



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale “G. Patrassi”

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXIII CICLO**

**ESPRESSIONE DELLA CORTACTINA E SUO
COINVOLGIMENTO NELL’AGGRESSIVITÀ
DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa PAOLA ZANOVELLO

Supervisore: Ch.mo Prof. GIANPIETRO SEMENZATO

Correlatore: Dott. LIVIO TRENTIN

Dottoranda: Dott.ssa VERONICA MARTINI

31 gennaio 2011

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag.	1
RIASSUNTO	pag.	3
ABSTRACT	pag.	5
INTRODUZIONE	pag.	7
1. Leucemia linfatica cronica di tipo B	pag.	7
1.1 Epidemiologia	pag.	7
1.2 Eziologia	pag.	8
1.3 Caratteristiche cliniche	pag.	8
1.4 Diagnosi	pag.	9
1.5 Prognosi	pag.	12
1.5.1 Fattori prognostici clinici	pag.	13
1.5.2. Fattori prognostici biologici	pag.	14
1.6 Trattamento	pag.	20
2. Linfociti B neoplastici	pag.	24
2.1 Controllo dell'apoptosi	pag.	27
2.2 Trasduzione del segnale mediata dal BCR	pag.	28
2.3 Microambiente	pag.	33
3. Cortactina	pag.	37
3.1 Struttura proteica	pag.	37
3.2 Regolazione e funzioni della cortactina	pag.	38
3.3 La cortactina nei tumori	pag.	40
SCOPO DELLA TESI	pag.	45
MATERIALI E METODI	pag.	47
1. Pazienti	pag.	47
2. Analisi immunofenotipica	pag.	50

3. Separazione dei linfociti B da sangue periferico	pag.	51
3.1 Stratificazione su Ficoll/Hypaque	pag.	51
3.2 Purificazione dei linfociti B mediante <i>kit</i> rosettesep	pag.	52
4. Preparazione dei lisati cellulari	pag.	52
5. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS	pag.	53
6. <i>Western blotting</i>	pag.	54
7. Elettroforesi bidimensionale (2DE-PAGE)	pag.	55
8. Analisi dei linfociti B in microscopia confocale	pag.	56
9. Estrazione dell'RNA	pag.	56
10. Sintesi del cDNA	pag.	58
11. Valutazione dell'espressione genica della cortactina mediante real-time RT-PCR	pag.	59
12. Valutazione delle isoforme della cortactina mediante RT-PCR	pag.	60
13. Stimoli cellulari	pag.	61
14. Analisi zimografica	pag.	61
15. Test di migrazione in camera di <i>Boyden</i>	pag.	62
16. Analisi statistica	pag.	64
RISULTATI	pag.	65
1. La cortactina è sovraespressa nei linfociti B di LLC-B	pag.	65
2. La cortactina è maggiormente espressa nei linfociti B di pazienti a prognosi più sfavorevole	pag.	66
3. La cortactina non è sovraespressa dai linfociti T dei pazienti con LLC-B.	pag.	67
4. La cortactina presenta forme proteiche a diverso peso molecolare	pag.	67
5. Le forme p75 e p85 originano dalle forme p70 e p80 per modificazioni post trascrizionali	pag.	71
6. Caratterizzazione delle varianti di <i>splicing</i> nei linfociti B normali e patologici	pag.	73
7. Corrispondenza tra varianti di <i>splicing</i> e forme proteiche	pag.	74
8. L'espressione della cortactina correla con l'indice di migrazione delle cellule B neoplastiche.	pag.	75

9. L'espressione della cortactina correla con il rilascio della metallo proteasi di matrice 9 (MMP-9) da parte delle cellule B neoplastiche.	pag.	77
10. La cortactina è localizzata in maniera anomala nel citosol dei linfociti B di LLC-B	pag.	80
DISCUSSIONE	pag.	85
BIBLIOGRAFIA	pag.	89

ABBREVIAZIONI

Ac	Anticorpo
AcMo	Anticorpo monoclonale
Ag	Antigene
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3
BC	Buffy coat (campione normale)
BCR	B-Cell Receptor
CCL/R	Chemokine (C-C motif) Ligand/Receptor
cDNA	DNA complementare
CXCL/R	Chemokine (C-X-C motif) Ligand/Receptor
ECM	Matrice extracellulare
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
Fab	Frammento legante l'antigene
Fc	Frammento cristallizzabile
F/H	Ficoll/Hypaque
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HAX-1	HS1-Associated Protein X-1
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HS1	Hematopoietic lineage cell Specific protein 1
Hsp90	Heat shock protein of 90kDa
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
I-FISH	Interphase Fluorescence In Situ Hybridization
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleuchina
IP3	Inositotrilfosfato
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMPs	Matrix Metalloproteases
MP	Membrana Plasmatica
MT-MMP	Membrane Type-Matrix Metalloproteasis
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
NTA	N-Terminale Acidico
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Fosfatidilinositolodifosfato
PLC	Phospholipase C
Plts	Piastrine
SDF-1α	Stromal Derived Factor-1 α
SDS-PAGE	Sodio Dodecil Solfato/Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide
SFKs	Src Family Kinases
SH	Src Homology
SHM	Ipermutazioni somatiche
sIg	Immunoglobuline di superficie
SV1	Splicing variant 1
SV2	Splicing variant 2
Syk	Spleen tyrosine kinase
TGFα	Transforming Growth Factor- α
TGN	Trans-Golgi Network
Th	Linfociti T helper
V_H	Regione variabile della catena pesante delle Ig
V_L	Regione variabile della catena leggera delle Ig
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
wb	<i>Western blotting</i>
WBC	White Blood Cell
WT	Wild-Type
ZAP-70	Zeta-Associated Protein 70

RIASSUNTO

La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B) è la forma più comune di leucemia dell'adulto ed è caratterizzata dall'accumulo clonale di piccoli linfociti B CD5+ dovuto sia ad una crescita incontrollata che ad una resistenza all'apoptosi. Un ruolo importante nella sopravvivenza dei linfociti B leucemici è giocato dalla chinasi Lyn. Qualche anno fa abbiamo dimostrato che la Src chinasi Lyn è sovraespressa, costitutivamente attiva e distribuita in maniera anomala nelle cellule B neoplastiche rispetto ai linfociti B normali. Considerato che uno dei suoi substrati, la proteina HS1, si trova sovraespressa e coinvolta nella sopravvivenza del clone neoplastico, abbiamo focalizzato l'attenzione su un altro putativo substrato di Lyn: la proteina cortactina poiché omologa di HS1 e sovraespressa in diversi tumori.

Mediante *western blotting* e real-time RT-PCR in questo studio abbiamo dimostrato che i linfociti B leucemici esprimono una maggiore quantità di cortactina rispetto ai linfociti B di soggetti sani. Correlando i dati di espressione con uno dei fattori prognostici più importanti della LLC-B, la presenza o assenza di ipermutazioni somatiche (SHM), abbiamo evidenziato che i livelli di espressione della cortactina sono più elevati in pazienti a prognosi sfavorevole (SHM-) rispetto a quelli a prognosi favorevole (SHM+).

Inoltre, abbiamo dimostrato che nei linfociti B neoplastici la sovraespressione della cortactina correla sia con l'indice di migrazione cellulare (IdM) che con la produzione della metalloproteasi di matrice 9 (MMP-9), suggerendo come nei pazienti con LLC-B la cortactina possa essere in qualche modo coinvolta nel processo di invasione dei linfonodi e della milza.

Come riportato in letteratura, la cortactina può influenzare la migrazione cellulare non solo attraverso la sua sovraespressione, ma anche mediante l'espressione di diverse varianti di *splicing*. Il nostro studio ha evidenziato che nei linfociti B normali è presente solo la variante di *splicing* SV1, mentre nei linfociti B di circa il 50% dei nostri pazienti è maggiormente espressa quella WT. Poiché è noto in letteratura che la variante WT rende alcuni tipi di cellule tumorali più aggressivi e mobili, si

potrebbe pensare che l'espressione di tale isoforma abbia un ruolo rilevante nella diffusione della LLC-B.

In conclusione, i dati finora ottenuti convergono tutti nell'affermare un ruolo negativo della cortactina nel decorso clinico della leucemia linfatica cronica di tipo B, suggerendo, quindi, che la cortactina possa essere coinvolta nella patogenesi della LLC-B.

ABSTRACT

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common form of leukemia in adults. It is characterized by the accumulation of clonal CD5+ B lymphocytes due to uncontrolled growth and resistance to apoptosis. The Src tyrosin kinase Lyn plays an important role in the survival of B lymphocytes. We previously observed that this kinase is overexpressed, constitutively active and anomalously distributed in malignant B cells as compared to normal B lymphocytes. Moreover we also found that one of its substrates, HS1, is overexpressed and involved in survival of B neoplastic cell; now we focused our attention on protein named cortactin, since this protein is homolog of HS1, a putative substrate of Lyn and it is overexpressed in many tumors.

In this study, by *western blotting* analysis and real-time RT-PCR, we demonstrated that in B neoplastic cells the protein cortactin is overexpressed with respect to normal B lymphocytes. When the expression level was correlated with somatic hypermutations of immunoglobulin heavy-chain variable region, one of the most important prognostic factors for B-CLL, we observed that the level of cortactin is higher in patients with poor prognosis with respect to those with favorable one. Moreover, we demonstrated that in neoplastic B lymphocytes cortactin overexpression correlated with both migration index and MMP9 production, suggesting that in these patients cortactin could be involved in the disease diffusion.

As reported in literature, cortactin can regulate cellular migration not only by its overexpression, but also by the expression of mRNA splicing variants. We found that normal B cells expressed only the SV1 splice variant, while in the neoplastic B lymphocytes about half of our patients expressed the WT variant. Since it has been reported that WT variant increases cell migration, we hypothesized that the expression of WT isoform could be another mechanism by which cortactin can modulate F-actin dynamics and cell migration.

All these findings converge to support a negative role of cortactin in clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia, suggesting that cortactin could be involved in pathogenesis and progression of B-CLL.

INTRODUZIONE

1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DI TIPO B

La Leucemia Linfatica Cronica a cellule B (LLC-B) è una malattia linfoproliferativa cronica di natura monoclonale, caratterizzata da un accumulo di piccoli linfociti B maturi CD5+ nel sangue periferico, nel midollo osseo, negli organi linfatici e raramente anche in sedi extralinfatiche¹. Nei casi, meno frequenti, in cui prevalga l'interessamento linfonodale rispetto a quello ematico, la malattia viene spesso identificata come Linfoma a Piccoli Linfociti (LPL). La LLC-B è una patologia che interessa prevalentemente soggetti adulti e l'incidenza aumenta con l'età. La prognosi è altamente variabile e questi pazienti sopravvivono in media una decina d'anni.

