB*, *TCL1A*), nella trasduzione del segnale (con un coinvolgimento delle vie di Rho, di Ras, delle piccole GTPasi e della cascata dell'NFkB), nella risposta agli stimoli (*HSPA1A*, *HSPA8*, *LDHA*, *MX1*, *MX2*, *CAT*, *DUP10*, *MAP2K3*), nell'apoptosi (*CD24*, *CD27*, *LY86*, *CD319*, *SQSTM1*, *TP53INP1*, *MDM4*, *TNFRSF14*) e nella motilità cellulare (*CD31*, *CD62L*, *CXCR3*, *IL16*, *LSP1*, *CORO1A*, *VIM*).

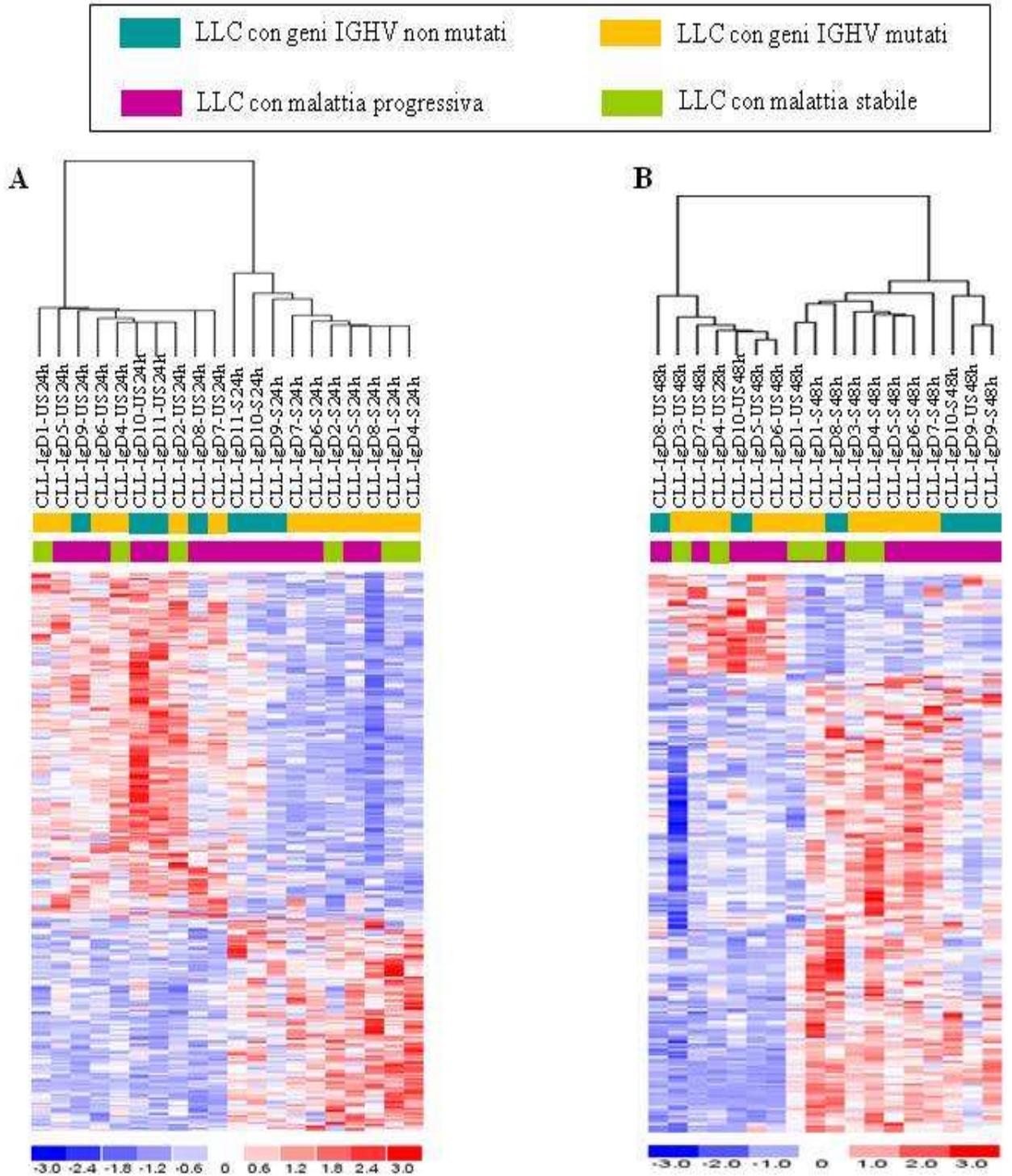
Infine, tale analisi ha evidenziato come, contrariamente a quanto osservato in seguito alla stimolazione del BCR, tutti i casi di LLC analizzati in questo studio risultino responsivi alla stimolazione delle IgD, indipendentemente dallo stato mutazionale dei geni IGHV.

Quando lo stesso approccio è stato applicato alle 48 ore, sono stati identificati 188 geni differenzialmente espressi tra cellule di LLC stimolate e non stimolate (Figura 12B). Diversamente dall'analisi effettuata alle 24 ore, in questo caso la maggior parte dei geni selezionati è risultata altamente espressa in seguito a cross-linking delle IgD, indicando

un'attivazione tardiva per questo tipo di stimolazione. Infatti, in accordo con questo risultato, solo 73 dei geni identificati nell'analisi a 48 ore è in comune alla stessa analisi effettuata alle 24 ore. Tra le categorie funzionali più significativamente rappresentate a 48 ore, vengono selezionati geni coinvolti nel metabolismo cellulare (*DDX24, ATRX, FOXP1, MTHFD2, ASNS, FAS, ACADVL, ALOX5, MARS*), nella regolazione positiva dell'espressione genica (*BPTF, NFAT-90, IRF1, NR4A2, KLF2*), nel processamento dell'RNA (*RBM25, RBM39, SRRM1, SRRM2, RNPC3, SFRS8*), nell'apoptosi (*CD24, BCL3, TRIB3, ATF5, TNFRSF14*) e nel differenziamento (*CD24, PTPN6, CEBPB, CEBPG, MAFG*).

Infine, anche nell'analisi a 48 ore è possibile evidenziare una risposta di tutti i campioni di LLC al cross-linking delle IgD, confermando quanto già emerso dalle 24 ore. Ciononostante, in due casi (CLL-IgD1 e CLL-IgD9) l'effetto della stimolazione sul profilo di espressione genica sembra essere più debole.

Figura 12. Identificazione dei geni differenzialmente espressi tra casi di LLC non stimolate (US) e stimolate (S) rispettivamente 24 (A) e 48 ore (B) dopo il cross-linking delle IgD.



3.3.8. Analisi del profilo di espressione genica associato alla stimolazione delle IgD in relazione ad alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della LLC

Sebbene tutti i campioni di LLC analizzati in questo studio siano risultati responsivi alla stimolazione, l'effetto del cross-linking delle IgD è stato valutato anche in relazione ad alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della LLC. A tale scopo, l'analisi del profilo di espressione genica è stata effettuata suddividendo i campioni sulla base di due importanti fattori prognostici, come lo stato mutazionale dei geni IGHV e lo stato di malattia.

In seguito a 24 ore di incubazione, mediante un t-test sono state paragonate le cellule di LLC stimulate e non stimulate ripartendo i campioni, una prima volta, tra casi con geni IGHV mutati e casi con geni IGHV non mutati, e, una seconda volta, tra casi di LLC con malattia stabile e casi con malattia progressiva (dati non mostrati). In accordo con i risultati emersi dal t-test effettuato su tutti i campioni, indipendentemente dal parametro valutato, molti dei geni selezionati in queste analisi, oltre ad essere down-modulati in seguito a cross-linking delle IgD, codificano per proteine coinvolte principalmente nella trasduzione del segnale. E' interessante però notare che, a prescindere dal numero di geni identificati in ciascun confronto, solo una parte dei trascritti risulta comune alla stimolazione quando suddividiamo i campioni nelle categorie sopra indicate.

Tali risultati sono stati confermati anche quando il paragone tra le cellule di LLC stimulate e non stimulate è stato eseguito combinando i due fattori prognostici. In particolare, l'effetto della stimolazione delle IgD è stato valutato, dopo 24 ore di incubazione, ripartendo i campioni in casi con geni IGHV non mutati e malattia progressiva, casi con geni IGHV mutati e malattia progressiva e, infine, casi con geni IGHV mutati e malattia stabile.

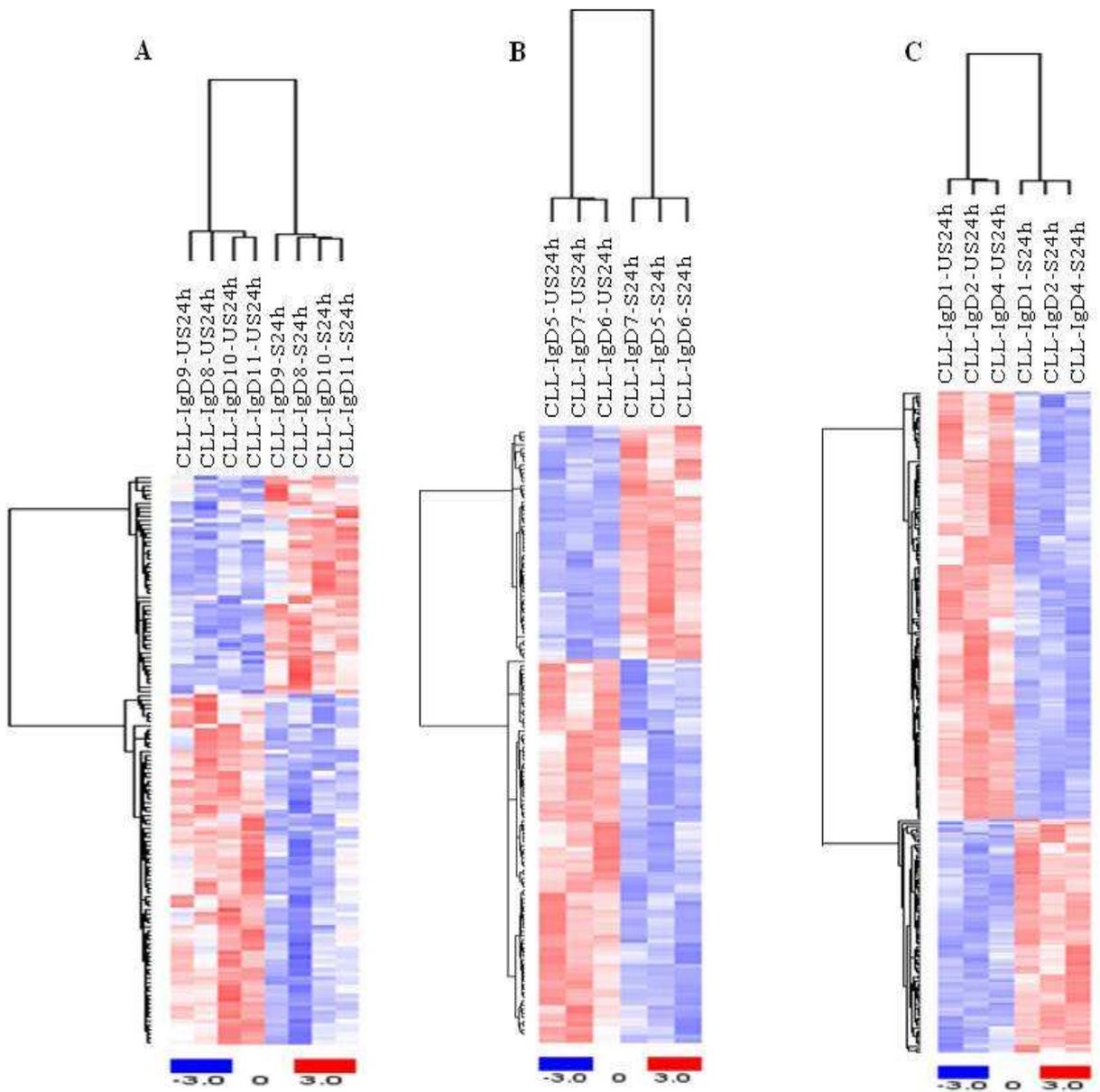
Come precedentemente descritto, anche in questo caso, sebbene il numero di geni differenzialmente espressi in seguito a cross-linking delle IgD sia risultato, rispettivamente, di

111 nel primo sottogruppo di pazienti, 128 nel secondo e 209 nel terzo (Figura 13), solo 19 geni sono comuni alle tre analisi.

Risultati analoghi, infatti, sono stati ottenuti quando lo stesso approccio delle 24 ore è stato utilizzato per le analisi a 48 ore (dati non mostrati). L'unica differenza riscontrata tra le analisi effettuate ai due diversi tempi di stimolazione riguarda il fatto che, a 48 ore, indipendentemente dai fattori prognostici considerati, la maggior parte dei geni selezionati risultano altamente espressi nelle cellule stimulate, confermando quanto già emerso dalle analisi eseguite su tutti i campioni.

Nell'insieme, queste osservazioni suggeriscono, quindi, una possibile influenza, sia da parte dello stato mutazionale dei geni IGHV che dello stato di malattia dei campioni analizzati, sulla responsività della LLC al cross-linking delle IgD e consente di identificare un piccolo set di geni comuni che vengono costantemente modulati in corso di stimolo, ed un secondo gruppo di geni che vengono modulati in modo specifico nelle categorie sovraindicate.

Figura 13. Identificazione dei geni differenzialmente espressi tra casi di LLC non stimolate (US) e stimolate (S) 24 ore dopo il cross-linking delle IgD, rispettivamente in casi con geni IGHV non mutati e malattia progressiva (**A**), casi con geni IGHV mutati e malattia progressiva (**B**) e casi con geni IGHV mutati e malattia stabile (**C**).



3.3.9. Confronto tra l'effetto della stimolazione delle IgM e l'effetto della stimolazione delle IgD sull'espressione genica delle cellule di LLC

Dopo aver analizzato separatamente gli effetti del cross-linking delle IgM e del cross-linking delle IgD sul profilo di espressione genica nella LLC, i risultati ottenuti con questi due tipi di stimolazione sono stati infine paragonati tra loro.

Specificamente, i dati ottenuti dal t-test effettuato tra le cellule di LLC stimulate e non stimulate, rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione con immunoglobuline anti-IgD, sono stati confrontati con la lista di geni che sono risultati modulati, in seguito a cross-linking del BCR, nei casi con geni IGHV non mutati. Nell'ambito di questa analisi è stato possibile identificare un piccolo gruppo di geni comuni al cross-linking delle IgM e a quello delle IgD; tra questi, la maggior parte dei geni sono risultati coinvolti nella biosintesi degli aminoacil-tRNA (*AARS*, *IARS*, *TARS*, *GARS*, *WARS*) o in altre vie metaboliche (*MTHFD2*, *ALOX5*, *OSBPL10*, *SLC7A5*, *SLC7A1*, *RNF141*) ma è stata riscontrata anche la presenza di alcuni trascritti coinvolti nella trasduzione del segnale della cellula B e nella regolazione del ciclo cellulare (*CD229*, *CD307*, *SYK*, *PTPN6*, *LFNG*, *CDC25B*).

La maggior parte dei geni selezionati nel corso delle analisi differiscono, però, in relazione al tipo di stimolazione eseguita. Tale osservazione è ancora più evidente se vengono paragonate le categorie funzionali significativamente rappresentate in seguito a stimolazione: per quanto riguarda il cross-linking del BCR, infatti, oltre al coinvolgimento di numerosi geni implicati nella trasduzione del segnale, sono stati individuati diversi trascritti codificanti per proteine che regolano l'organizzazione citoscheletrica, la proliferazione e la sopravvivenza; per quanto riguarda, invece, il cross-linking delle IgD, le due funzioni più rappresentate a livello genico, oltre quella del signaling, sono il differenziamento cellulare e l'apoptosi.