1.1 Epidemiologia

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

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

1.2 Eziologia

L'eziologia è sconosciuta; l'esposizione ai comuni agenti cancerogeni non sembra associarsi allo sviluppo della malattia. Sono in fase di studio una potenziale relazione tra l'insorgenza della LLC-B e condizioni a carattere infiammatorio ed autoimmune^{2,3}. È stata, invece, ben documentata una familiarità che interessa almeno il 5-10% dei casi. Ciò è emerso sia dall'osservazione che la malattia è molto rara in Cina, Corea e Giappone e che l'incidenza in questi gruppi etnici non si modifica nemmeno tra i soggetti emigrati in paesi a maggior incidenza, sia dalla constatazione, rilevata attraverso studi epidemiologici, che il rischio di ammalarsi per i parenti di primo grado di un soggetto affetto è circa 7-8 volte maggiore rispetto al rischio della popolazione generale. Inoltre, è stato messo in evidenza come tra i casi familiari sussista il "fenomeno dell'anticipazione" per cui, con l'avanzare delle generazioni, l'esordio della malattia tende ad essere più precoce e il decorso clinico più severo^{4,6}.

1.3 Caratteristiche cliniche

Il decorso clinico e la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC-B sono piuttosto variabili: alcuni soggetti rimangono asintomatici e non richiedono alcun trattamento per diversi anni, mentre altri hanno un andamento clinico aggressivo e difficilmente controllabile con la terapia. Molte volte la LLC-B viene accertata casualmente a seguito di esami di laboratorio di routine; in altri casi si manifesta con astenia, perdita di peso, malessere, febbre o febbricola, anemia e/o piastrinopenia, aumento di volume dei linfonodi ed epato-splenomegalia. I segni e i sintomi sono legati all'entità di infiltrazione dei tessuti. Con il progredire della malattia, l'infiltrazione midollare può provocare neutropenia o piastrinopenia. Alcuni pazienti possono manifestare fenomeni autoimmuni fra i quali il più frequente è l'anemia emolitica autoimmune (manifestata dall'11% dei pazienti). Il fenomeno dell'ipogammaglobulinemia, caratteristico dei soggetti affetti da LLC-B, può portare il paziente ad avere un quadro di immunodeficienza ad elevata mortalità per infezioni^{7,8}.

Sebbene le cause di morte dei pazienti con LLC siano spesso da attribuire a patologie concomitanti, vista l'età avanzata della maggior parte di essi, e soprattutto alle complicanze infettive, in alcuni casi

possono svilupparsi sindromi evolutive che segnano un netto peggioramento della prognosi. Una di queste è la sindrome di Richter, che consiste nella trasformazione della malattia in un linfoma a grandi cellule che si manifesta con un aggravamento rapido delle condizioni cliniche, comparsa di sintomi B e vistosa linfadenomegalia (mediana di sopravvivenza: circa 6 mesi)⁹. L'altra sindrome evolutiva è la trasformazione in leucemia prolinfocitica, anch'essa contrassegnata da rapido decadimento fisico e prognosi infausta (mediana di sopravvivenza: circa 14 mesi). Molto rara è l'insorgenza di una leucemia acuta linfoblastica in corso di LLC, mentre la comparsa di una leucemia acuta mieloide, così come quella di altre neoplasie non ematologiche, sono eventi correlabili al deficit immunologico e ai trattamenti chemio-radioterapici¹⁰.

1.4 Diagnosi

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

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

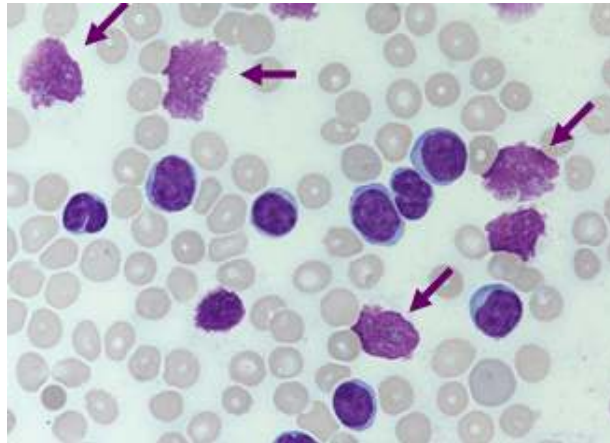


Figura 1. Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da LLC. Le frecce indicano le ombre di Gumprecht, patognomoniche della LLC.

Il French-American-British Group (FAB) ha stabilito che il numero di linfociti atipici (prolinfociti, immunoblasti, linfoblasti) non debba superare il 10% nella formula leucocitaria (LLC tipica). La presenza di un numero di questi elementi compreso tra il 10 e il 55% configura il quadro di LLC atipica e, in particolare, nel caso si tratti di prolinfociti (PL), della forma LLC/PL, caratterizzata da un andamento clinico più aggressivo. Un numero di prolinfociti maggiore del 55% comporta la diagnosi di leucemia prolinfocitica (LPL).

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

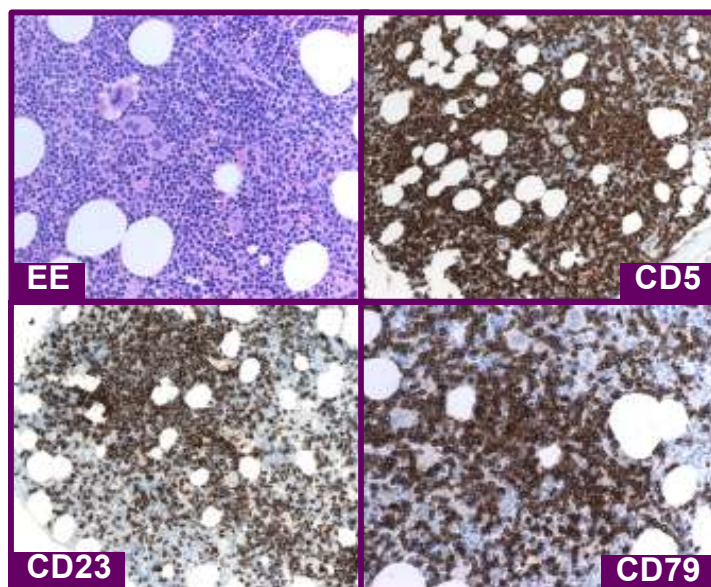


Figura 2. Biopsia osteomidollare di un paziente affetto da LLC. Preparato colorato con ematossilina-eosina (EE) e tre immagini immunohistologiche che evidenziano alcuni marcatori diagnostici.

- 3) l'analisi dell'immunofenotipo dei linfociti è indispensabile per differenziare la LLC-B da altre condizioni linfoproliferative quali la LPL, la leucemia a cellule capellute, il linfoma mantellare e altre forme di linfomi. Tre sono gli elementi caratterizzanti il fenotipo di membrana delle cellule della LLC-B:
 - a) l'espressione di un unico tipo di catena leggera delle immunoglobuline (κ o λ);
 - b) l'espressione dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD23) assieme ad un unico marcatore normalmente espresso sulle cellule T (CD5); il CD23 riveste particolare importanza nella diagnosi differenziale con il linfoma mantellare (CD5+ ma CD23-);
 - c) la bassa espressione di CD79b e delle immunoglobuline di superficie (sIg), diversamente della LPL-B che esprime sIg ad alta intensità; nella LC-B esse risultano essere prevalentemente IgM, seguite da IgD, IgG e IgA; non è rara la coespressione di IgM e IgD (figura 3).

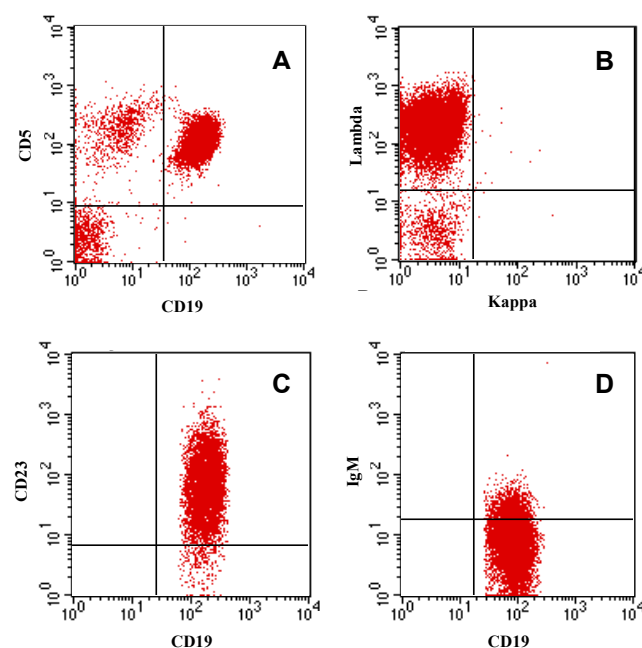


Figura 3. Citogrammi relativi ad un caso rappresentativo di LLC. La popolazione di linfociti B (CD19+) esaminata nell'esempio risulta positiva per CD5 (pannello A) e per CD23 (pannello C), esprime un unico tipo di catena leggera (λ , pannello B) ed esprime IgM di superficie a bassa intensità (pannello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

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

Altri esami di laboratorio sono generalmente eseguiti per confermare la diagnosi, definire l'estensione della malattia e prevenirne le complicanze: elettroforesi delle proteine sieriche e dosaggio delle Ig, test di Coombs, studio della funzionalità renale ed epatica; prima di iniziare una terapia immunosoppressiva è necessario accertarsi che non vi sia evidenza di infezioni da parte dei comuni agenti virali in atto (per esempio HBV, HCV, CMV)¹¹.

1.5 Prognosi

Data l'estrema eterogeneità della malattia, la definizione della prognosi nella gestione di un caso di LLC-B riveste un ruolo decisivo e

pone le maggiori difficoltà soprattutto per la valutazione di una corretta terapia, che potrà variare⁵.

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

1.5.1 Fattori prognostici clinici

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

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

Questo sistema è stato in seguito modificato, definendo lo stadio 0 come stadio a basso rischio, raggruppando gli stadi 1 e 2 nello stadio a rischio intermedio, e gli stadi 3 e 4 nello stadio ad alto rischio⁵.

Il sistema secondo Binet individua solamente tre stadi:

- stadio A: linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfoidi coinvolte (comprendendo sia i linfonodi che la milza e il fegato);
- stadio B: linfocitosi periferica e midollare con più di tre aree linfoidi coinvolte;
- stadio C: anemia con $\text{Hb} < 10\text{ g/dL}$ e/o piastrinopenia con $\text{Plts} < 100.000/\mu\text{L}$, indipendentemente dal numero di aree linfoidi coinvolte⁸.

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

3) Modalità di infiltrazione del midollo osseo: un pattern di infiltrazione diffuso si associa a una cattiva prognosi^{12,13}.