Un'ulteriore differenza tra la stimolazione delle IgM e la stimolazione delle IgD, è rappresentata dal fatto che la risposta al cross-linking del BCR è fortemente influenzata dalle

caratteristiche biologiche dei campioni considerati, in particolare lo stato mutazionale dei geni IGHV e i livelli di espressione delle IgM di membrana. In relazione a tali risultati, nelle cellule di LLC stimulate e non stimulate sono stati valutati anche i livelli di espressione delle IgD. Contrariamente a quanto emerso dalle analisi sulle IgM, non in tutti i casi è possibile rilevare un'espressione significativa delle IgD, sebbene tali differenze non si associno ad una diversa responsività del campione alla stimolazione. Inoltre, nell'ambito dei casi progressivi, i livelli di espressione delle IgD subiscono una down-modulazione in seguito alla stimolazione.

3.4. DISCUSSIONE

La LLC è una patologia caratterizzata da un andamento clinico estremamente variabile. Nel corso degli anni, diversi sono stati gli sforzi eseguiti nel tentativo di identificare i possibili meccanismi alla base di tale eterogeneità e coinvolti nella progressione della malattia. Alla luce di queste osservazioni e visto il ruolo svolto dalla stimolazione antigenica nella LLC, l'obiettivo del presente studio è stato quello di analizzare l'effetto di due diverse tipologie di stimoli, il cross-linking delle IgM e il cross-linking delle IgD, sull'espansione del clone leucemico. A tale scopo, è stato scelto un modello sperimentale *in vitro* che ha previsto l'uso di immunoglobuline anti-IgM e anti-IgD immobilizzate, in quanto questa condizione sembra mimare al meglio le condizioni dell'attivazione, *in vivo*, della cellula B (88).

L'impatto dei due diversi tipi di stimolazione a livello della trascrizione genica, è stato valutato utilizzando la metodica dei microarrays.

Per quanto riguarda la stimolazione delle IgM, i risultati ottenuti nell'ambito di questo studio hanno dimostrato una diversa risposta delle cellule di LLC in seguito a questo tipo di stimolo, correlabile con lo stato mutazionale dei geni IGHV: infatti, sono state riscontrate variazioni del profilo di espressione genica in seguito a cross-linking del BCR esclusivamente nei casi di LLC con geni IGHV non mutati. In tale sottogruppo di campioni, le categorie funzionali maggiormente coinvolte in questo tipo di stimolazione sono risultate la trascrizione, la trasduzione del segnale, la regolazione del ciclo cellulare e l'organizzazione del citoscheletro; è interessante notare che, all'interno di queste categorie, sono stati identificati diversi membri appartenenti alla stessa famiglia genica, come nel caso di *CCL3* e *CCL4*, entrambi coinvolti nell'omeostasi del calcio e nella motilità cellulare, o come nel caso dei fattori di trascrizione EGR (di cui ritroviamo *EGR1*, *EGR2* ed *EGR3*), NR4A (di cui ritroviamo *NR4A1*, *NR4A2* e *NR4A3*) e NME (di cui ritroviamo *NME1* e *NME2*).

Inoltre, in accordo con quanto riportato in lavori precedenti (54), i risultati ottenuti hanno indicato che il cross-linking delle IgM induce una variazione nell'espressione genica di numerosi trascritti che controllano sia la sopravvivenza che la proliferazione cellulare nell'ambito dei casi di LLC con geni IGHV non mutati. In particolare, tra i geni che regolano la sopravvivenza, in seguito a stimolazione del BCR è stato osservato un coinvolgimento di tutte e tre le vie di segnalazione delle MAPK, come dimostrato i) dall'incrementata espressione di *NFATC1*, un fattore implicato nella trasduzione del segnale di ERK e delle JNK (89); ii) dalla down-modulazione del *CDC25B*, un fattore a valle della cascata della p38 (90); iii) dalla variazione dei livelli di espressione di diversi membri delle DUSP – i.e. *DUSP2*, *DUSP4* e *DUSP10* -, una famiglia di fosfatasi importante per la regolazione dell'attività chinasi (91). Tra i geni invece coinvolti nella proliferazione, la stimolazione induce l'iperespressione di *CCND2* e *CDK4*. Complessivamente, queste osservazioni sono in linea con i dati di Muzio e colleghi (92), che recentemente hanno individuato, nell'attivazione di ERK1/2 e nell'aumentata transattivazione di NF-AT, la “signature” molecolare della risposta alla stimolazione delle sIg nella LLC.

Inoltre, questi dati sono stati confermati a livello funzionale dall'analisi del ciclo cellulare e da saggi di proliferazione (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo), indicando che la stimolazione del BCR contribuisce effettivamente alla sopravvivenza delle LLC con geni IGHV non mutati rispetto a quelle con geni IGHV mutati.

In accordo con quanto descritto finora, se, da un lato, è ben chiaro il contributo dato dall'aumento della sopravvivenza cellulare nella patogenesi della LLC, dall'altro, il ruolo dell'apoptosi nella progressione della malattia è ancora ampiamente dibattuto. A tale riguardo, dati contrastanti sono stati, infatti, ottenuti in cellule di LLC in seguito a stimolazione delle IgM. In passato, diversi lavori hanno riportato un'aumento dell'apoptosi parzialmente

correlato all'espressione del CD38 in seguito a cross-linking del BCR (93, 94). Più recentemente, Ricciardi e colleghi (95) hanno dimostrato che le cellule leucemiche derivanti da pazienti con malattia stabile sono più suscettibili all'apoptosi rispetto alle cellule leucemiche dei pazienti con malattia progressiva; infine, altri autori hanno indicato che le cellule di LLC presentano un alterato meccanismo di induzione dell'apoptosi che può essere correlato all'attività di Lyn, una tirosin chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale e costitutivamente attivata nelle cellule leucemiche (96).

In questo studio, l'analisi del profilo di espressione genica ha mostrato che, in seguito a stimolazione del BCR, un numero molto ristretto di geni coinvolti nella regolazione dell'apoptosi risulta up-regolato esclusivamente nei casi di LLC con geni IGHV non mutati, suggerendo che l'apoptosi svolge un ruolo minore nel cross-linking delle IgM. E' interessante però notare che tutti i geni selezionati in questa categoria esercitano una funzione anti-apoptotica; infatti, è stato riscontrato un incremento dell'espressione di una serie di trascritti coinvolti nella via di traduzione del segnale del TNF e dell'NFkB che inibiscono la morte cellulare programmata, come nel caso del *CD40*, di *TRAF* e di *TNFAIP3*.

Per confermare questi risultati, a livello funzionale è stato valutato il grado di apoptosi delle cellule di LLC in seguito a cross-linking del BCR (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo): un incremento dei livelli di apoptosi è stato riscontrato dopo stimolo esclusivamente nell'ambito del sottogruppo di LLC con geni IGHV mutati. Nel complesso, queste osservazioni, unite ai dati precedentemente descritti, indicano che la stimolazione delle IgM contribuisce alla sopravvivenza delle cellule di LLC con geni IGHV non mutati mentre nei casi di LLC con geni IGHV mutati, non essendo attivato alcun segnale pro-proliferativo e anti-apoptotico, le cellule muoiono portando a compimento un programma apoptotico già intrinsecamente attivato.

I risultati ottenuti in questo studio differiscono da quanto riportato recentemente da Vallat e colleghi (97), che hanno valutato il profilo di espressione genica di cellule B derivanti da pazienti affetti da LLC e da donatori sani a diversi tempi, ma più precoci, di stimolazione delle IgM. Infatti, gli autori hanno osservato, in seguito a cross-linking del BCR, un aumento dei livelli di apoptosi nei casi di LLC rispetto alle cellule B normali; inoltre, nell'ambito dello stesso lavoro, è stata inaspettatamente riscontrata l'up-regolazione di diversi geni pro-apoptotici in campioni con malattia progressiva. Tra le possibili cause che possono aver contribuito ad una discordanza di risultati, è importante sottolineare che i) le caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti analizzati nei due lavori sono profondamente diverse; ii) nel presente studio sono stati valutati dei tempi di stimolazione prolungati, che trovano più facile riscontro con i dati funzionali; ciononostante, un piccolo gruppo di geni che risulta up-regolato dopo lo stimolo è già identificabile a 6 ore e confermato a 24 ore; iii) vi sono due questioni di tipo metodologico: la prima riguarda il fatto che Vallat e colleghi (97) utilizzano per la stimolazione IgM solubili anziché immobilizzate, la seconda riguarda il fatto che, nel presente studio, non sono state analizzate le cellule B derivanti dai donatori sani, che potrebbero aver interferito con la normalizzazione dei campioni e, quindi, con l'analisi del profilo di espressione genica.

Infine, la risposta alla stimolazione del BCR è risultata correlata, oltre allo stato mutazionale dei geni IGHV, all'espressione delle IgM, come provato dal fatto che livelli trascrizionali più alti di questa molecola sono stati riscontrati nei casi di LLC con geni IGHV non mutati. Tali risultati indicano che i livelli di IgM svolgono un ruolo più importante in questo tipo di stimolazione rispetto ad altri fattori prognostici caratteristici della LLC, quali il CD38 e ZAP-70. Nella casistica riportata in questo studio, un solo paziente esprimeva il CD38 e pertanto non è stato possibile definire il suo ruolo nel cross-linking delle IgM. Per quanto riguarda ZAP-70, in letteratura è stato riportato che i suoi livelli di espressione, in diverse

sottopopolazioni di linfociti B normali, possono essere modulati in seguito alla stimolazione del BCR e sono più alti nelle cellule recentemente attivate dall'antigene (98). Inoltre, nelle cellule di LLC, l'attivazione di ZAP-70 in seguito a cross-linking delle IgM è risultata trascurabile quando confrontata a quella di Syk, dimostrando che il ruolo di ZAP-70 nel signaling del BCR probabilmente è quello di mantenimento dello stimolo e di amplificazione del segnale nonché di ridurre l'internalizzazione del recettore (99). In linea con queste osservazioni, nell'ambito del presente studio non sono state riscontrate variazioni nei livelli di espressione di ZAP-70 in seguito a stimolazione delle IgM tanto nei casi di LLC con geni IGHV non mutati quanto nei casi di LLC con geni IGHV mutati. Al contrario, è stata evidenziata una differenza significativa nell'espressione di SYK dopo lo stimolo esclusivamente nei campioni con geni IGHV non mutati, confermando il ruolo predominante di questa molecola nella trasduzione del segnale del BCR (82).

Il ruolo svolto dalle IgD nella LLC è ancora fortemente dibattuto e pochi studi sono disponibili sull'argomento. A differenza dello studio sulle IgM, nell'intento di analizzare eventuali cambiamenti riportati a livello trascrizionale in seguito a cross-linking delle IgD, le cellule di LLC sono state valutate a due diversi tempi, di cui uno più tardivo (48 ore), poiché Zupo e colleghi (94) hanno precedentemente riportato che, sebbene l'attivazione del signaling cellulare sia un evento precoce tanto nella stimolazione delle IgD quanto in quella delle IgM, variazioni della vitalità cellulare sono riscontrabili in seguito a cross-linking delle IgD solo a distanza di 4/5 giorni dalla stimolazione. In accordo con queste osservazioni, nel presente studio, mentre a 24 ore la maggior parte dei geni sono risultati down-modulati in seguito a cross-linking delle IgD, un'attivazione genica consistente è stata evidenziata solo a 48 ore; tali risultati sono stati corroborati dal fatto che, esaminando le categorie funzionali selezionate in relazione a questo tipo di stimolazione nelle diverse analisi, a 24 ore è estremamente

rappresentata la trasduzione del segnale mentre a 48 ore la regolazione positiva dell'espressione genica e l'attivazione della trascrizione da parte della RNA polimerasi II.

Inoltre, in accordo con i dati funzionali riportati in altri lavori (94), nel presente studio è emerso che, analogamente ai risultati ottenuti dal cross-linking delle IgM, anche nella stimolazione delle IgD vengono modulati i geni che codificano per numerose chinasi, tra cui Syk, coinvolte nel signaling del BCR, confermando che negli eventi precoci di queste due vie di trasduzione del segnale vengono attivate le stesse molecole, specifiche della cellula B. Viceversa, maggiori differenze tra stimolazione IgM e stimolazione IgD sono emerse in relazione ai fattori di trascrizione attivati, suggerendo che gli eventi più tardivi di questi due tipologie di stimolazione prevedono invece programmi trascrizionali molto diversi.

Tra le categorie funzionali più significative in seguito alla stimolazione delle IgD, sia a 24 che a 48 ore, sono state individuate quella del differenziamento cellulare e dell'apoptosi. Il dato sul differenziamento è in linea con quanto Zupo e colleghi (94) hanno già documentato circa la capacità delle cellule di LLC CD38+ di differenziare in plasmacellule dopo stimolazione con IgD ed IL2. Al contrario, nello stesso lavoro, il cross-linking delle IgD non ha effetto sui livelli apoptotici dei campioni analizzati bensì induce un aumento della sopravvivenza cellulare. Analogamente a quanto precedentemente descritto per le IgM, anche in relazione alla stimolazione delle IgD il ruolo dell'apoptosi è ancora poco chiaro; infatti, anche in questo caso, studi diversi riportano dati discordanti. I risultati ottenuti nell'ambito del presente lavoro sono in linea con quelli di Peckham e colleghi (100), dove viene riportato che la stimolazione delle IgD, a basse concentrazioni, è più efficiente di quella delle IgM ad accelerare l'ingresso delle cellule in apoptosi. Nello stesso studio, è stato però indicato che l'effetto della stimolazione è fortemente influenzato da alcuni parametri metodologici, quali la concentrazione e la tipologia (solubile o immobilizzata) di anticorpo utilizzato. Queste ragioni potrebbero essere alla base di una discordanza di risultati osservati.

Comunque, per validare i dati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica, il grado di apoptosi delle cellule di LLC in seguito a cross-linking delle IgD è stato valutato anche a livello funzionale (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo): in tutti i casi esaminati è stato confermato un aumento dei livelli di apoptosi dopo stimolo.

Come evidenziato sia dall'analisi *unsupervised* che dall'analisi *supervised*, la principale differenza riscontrata tra la stimolazione delle IgM e quella delle IgD risiede nella diversa responsività dei campioni. Infatti, se da un lato, l'attivazione della cellula di LLC in seguito a cross-linking del BCR è strettamente associata allo stato mutazionale dei geni IGHV e all'espressione delle IgM, dall'altro, il cross-linking delle IgD è in grado di indurre una variazione del profilo di espressione genica in tutti i casi di LLC considerati, indipendentemente dalle loro caratteristiche clinico-biologiche. Come riportato in altri lavori (84, 101), una non responsività dei campioni al cross-linking delle IgM non altera, quindi, la capacità di risposta della cellula di LLC alla stimolazione delle IgD. Complessivamente, queste osservazioni corroborano l'evidenza che questi due tipi di stimolazione presentano dei pattern di risposta differenti, nonostante sia stato identificato un esiguo gruppo di geni che risulta modulato in entrambe le vie di trasduzione del segnale.

Infine, nonostante tutti i campioni esaminati nello studio siano risultati responsivi al cross-linking delle IgD, le analisi sono state effettuate anche considerando alcuni parametri clinico-biologici caratteristici della patologia, specialmente in relazione al fatto che, in un recente lavoro (102), è stata messa in evidenza una rilevanza prognostica della risposta allo stimolo delle IgD nella LLC. I dati ottenuti in questo studio hanno mostrato che, quando i campioni vengono suddivisi in vari sottogruppi, sulla base dello stato mutazionale dei geni IGHV e dello stato di malattia, emergono delle differenze, sia a 24 che a 48 ore, nei profili di espressione genica attivati in seguito a stimolazione. Di conseguenza, questi risultati non

escludono una possibile influenza da parte di alcuni fattori biologici nella responsività della cellula di LLC al cross-linking delle IgD.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che esiste una diversa responsività alla stimolazione del BCR tra casi di LLC con geni IGHV non mutati e casi di LLC con geni IGHV mutati. Inoltre, in linea con questi risultati, l'analisi del profilo di espressione genica in questi campioni ha permesso di individuare numerosi geni differenzialmente espressi in corso di stimolazione esclusivamente nei casi con geni IGHV non mutati. Esperimenti *in vitro* hanno infine corroborato tali osservazioni mostrando differenze, in seguito a cross-linking delle IgM, nella distribuzione del ciclo cellulare, nell'attività proliferativa e nei livelli di apoptosi correlabili allo stato mutazionale dei campioni, supportando l'ipotesi che la risposta agli stimoli da parte del BCR può svolgere un ruolo cruciale nella progressione della malattia nei casi con geni IGHV non mutati.

Al contrario, la stimolazione delle IgD induce nella LLC una risposta di tipo apoptotico e differenziativo indipendente dalle caratteristiche clinico-biologiche dei campioni considerati, sebbene delle differenze a livello del profilo di espressione genica siano riscontrabili in diverse categorie di pazienti.

CAPITOLO 4

STUDIO 2: Valutazione del profilo di espressione genica associato alle protein chinasi nella leucemia linfatica cronica

4.1. INTRODUZIONE

4.1.1. Ruolo fisiologico delle protein chinasi

Le protein chinasi (PK) sono enzimi in grado di trasferire gruppi fosfato da molecole donatrici ad alta energia (come l'ATP) a residui amminoacidici di specifici substrati, in un processo definito come fosforilazione. Il gruppo di enzimi che catalizza la reazione inversa, ossia la defosforilazione, è invece denominato fosfatasi. Fisiologicamente, la fosforilazione è un processo reversibile: l'attività di qualunque proteina regolata da fosforilazione dipende infatti dall'equilibrio, in ogni momento, fra le attività delle chinasi che la fosforilano e quelle delle fosfatasi che la defosforilano.

La fosforilazione solitamente risulta in un cambiamento funzionale della proteina substrato che si esplica in vari modi: i) mediante un cambiamento dell'attività enzimatica, ii) mediante una rilocalizzazione cellulare, iii) mediante l'associazione con altre proteine. Si ipotizza che più del 30% di tutte le proteine siano modificate da un'attività chinasica; le PK, infatti, regolano la maggior parte delle vie di trasduzione del segnale, rivestendo un ruolo centrale in diversi processi biologici della cellula come il metabolismo, il riarrangiamento del citoscheletro, l'adesione, la migrazione, il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi (103).

Le chinasi rappresentano il gruppo più grande di enzimi presenti in natura: si tratta spesso di molecole strutturalmente molto simili tra loro, ma dotate di una specificità di substrato

estremamente elevata. Si stima che il genoma umano sia in grado di codificare per circa 550 chinasi e 130 fosfatasi (104).

La famiglia delle PK comprende due sottofamiglie: le tirosin chinasi (TRK) e le serin-treonin chinasi (STRK) (105).

Le TRK trasferiscono gruppi fosfato ai gruppi idrossilici di specifici residui tirosinici presenti nelle proteine substrato. Le TRK sono a loro volta divise in due classi principali: i recettori ad attività tirosin chinasi (RTRK) e le tirosin chinasi non recettoriali.

i) RTRK.

Questa classe di proteine è costituita da recettori localizzati sulla superficie cellulare, composti da un dominio extracellulare di legame al ligando, un dominio transmembrana idrofobico ed un dominio intracellulare catalitico ad attività tirosin chinasi. In assenza del ligando, i RTRK sono monomerici, non fosforilati e il loro dominio chinasi è in conformazione inattiva. Il legame tra il ligando e il dominio extracellulare del recettore induce la dimerizzazione dello stesso con conseguente autofosforilazione di residui tirosinici del dominio catalitico e cambiamenti nella struttura terziaria che provocano l'attivazione della proteina (106). Una volta attivati, i RTRK possono fosforilare le proteine substrato e, attraverso i propri residui fosforilati, fungere da sito di attacco per proteine implicate nella cascata del segnale (107).

ii) TRK non recettoriali.

Questa classe comprende proteine che mancano del dominio transmembrana e sono localizzate nel citoplasma, nel nucleo o sulla superficie interna della membrana plasmatica. Le TRK non recettoriali sono mantenute nel loro stato inattivo attraverso proteine e lipidi inibitori e, come avviene per alcuni RTRK, hanno un dominio

autoinibitorio che stabilizza la proteina nella conformazione non attiva (108). L'attivazione delle TRK non recettoriali può essere stimolata da molteplici segnali intracellulari attraverso diversi meccanismi, quali la dissociazione degli inibitori, il reclutamento a livello dei recettori transmembrana o la fosforilazione da parte di altre chinasi (109).

Le STRK trasferiscono gruppi fosfato ai residui delle serine e delle treonine (che hanno catene laterali simili) presenti nelle proteine substrato. L'attività di queste chinasi può essere indotta da eventi specifici come un danno al DNA, tanto quanto da numerosi segnali chimici. Appartengono alla sottofamiglia delle STRK le CDK (Cyclin-Dependent Kinases), che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare, e le MAPK, che regolano varie attività cellulari come la mitosi, il differenziamento, la sopravvivenza e l'apoptosi.

4.1.2. Meccanismi di deregolazione delle protein chinasi nelle neoplasie ematologiche

La generazione di diversi tipi cellulari nell'ambito dell'ematopoiesi è regolata da una complessa rete di trasduzione del segnale mediata da diverse citochine e recettori. Alterazioni di questo intricato meccanismo sono alla base dello sviluppo delle leucemie o di altri disordini mielo e linfoproliferativi.

Dal momento che le PK hanno profondi effetti sulle funzioni cellulari, la deregolazione di tali enzimi svolge un ruolo preponderante nello sviluppo di diversi tumori (109, 110); anche tra le neoplasie ematologiche, infatti, una deregolazione delle PK è stata ampiamente documentata e molteplici casi di disfunzione di tali enzimi sono stati riportati (111).

Molteplici possono essere le modalità attraverso cui le PK acquisiscono un'alterata funzionalità (Figura 14).

Tra queste, le principali sono:

i) Traslocazioni cromosomiche.

Un comune meccanismo di attivazione delle TRK nei tumori è la fusione con un'altra proteina – definita proteina partner - come conseguenza di una traslocazione cromosomica bilanciata. Generalmente, il gene partner fornisce sia il promotore che controlla la trascrizione della proteina di fusione sia un dominio che causa l'oligomerizzazione costitutiva della TRK anche in assenza del ligando o dei segnali di attivazione fisiologici, promuovendone l'autofosforilazione e l'attivazione. L'esempio più rappresentativo di questo meccanismo è costituito dal riarrangiamento *BCR-ABL*. Il prodotto di fusione *BCR-ABL*, risultato della traslocazione t(9;22)(q34;q11), è causale di LMC ed è inoltre riscontrato in circa il 25% dei pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta (LAL) (111). *ABL* è una TRK non recettoriale la cui funzione, in condizioni fisiologiche, è inibita da una regione regolatoria negativa; diversamente, nella proteina di fusione *BCR-ABL*, *ABL* mantiene il dominio catalitico ma perde la regione di regolazione negativa, risultando in un'attivazione costitutiva di tale proteina. Ciò comporta un'amplificazione dei segnali controllati da *ABL* che, di conseguenza, alterano la proliferazione, la sopravvivenza e l'adesione cellulare (112, 113).

ii) Mutazioni attivanti.

Mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni o duplicazioni intrageniche possono attivare in maniera costitutiva una chinasi. Le mutazioni attivano le TRK principalmente attraverso tre meccanismi: 1) mutazioni nel dominio extracellulare delle TRK recettoriali che ne promuovono la dimerizzazione; 2) mutazioni in un

dominio inibitorio; 3) mutazioni attivanti del dominio catalitico. In relazione a questo meccanismo di deregolazione delle PK si può riportare l'esempio di JAK2.

JAK2 è una TRK non recettoriale coinvolta nella trasduzione del segnale proveniente dai recettori di citochine. La scoperta della mutazione puntiforme attivante V617F (Val⁶¹⁷→Phe) nel dominio inibitorio di JAK2, in molti disordini mieloproliferativi - i.e. mielofibrosi idiopatica, trombocitemia essenziale e policitemia vera - (114-116), è stata una delle più importanti scoperte ematologiche degli ultimi anni. Esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno infatti dimostrato il potenziale trasformante della mutazione (115, 117).

iii) Iperespressione.

Un terzo meccanismo di deregolazione delle TRK può essere dovuto all'iperespressione o all'espressione aberrante di un RTRK, del suo ligando, o di entrambi. Un esempio a tale riguardo è costituito dall'iperespressione del recettore FGFR3 in alcuni casi di mieloma con t(4;14) (118).

iv) Diminuzione dei fattori limitanti l'attività chinasi.

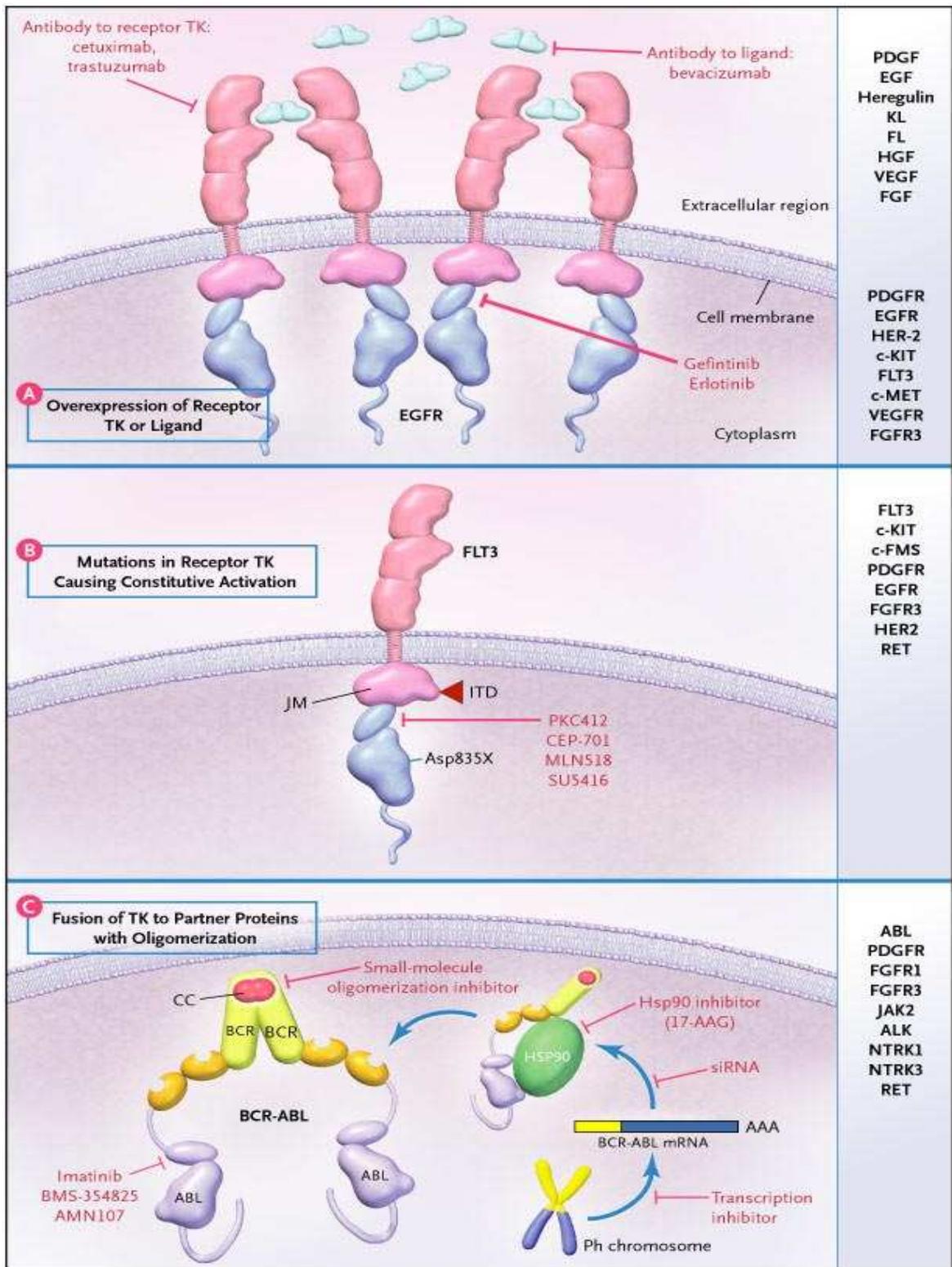
Una deregolazione delle fosfatasi o una down-modulazione delle proteine inibitrici delle PK potrebbe comportare un aumento dell'attività chinasi. Un esempio di questo meccanismo è costituito dall'associazione tra la ridotta espressione della citochina SOCS1 (un regolatore negativo della famiglia delle Janus chinasi) e la leucemogenesi (119).

Alla luce di queste osservazioni, il ruolo chiave delle PK nella trasduzione del segnale, specialmente in ambito ematologico, le rende una classe di molecole estremamente

interessante per la messa in atto di terapie mirate; a tale riguardo, negli ultimi decenni sono stati compiuti grandi sforzi per la generazione di diversi inibitori diretti contro PK specifiche. Tra i farmaci correntemente usati nella pratica clinica, l'Imatinib (conosciuto anche come Gleevec) è stato il primo inibitore di TRK ad entrare nei trials clinici per il trattamento di pazienti affetti da LMC e, in misura minore, da LAL con il riarrangiamento *BCR-ABL*. Questo composto è in grado sia di legare la conformazione inattiva di *BCR-ABL* che di inibire altre proteine, quali *ABL2* (ARG), *PDGFR α* e *PDGFR β* , *KIT* e *CSF1R/FMS* (120-122).

Attualmente hanno trovato impiego in onco-ematologia anche inibitori di PK di seconda generazione, come il Nilotinib e il Dasatinib, o farmaci diretti contro altre molecole bersaglio, come nel caso degli inibitori di *FLT3* di prima e seconda generazione (*PKC412* e *CEP-701*, rispettivamente).

Figura 14. A-C: comuni meccanismi di deregolazione delle TRK nei tumori: overespressione (A), mutazioni attivanti (B) e traslocazioni cromosomiche (C). Per ogni riquadro sono riportate come esempio le proteine deregolate secondo il meccanismo illustrato e, sulla fascia laterale, sono indicati i nomi di altre TRK deregolate in modo analogo.



4.2. SCOPO DELLO STUDIO

Come precedentemente descritto, il decorso naturale della LLC è molto eterogeneo; infatti, mentre alcuni individui hanno un andamento clinico relativamente indolente, in altri la patologia peggiora progressivamente e vi è quindi la necessità di precoci e frequenti trattamenti terapeutici, data l'aggressività della malattia stessa.