1.5.2 Fattori prognostici biologici

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

- 1) La percentuale di prolinfociti.** Se questa risulta <10% (LLC tipica) la probabilità di evoluzione in PL è decisamente scarsa; se invece la percentuale di prolinfociti è compresa tra 10% e 55% (LLC/PL) la probabilità che si verifichi un progressivo aumento dei prolinfociti nel sangue periferico è pari ad un terzo, mentre nel 18% dei casi può verificarsi l’evoluzione del quadro morfologico in PL conclamata¹⁴.
- 2) Il valore di $\beta 2$ microglobulina.** Questo parametro è inversamente correlato con la sopravvivenza; un suo aumento è indice di un’aumentata attività proliferativa delle cellule neoplastiche, essendo correlato al tempo di raddoppiamento linfocitario e ad un’imminente progressione nella stadiazione clinica¹⁴.
- 3) Il valore di timidina chinasi (TK).** I livelli sierici di questo enzima si sono dimostrati in grado di identificare i pazienti affetti da una malattia indolente rispetto a quelli con un’elevata probabilità di progressione a breve termine. In particolare, livelli di TK <7,1U/l si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari a 49 mesi, mentre livelli di TK >7,1U/l si associano ad un intervallo medio libero da progressione pari soltanto a 8 mesi⁸.
- 4) Il valore di CD23 solubile.** La molecola CD23 è normalmente presente sulla membrana dei linfociti B dove media diverse funzioni; essa è in grado di prevenire l’apoptosi delle cellule del CG ed è coinvolta nella costimolazione della produzione dell’IFN- γ da parte dei linfociti T. I frammenti di clivaggio della molecola (sCD23), i cui livelli possono essere determinati nel siero del paziente, risultano più elevati nei pazienti affetti da LLC ed è stato

dimostrato come essi siano correlati allo stadio clinico secondo Rai e al numero di linfociti B circolanti. L'aumento del sCD23 anticipa di circa 48 mesi la progressione della malattia ed è un indice affidabile del rischio di morte del paziente^{8,15}.

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

- 1) **Le ipermutazioni somatiche (SHM) dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgV_H).** La presenza di SHM in percentuale inferiore al 2% rispetto alla sequenza "germline" identifica un gruppo di pazienti (SHM non mutati o SHM-) a prognosi negativa, con una mediana di sopravvivenza dopo la diagnosi di circa 8 anni, mentre una percentuale di mutazione uguale o superiore al 2% (SHM mutati o SHM+) identifica un gruppo di pazienti con mediana di sopravvivenza di circa 25 anni. Questo fattore prognostico, identificato nel 1999 da due distinti gruppi di ricercatori, ha assunto un importante significato per il suo elevato valore predittivo^{16,17}. L'analisi del repertorio del BCR dei linfociti B leucemici e, in particolare, la distribuzione delle diverse famiglie di geni per le regioni V delle catene pesanti delle Ig espresse, ha evidenziato un'elevata frequenza del gene V_H3.21 che, indipendentemente dal suo stato mutazionale, si associa ad un andamento clinico più rapido ed aggressivo. Questo dato, tuttavia, è stato evidenziato soprattutto tra i pazienti che vivono nei paesi del Nord Europa, mentre non è stato confermato nei paesi dell'area mediterranea¹⁸.
- 2) **L'espressione sulla membrana cellulare di CD38 e CD49d.** I casi di LLC-B con una quota di cellule CD38 positive superiore al 30% presentano una prognosi negativa. In realtà, il valore del *cut-off* per cui separare i casi CD38+ da quelli CD38- non è unanimemente definito in letteratura, con alcuni autori che lo hanno spostato al

20%¹⁹, o al 7%¹⁸. Rispetto alle SHM, CD38 ha un valore prognostico indipendente. Dapprima, infatti, si riteneva che la sua espressione correlasse strettamente con lo stato non mutato delle regioni V_H delle Ig. Studi più approfonditi hanno invece ridimensionato questa affermazione che risulta non vera in circa un terzo dei casi. Questi presentano una mediana di sopravvivenza di circa 15 anni, un valore intermedio tra i casi SHM-/CD38+ e quelli SHM+/CD38-. Inoltre, un limite di questo marcatore è la sua variabilità nel corso della malattia, in particolare dopo trattamento. Sembra infatti che la chemioterapia colpisca prevalentemente le cellule CD38-, determinando, alla ripresa, un aumento delle cellule CD38+. Tuttavia sono stati identificati casi in cui l'espressione di CD38 varia anche in assenza di trattamento, sia nel senso di un aumento, sia di una diminuzione. Ciò limita la sua utilità nel definire la prognosi, tanto che negli ultimi anni ad esso vengono preferiti marcatori più attendibili e stabili nel tempo¹⁶⁻¹⁸.

È stata dimostrata in molti casi la coespressione sulla membrana plasmatica dei linfociti B di LLC-B delle molecole CD38 e CD49d. CD49d è una molecola di adesione variabilmente espressa nelle cellule di LLC-B: una percentuale di espressione maggiore del 30% ha permesso di discriminare i pazienti in due gruppi prognostici²⁰.

- 3) **L'espressione intracitoplasmatica della protein chinasi associata alla catena ζ del TCR di 70 kDa (ZAP-70).** L'identificazione di questo fattore prognostico si deve alle indagini condotte con la tecnica del DNA microarray sulle cellule di LLC SHM+ o SHM- per determinare se vi fossero differenze nell'espressione genica²¹. Il gene codificante ZAP-70 è risultato quello che meglio correla con lo stato mutazionale delle Ig, essendo espresso nei casi non mutati e non espresso nei casi mutati⁵. Il grado di correlazione, in realtà, non è concorde in tutti gli studi condotti a tal proposito, variando da un valore minimo del 77%²² ad uno massimo del 95%²². Queste differenze sono state attribuite alla presenza di altri fattori prognostici indipendenti, in particolare ad alcune alterazioni cromosomiche (del 17p e del 11q)²³. La valutazione combinata di ZAP-70 e CD38 si è dimostrata in grado di predire con un alto livello di confidenza sia la sopravvivenza globale che l'intervallo

libero da terapia; questi due fattori sono quindi di estrema utilità nella valutazione dei pazienti in stadio precoce di malattia soprattutto al fine di definire una strategia terapeutica “risk adapted”²⁴. L’analisi dell’espressione di ZAP-70 può essere effettuata per mezzo di diverse metodiche: la citofluorimetria, l’immunoistochimica, il western-blotting, la quantificazione dell’mRNA per mezzo di real-time RT-PCR. Tra queste, quella che appare come la più vantaggiosa soprattutto per la sua ampia diffusione e semplicità di applicazione è la citofluorimetria.

- 4) **La presenza di alterazioni cromosomiche.** Le più frequenti sono alcune delezioni (11q22-23, 17p13, 13q14, 6q21) e la trisomia del cromosoma 12. Per mezzo della metodica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), effettuata sui nuclei in interfase dei linfociti leucemici, è possibile identificare la presenza di aberrazioni cromosomiche nell’80% circa dei casi. La prevalenza delle alterazioni più comuni è stata così stimata da uno studio multicentrico condotto in Germania: 13q- 55%; 11q- 18%; +12 16%; 17p- 7%; 6q- 7%²⁵. Per ciascuna di queste alterazioni sono stati identificati un valore prognostico e una correlazione con specifiche caratteristiche cliniche della malattia: la delezione 13q, se è l’unica alterazione presente, si associa ad una morfologia cellulare tipica ed a un decorso clinico indolente; la trisomia 12 si associa alla forma atipica di LLC; la delezione 6q identifica un sottogruppo di casi a prognosi intermedia; la delezione 11q e la delezione 17p sono invece associate ad un decorso clinico aggressivo, con marcata linfoadenomegalia e aumentata resistenza al trattamento. A questo proposito, l’US Intergroup Phase III Trial ha recentemente dimostrato, con uno studio prospettico, che rispetto agli altri marcatori prognostici, solo l’indagine citogenetica ha rilevanza nel predire l’intervallo libero da progressione della malattia dopo terapia con Fludarabina. La presenza di alterazioni cromosomiche ad alto rischio giustifica dunque il ricorso a trattamenti più aggressivi (figura 4)²⁶. Le alterazioni cromosomiche sono indipendenti dallo stato mutazionale, anche se appare evidente una maggior frequenza di 11q- e 17p- tra i casi non mutati e di 13q- tra i casi mutati. Tuttavia, circa i due terzi dei casi non mutati non

mostra alcuna alterazione cromosomica con un riconosciuto valore prognostico negativo. Questo dato comporta che la citogenetica possa venire utilizzata quale ulteriore strumento di stratificazione del rischio da affiancare agli altri marcatori prognostici^{9,17}.

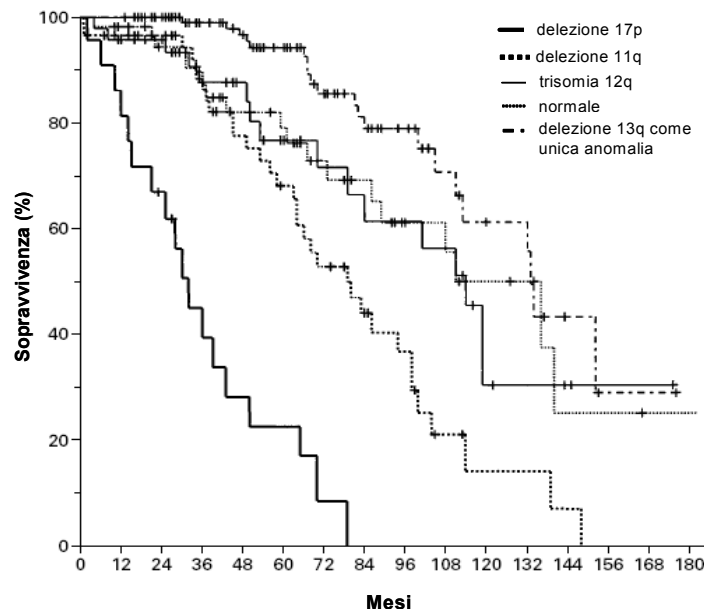


Figura 4. Curve di sopravvivenza relative alle più comuni alterazioni cromosomiche in pazienti con LLC. I tempi di sopravvivenza media per i gruppi con del(17p), del(11q), 12+, cariotipo normale e del(13q) sono pari rispettivamente a 32, 79, 114, 111, 133 mesi. (Modificata da Dohner H et al. N Engl J Med 2000; 343: 1910-1916)¹⁷.

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

di progressione tra i pazienti con IgV_H mutate, mentre la lunghezza dei frammenti di restrizione telomerici assume un maggior valore predittivo tra i pazienti con IgV_H non mutate (figura 5)^{8,27}.