Nel corso degli ultimi anni, l'avanzamento delle conoscenze biologiche ha consentito di individuare marcatori prognostici che permettono di stratificare i pazienti in fasce di rischio ben definite.

Ciononostante, ad oggi, sebbene l'armamentario terapeutico si sia nettamente ampliato e comprenda non solo composti chemioterapici ma anche anticorpi monoclonali diretti specificamente contro le cellule leucemiche, le terapie disponibili - eccezion fatta delle procedure allotrapiantologiche -, non permettono l'eradicazione della malattia, ed è pertanto necessario identificare nuovi composti terapeutici attivi in questa neoplasia.

In tale contesto ed in accordo con il ruolo svolto dalle PK nello sviluppo della maggior parte dei tumori, tra i farmaci "intelligenti" disponibili in commercio, gli inibitori delle PK hanno fornito risultati assai soddisfacenti in alcune neoplasie ematologiche. Inoltre, il vantaggio nell'uso di tali farmaci, in particolar modo alcuni inibitori delle PK di seconda generazione, risiede nella capacità di inibire simultaneamente più proteine, agendo, quindi, su più bersagli molecolari contemporaneamente.

Lo scopo del presente studio è stato quello di comprendere se l'impiego degli inibitori delle PK abbia un razionale anche nel trattamento di pazienti con LLC, laddove necessario.

A questo fine, è stata inizialmente impiegata la metodica dei microarrays per due ragioni principali: 1) questo approccio consente di quantificare l'espressione di un ingente numero di geni in un singolo esperimento; 2) questo approccio ha dato, in precedenza, un contributo importante nella comprensione di alcune caratteristiche biologiche della malattia.

L'espressione genica delle PK è stata valutata nella LLC sia considerandola come singola entità, sia suddividendo i pazienti in base a fattori prognostici noti, quali lo stato mutazionale dei geni IGHV, l'espressione dell'antigene CD38 e l'espressione della proteina ZAP-70. Lo scopo di tale approccio è stato quello di identificare eventuali differenze nei livelli di espressione delle PK, che possano guidare al meglio potenziali decisioni terapeutiche. Infatti, l'obiettivo al quale tende la medicina moderna è la scoperta di terapie personalizzate e mirate ad un determinato bersaglio molecolare.

Nel corso di questa ricerca, i risultati ottenuti con i microarray sono stati convalidati mediante RT-Q-PCR e test funzionali *in vitro* (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo), per confermare la potenziale applicabilità della somministrazione degli inibitori delle PK.

4.3. RISULTATI

4.3.1. Caratteristiche dei pazienti

Nel presente studio, sono stati analizzati mediante la metodica degli oligonucleotide arrays 181 pazienti con diverse neoplasie ematologiche, arruolati nell'ambito dello studio MILE (Microarray Innovations in LEukemia) (123); specificamente, sono stati valutati 44 casi di LLC, definiti per semplicità come “*training set*”, 45 casi di LAL a cellule T (LAL-T) e 92 casi di LAL a cellule B (LAL-B). Per convalidare i risultati ottenuti, sono stati considerati altri due gruppi di pazienti affetti da LLC: il primo gruppo, composto da 19 casi, è stato definito come “*test set #1*”, il secondo gruppo, comprendente 30 casi, è stato definito come “*test set #2*”.

La diagnosi di LLC è stata stabilita sulla base della presenza di più di 5000 linfociti B clonali/ μ l circolanti, esprimenti il fenotipo tipico della LLC (CD5/CD20+, CD23+, bassa espressione delle sIg, CD10-).

Laddove possibile, i pazienti sono stati caratterizzati per i seguenti fattori prognostici: stato mutazionale dei geni IGHV, espressione del CD38 ed espressione di ZAP-70.

Le caratteristiche dei pazienti compresi nel *training set*, nel *test set #1* e nel *test set #2* sono riassunte nella Tabella 5.

Tabella 5. Caratteristiche cliniche dei pazienti con LLC studiati mediante la metodica dei microarrays.

	Training set (n = 44)		Test set #1 (n = 19)*		Test set #2 (n = 30)‡	
	IGHV M (n = 26)	IGHV NM (n = 18)	IGHV M (n = 12)	IGHV NM (n = 4)	IGHV M (n = 17)	IGHV NM (n = 12)
Maschi/Femmine	13/13	12/6	11/1	3/1	12/5	9/3
Età media (range)	49 (36-66)	53 (39-67)	51 (33-69)	48 (39-58)	52 (33-63)	56 (39-77)
Media WBC x 10⁹/l (range)	55 (12-116)	74 (10-221)	51 (9-100)	54 (20-94)	59 (12-174)	85 (6-180)
Hb g/dl (range)	13.5 (10-16)	13 (9-16)	13.5 (11-15)	12 (10-14)	13.5 (12-16)	11 (7-14)
Conta Plts 10⁹/l (range)	188 (87-364)	172 (47-303)	153 (106-186)	177 (176-263)	168 (83-374)	133 (30-236)
Stadio di Binet:						
A	24	9	8	1	12	0
B	2	6	4	3	3	9
C	0	3	0	0	2	3
Stato di malattia:						
Stabile	15	3	8	0	13	0
Progressiva	11	15	4	4	4	12
CD38 (%):						
Positivo	3	11	3	2	1	5
Negativo	23	7	7	2	9	4
N.V.	0	0	2	0	0	0
ZAP-70 (%):						
Positivo	3	13	4	3	0	0
Negativo	20	4	6	1	0	0
N.V.	3	1	2	0	17	12
Tipo di array:	HG133 Plus 2.0		HG133A 2.0		HG95Av2	

Abbreviazioni. NM: non mutati; M: mutati; N.V.: non valutato;

* in 3 pazienti l'analisi dei geni IGHV non è stata valutabile;

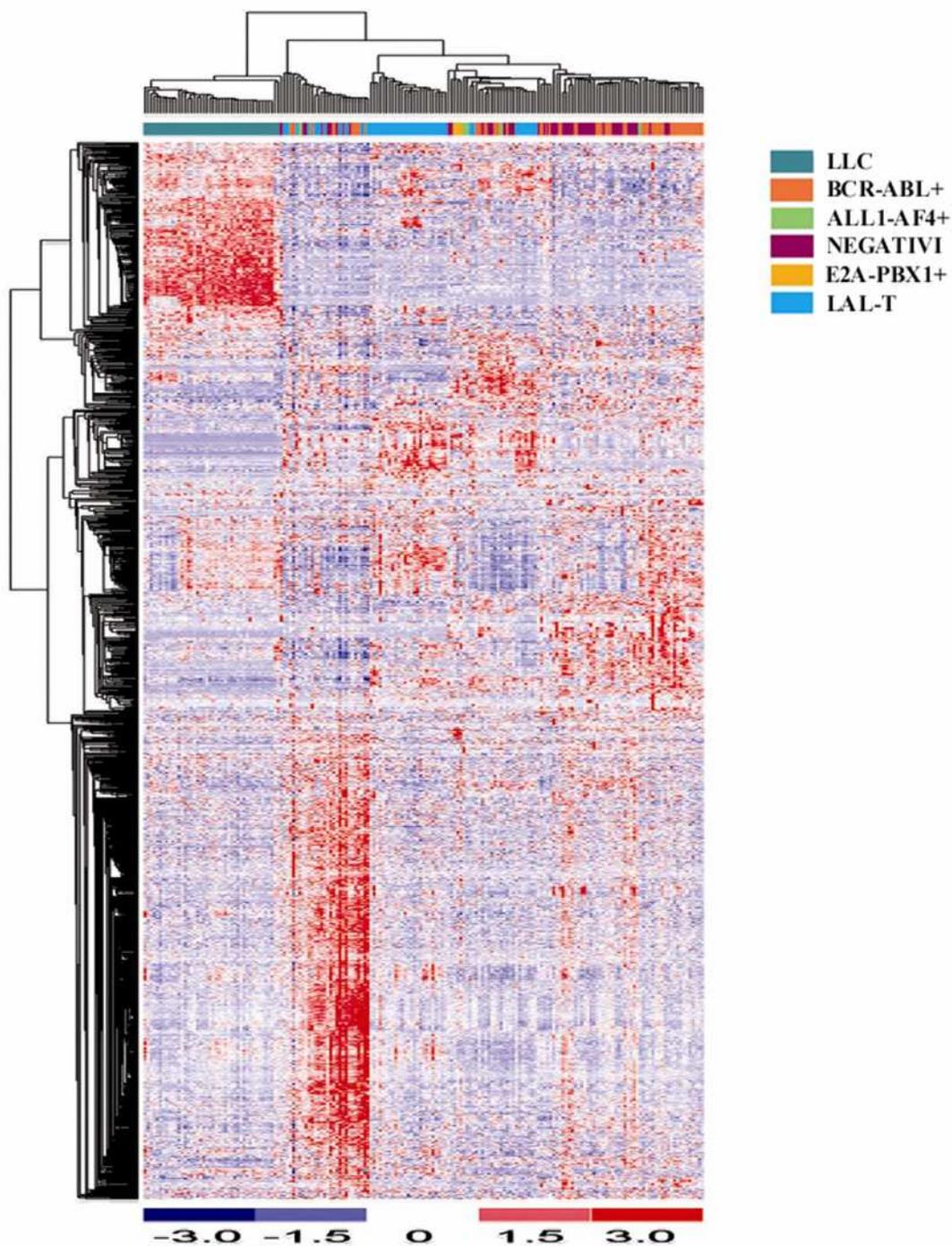
‡ in 1 paziente l'analisi dei geni IGHV non è stata valutabile.

4.3.2. Analisi del profilo di espressione genica delle PK in diverse neoplasie linfoidi

Al fine di valutare il profilo di espressione genica associato alle PK in diverse neoplasie linfoidi, è stata inizialmente effettuata un'analisi *unsupervised* sulla base di una lista di 1324 probesets, corrispondenti a 505 geni codificanti PK. Nell'ambito della suddetta analisi, sono stati valutati diversi campioni di LLC, di LAL-T e di LAL-B, questi ultimi suddivisi in casi con t(9;22) esprimenti il riarrangiamento *BCR-ABL*, casi con t(4;11) esprimenti il riarrangiamento *ALL1-AF4*, casi con t(1;19) esprimenti il riarrangiamento *E2A-PBX1*, e casi senza alterazioni genetiche note, indicati come “negativi”.

Come mostrato in Figura 15, l'*unsupervised hierarchical clustering* ha rivelato un profilo di espressione genica associato alle PK distintivo ed omogeneo per i casi di LLC, caratterizzato dall'overespressione di un grande numero di PK; al contrario, un profilo molto più eterogeneo è stato osservato nei casi di LAL.

Figura 15. *Unsupervised hierarchical clustering* dei casi di LLC e di vari sottogruppi di LAL basato su una lista di 505 geni codificanti PK. I livelli di espressione genica sono rappresentati mediante una scala di colori: il rosso e il blu rappresentano, rispettivamente, livelli di espressione più alti e più bassi.



4.3.3. Identificazione di un gruppo di geni codificanti PK più altamente espressi nella LLC

Sulla base dell'analisi *unsupervised*, la LLC è risultata essere caratterizzata dall'iperpressione di un grande numero di geni codificanti PK. Al fine di identificare le PK più altamente e specificamente espresse in questa patologia, è stata effettuata un'analisi *supervised*, detta ANOVA, utilizzando i criteri indicati nei Materiali e Metodi. Dal confronto tra i casi di LLC e i vari sottogruppi di LAL, sono risultati differenzialmente espressi 360 geni (Figura 16), 144 dei quali con un'espressione media ≥ 300 nei casi di LLC; di questi ultimi, 56 geni, riportati in Tabella 6, hanno mostrato una differenza di espressione ≥ 1.5 tra i casi di LLC e gli altri sottogruppi analizzati.

I geni che sono risultati maggiormente espressi nella LLC codificano per le due principali classi di PK: le TRK e le STRK.

Tra i geni codificanti TRK, sono stati identificati un gruppo di geni coinvolti nella trasduzione del segnale del BCR e del TCR (come *SYK*, *LYN* e *CSK*), un gruppo di geni appartenenti alla famiglia delle JAK (JAnus Kinases) e alla sottofamiglia dei ROR (RAR-related Orphan Receptors) e, infine, un gruppo di geni appartenenti alla SFK, come *LYN*, *CSK*, *FGR* e *SCAP1*.

Tra i geni codificanti STRK, sono stati identificati membri della famiglia delle MAPK e della famiglia delle PKC.

Figura 16. ANOVA dei 360 geni codificanti PK, differenzialmente espressi tra i casi di LLC e i diversi sottogruppi di LAL.

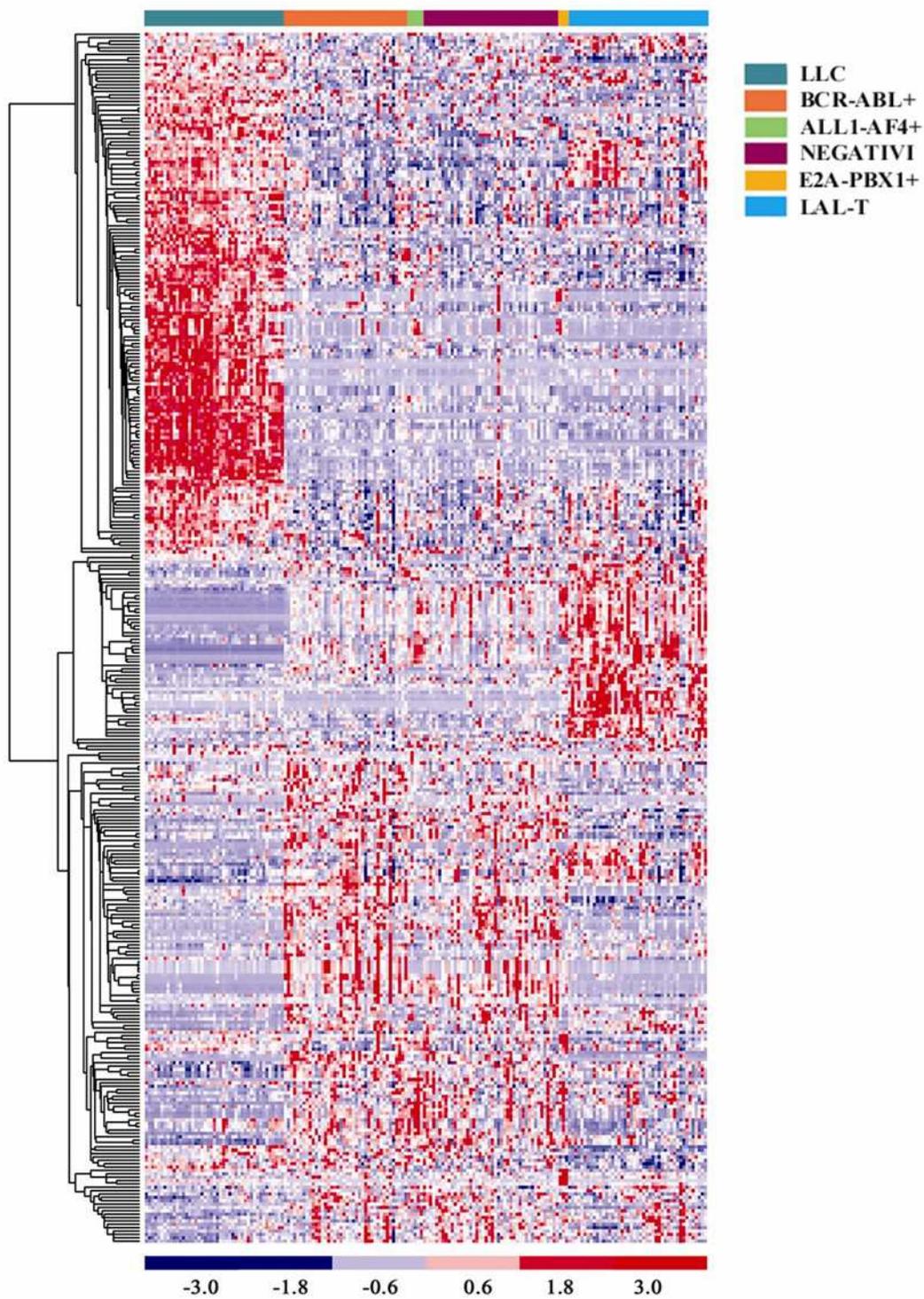


Tabella 6. Lista dei 56 geni codificanti PK più altamente e specificamente espressi nei casi di LLC. I geni sono ordinati in base alla famiglia proteica di appartenenza. I 16 geni contrassegnati con un asterisco sono quelli risultati iperespressi in tutti e 3 i set di LLC analizzati.

Nomi dei geni	Locus link ID	P-value	Attività chinasi	Funzione
Famiglia delle Src chinasi				
LCK*	3932	0	TRK	Trasduzione del segnale del TCR e BCR; Ciclo cellulare
BLK*	640	0	TRK	Trasduzione del segnale del BCR
CSK*	1445	0	TRK	Trasduzione del segnale del BCR; Ciclo cellulare
LYN*	4067	0	TRK	Trasduzione del segnale del BCR
SCAP1	8631	0	TRK	Trasduzione del segnale
FGR*	2268	0	TRK	Trasduzione del segnale del BCR
Famiglia delle MAPK				
MAP2K4	6416	0	STRK	Trasduzione del segnale
MAP3K1	4214	0	STRK	Trasduzione del segnale
MAP3K2	10746	0	STRK	Attivazione della cascata delle JNK
MAP3K8	1326	0.0004	STRK	Attivazione della cascata delle MAPK e delle JNK
MAP3K9	4293	0	STRK e TRK	Attivazione della cascata delle JNK
MAP3K14	9020	0	STRK	Trasduzione del segnale
MAP4K1*	11184	0	STRK	Attivazione della cascata delle MAPK e delle JNK
Famiglia delle JAK				
JAK1*	3716	0	TRK	Trasduzione del segnale; Ciclo cellulare
JAK2	3717	0	TRK	Trasduzione del segnale; Ciclo cellulare
TYK2	7297	0	TRK	Trasduzione del segnale
JAK3	3718	9.08E ⁻⁰⁶	TRK	Trasduzione del segnale
Famiglia delle PKC				
PRKCB1*	5579	0	STRK	Trasduzione del segnale
PRKD3	23683	0	STRK	Trasduzione del segnale
Famiglia delle CLK				
CLK2	1196	0	STRK e TRK	Regolazione delle proteine del complesso dello spliceosoma
CLK4	57396	4.33E ⁻⁰⁸	STRK e TRK	Regolazione delle proteine del complesso dello spliceosoma
Famiglia NimA				
NEK3	4752	0	STRK e TRK	Regolazione del ciclo cellulare
NEK8	284086	0	STRK e TRK	Regolazione del ciclo cellulare
Famiglia delle DYRK				
DYRK1B	9149	0	STRK e TRK	Regolazione della trascrizione
DYRK4	8798	0	STRK e TRK	Regolazione della proliferazione cellulare
Famiglia delle CDK				
CDK10	8558	0	STRK	Regolazione del ciclo cellulare
Famiglia delle MAGUK				
CASK	8573	0	STRK	Adesione cellulare

Famiglia delle GCK				
MINK1	50488	0	STRK	Attivazione della cascata delle JNK
Famiglia delle RSK				
RPS6KA3	6197	0	STRK	Trasduzione del segnale
Famiglia delle RIP				
RIPK3	11035	0	STRK	Regolazione dell'apoptosi
Famiglia delle CAMK				
CAMK2D	817	0	STRK	Regolazione della proliferazione cellulare
Sottofamiglia dei ROR				
ROR1	4919	0	TRK	Trasduzione del segnale
Altri				
SYK*	6850	0	TRK	Trasduzione del segnale del BCR
DKFZp761P0423	157285	0	TRK	-
STK17A	9263	2.57E ⁻¹⁰	STRK	Regolazione dell'apoptosi
PIM2*	11040	0	STRK	Regolazione della proliferazione cellulare
PFTK1*	5218	0	STRK	-
CDC2L5	8621	0	STRK	Regolazione del ciclo cellulare
TLK1*	9874	0	STRK	Modificazione della cromatina
CRKRS	51755	2.61E ⁻⁰⁹	STRK	Trasduzione del segnale
PASK	23178	2.68E ⁻¹⁰	STRK	Trasduzione del segnale
PDPK1*	5170	0	STRK	Trasduzione del segnale
BMPR2	659	0	STRK	Regolazione della proliferazione cellulare
CSNK1G3	1456	0	STRK	Trasduzione del segnale
ADRBK2	157	0	STRK e TRK	Trasduzione del segnale
UHMK1	127933	0	STRK	Regolazione del ciclo cellulare
CDKL1	8814	0	STRK	Regolazione del ciclo cellulare
STK10*	6793	0	STRK	Cascata delle MAPK
STK25	10494	0	STRK	Trasduzione del segnale; Risposta allo stress ossidativo
WEE1*	7465	2.86E ⁻⁰⁶	STRK e TRK	Regolazione del ciclo cellulare
STK4	6789	0	STRK e TRK	Regolazione dell'apoptosi
GRK6*	2870	0	STRK e TRK	Trasduzione del segnale
SRPK2	6733	0	STRK e TRK	Splicing dell'RNA
Sconosciuto	-	0	Sconosciuta	-
Sconosciuto	-	0	Sconosciuta	-
Sconosciuto	-	0	Sconosciuta	-

Abbreviazioni. I p-value <E⁻¹⁰ sono riportati come 0; CLK: CDC-Like Kinases; NimA: Never in mitosis A; DYRK: Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation Regulated Kinases; MAGUK: Membrane-Associated GUanylate Kinases; GCK: Germinal Center Kinases; RSK: Ribosomal S6 Kinases; RIP: Receptor-Interacting Proteins; CAMK: Calcium/calmodulin-dependent protein Kinases.

4.3.4. Validazione dei risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica delle PK nella LLC

Per confermare i risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica associato alle PK nella LLC, la lista di 56 geni selezionata nella precedente analisi è stata applicata a due diversi gruppi di LLC, utilizzati come *test sets* di convalida: 39 geni hanno mostrato alti livelli di espressione nel *test set #1* e 19 geni nel *test set #2*, rispettivamente. La differenza osservata nel numero dei geni overespressi tra i tre gruppi di LLC analizzati, è probabilmente implicabile a cause metodologiche, come il tipo di array usato o il protocollo utilizzato per il processamento dei campioni.

Sedici geni sono risultati avere un'espressione ≥ 300 in tutti i gruppi di LLC analizzati: tra questi, 7 geni codificano per TRK, quali *SYK*, *LYN*, *BLK*, *LCK*, *JAK1*, *CSK* e *FGR*, 7 geni codificano per STRK, quali *PIM2*, *PFTK1*, *TLK1*, *MAP4K1*, *PDPK1*, *PRKCB1* e *STK10*, ed infine 2 geni, *GRK6* e *WEE1*, codificano per proteine con attività sia tirosin chinasi che serin-treonin chinasi (Tabella 6).

4.3.5. Analisi del profilo di espressione genica associato alle PK in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV nella LLC

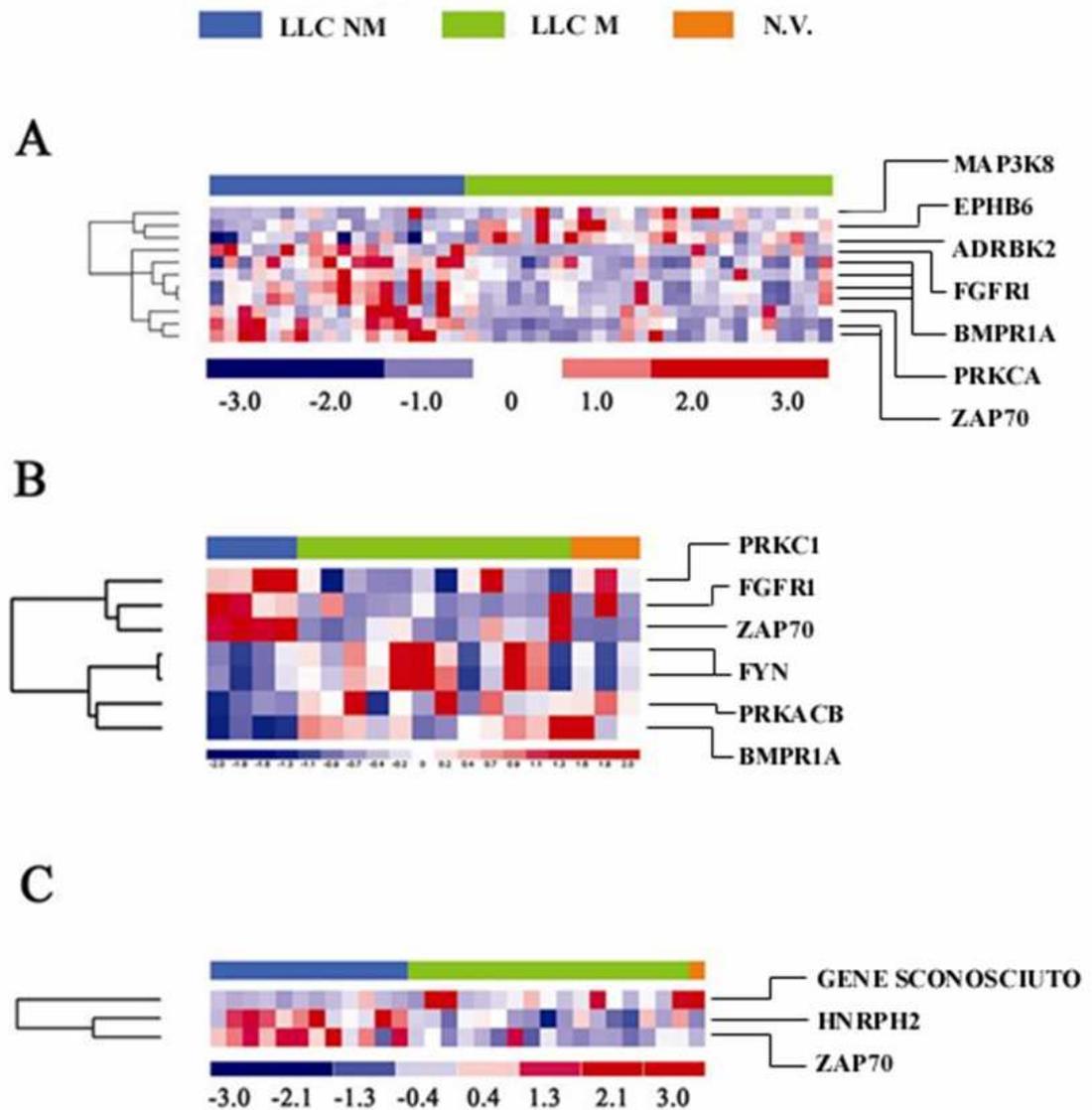
Sia l'analisi *unsupervised* che l'analisi *supervised* dei campioni di LLC hanno mostrato la deregolazione di un grande numero di PK in questa patologia. Al fine di analizzare l'espressione dei geni codificanti PK in specifici sottogruppi di LLC, sono stati effettuati dei t-test nell'ambito dei tre gruppi sperimentali di LLC analizzati (come indicato nei Materiali e Metodi), suddividendo i campioni sulla base di alcuni principali fattori prognostici.

Considerato l'impatto prognostico dello stato mutazionale dei geni IGHV nella LLC, i campioni sono stati suddivisi in base a questo parametro ed è stato eseguito un t-test, paragonando i casi con geni IGHV mutati ai casi con geni IGHV non mutati, rispettivamente nel *training set*, nel *test set #1* e nel *test set #2*.

Nei singoli gruppi sperimentali analizzati, sono stati identificati pochi geni codificanti PK differenzialmente espressi in relazione allo stato mutazionale dei geni IGHV (Figura 17); inoltre, nessuno è risultato essere comune a tutti e tre i gruppi, ad eccezione di ZAP-70. Pertanto, non sono state identificate PK specifiche associate a questo fattore prognostico.

In accordo con precedenti lavori (59, 61, 74), ZAP-70 è stato l'unico gene identificato in tutti e tre i gruppi di LLC analizzati come differenzialmente espresso rispetto allo stato mutazionale dei geni IGHV, con una maggiore espressione nell'ambito dei casi non mutati.

Figura 17. A-C: geni codificanti le PK differenzialmente espressi tra i casi di LLC con geni IGHV mutati e i casi di LLC con geni IGHV non mutati. **(A)** *Training set*; **(B)** *test set #1*; **(C)** *test set #2*. Legenda: blu, campioni con geni IGHV non mutati (LLC NM); verde, campioni con geni IGHV mutati (LLC M); arancione, campioni in cui lo stato mutazionale dei geni IGHV non è stato valutato (N.V.).



4.3.6. Analisi del profilo di espressione genica associato alle PK in relazione all'espressione del CD38 e di ZAP-70 nella LLC

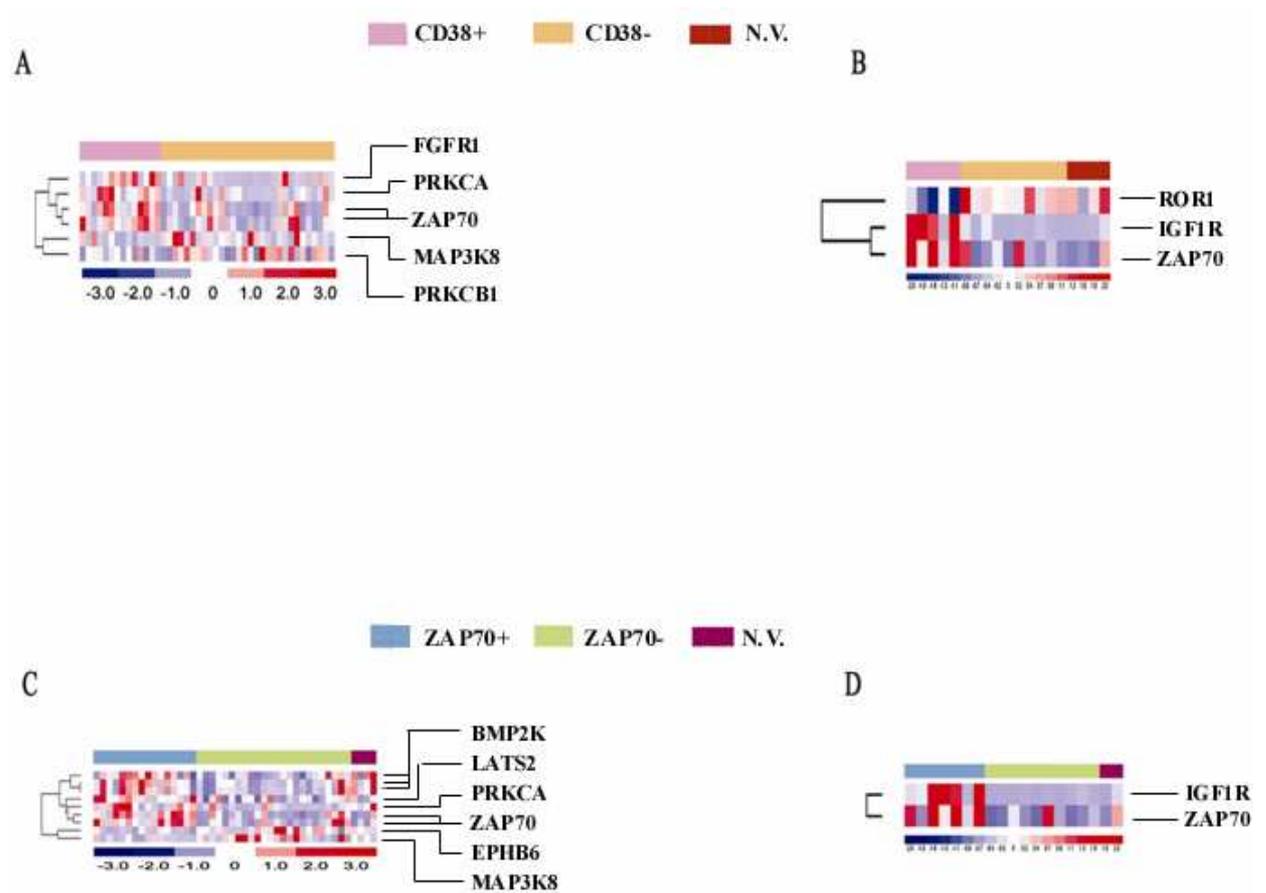
Dal momento che il t-test basato sui geni codificanti PK tra casi di LLC con geni IGHV mutati e non mutati non ha rivelato differenze rilevanti tra questi due gruppi di pazienti, sono state effettuate ulteriori analisi suddividendo i campioni di LLC sulla base dell'espressione del CD38 e di ZAP-70.