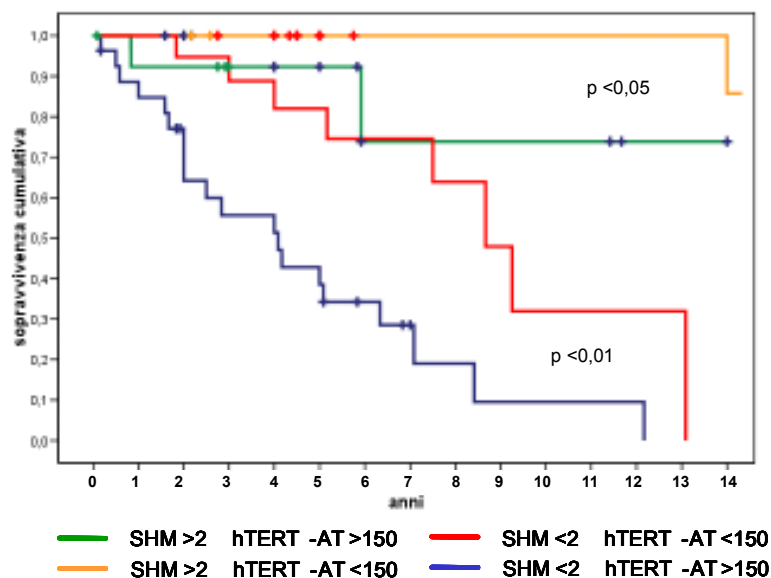


Figura 5. Curve di sopravvivenza relative ai gruppi di pazienti mutati e non mutati, differenziati secondo il livello di espressione di tutti i trascritti della telomerasi (hTERT-AT). (Terrin L et al. Leukemia 2007; 21 : 965-972).

Pur essendosi dimostrati tutti dotati di un sicuro potere predittivo, i fattori prognostici biologici più recenti richiedono ulteriori studi clinici controllati per standardizzarli e per rendere unanime la loro identificazione ed interpretazione, al fine di poter definire, con maggior sicurezza, la loro capacità di indicare il miglior atteggiamento terapeutico¹¹. A questo scopo sono in corso numerosi studi prospettici, sia su pazienti in stadi precoci di malattia, sia su pazienti in stadi più avanzati.

Negli ultimi anni si sta anche studiando il coinvolgimento nella patogenesi della LLC-B dei microRNA, ovvero, piccole molecole di RNA a singolo filamento di 20-22 nucleotidi che svolgono diverse funzioni, la più nota è una regolazione post-trascrizionale: legandosi ad uno specifico filamento di mRNA o ad una specifica proteina ne inibiscono l'attività. In particolare, è stato dimostrato che in tutti i pazienti di LLC-B in cui è sovraespressa la molecola antiapoptotica Bcl2 sono deleti o down regolati MIRN15a e MIRN16-1, localizzati nel locus cromosomico 13q14. Inoltre, è

stato dimostrato che trasfettando le cellule con questi due microRNA, Bcl2 viene bloccato e nella cellula viene ripristinato il normale processo di apoptosi. Gli studi attualmente in corso, mirano ad individuare quali altri microRNA siano coinvolti nella patologia in modo da sviluppare non solo nuovi fattori prognostici, ma anche nuove terapie geniche più complete e mirate²⁸.

1.6 Trattamento

La decisione su quando iniziare un trattamento nella LLC-B dipende dai sintomi clinici, dallo stadio e dall'attività della malattia. Una terapia citostatica è sempre indicata nei pazienti ad alto rischio (stadio 3 e 4 di Rai, C di Binet), mentre nei pazienti a rischio intermedio e basso (stadio 0,1 e 2 di Rai, A e B di Binet) l'indicazione si pone solo se si è in presenza di: tempo di raddoppiamento linfocitario inferiore ad un anno; aumento delle linfadenopatie; sintomi legati all'ingombro splenico e/o all'ipersplenismo; comparsa di sintomi sistemici (sintomi B) e/o di prurito. Negli altri casi, è indicata una strategia di "watch and wait"²⁹.

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

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

loro effetti avversi, in particolare nel favorire le infezioni opportunistiche. Tuttavia, essi sono utilizzati per contenere le complicanze autoimmuni della malattia.

Negli anni passati, sulla base delle esperienze nel campo dei linfomi a basso grado, si è tentato di utilizzare combinazioni di chemioterapici quali CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina, Prednisone) o COP (Ciclofosfamide, Vincristina, Prednisone); sebbene essi diano con elevata frequenza risposte complete, non hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza a fronte, peraltro, di una maggiore tossicità. Attualmente rappresentano un'opzione utilizzabile nei pazienti ad alto rischio che richiedono un'azione terapeutica energica^{30,31}.

Dalla metà degli anni novanta, il trattamento di prima scelta per gran parte dei casi di LLC è rappresentato dall'uso degli analoghi delle purine. In questa classe di farmaci sono annoverati la Pentostatina, la Cladribina e la Fludarabina; il primo è un inibitore della adenosina deaminasi, mentre gli altri due agiscono come inibitori della DNA-polimerasi. Tra questi, quello che si è dimostrato più efficace nella LLC-B è la Fludarabina (25-30mg/m² per 5 giorni al mese, per 3-6 mesi). Essa, utilizzata singolarmente, è in grado di dare una risposta globale nell'80% dei casi e una risposta completa nel 30% dei casi; inoltre, rispetto alla combinazione Clorambucile-Prednisone, la durata delle remissioni raggiunte è maggiore. Gli effetti collaterali sono prevalentemente dovuti alla mielosoppressione³². Nonostante gli effetti positivi in termini di risposta globale, la Fludarabina e gli altri analoghi delle purine non si sono dimostrate altrettanto efficaci nel migliorare il tasso di sopravvivenza rispetto al Clorambucile o agli agenti alchilanti³³⁻³⁶. Attualmente si ritiene che gli analoghi delle purine possano avere un'azione sinergica con gli alchilanti, impedendo la riparazione dei danni inflitti da questi al DNA delle cellule leucemiche³⁷. Sulla base di questo presupposto sono stati condotti alcuni trials clinici utilizzando combinazioni di questi farmaci. Il già citato US Intergroup Trial ha recentemente dimostrato che la combinazione di Ciclofosfamide e Fludarabina è in grado, rispetto alla sola Fludarabina, di dare un maggior tasso di risposta globale (74,3% *vs* 59,5%), di risposte complete (23,4% *vs* 4,6%) ed un aumento della sopravvivenza libera da malattia (31,6 *vs* 19,2 mesi). Al contrario, la combinazione dei due farmaci ha comportato una maggiore tossicità

midollare, con maggior incidenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia, senza che questo determinasse un aumento delle complicanze infettive³⁸.

Un ulteriore passo in avanti è stato compiuto con l'introduzione dell'immunoterapia, cioè l'uso di anticorpi monoclonali (AcMo) diretti contro antigeni di superficie delle cellule leucemiche. Il Rituximab è un AcMo chimerico diretto contro il CD20, un antigene espresso su tutti i linfociti B ma che nella LLC-B è caratteristicamente espresso a bassa intensità. Per questo motivo il Rituximab possiede solo una modesta attività se utilizzato singolarmente. Tuttavia, studi preclinici hanno evidenziato la capacità del Rituximab di aumentare l'efficacia di farmaci citotossici in linee cellulari resistenti, alterando la trasmissione dei segnali antiapoptotici; un esempio di come ciò accada è il blocco da parte del farmaco del recettore per IL-10 che inibisce l'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2³⁹. Inoltre, si è osservato che la Fludarabina è in grado di aumentare l'efficacia del Rituximab nell'indurre la lisi cellulare mediata dal complemento, attraverso la "down-regulation" cellulare delle proteine regolatorie del complemento CD55 e CD59⁴⁰. L'associazione del Rituximab alla Fludarabina e alla Ciclofosfamide è stata valutata in alcuni studi sia come terapia iniziale sia nei casi recidivanti o refrattari a terapie precedenti. In entrambi i casi, essa ha dimostrato un miglioramento del tasso di risposte globali e complete, queste ultime documentate anche a livello molecolare. Nei pazienti mai trattati precedentemente, la sopravvivenza libera da malattia si è dimostrata superiore a quattro anni in circa i due terzi dei pazienti^{41,42}. Gli effetti avversi del Rituximab sono essenzialmente correlati all'infusione endovenosa, a causa del rilascio di citochine (febbre, brividi, ipotensione, nausea); essendo più comuni alla prima infusione, si possono contenere adottando inizialmente dosi ridotte, per poi aumentarle gradualmente.

Il Campath-1H (alemtuzumab) è un AcMo diretto contro il CD52, espresso nel 95% dei linfociti umani, nei monociti e nei macrofagi. Può essere somministrato per via sottocutanea. Si è dimostrato molto efficace nell'indurre remissione nei pazienti con LLC recidivante o refrattaria, con buoni risultati anche nei pazienti mai trattati in precedenza. Inoltre, può venire utilizzato nei pazienti che hanno risposto alla Fludarabina per eliminare la malattia residua midollare⁴³. Tuttavia, esso può provocare

un'immunosoppressione marcata, per cui è necessaria una terapia di profilassi per l'infezione da *Pneumocystis carinii* e VZV, oltre al monitoraggio della riattivazione del CMV. L'associazione con Fludarabina e Ciclofosfamide è gravata da importante tossicità midollare, evento che comporta una particolare precauzione in termini di tempistica e durata di somministrazione dell'alemtuzumab⁴⁴.

Gli studi sulla patogenesi della LLC-B hanno offerto altri bersagli terapeutici; uno di questi è la proteina anti-apoptotica Bcl-2, che, nei pazienti in cui risulta espressa, si associa alla resistenza ai farmaci comunemente utilizzati. Un recente trial clinico randomizzato di fase III ha valutato l'efficacia dell'Oblimersen, un oligonucleotide antisense che, legandosi all'mRNA di Bcl-2, ne inibisce la traduzione, associato a Fludarabina e Ciclofosfamide. Esso si è dimostrato efficace nel migliorare la percentuale di risposte globali e complete nei pazienti refrattari o recidivanti esaminati, rispetto alla sola associazione di Fludarabina e Ciclofosfamide⁴⁵.

Il trapianto di cellule staminali è un'opzione possibile ma ancora non ben definita. Il trapianto autologo ha un alto tasso di risposte complete, ma è gravato da un'elevata probabilità di recidiva e sono necessari ulteriori studi che ne confrontino il rapporto rischio-beneficio rispetto alla chemioterapia. L'allogtrapianto è indicato nei pazienti refrattari in stadio avanzato ma, pur essendo l'unica strategia potenzialmente in grado di guarire dalla malattia, è fortemente limitato dall'età del paziente, che non può essere superiore ai 45 anni (figura 6)^{13,46}.