Nel *training set* e nel *test set #1*, sia il confronto tra casi CD38+ e CD38- che il confronto tra casi ZAP-70+ e ZAP-70-, ha permesso di identificare pochi geni codificanti PK differenzialmente espressi tra i diversi sottogruppi considerati (Figura 18).

Nel *test set #2* non sono stati identificati geni differenzialmente espressi tra casi CD38+ e CD38-, mentre il confronto basato sull'espressione di ZAP-70 non è stato eseguito poiché in questo gruppo di pazienti questo parametro non era stato precedentemente valutato.

Nel complesso, questi risultati indicano che non vi sono geni differenzialmente espressi, ricorrenti nei tre gruppi sperimentali, né in associazione all'espressione del CD38 né di ZAP-70. Pertanto, come per lo stato mutazionale dei geni IGHV, non sono state identificate delle PK specifiche correlate a questi due fattori prognostici.

Figura 18. A-D: profilo di espressione genica delle PK in diversi sottogruppi di LLC. (A) e (C) *Training set*; (B) e (D) *test set #1*. (A) e (B) Confronto tra casi CD38+ e casi CD38-. Legenda: rosa, casi CD38+; giallo, casi CD38-; marrone, casi in cui l'espressione del CD38 non è stata valutata (N.V.). (C) e (D) Confronto tra casi ZAP-70+ e casi ZAP-70-. Legenda: celeste, casi ZAP-70+; verde, casi ZAP-70-; viola, casi in cui l'espressione di ZAP-70 non è stata valutata (N.V.).



4.3.7. Convalida dei risultati di espressione genica mediante RT-Q-PCR

Per confermare i risultati ottenuti mediante la metodica dei microarrays relativi ai 16 geni codificanti le PK più altamente espresse in tutti i gruppi di LLC analizzati, è stata utilizzata la RT-Q-PCR: l'analisi è stata effettuata su 14 casi di LLC (7 casi con geni IGHV mutati e 7 casi con geni IGHV non mutati), 6 casi di LAL-B, 3 casi di LAL-T e 3 campioni di donatori sani purificati per cellule CD19+.

La correlazione tra i valori di espressione ottenuti mediante la metodica dei microarrays e i valori di ΔC_T ricavati dall'analisi delle RT-Q-PCR, espressa con il coefficiente di Pearson, è risultata essere elevata, dimostrando una buona concordanza delle due tecniche. Dal momento che bassi valori di ΔC_T corrispondono ad alti valori di espressione genica, per ogni gene l'indice di correlazione è risultato negativo. Ad eccezione di LCK, che è altamente espresso anche nelle LAL-T, i coefficienti di Pearson sono risultati tutti minori di -0.7 (Tabella 7).

I valori di ΔC_T dei geni codificanti PK analizzati mediante RT-Q-PCR sono rappresentati nelle Figure 19 e 20 sotto forma di box plots. Questi risultati dimostrano che, per tutti i geni analizzati, i campioni di LLC mostrano livelli di espressione significativamente più alti, quando confrontati ai campioni di LAL-B, di LAL-T e di donatori sani (p-value <0.0001). Al contrario, non sono emerse differenze statisticamente significative nell'espressione delle PK quando i campioni di LLC utilizzati nell'analisi precedente sono stati suddivisi in base allo stato mutazionale dei geni IGHV (Figure 19 e 20, riquadri interni in alto a destra).

Tabella 7. Coefficienti di correlazione tra i valori di espressione dei geni codificanti PK ottenuti mediante la metodica dei microarrays e i valori di ΔC_T ricavati dall'analisi delle RT-Q-PCR.

Gene	Coefficiente di Pearson
LCK	-0.36
BLK	-0.74
CSK	-0.89
LYN	-0.77
FGR	-0.88
MAP4K1	-0.83
JAK1	-0.78
PRKCB1	-0.87
SYK	-0.77
PIM2	-0.75
PFTK1	-0.78
TLK1	-0.90
PDPK1	-0.79
STK10	-0.86
WEE1	-0.70
GRK6	-0.78

Figura 19. A-F: Livelli di espressione ottenuti mediante RT-Q-PCR dei 6 geni codificanti PK che hanno mostrato il miglior indice di correlazione con i risultati ottenuti mediante la metodica dei microarrays. I valori di espressione genica sono espressi in termini di ΔC_T : bassi valori di ΔC_T corrispondono ad alti livelli di espressione genica. Per ogni gene, il riquadro interno in alto a destra rappresenta i valori di ΔC_T nei casi di LLC suddivisi in base allo stato mutazionale dei geni IGHV (non mutati: LLC NM; mutati: LLC M).

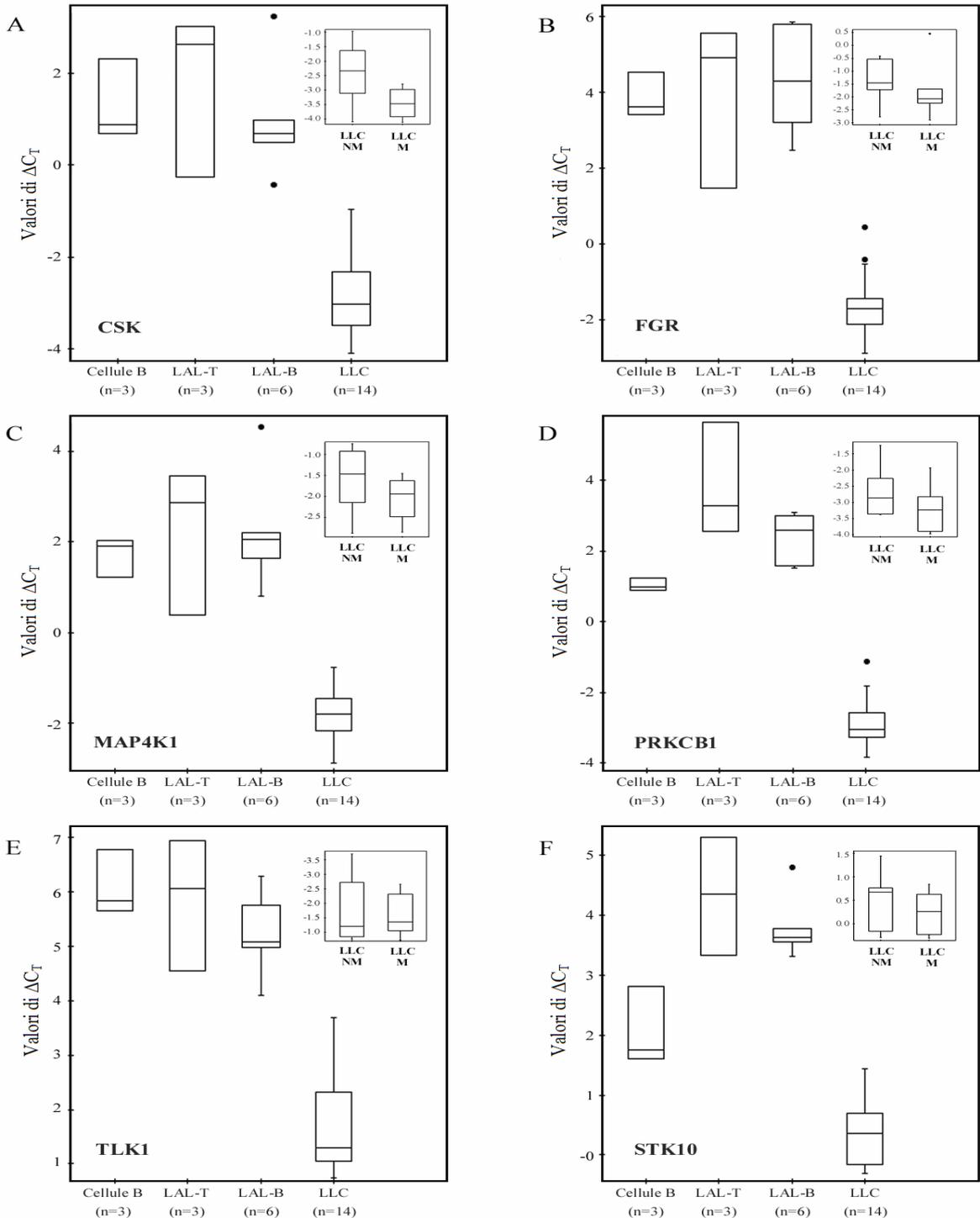
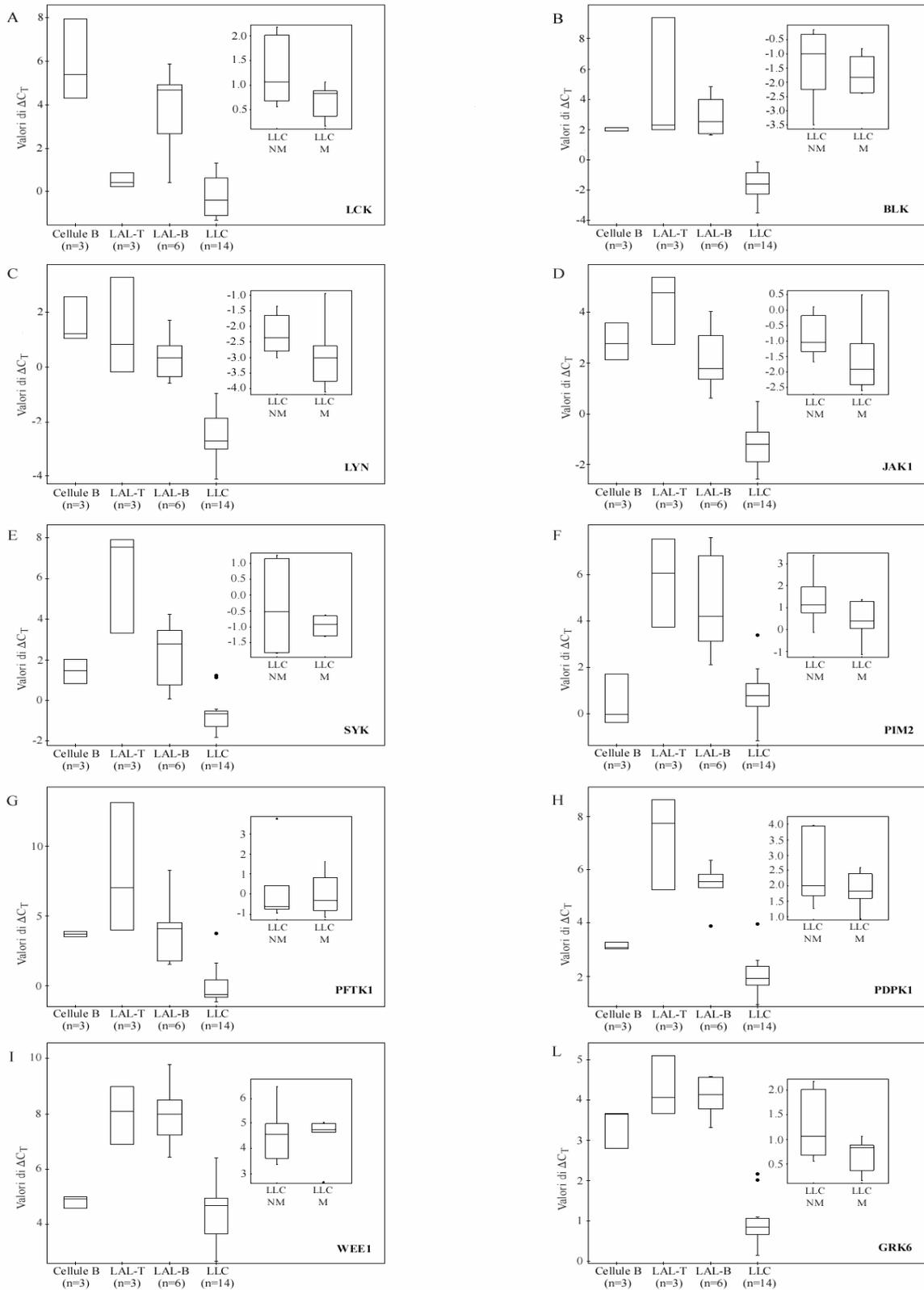


Figura 20. A-L: Livelli di espressione ottenuti mediante RT-Q-PCR dei restanti 10 geni codificanti PK analizzati. Per ogni gene, il riquadro interno in alto a destra rappresenta i valori di ΔC_T nei casi di LLC suddivisi in base allo stato mutazionale dei geni IGHV (non mutati: LLC NM; mutati: LLC M).



4.4. DISCUSSIONE

La LLC è una patologia dal decorso clinico estremamente eterogeneo, con pazienti in cui la malattia può rimanere stabile per anni, anche in assenza di terapia, e pazienti in cui la malattia peggiora progressivamente, con necessità di trattamenti terapeutici. In un simile contesto, rivestono una grande importanza i fattori prognostici che permettono la stratificazione dei pazienti alla diagnosi in base a fasce di rischio ben definite.

Nonostante gli sviluppi ottenuti negli ultimi anni dal punto di vista terapeutico per la LLC, attualmente - eccezion fatta per le procedure allotrapiantologiche - non è ancora disponibile un trattamento in grado di eradicare totalmente la malattia, sottolineando la necessità di identificare nuovi potenziali bersagli molecolari in questa neoplasia.

In accordo con il ruolo svolto dalle PK nello sviluppo della maggior parte dei tumori, specialmente quelli ematologici, e alla luce del recente sviluppo di inibitori chinasi di seconda generazione, l'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare il ruolo delle PK nella LLC, al fine di comprendere se questa classe di molecole possa rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico in questa malattia.

Il primo approccio utilizzato è stata un'analisi *unsupervised* per valutare il profilo di espressione genica delle PK in diverse neoplasie linfoidi. Tale analisi è stata effettuata su un'ampia casistica di LLC, di LAL-T e di LAL-B, queste ultime suddivise in vari sottogruppi molecolari. Il confronto delle LLC con le LAL-B e le LAL-T si basa sul fatto che, sia nelle cellule B che nelle T, le PK rivestono un ruolo importante nella trasduzione del segnale; inoltre, come già menzionato, una deregolazione delle PK è ampiamente documentata nelle LAL e quindi il paragone può fornire utili informazioni.

I risultati hanno dimostrato che la LLC è caratterizzata da un profilo di espressione genica delle PK unico ed omogeneo. A differenza di altre neoplasie ematologiche – i.e. LMC, LAL, LAM e altri disordini mieloproliferativi e mielodisplastici – dove solitamente vi è il

coinvolgimento di una sola PK (111), in questo studio è stata osservata nella LLC l'iperespressione di molte PK contemporaneamente.

Il secondo approccio utilizzato è stato un'analisi *supervised* per confrontare tra loro i diversi gruppi di neoplasie linfoidi valutate e, in ultimo, per individuare eventuali differenze nel profilo di espressione genica associato alle PK. In particolare, è stata scelta l'ANOVA perché permette di paragonare più di due gruppi contemporaneamente.

Questo tipo di analisi ha confermato i risultati ottenuti mediante l'analisi *unsupervised* ed ha permesso di identificare l'iperespressione di 56 geni codificanti PK nella LLC. Questi trascritti codificano per proteine con attività tirosin chinasi, per proteine con attività serin-treonin chinasi e per proteine con entrambe le attività. La maggior parte di queste PK sono coinvolte in importanti processi cellulari o vie di trasduzione del segnale; molte di queste, infatti, sono membri di note famiglie di PK, come la SFK, quella delle MAPK e quella delle JAK.

Per confermare i risultati ottenuti dalle precedenti analisi, vista anche la difficoltà spesso di validare i dati del profilo di espressione genica in altre coorti di pazienti, nel nostro studio al *training set* sono stati affiancati due *test sets* addizionali di LLC.

Dei 56 geni selezionati nel *training set*, 16 sono risultati altamente espressi in tutti e tre i gruppi analizzati.

I 16 geni selezionati risultano di potenziale interesse per due ragioni principali: 1) per alcuni è stata già dimostrata una deregolazione nella LLC; 2) la maggior parte di questi potrebbe rappresentare un bersaglio terapeutico, dato che esistono composti in grado di inibirne l'attività. Di questi 16 geni, 5 – i.e. *FGR*, *CSK*, *LCK*, *BLK* e *LYN* - codificano per TRK appartenenti alla SFK. Le SFK sono proto-oncogeni che controllano la crescita e la proliferazione cellulare nei mammiferi (124), e quindi una loro deregolazione può contribuire allo sviluppo del cancro (110). Inoltre, alcune SFK svolgono un ruolo critico nella fase

iniziale della trasduzione del segnale del BCR e del TCR (125-129). Tra queste, la proteina Lyn è iperespressa e costitutivamente attivata nelle cellule di LLC rispetto ai linfociti B normali; inoltre, è stato dimostrato che due diversi inibitori delle SFK (PP2 e SU6656) inducono una riduzione dell'attività di Lyn e ripristinano l'apoptosi in cellule primarie di LLC (96).

Altri geni codificano per proteine con attività chinasiche e funzioni diverse. Per quanto riguarda le TRK troviamo *JAK1* e *SYK*, per quanto riguarda le STRK troviamo *PIM2*, *PFTK1*, *TLK1*, *PDPK1*, *STK10*, *MAP4K1* e *PRKCB1* mentre *WEE1* e *GRK6* hanno sia attività tirosin chinasiche che serin-treonin chinasiche. *PRKCB1* potrebbe costituire un potenziale bersaglio terapeutico nella LLC poiché studi recenti hanno dimostrato che l'espressione e l'attività di diverse PKC sono importanti per la sopravvivenza delle cellule di LLC, e che la loro inibizione induce apoptosi. Queste evidenze suggeriscono quindi che gli inibitori delle PKC, potrebbero avere un ruolo nella terapia dei pazienti con LLC (130).

Considerando il profondo impatto dei fattori prognostici nella LLC, è stato utilizzato un approccio *supervised* anche per valutare il profilo di espressione genica delle PK eventualmente associato ai diversi sottogruppi di LLC considerati. In particolare, è stato scelto il t-test perché permette di confrontare un gruppo verso l'altro. Nel complesso, non sono state identificate delle PK specifiche associate allo stato mutazionale dei geni IGHV, all'espressione di ZAP-70 e all'espressione del CD38, ad eccezione di ZAP-70 che, come atteso, è risultato differenzialmente espresso rispetto allo stato mutazionale dei geni IGHV. Infatti, le poche PK differenzialmente espresse tra i vari sottogruppi confrontati, non sono risultate le stesse nel *training set* e nei due *test sets*, ovvero non vi era sovrapposizione nelle PK selezionate nei tre gruppi sperimentali analizzati. Questi risultati indicano che l'iperespressione delle PK è associata alla LLC stessa e non differisce nei specifici sottogruppi.

Per confermare l'overespressione dei 16 geni codificanti PK identificati in tutti i gruppi di LLC analizzati, nel presente studio è stata utilizzata la metodica della RT-Q-PCR. La correlazione tra i valori di espressione ottenuti mediante la metodica dei microarrays e i valori di ΔC_T ricavati dall'analisi delle RT-Q-PCR, è risultata essere molto alta, dimostrando la riproducibilità dei risultati. Attraverso il confronto con i casi di LAL-B e di LAL-T sono stati confermati, per tutti i geni analizzati, livelli di espressione significativamente più alti nella LLC. Inoltre, mediante RT-Q-PCR sono stati analizzati anche 3 campioni di donatori sani, purificati per cellule CD19+, al fine di quantificare i livelli di espressione delle PK differenzialmente espresse nella controparte normale. I risultati hanno dimostrato che, per tutti i geni analizzati, i campioni di LLC mostrano livelli di espressione significativamente più alti rispetto ai campioni di donatori sani. Questi controlli hanno quindi permesso di verificare che l'iperespressione delle PK è caratteristica della cellula leucemica. Infine, come già osservato nell'analisi dei dati del profilo genico, anche mediante RT-Q-PCR non sono emerse differenze significative in relazione allo stato mutazionale dei campioni, confermando ulteriormente che l'iperespressione delle PK è caratteristica della LLC stessa.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti costituiscono il razionale per considerare le PK identificate in questo studio come potenziali bersagli terapeutici nella LLC: per la maggior parte delle PK in questione, infatti, esistono degli inibitori. Tra gli inibitori di PK di prima generazione l'Imatinib, ampiamente impiegato nel trattamento della LMC ed in minor misura della LAL *BCR-ABL+*, è stato raramente testato su cellule primarie di LLC; è comunque stato riportato che l'Imatinib non solo sensibilizza le cellule di LLC al Clorambucil (131), ma induce l'apoptosi nei linfociti della LLC che esprimono alti livelli della proteina proapoptotica Par-4 (132). Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione della proteina Abl nelle cellule di LLC, oltre ad essere associata a stadi clinici più avanzati della malattia, è maggiore rispetto alle cellule B normali isolate da sangue periferico. Infine, i livelli di

espressione di Abl variano nei diversi cloni cellulari di LLC, e le cellule con una maggiore espressione sono più sensibili all'apoptosi indotta dall'Imatinib rispetto ai casi con una minore espressione (133).

Tra gli inibitori di PK di seconda generazione, il Nilotinib e il Dasatinib sono dei composti molto promettenti (134). Il Nilotinib, come l'Imatinib e il Dasatinib, inibisce l'attività chinasi mediante competizione con l'ATP, ma ha una maggiore affinità di legame per Abl rispetto all'Imatinib ed agisce anche in presenza di mutazioni, ad eccezione della mutazione T315I (134). Il legame del Dasatinib nella tasca in cui si posiziona l'ATP è invece meno stringente rispetto a quello dell'Imatinib e del Nilotinib; infatti, a differenza di questi due composti che legano solo la conformazione inattiva di *BCR-ABL*, il Dasatinib è in grado di legare sia la conformazione attiva che inattiva di Abl, agisce anche in presenza di mutazioni, ad eccezione della T315I (135), e possiede una duplice specificità, poiché oltre Abl inibisce anche le Src chinasi (136).

Il Dasatinib ha mostrato un'attività anti-proliferativa in linee cellulari di neoplasie ematologiche e di tumori solidi (135, 137-139) ed è più efficace dell'Imatinib in cellule trasfettate con *BCR-ABL* wild type (135). Allo stato attuale, il Dasatinib è stato comunemente introdotto nel trattamento dei pazienti con LMC e LAL *BCR-ABL*⁺ intolleranti o resistenti all'Imatinib (140-142); inoltre, in alcuni studi più recenti è stato riportato l'uso del Dasatinib nel trattamento in prima linea delle LAL *BCR-ABL*⁺ (143, 144). I vantaggi di questo composto sono quindi: i) un più ampio spettro d'azione, ii) una maggiore efficacia, iii) un'attività anche in presenza di mutazioni e iv) una minore tossicità rispetto all'Imatinib.

Negli ultimi tempi, è stato documentato *in vitro* un effetto anti-proliferativo di questo farmaco anche sulle cellule di LLC (145-147), in maniera particolare se usato in combinazione con gli agenti chemioterapici Clorambucil e Fludarabina (148). Tenendo conto di queste osservazioni e considerando sia che è stata dimostrata, in altri lavori, un'overespressione di Abl nelle

cellule di LLC sia che 5/16 dei geni identificati come overespressi nella LLC, nel presente studio, codificano per membri della SFK, il Dasatinib è stato considerato il miglior candidato per effettuare esperimenti funzionali su cellule primarie di LLC. Pertanto, nel corso di questa ricerca i risultati ottenuti con i microarray sono stati convalidati mediante test funzionali *in vitro* su cellule primarie di LLC (dati non mostrati, eseguiti avvalendoci della collaborazione di altri membri del nostro gruppo), al fine di confermare la potenziale applicabilità della somministrazione degli inibitori delle PK anche in questa neoplasia.

In conclusione, il presente studio ha dimostrato che la LLC è caratterizzata da un particolare profilo di espressione genica associato alle PK e l'analisi di questo profilo ha permesso di identificare alcuni potenziali bersagli molecolari. Inoltre, i risultati ottenuti indicano che un comune meccanismo di deregolazione, PK-mediato, è presente nella LLC indipendentemente da altri fattori prognostici noti. I risultati di espressione genica, uniti a quelli ottenuti mediante saggi funzionali *in vitro*, forniscono il razionale a supporto della possibilità che gli inibitori di PK di seconda generazione, ed in particolare quelli a largo spettro d'azione come il Dasatinib, possano trovare impiego nel trattamento dei pazienti con LLC, probabilmente in combinazione con altri farmaci o per terapie di mantenimento. A tale riguardo, infatti, studi di fase II su pazienti recidivati o refrattari al trattamento sono attualmente in corso nella LLC (149).

CAPITOLO 5

Materiali e Metodi

Questo paragrafo riporta le procedure sperimentali che sono state impiegate in tutti e due gli studi descritti in questa tesi di dottorato di ricerca.

5.1. Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da cellule mononucleate ottenute da sangue venoso periferico.

Per quanto riguarda lo studio 1, tutti i campioni sono stati purificati per cellule CD19+ e l'RNA totale è stato successivamente estratto dalle cellule utilizzando esclusivamente la metodica del Trizolo (Life Technologies, Grand Island, NY). Per quanto riguarda lo studio 2, i campioni del *training set* e del *test set #2* non sono stati sottoposti ad alcuna procedura di purificazione, mentre i campioni del *test set #1* e dei donatori sani sono stati arricchiti per cellule CD19+. In questo caso, l'RNA totale è stato estratto con due diverse metodiche: il Trizolo e l'RNeasy mini procedure (Qiagen, Hilden, Germany).

L'estrazione dell'RNA con il Trizolo è costituita da una prima fase in cui il pellet cellulare del campione è stato lisato con 1 ml di Trizolo con l'ausilio di una siringa e lasciato riposare per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, 200 µl di cloroformio sono stati aggiunti al campione che, dopo essere stato miscelato per inversione, è stato lasciato riposare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di essere centrifugato a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione, la fase trasparente, contenente il materiale ribonucleico, è stata recuperata, e messa a precipitare overnight mediante l'aggiunta di un isovolume di isopropanolo. Il pellet di RNA visibile in seguito alla precipitazione, è stato prima lavato due volte con etanolo al 70% freddo e successivamente lasciato in un termostato per 5 minuti a

65°C, al fine di eliminare eventuali residui di sali rimasti. L'RNA è stato infine risospeso con acqua trattata DEPC e lasciato idratare per 5 minuti a 65°C.

Nell'estrazione che impiega l'RNeasy mini procedure, le cellule del campione sono state lisate con 350 µl di un buffer contenente guanidina isotiocianato, e β-mercaptoetanololo. Il lisato è stato successivamente aggiunto alla QIAshredder Spin Column e centrifugato a 14000 rpm a temperatura ambiente per 2 minuti. L'eluato è stato recuperato e ad esso sono stati aggiunti 300 µl di etanolo al 70%. A questo punto, i 650 µl del campione sono stati trasferiti nella RNeasy Mini Column e centrifugati a 10000 rpm a temperatura ambiente per 1 minuto. Sono stati poi eseguiti un primo lavaggio con 700 µl di RW1 Buffer a 10000 rpm a temperatura ambiente per 1 minuto, e due lavaggi con 500 µl di RPE alle medesime condizioni di centrifugazione. Successivamente la colonnina è stata centrifugata a 10000 rpm a temperatura ambiente per 2 minuti, per eliminare eventuali residui. Infine, sono stati aggiunti 35 µl di AmpliLute RNase-free water per l'eluizione dell'RNA.

Al termine dell'estrazione, la qualità dell'RNA è stata valutata mediante corsa elettroforetica e lettura spettrofotometrica: solo i campioni aventi un rapporto 260/280 superiore ad 1.8 sono stati successivamente utilizzati per lo studio del profilo di espressione genica.

5.2. Oligonucleotide microarrays

Per studiare il profilo di espressione genica dei campioni dello studio 1, sono stati usati gli arrays HGU133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Per i campioni dello studio 2, sono stati utilizzati gli arrays HGU133 Plus 2.0, HGU133A 2.0 e HGU95Av2 per il *training set*, il *test set #1* e il *test set #2*, rispettivamente.

Il protocollo dettagliato per la preparazione dei campioni dello studio 1 e per quelli del *test set #1* e del *test set #2* dello studio 2, è disponibile presso il sito di Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx).

Per la preparazione dei campioni del *training set* dello studio 2, il primo filamento di cDNA è stato retrotrascritto a partire da 5 µg di RNA totale, usando il primer T7-(dT)₂₄; la sintesi del secondo filamento è stata effettuata impiegando il Roche Applied Science Microarray CDNA Synthesis kit (Mannheim, Germany). Il cDNA a doppio filamento così ottenuto, è stato utilizzato per la reazione di trascrizione *in vitro* (IVT) eseguita con il Roche Applied Science Microarray RNA Target Synthesis (T7) kit, che ha richiesto un'incubazione dei campioni a 37°C per 4 ore. Undici µg del cRNA biotinilato così generati sono stati sottoposti a frammentazione e successivamente ibridati sugli arrays a 45°C per 16 ore alla velocità di 60 rpm a rotazione continua. Infine, sono stati eseguiti i passaggi di lavaggio, marcatura, e scannerizzazione.