Attualmente sono in atto protocolli sperimentali per il trattamento della LLC-B con la lenalidomide, un agente immunomodulante che blocca lo sviluppo delle cellule tumorali, inibisce l'angiogenesi e stimola anche particolari cellule del sistema immunitario ad attaccare le cellule tumorali. In particolare, questi protocolli permettono di studiare l'effetto dose-dipendente per stabilire una dose efficace e sicura per ogni paziente.

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

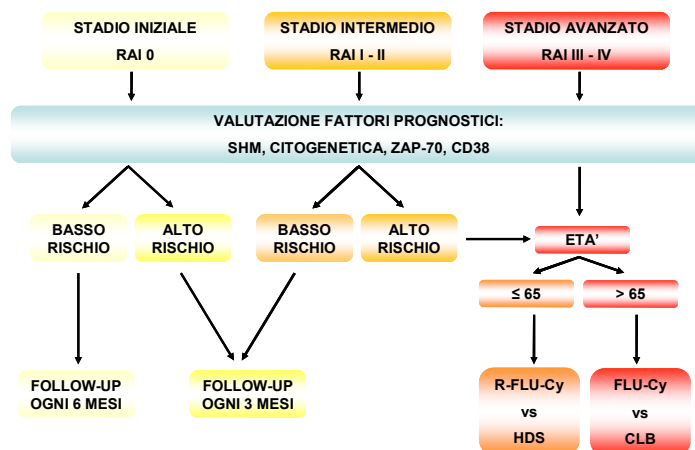


Figura 6. Possibile schema decisionale per il trattamento della LLC. *R-FLU-Cy*: Rituximab, Fludarabina, Ciclofosfamide; *HDS*: Chemioterapia ad alte dosi; *CLB*: Clorambucile.

2. I LINFOCITI B NEOPLASTICI

La LLC-B è una malattia che si caratterizza clinicamente per il suo decorso estremamente variabile, a dispetto di una sostanziale uniformità delle caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche.

I linfociti B sono le cellule del sistema immunitario responsabili della risposta di tipo umorale. Essi, opportunamente stimolati, sono in grado di differenziarsi da linfociti “vergini” in cellule secernenti anticorpi diretti contro uno specifico antigene (plasmacellule), o, in alternativa, in linfociti B “della memoria”, cioè cellule che non secernono anticorpi, ma che circolano nel sangue e che sono in grado di riconoscere uno specifico antigene e di attivarsi in risposta ad esso per dare inizio ad una risposta immunitaria più rapida ed efficace. Il riconoscimento dell’antigene avviene per mezzo del recettore delle cellule B (BCR), un complesso multimerico di membrana composto da un’immunoglobulina di superficie legata alla membrana plasmatica (MP) per mezzo della sua regione costante (Frammento cristallizzabile, Fc) e che rivolge all’esterno la sua regione legante l’antigene (Fab), a cui si associa, per mezzo di un legame non covalente, l’eterodimero $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b), deputato alla trasduzione intracellulare del segnale (figura 7). La regione Fab comprende le regioni variabili (V) delle catene pesanti e leggere delle Ig, che sono le regioni che conferiscono al BCR la specificità per un antigene. Le regioni V a loro volta comprendono tre regioni ipervariabili, dette

mentre gli altri vanno incontro ad apoptosi. Il repertorio linfocitario che così si sviluppa è dotato di recettori altamente affini per l'antigene e quindi in grado di attivare una risposta immunitaria più efficace e rapida.

I linfociti B di LLC-B sono piccoli linfociti B “della memoria” bloccati in fase G_0/G_1 , caratterizzati da alcuni marcatori di superficie riconoscibili da specifici anticorpi monoclonali (AcMo); alcuni di questi antigeni sono B-correlati come CD19 e CD21, mentre altri, come CD5, CD23, CD25 ed HLA-DR (Human Leukocyte Antigen D-related) non sono specifici per la linea B (figura 8). In particolare, le cellule di LLC-B esprimono molti dei marcatori di superficie presenti nelle cellule B mature localizzate nella zona mantellare dei follicoli linfatici secondari.

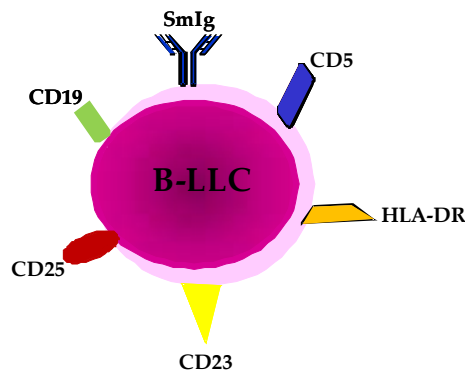


Figura 8. Fenotipo caratteristico di un linfocita B di LLC-B. CD19 è un antigene B-correlato, mentre CD23, CD25, CD5, HLA-DR e le immunoglobuline di membrane non sono specifici per la linea B.

Il linfocita viene interessato dall'evento leucemico in uno stadio precoce di maturazione, quando esprime Ig di superficie a bassa densità di tipo IgM e/o IgD; il clone neoplastico che ne deriva, bloccato in tale stadio, è composto da linfociti con catene leggere dello stesso isotipo. La monoclonalità dei linfociti B leucemici viene dimostrata in citofluorimetria analizzando le catene leggere delle Ig che nel 60% dei casi sono di tipo κ e nel 40% di tipo λ .

I numerosi sforzi volti a cercare dei criteri per definire la prognosi della malattia si incrociano con la ricerca dei meccanismi patogenetici che ne stanno alla base. In particolare, i fattori che intervengono nella patogenesi della LLC-B comprendono il controllo dell'apoptosi, la

trasmissione intracellulare del segnale mediata dal BCR ed il microambiente.

2.1 Controllo dell'apoptosi

La disregolazione del processo di morte cellulare programmata (apoptosi) è ormai largamente riconosciuta come uno dei meccanismi principali nella patogenesi di numerosi tumori; nella LLC-B essa assume un ruolo particolarmente importante. L'accumulo delle cellule di LLC-B è legato al fatto che esse non vanno incontro a morte cellulare programmata, quindi viene a mancare il meccanismo omeostatico che normalmente limita il numero di cellule circolanti. Paradossalmente è stato osservato che, una volta messe in coltura, queste cellule vanno rapidamente incontro ad apoptosi. Questo solleva il problema della comprensione se la resistenza all'apoptosi sia legata a fattori intrinseci alla cellula e/o dipenda da messaggi esterni provenienti dal microambiente in cui vive¹⁸(figura 9).

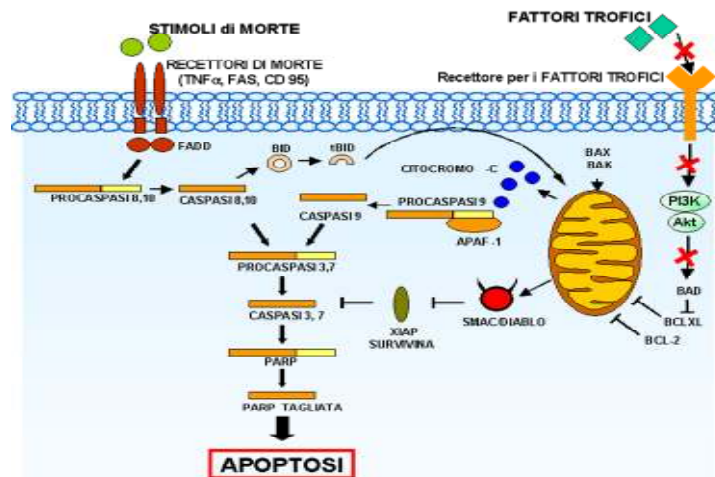


Figura 9. Vie di trasduzione del segnale nel processo apoptotico. Entrambe le vie, estrinseca (a sinistra) ed intrinseca (a destra), hanno in comune l'attivazione degli effettori centrali dell'apoptosi, un gruppo di proteasi chiamate caspasi, che dirigono la distruzione degli elementi strutturali (citosteleto) e funzionali (organuli) della cellula.

Per quanto riguarda i fattori intrinseci, importante è l'equilibrio tra fattori pro- ed anti-apoptotici. Tra questi, i principali regolatori dell'apoptosi sono delle proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), che giocano un ruolo in questo meccanismo inibendo (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1 ed Mcl-1) o promuovendo (Bax, Bak, Bcl-xs, Bid, Bik ed

Hrk) l'apoptosi. L'eterodimerizzazione tra membri pro- ed anti-apoptotici di questa famiglia ed i livelli relativi di entrambi i tipi di proteine possono determinare la predisposizione a rispondere ad un determinato stimolo apoptotico.

In molti casi di LLC-B è stata riscontrata una sovraespressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 ed Mcl-1 (Mantle cell lymphoma-1). Quando Bcl-2 è sovraespresso, si ha un aumento del rapporto Bcl-2/Bax rispetto ai linfociti T e B di soggetti normali ed una maggiore resistenza all'apoptosi. La proteina Bcl-xs, che inibisce la funzione di Bcl-2, è presente soltanto in tracce. Per quanto riguarda la proteina anti-apoptotica Mcl-1, essa è risultata sovraespressa nella LLC, specialmente in alcuni casi a rapida progressione e con una scarsa risposta alla terapia citoriduttiva. In particolare, uno studio condotto su un campione di pazienti affetti da LLC-B ha evidenziato come in circa un terzo di essi fosse presente un'inserzione di 6-18 paia di basi a livello del promotore del gene di Mcl-1; tale inserzione, assente in tutti i soggetti di controllo, si associava ad un'aumentata espressione della proteina a livello cellulare, mentre sul piano clinico si osservava una riduzione della risposta alla chemioterapia e della sopravvivenza del paziente⁴⁷.

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

Inoltre, nei linfociti B di LLC, il recettore Fas (CD95) risulta poco o per nulla espresso, di conseguenza manca la via apoptotica da esso mediata, normalmente presente nei linfociti B sani⁴⁸. Tuttavia, anche rese Fas-positive da un processo di attivazione *in vitro*, le cellule B di LLC sono generalmente resistenti all'apoptosi mediata da Ac anti-Fas.

2.2 Trasduzione del segnale mediata dal BCR

Nel processo di attivazione delle cellule B risulta fondamentale il ruolo svolto dal BCR, necessario per dare inizio alla cascata di eventi che porta alla trasduzione dei segnali cellulari che determinano la sopravvivenza, la proliferazione e l'apoptosi della cellula.

Il recettore delle cellule B è un complesso multimerico di membrana formato da un'immunoglobulina, in grado di legare l'antigene, e dall'eterodimero Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) che media la trasduzione del segnale, associati non covalentemente mediante un ponte disolfuro. Entrambe le molecole Ig α ed Ig β contengono, nel loro dominio citoplasmatico, un motivo ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) soggetto a fosforilazione da parte di chinasi della famiglia Src (chinasi identificata per la prima volta nel virus che causa il sarcoma nei polli). Questa fosforilazione si traduce nel reclutamento di altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale mediata dal BCR. Dati recenti indicano che il BCR può risiedere nella MP come dimero o multimerico e che, in assenza di legame con l'Ag, il BCR è pre-assemblato in complessi recettoriali oligomerici in grado di generare un livello basale di segnale, essenziale per il mantenimento delle cellule B (figura 10).

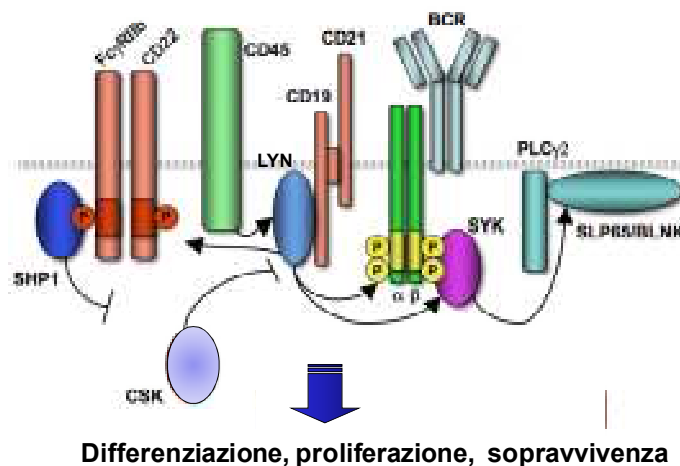


Figura 10. Modello di trasduzione del segnale mediato dal BCR. Quando l'Ag lega il BCR, la tirosin chinasi Lyn va a fosforilare le sequenze ITAMs dei domini citoplasmatici di Ig α ed Ig β , creando così siti di legame per i domini SH2 di proteine quali la chinasi Syk; seguono diverse reazioni biochimiche che culminano nell'attivazione, differenziamento e/o proliferazione del linfocita B.

Il BCR delle cellule B leucemiche di pazienti con LLC ha una ridotta capacità di attuare i meccanismi di cattura, presentazione e risposta agli antigeni ed induce una difettiva fosforilazione tirosinica dei substrati. Nel caso specifico, il 75% dei pazienti affetti da LLC-B non esprime il dominio extracellulare di CD79b; si ha quindi un CD79b "difettoso", chiamato Δ CD79b, generato da *splicing* alternativo del gene b29 che codifica per

CD79b ed a cui mancano i tre esoni codificanti per il dominio extracellulare. Le cellule di LLC-B che presentano la forma deleta Δ CD79b hanno, quindi, una trasduzione del segnale mediata dal BCR difettiva rispetto alle cellule normali⁴⁹.

Nel processo di attivazione delle cellule B, una funzione importante è svolta dai microdomini di membrana chiamati *lipid raft*. Questi domini, ricchi in colesterolo e glicosfingolipidi, fungono da piattaforma per la trasduzione del segnale e per la processazione dell'antigene. Tali domini includono selettivamente determinate proteine e ne escludono altre, regolando in tal modo le interazioni proteiche. In essi sono presenti in elevate concentrazioni le tirosin chinasi Lyn e Fyn, appartenenti alla famiglia Src, altre molecole coinvolte nella trasduzione del segnale quali Blk, Ras, c-Abl, PAG/cbp (una proteina di membrana coinvolta nella regolazione della famiglia Src) ed actina.

Ulteriori proteine, come ad esempio CD45 e Syk, sembrano invece escluse dai *raft* e reclutate in essi soltanto quando vi abbia traslocato il BCR, a seguito del suo contatto con l'Ag. Secondo il più recente modello proposto per spiegare la funzione del BCR nell'attivazione dei linfociti B, si ritiene che in cellule quiescenti il BCR sia inizialmente escluso dai *lipid raft*; una volta legato l'Ag, il BCR traslocherebbe all'interno del *raft* facendo partire la cascata di trasduzione del segnale.

Lyn è la proteina che, con la sua attività fosforilativa, dà inizio alla cascata di trasduzione del segnale indotta dalla stimolazione del BCR. La chinasi Lyn, dopo l'incontro dell'Ag col BCR, fosforila i residui tirosinici presenti nelle sequenze ITAMs dei domini citoplasmatici delle molecole Ig α ed Ig β , creando così siti di legame per i domini SH2 di diverse proteine coinvolte nella cascata di trasduzione del segnale, come le tirosin chinasi Syk e Btk (Bruton's Tyrosin Kinase). Lyn dunque partecipa agli stadi iniziali della trasduzione del segnale e gioca un ruolo essenziale nel mediare gli eventi successivi al contatto del BCR con l'antigene. Studi su topi *lyn*^{-/-} hanno dimostrato che questa protein chinasi partecipa, oltre che positivamente, anche negativamente al segnale mediato dal BCR. Promuove, infatti, meccanismi inibitori che spengono gli eventi innescati dal BCR disattivando, in questo modo, la cellula B. Ad esempio, Lyn è responsabile della fosforilazione di CD22, una proteina specifica dei linfociti B associata al BCR nelle cellule non stimulate. Tra le molecole che

legano la forma fosforilata di CD22, SHP-1 (Short Heterodimer Partner) è quella in grado di mediare molte delle azioni inibitorie di CD22, tra cui quelle che inibiscono la proliferazione cellulare. Cellule Lyn^{-/-} hanno una fosforilazione ridotta di CD22 e, conseguentemente, un aumento della proliferazione cellulare. Nei linfociti B, Lyn può associarsi anche alla tirosin chinasi non recettoriale FAK (Focal Adhesion Kinase), coinvolta in diverse cascate di trasduzione del segnale. La formazione di questo complesso potrebbe contribuire alla riorganizzazione del citoscheletro nei linfociti B dopo l'avvenuto legame con l'Ag.

Il nostro gruppo ha dimostrato che nei linfociti B di LLC la chinasi Lyn risulta sovraespressa e con una diversa localizzazione rispetto ai linfociti B normali⁵⁰. Lyn è infatti presente in modo omogeneo in tutta la membrana, non solo all'interno dei *raft* lipidici come nei linfociti B normali.

È stata riscontrata una diretta correlazione tra l'aumento dell'attività basale della tirosin chinasi, dovuto ad una sua attivazione costitutiva non mediata dal BCR, ed il difettivo meccanismo apoptotico caratterizzante i cloni cellulari neoplastici⁵⁰. È stato anche dimostrato che, nei linfociti B neoplastici, la frazione citosolica di Lyn è parte integrante di un complesso di 600kDa, dove si trova associata a diverse proteine come Hsp90 (Heat shock protein of 90kDa), HS1 (Hematopoietic lineage cell Specific protein 1) e SHP-1L. In particolare, Hsp90 stabilizza questo complesso mantenendo Lyn nella conformazione attiva e prevenendone la degradazione⁵¹.

HS1, uno dei principali substrati di Lyn, è una proteina in grado di legare la F-actina ed è coinvolta nel processo apoptotico di alcune linee cellulari ematopoietiche. La fosforilazione di HS1 avviene, secondo un modello definito sequenziale, ad opera di Syk e Lyn. Sembra che anche la fosforilazione dei residui tirosinici della cortactina, proteina omologa ad HS1 e coinvolta nella motilità cellulare, avvenga con lo stesso meccanismo di reclutamento delle tirosin chinasi della famiglia Src.

Al processo di attivazione del BCR nei linfociti B normali partecipano anche molecole adattatrici, quali BLNK (B-cell linker) e BAM32 (B lymphocyte Adaptor Molecule of 32kDa), che svolgono un ruolo importante nel connettere le chinasi con i loro effettori. BLNK, per esempio, connette Syk e Btk con PLCγ2 (Phospholipase Cγ2). L'effettore

PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) fosforila il fosfatidilinositolodifosfato (PIP₂) producendo fosfatidilinositolotrifosfato (PIP₃) il quale, attraverso il dominio fosforilato, recluta alcune molecole di membrana coinvolte nella trasduzione del segnale cellulare. PLC γ 2 usa lo stesso substrato di PI3K, cioè il PIP₂, per generare inositolotrifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). L'IP₃ determina la liberazione di Ca²⁺ intracellulare, mentre DAG va ad attivare la protein chinasi C (PKC): entrambi questi effettori inducono l'attivazione delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) e la trascrizione dei fattori nucleari NF κ B (Nuclear Factor κ B) ed NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), implicati nel controllo del destino delle cellule B.

Nelle cellule B mature il BCR si associa ai *raft* lipidici solo dopo il legame con l'Ag ed il processo di trasduzione del segnale induce l'attivazione trascrizionale dei geni associati all'attivazione delle cellule B. Il BCR viene poi internalizzato e può essere degradato oppure mandato in un compartimento intracellulare chiamato MIIC (MHC-class-II-peptide-loading-compartment) dove avviene il processamento dell'Ag e la sintesi di complessi peptide-MHC per la presentazione dell'Ag. I complessi MHC-peptide vengono poi portati alla superficie cellulare, presentati alle cellule T e quindi riconosciuti dal TCR delle cellule Th. Così attivate, le cellule Th provvedono ad attivare, mediante liberazione di citochine, le cellule B. Nelle cellule B immature, il BCR è escluso dai *raft* anche dopo il legame con l'Ag e, in questo caso, viene indotta l'apoptosi della cellula. Se la cellula B immatura non incontra l'Ag, lo sviluppo del linfocita continua fino alla sua maturazione.

Un comportamento analogo a quello delle cellule B immature è descritto anche per il BCR di quelle cellule B rese tolleranti o anergiche da un'esposizione cronica all'Ag: il BCR è comunque escluso dal *raft* anche dopo il legame con l'Ag ed il risultato è una mancata risposta cellulare. Nei prelinfociti B, invece, una percentuale significativa di BCR e molecole segnale quali PLC γ 2 e PI3K sono costitutivamente associati ai *raft* e questo sembra generare un segnale di sopravvivenza e di differenziamento cellulare. In questi casi, molecole quali PI3K, RAS, RAF, ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) ed NF κ B sono fondamentali nel processo di trasduzione del segnale in associazione con il BCR. La PI3K è in grado di attivare e fosforilare Akt che, a sua volta, fosforila bersagli

cellulari che sono coinvolti nella sopravvivenza cellulare, inclusi fattori che regolano l'apoptosi ed il metabolismo del glicogeno. Nelle cellule B, tra le funzioni di Akt c'è quella di inibire l'attivazione di BAD (Bcl-2 Associated Death promoter), membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2, e quella di fosforilare, inibendola, la chinasi GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3). GSK3 è attiva costitutivamente nelle cellule non stimolate, dove fosforila e destabilizza Myc e la ciclina D, entrambi richiesti per la progressione del ciclo cellulare. Sembra che la funzione di Akt consista nel promuovere la proliferazione cellulare indotta dal *B-cell receptor*. Quindi, la funzione di questa molecola non è soltanto quella di proteggere dal processo di morte cellulare, inibendo BAD, ma anche di promuovere e mantenere la sopravvivenza delle cellule B, inibendo GSK3.