5.3. Metodi statistici per le analisi dei microarrays

L'analisi dei dati è stata effettuata attraverso il software dChip (www.dchip.org), che utilizza un metodo di normalizzazione in cui l'array con l'intensità complessiva media è scelto come base per la normalizzazione.

Per l'identificazione dei geni selezionati nell'ambito dei due diversi studi presentati, è stato usato il software dell'Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>).

I criteri di filtro non specifici utilizzati nell'ambito delle analisi *unsupervised* dello studio 1, hanno previsto livelli di espressione ≥ 100 in più del 30% dei campioni ed un rapporto tra la deviazione standard e la media di espressione fra tutti i campioni compreso tra 0.5 e 1000. Esclusivamente per lo studio 2, tutte le analisi sono state effettuate sulla base di una lista di 1324 probesets, corrispondenti a 505 geni codificanti le PK.

L'*unsupervised hierarchical clustering* è stato eseguito in entrambi gli studi come descritto da Eisen e colleghi (72).

Nell'ambito dello studio 2, per confrontare i casi di LLC con i casi di LAL-B e i casi di LAL-T è stata effettuata un'ANOVA utilizzando un p-value ≤ 0.001 ; successivamente, è stata effettuata un'ulteriore selezione mantenendo solo i probesets il cui livello di espressione media era ≥ 300 in almeno un gruppo e che mostravano una differenza di espressione ≥ 1.5 tra tutti i gruppi.

Per identificare i geni differenzialmente espressi tra i diversi sottogruppi di LLC confrontati nei due studi, è stato applicato un t-test in cui sono stati selezionati esclusivamente i probesets con un'espressione ≥ 100 , un p-value ≤ 0.05 e una differenza di espressione ≥ 1.5 .

Infine, per l'annotazione delle categorie funzionali dei geni identificati nell'ambito dello studio 1 è stato usato il database DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

5.4. RT-Q-PCR e analisi dei risultati

Per convalidare i dati del profilo di espressione genica dei due studi, è stata utilizzata la RT-Q-PCR.

Un μg di RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando l'Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech, Mountain View, CA) e il cDNA così ottenuto è stato successivamente utilizzato per la RT-Q-PCR. I primers sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express 1.5.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); i nomi dei geni ed i rispettivi primers utilizzati nei due studi sono elencati nella Tabella 8.

L'analisi dell'RT-Q-PCR è stata effettuata utilizzando l'ABI PRISM 7700 sequence detection system e il metodo SYBR green (Applied Biosystems). Le condizioni dell'RT-Q-PCR sono state le seguenti: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti, 1 ciclo a 95°C per 10 minuti, 1 ciclo a 95°C per 15 secondi, 1 ciclo a 60°C per 1 minuto, per un totale di 40 cicli. Ogni campione è stato amplificato in triplicato. Al termine di ogni corsa, è stata inoltre effettuata una curva di dissociazione, per valutare l'eventuale presenza di amplificazioni aspecifiche.

Per ciascun campione dei due studi il valore del ciclo soglia (C_T) della *GAPDH* è stato utilizzato per la normalizzazione. Per ciascun gene, i livelli di espressione sono indicati come la differenza (ΔC_T) tra il valore C_T del gene in esame e il valore C_T della *GAPDH* ($\Delta C_T = C_T(\text{gene di interesse}) - C_T(\text{GAPDH})$).

I box plots sono stati generati utilizzando il software StatCrunch (www.statcrunch.com) e i p-values sono stati ottenuti utilizzando lo stesso software. Per lo studio 2, la correlazione tra i risultati ottenuti con la metodica dei microarrays e i risultati ottenuti mediante RT-Q-PCR è stata calcolata usando il coefficiente di Pearson.

Tabella 8. Nomi dei geni e relativi primers valutati mediante RT-Q-PCR.

Nomi dei geni	Primer forward	Primer reverse
GAPDH (studio 1 e 2)	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC-3'	5'-GAT GGG ATT TCC ATT GAT GAC A-3'
ZAP-70 (studio 1)	5'-GCACCCGAATGCATCAAC-3'	5'-GACAAGGCCTCCACATG-3'
LCK (studio 2)	5'-AGG CAT GGC ATT CAT TGA AGA-3'	5'-CTC AGG GTG TCA GAC ACC AGA A-3'
BLK (studio 2)	5'-GCC CAG GAT GAA TGG GAG AT-3'	5'-CCA GAC TTC GCC GAA TTG TC-3'
CSK (studio 2)	5'-TCG ACG AGG AGG TGT ACT TTG A-3'	5'-GGC GCG TAC AGA GTC CAT CT-3'
LYN (studio 2)	5'-GAT CCG GGA AGA GTG GAA CAA-3'	5'-TTA ATG CTG ACC ACA GAC TCC TTT-3'
FGR (studio 2)	5'-TCA GAC CAG AGG CGA TCA TGT-3'	5'-TGA ACC CGT GTG GTG ATG TAG T-3'
MAP4K1 (studio 2)	5'-ATC TGG TCC CTG GGC ATC A-3'	5'-GAG AAC TCT GAG AGG GTG CAC AT-3'
JAK1 (studio 2)	5'-ATT TCC CTG GCC TTC TTC GA-3'	5'-ACA GAC GCC ATA GAG GTA CAC GAT-3'
PRKCB1 (studio 2)	5'-AAG GCA GCT TTG GCA AGG T-3'	5'-CGT CCT TCT TCA GGA TCT TCA CA-3'
SYK (studio 1 e 2)	5'-ATG GAA AAA TCT CTC GGG AAG AA-3'	5'-TGG CTC GGA TCA GGA ACT TT-3'
PIM2 (studio 2)	5'-CAC TGG GCA TCC TCC TCT ATG-3'	5'-GGA GCT CAG CTT CCA GAA TCT C-3'
PFTK1 (studio 2)	5'-AAT CCG TCC CTA GCC ACA CAT A-3'	5'-CTG TTG AGC CTA GAA GGA CAT CTG-3'
TLK1 (studio 2)	5'-AAT TCT CAG GCA CCC TCT ACC A-3'	5'-AAA GGG ATC ATT CTC TGC TCC AT-3'
PDPK1 (studio 2)	5'-GCC TGG ATC ACC CCT TCT TT-3'	5'-TGG CAT AAC TAA GGC CGA AAT AC-3'
STK10 (studio 2)	5'-GGA GCA CAC GCA GAA AAA GC-3'	5'-TTG TCG GTG GTG AGC CTC TT-3'
WEE1 (studio 2)	5'-AGA GGC TGG ATG GAT GCA TT-3'	5'-TCA AAG CGT TCT GCT CAT CAA C-3'
GRK6 (studio 2)	5'-ATG CCT GCA AGA AGC TAG AGA AA-3'	5'-CCA GGA TCT GCT TCT CGT TCA G-3'

BIBLIOGRAFIA

1. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1999; 17:399-408.
2. Gale RP, Foon KA. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 1987;24:209-29.
3. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;64:234-46.
4. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995;333:1052-7.
5. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999;94:448-54.
6. Weiss NS. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1979:139-42.
7. Boggs DR, Chen SC, Zhang ZN, Zhang A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol*. 1987;25:349-54.
8. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, et al. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol*. 2000;109:794-9.
9. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, et al. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113:407-14.

10. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med.* 1999;77:282-93.
11. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood.* 2002;100:3741-8.
12. Korz C, Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood.* 2002;99:4554-61.
13. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13944-9.
14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15524-9.
15. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* 2006;66:11590-3.
16. Yan XJ, Albesiano E, Zanesi N, et al. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:11713-8.
17. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910-6.

18. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115:755-64.
19. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000;4:22-47.
20. Lampert IA, Wotherspoon A, Van Noorden S, Hasserjian RP. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Pathol.* 1999;30:648-54.
21. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001;97:2777-83.
22. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology.* 1994;24:445-51.
23. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:399-413.
24. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87:4990-7.
25. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood.* 2002;100:635-9.

26. Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*. 2004;103:2337-42.
27. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al; International Familial CLL Consortium. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130:325-32.
28. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*. 1996;92:382-8.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol*. 1989;42:567-84.
30. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8:1640-5.
31. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108:378-82.
32. Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, et al. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1992;40:259-63.
33. Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood*. 1996;87:2615-20.

34. Dorfman DM, Pinkus GS. Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod Pathol.* 1994;7:326-31.
35. Matutes E, Carrara P, Coignet L, et al. FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. *Leukemia.* 1999;13:1721-6.
36. Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I, et al. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997;94:36-43.
37. Dighiero G, Binet JL. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1799-801.
38. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood.* 2003;102:1035-41.
39. Gentile M, Mauro FR, Guarini A, Foà R. New developments in the diagnosis, prognosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2005;17:597-604.
40. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:279-84.
41. Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur J Haematol.* 1990;44:277-81.

42. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, et al. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica*. 1994;79:334-41.
43. Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, et al. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. *Br J Haematol*. 1996;93:111-6.
44. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br J Haematol*. 1986;63:377-87.
45. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1999;26:107-14.
46. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1984;54:2450-5.
47. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;93:1732-7.
48. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88:4259-64.
49. Molica S, Levato D, Dell'Olio M, et al. Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica*. 1996;81:428-33.

50. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5413-7.
51. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-7.
52. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848-54.
53. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-38.
54. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639-47.
55. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108:1135-44.
56. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99:1023-9.
57. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:181-6.

58. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1410–6.
59. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:4609-14.
60. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105:2036-41.
61. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.
62. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363:105-11.
63. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:893-901.
64. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2005;104:2124-32.
65. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17:28-40.

66. Stankovic T, Weber P, Stewart G, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 1999;353:26-9.
67. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85:1580-9.
68. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 2004;22:3937-49.
69. Tam CS, Keating MJ. Chemoimmunotherapy of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:479-98.
70. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-70.
71. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1675-80.
72. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14863-8.
73. Slonim DK. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat Genet*. 2002;32 Suppl:502-8.
74. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101:4944-51.

75. Dürig J, Nüchel H, Hüttmann A, et al. Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:2748-55.
76. Fält S, Merup M, Gahrton G, et al. Identification of progression markers in B-CLL by gene expression profiling. *Exp Hematol*. 2005;33:883-93.
77. Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, et al; Spanish National Cancer Centre (CNIO). Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia*. 2007;21:1984-91.
78. Del Giudice I, Chiaretti S, Tavoraro S, et al. Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases. *Blood*. 2009;114:638-46.
79. Friedman DR, Weinberg JB, Barry WT, et al. A genomic approach to improve prognosis and predict therapeutic response in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15:6947-55.
80. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood*. 2004;104:1428-34.
81. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352:804-15.
82. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:415-24.

83. Schroeder Jr HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology Today*. 1994;15:288–94.
84. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:1087-93.
85. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, et al. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2005;65:7328-37.
86. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:841-94.
87. Tavolaro S, Chiaretti S, Messina M, et al. 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;34:733-41.
88. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66:7158-66.
89. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*. 2001;14:13-20.
90. Lemaire M, Froment C, Boutros R, et al. CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle*. 2006;5:1649-53.

91. Teng CH, Huang WN, Meng TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2007;282:28395-407.
92. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood.* 2008;112:188-95.
93. Zupo S, Isnardi L, Megna M, et al. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood.* 1996;88:1365-74.
94. Zupo S, Massara R, Dono M, et al. Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood.* 2000;95:1199-206.
95. Ricciardi MR, Petrucci MT, Gregorj C, et al. Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;113:391-9.
96. Contri A, Brunati AM, Trentin L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest.* 2005;115:369-78.
97. 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;109:3989-97.

98. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*. 2005;19:1018-24.
99. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007;109:2032-9.
100. Peckham D, Andersen-Nissen E, Finkelman FD, et al. Difference in apoptosis induction between surface IgD and IgM. *Int Immunol*. 2001;13:285-95.
101. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, et al. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood*. 2007;109:4424-31.
102. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, et al. Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL. *Br J Haematol*. 2010;149:160-3.
103. Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*. 2002;298:1912-9.
104. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
105. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411:355-65.

106. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:361-70.
107. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2000;103:211–25.
108. Van Etten RA. c-Abl regulation: a tail of two lipids. *Curr Biol*. 2003;13:R608-10.
109. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005;353:172-87.
110. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 2000;19:5636-42.
111. Chase A, Cross NCP. Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. *Clinical Science*. 2006;111:233–49.
112. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia: signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18:545–68.
113. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18:189–218.
114. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054–61.

115. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387–97.
116. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779–90.
117. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144–8.
118. Chesi M, Brents LA, Ely SA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood*. 2001;97:729-36.
119. Watanabe D, Ezoe S, Fujimoto M, et al. Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *Br J Haematol*. 2004;126:726-35.
120. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295:139–45.
121. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood*. 2001;97:2440–8.
122. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, et al. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood*. 2005;105:3127–32.

123. Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, et al. Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Subclassification of Leukemia: Report From the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20.
124. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:513-609.
125. Wechsler RJ, Monroe JG. Src-family tyrosine kinase p55fgr is expressed in murine splenic B cells and is activated in response to antigen receptor cross-linking. *J Immunol*. 1995;154:3234-44.
126. Hata A, Sabe H, Kurosaki T, et al. Functional analysis of Csk in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:7306-13.
127. Dal Porto JM, Burke K, Cambier JC. Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck. *Immunity*. 2004;21:443-53.
128. Dymecki SM, Niederhuber JE, Desiderio SV. Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cells. *Science*. 1990;247:332-6.
129. Takata M, Sabe H, Hata A, et al. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J*. 1994;13:1341-9.
130. Alkan S, Huang Q, Ergin M, et al. Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am J Hematol*. 2005;79:97-106.

131. Aloyz R, Grzywacz K, Xu ZY, et al. Imatinib sensitizes CLL lymphocytes to chlorambucil. *Leukemia*. 2004;18:409-14.
132. Chow KU, Nowak D, Hofmann W, et al. Imatinib induces apoptosis in CLL lymphocytes with high expression of Par-4. *Leukemia*. 2005;19:1103-5.
133. Lin K, Glenn MA, Harris RJ, et al. c-Abl expression in chronic lymphocytic leukemia cells: clinical and therapeutic implications. *Cancer Res*. 2006;66:7801-9.
134. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;65:4500-5.
135. Shah NP, Tran C, Lee FY, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305:399-401.
136. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47:6658-61.
137. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res*. 2006;66:473-81.
138. Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6924-32.

139. Nam S, Kim D, Cheng JQ, et al. Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:9185-9.
140. Brave M, Goodman V, Kaminskas E, et al. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2008;14:352-9.
141. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia.* 2008;22:1200-6.
142. Ottmann O, Dombret H, Martinelli G, et al. Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood.* 2007;110:2309-15.
143. Foà R, Vitale A, Guarini A, et al. First line treatment of adult Ph+ acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Final results of the GIMEMA LAL1205 study. *ASH, San Francisco, CA December 6–8, 2008, abs#305.*
144. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, et al. First report of phase II study of dasatinib with hyperCVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010 May 13.
145. Veldurthy A, Patz M, Hagist S, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood.* 2008;112:1443-52.

146. Song Z, Lu P, Furman RR, et al. Activities of SYK and PLCgamma2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Clin Cancer Res.* 2010;16:587-99.
147. Harr MW, Caimi PF, McColl KS, et al. Inhibition of Lck enhances glucocorticoid sensitivity and apoptosis in lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Differ.* 2010 Mar 19.
148. Amrein L, Hernandez TA, Ferrario C, et al. Dasatinib sensitizes primary chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to chlorambucil and fludarabine in vitro. *Br J Haematol.* 2008;143:698-706.
149. O'Brien S. New agents in the treatment of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:457-64.