2.3 Microambiente

La sopravvivenza dei linfociti B leucemici risulta influenzata anche dal microambiente che li circonda e dalle cellule che lo compongono. Le cellule B patologiche prendono stretto contatto con diverse cellule accessorie a livello del sangue periferico (cellule "*nurse like*"), dei linfonodi (linfociti T CD4+) e del midollo osseo (cellule stromali) (figura 11). Le cellule B neoplastiche, se isolate dal sangue periferico o dai tessuti linfoidi di soggetti con LLC e poste *in vitro*, vanno rapidamente incontro ad apoptosi spontanea, mentre la presenza di cellule stromali midollari e cellule "*nurse like*" è in grado di prolungarne la sopravvivenza.

Le cellule B patologiche che si accumulano progressivamente nel sangue periferico dei pazienti affetti da LLC-B derivano da aggregati proliferanti di prolinfociti e paraimmunoblasti, che costituiscono i cosiddetti pseudofollicoli o centri di proliferazione, presenti nei linfonodi, nella polpa bianca della milza e nel midollo osseo. Sia nel midollo osseo che nei linfonodi infiltrati dalle cellule di LLC-B è presente una popolazione di linfociti T CD4+ esprimenti CD40 ligando (L) (membro della superfamiglia del Tumor Necrosis Factor), normalmente espresso dai linfociti T attivati. Queste cellule tendono a concentrarsi in prossimità dei centri di proliferazione, prendendo stretto contatto con i linfociti B patologici, i quali a loro volta esprimono costitutivamente il recettore CD40. La stimolazione via CD40/CD40L protegge le cellule neoplastiche

dall'apoptosi e ne induce la proliferazione. Studi *in vitro* indicano inoltre che alcune citochine prodotte dai linfociti T (IL-4, INF- α , INF- γ) inibiscono la risposta apoptotica delle cellule B neoplastiche, mediante *up*-regolazione di Bcl-2. I linfociti B di LLC sono a loro volta in grado di plasmare il microambiente in cui si accumulano attraverso la secrezione di alcune chemochine, quali CCL17 e CCL22, creando un circuito autocrino in grado di sostenere il clone neoplastico⁵².

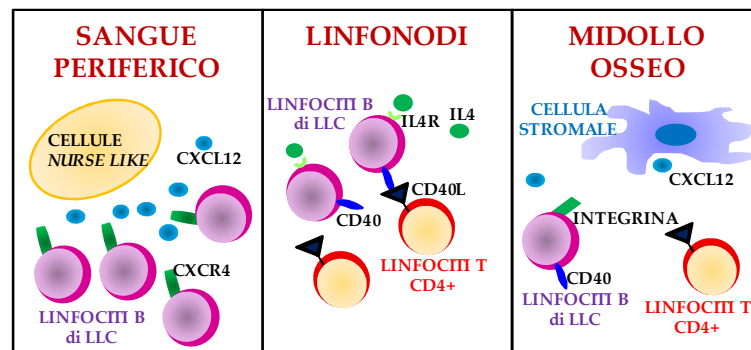


Figura 11. Interazioni tra linfociti B di LLC e cellule componenti il microambiente a livello del sangue periferico, dei linfonodi e del midollo osseo. Nel sangue periferico sono presenti cellule che *in vitro* differenziano in cellule aderenti definite "nurse like" capaci di proteggere i linfociti B neoplastici dall'apoptosi spontanea. I pazienti affetti da LLC-B presentano un aumento dei linfociti T CD4+, localizzati prevalentemente a livello midollare e linfonodale, dove si concentrano in prossimità dei centri di proliferazione e secernono citochine (IL-4, IFN- α e IFN- γ) che inibiscono l'apoptosi delle cellule neoplastiche. A livello midollare le cellule stromali esercitano un effetto anti-apoptotico sia mediante interazioni dirette che attraverso fattori solubili.

Un ruolo fondamentale per la sopravvivenza delle cellule di LLC-B è esercitato anche dalle cellule stromali midollari, sia attraverso interazioni dirette, mediate da integrine di superficie, sia attraverso fattori solubili. Studi *in vitro* dimostrano che il legame alle cellule dello stroma, mediato dalle integrine di membrana di tipo $\beta 1$ e $\beta 2$ (esprese dalle cellule B), determina un aumento della sopravvivenza dei linfociti B patologici, mentre la produzione da parte delle cellule stromali di Stromal Derived Factor (SDF-1 α o CXCL12), che si lega al recettore CXCR4, costitutivamente espresso nelle cellule di LLC-B, esercita da un lato un effetto protettivo sull'apoptosi, dall'altro un effetto chemotattico, favorendo la localizzazione midollare delle cellule neoplastiche.

L'infiltrazione dei linfociti B leucemici nel midollo osseo e negli organi linfatici è regolata dalle interazioni delle chemochine con i recettori

espressi sulle cellule B neoplastiche. Dati recenti indicano che queste cellule B esprimono *set* specifici di recettori per chemochine e rispondono in maniera selettiva ad alcune di esse raggiungendo, così, sedi precise⁵³. CXCR3 è un recettore per chemochine costitutivamente espresso nelle cellule B di LLC-B, dove si comporta come un recettore funzionale in grado di indurre l'attività chemotattica dopo aver legato specifiche chemochine (ad es.: IP-10/CXCL10 e Mig/CXCL9). Questo recettore non è espresso nei linfociti B normali, può quindi rappresentare un *marker* della LLC-B. La presenza di questo recettore sarebbe in grado di mediare il traffico delle cellule B neoplastiche da un sito ad un altro favorendo, così, il propagarsi della malattia nei vari distretti dell'organismo e richiamare i linfociti T con funzioni antitumorali⁵³. Le cellule endoteliali delle venule ad endotelio alto, che regolano l'accesso ai linfonodi, producono CCL19 e CCL21, chemochine che si legano a CCR7, recettore sovraespresso sulla superficie delle cellule B di LLC, determinando un aumento dell'infiltrazione linfocitaria nei linfonodi⁵⁴.

Studi recenti hanno dimostrato che la chemochina CXCL12/SDF-1 α è in grado di indurre nelle cellule B di pazienti affetti da LLC-B la sovraespressione di MMP-9, una metalloproteasi della matrice extracellulare (ECM)⁵⁵. Le metalloproteasi di matrice (MMPs) sono una famiglia di enzimi prodotti prevalentemente da cellule del tessuto connettivo e secreti come zimogeni nella ECM. Le MMPs sono endopeptidasi multidominio zinco- e calcio-dipendenti che svolgono una specifica attività proteolitica su gran parte dei costituenti della ECM. I prodotti di degradazione delle proteine della ECM partecipano alla regolazione del comportamento cellulare: svolgendo un ruolo chiave nel regolare la degradazione della ECM, le MMPs sono coinvolte in un numero di processi di rimodellamento tissutale durante la crescita e lo sviluppo di differenti tumori.

In base all'efficienza di proteolisi dei componenti della ECM ed alla specificità del substrato, la famiglia delle MMPs viene suddivisa in cinque classi principali: collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), gelatinasi (MMP-2 e MMP-9), PUMP-I o matrilisine (MMP-7) ed MMPs di membrana (MT-MMPs). Dal punto di vista strutturale, ogni membro della famiglia è costituito da: un dominio idrofobico pre-peptide necessario per il segnale di secrezione, un dominio

N-terminale pro-peptide che viene rimosso dopo attivazione ed un dominio catalitico contenente ioni zinco. Le gelatinasi (chiamate anche collagenasi di tipo IV) sono molecole caratterizzate da un'elevata efficienza proteolitica nei confronti della gelatina e sono ritenute implicate in una varietà di processi patologici quali la proliferazione tumorale e la formazione di metastasi. Nella struttura delle gelatinasi è contenuta, rispetto alle altre MMPs, una sequenza aggiuntiva inserita in un *loop* del dominio catalitico; tale sequenza assume la conformazione di tipo II che si trova anche nella fibronectina. La presenza del dominio *fibronectin-like* conferisce alle gelatinasi la capacità di interagire con diverse macromolecole della ECM⁵⁵.

Grazie a tutte queste caratteristiche, MMP-9 svolge un ruolo chiave nella migrazione transendoteliale, nell'invasione delle membrane basali e nell'infiltrazione nel tessuto linfoide, determinando in questo modo una progressione della LLC-B. È stato infatti dimostrato che cellule B di pazienti affetti da LLC-B producono costitutivamente MMP-9 nelle diverse forme molecolari e che elevati livelli di MMP-9 intracellulare correlano con stadi avanzati della patologia e con una prognosi sfavorevole per il paziente. L'aumento dei livelli di MMP-9 è dovuto alla risposta a diversi segnali dati dall'interazione dell'integrina $\alpha 4\beta 1$ o del CXCR4 con i rispettivi ligandi; l'adesione del frammento di fibronectina FN-H89 o VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) endoteliale all'integrina $\alpha 4\beta 1$ della cellula patologica, attiva il *pathway* PI3-K/Akt/NF-kB, mentre l'interazione CXCL12/SDF-1 α -CXCR4 attiva la via del segnale ERK1/2-*c-Fos*⁵⁵ (figura 12).

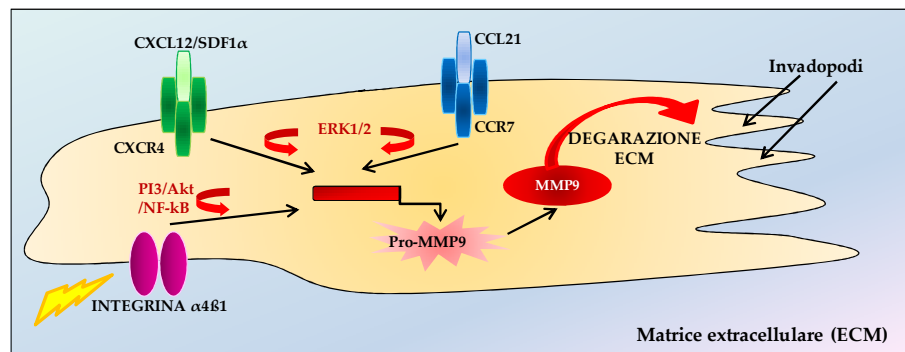


Figura 12. Rappresentazione schematica delle vie di attivazione di MMP-9. L'aumento dei livelli di MMP-9 è dovuto alla risposta a diversi segnali dati dall'interazione dell'integrina $\alpha 4\beta 1$ o del CXCR4 con i rispettivi ligandi; l'adesione del frammento di fibronectina FN-H89 o VCAM-1 endoteliale all'integrina $\alpha 4\beta 1$ della cellula patologica attiva il *pathway* PI3-K/Akt/NF-kB, mentre l'interazione CXCL12/SDF-1 α -CXCR4 attiva la via del segnale ERK1/2-*c-Fos*⁵⁵.

3. CORTACTINA

La cortactina è una proteina strutturale del citoscheletro ed è codificata dal gene EMS1, localizzato a livello del *locus* cromosomico 11q13. Secondo letteratura questa proteina viene espressa in modo ubiquitario, preferenzialmente in cellule epiteliali e fibroblasti, ma non nelle cellule ematopoietiche (eccetto piastrine e megacariociti)⁵⁶.

3.1 Struttura proteica

La cortactina è una proteina costituita da 546 aminoacidi ed ha una massa molecolare di 61-63kDa, ma nelle piastrine il peso molecolare apparente in seguito a migrazione in SDS-PAGE è di 80 e 85kDa (p80 e p85). La cortactina nei linfociti B si localizza a livello citosolico, in strutture citoscheletriche legate alla motilità della cellula come pseudopodi, lamellipodi e fillopodi. Dall'estremità N-terminale la proteina presenta i seguenti domini strutturali (figura 13):

- un dominio N-terminale acidico (NTA) che lega il complesso Arp2/3 (Actin related protein 2/3);
- una regione responsabile del legame con la proteina anti-apoptotica mitocondriale HAX-1 (HS1- Associated Protein X-1)⁵⁷;
- una sequenza di 37 aminoacidici ripetuta sei volte e mezzo, con struttura dinamica⁵⁸, in grado di legare l'actina del citoscheletro e contenente un solo sito di legame per PIP₂;
- un dominio con struttura ad α -elica di circa 50 aminoacidi;
- una regione ricca in proline, contenente i siti di fosforilazione della proteina;
- un dominio SH3 all'estremità C-terminale, in grado di legare numerose proteine coinvolte principalmente nel rimodellamento citoscheletrico (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP), dinamina 2, WASP-Interacting Protein (WIP), Faciogenital dysplasia 1 (Fgd1))⁵⁷.

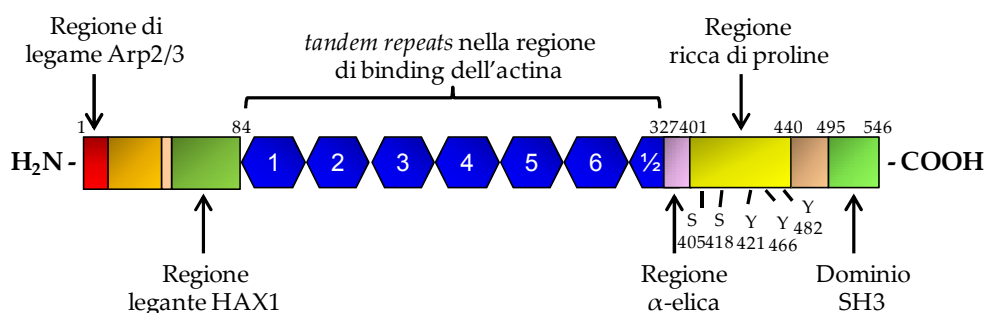


Figura 13. Struttura schematica della proteina cortactina. Sono indicati i siti di fosforilazione tirosinici (Y421, Y466, Y482) e serinici (S405, S418) della proteina.

La cortactina è coinvolta nella regolazione della polimerizzazione e depolimerizzazione dell'actina; importanti in questo processo sono risultati essere il livello di espressione della cortactina ed il suo grado di fosforilazione in tirosina. Inoltre, studi condotti in fibroblasti NIH3T3 hanno permesso di individuare, come ulteriore fattore di regolazione della polimerizzazione dell'actina, l'espressione di varianti umane della cortactina che derivano da eventi di *splicing* alternativo durante la trascrizione del gene EMS1. Fino ad ora sono state identificate 3 varianti di *splicing*, l'isoforma *wild-type* (WT), l'isoforma SV1, deleta della sesta ripetizione nel dominio di *binding* dell'actina, e l'isoforma SV2, deleta, invece, della quinta e sesta ripetizione. È stato dimostrato che queste isoforme hanno una minore affinità di legame con F-actina, nonché una minore capacità di regolare la migrazione cellulare⁵⁹.

3.2 Regolazione e funzioni della cortactina

La fosforilazione della cortactina costituisce un importante meccanismo di regolazione della sua attività. La cortactina viene fosforilata sia da tirosin chinasi (Src-chinasi, Syk, c-Met e Fer) che da serin/treonin chinasi (ERK e PAK).

Le tirosin chinasi fosforilano la cortactina a livello di tre residui (Tyr-421, Tyr-466 e Tyr-482) e sembra che la fosforilazione primaria del residuo Tyr-421 sia essenziale per la fosforilazione dei residui Tyr-466 e Tyr-482⁶⁰. La fosforilazione in tirosina da parte delle Src-chinasi avviene in risposta a numerosi stimoli fisiologici e patologici, indotti da fattori di crescita quali aFGF, Epidermal Growth Factor (EGF) e PDGF (Platelet-

derived Growth Factor), da molecole per l'adesione cellulare integrina-mediata (integrine, ICAM-1, CD44) e dall'invasione cellulare da parte di patogeni (*S. flexeri*, *C. trachomatis*). Questo meccanismo di regolazione facilita l'interazione della cortactina con il dominio SH2 di proteine quali le Src-chinasi ed Nck (non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), riduce l'affinità di legame per l'actina e la sua attività di *crosslinking* ed aumenta l'interazione della cortactina con EC-MLCK (Endothelial Cell Myosin Light-Chain Kinase)⁶¹. Inoltre, nelle piastrine è stato dimostrato che la fosforilazione in tirosina sembra causare uno *shift* del peso molecolare apparente da 80 ad 85kDa in elettroforesi SDS-PAGE⁶².

La fosforilazione a livello dei residui di serina/treonina è invece mediata dalle chinasi della famiglia MEK (MAP chinasi/ ERK chinasi)⁶³ e da PAK1 (p21-Activated Kinase 1) nelle piastrine⁶⁴. I siti putativi di fosforilazione sono la Ser-405 e la Ser-418 presenti nella regione ricca in proline⁶³. La fosforilazione della cortactina da parte di ERK provoca una variazione conformazionale che espone il dominio SH3 C-terminale, liberandolo dalle interazioni molecolari con la regione ricca in proline. Questo facilita l'interazione con le proteine N-WASP e WASP, permettendo il reclutamento di altre proteine coinvolte nella polimerizzazione dell'actina e aumentando l'affinità di legame verso l'actina stessa⁶⁵. Gli stessi fattori che attivano le ERK chinasi, attivano anche le Src chinasi, che, invece, impediscono il legame di WASP ed N-WASP alla cortactina, diminuendo la capacità di legame al complesso Arp2/3⁶⁵.

La cortactina è coinvolta nell'assemblamento dell'actina tramite meccanismi che prevedono:

- il legame di F-actina a livello della regione contenente i "*tandem repeats*";
- il legame diretto del dominio NTA al complesso Arp2/3;
- il reclutamento di proteine attivatrici di tale complesso, come N-WASP, al dominio SH3⁶⁵.

Questa proteina partecipa dunque a diversi processi cellulari citoscheletro-mediati quali l'endocitosi, la formazione di giunzioni cellulari strette ed aderenti, la migrazione cellulare (figura 14).

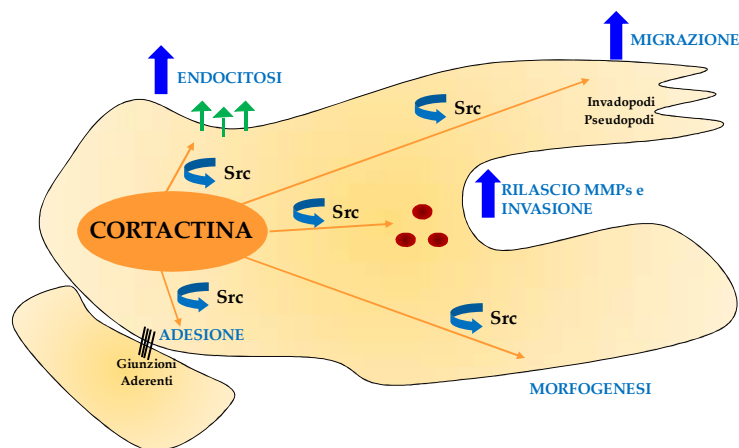


Figura 14. Rappresentazione schematica del coinvolgimento della cortactina nei diversi meccanismi della dinamica cellulare. MMPs, Matrix metalloproteases.

Importante nel regolare l'attività della cortactina è anche l'attivazione del recettore CXCR4 da parte del suo ligando CXCL12/SDF-1 α , che determina la traslocazione della cortactina dagli endosomi alla periferia cellulare e ne induce la fosforilazione tirosinica Src- e dinamina-dipendente. La cortactina, così fosforilata e legata a CXCR4, partecipa all'internalizzazione ed al riciclo del CXCR4 stesso, all'attivazione di ERK1/2 mediata da CXCR4 ed alla chemotassi mediata da recettore⁶⁶.

La *down*-regolazione della cortactina tramite RNA-*interference* ne ha evidenziato il ruolo essenziale nella morfogenesi di cellule spinali dendritiche e nel contatto E-caderina-mediato di cellule epiteliali⁵⁷. Inoltre, la cortactina è substrato della caspasi-3 nell'apoptosi indotta dall'anticorpo anti-Fas (CD95) in cellule Jurkat ed HeLa: i siti specifici di clivaggio per tale caspasi (D/EXXD) sono localizzati a livello della regione legante l'actina e del dominio SH3.

3.3 La cortactina nei tumori

La cortactina è sovraespressa in diversi tumori⁶⁵, come ad esempio, nelle cellule tumorali del cancro al seno⁶⁷, del fegato⁶⁸, del carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)⁶⁹, del carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC)⁷⁰. In alcuni tumori un confronto tra l'incidenza della sovraespressione di questa proteina e dell'amplificazione del suo gene suggerisce che altri meccanismi, oltre all'amplificazione del

gene, siano coinvolti nella sovraespressione. Infatti, in tessuti tumorali asportati chirurgicamente da pazienti con ESCC, nel 91% dei casi la proteina risultava sovraespressa, ma la duplicazione genica è stata riscontrata solo nel 30% dei casi⁷⁰. In modo analogo, solo nel 20% dei pazienti con HCC (Hepatocellular Carcinoma) era presente la duplicazione del gene, contro un 85% di pazienti che sovraesprimono la cortactina⁶⁸.

Gli elevati livelli di proteina sono stati correlati con un decorso clinico sfavorevole: la sua sovraespressione può infatti aumentare la proliferazione e la migrazione delle cellule favorendo, così, l'invasione delle cellule tumorali nei tessuti e quindi il processo di metastasi. Infatti, è stato osservato che nell'HNSCC la sovraespressione della cortactina contribuisce alla crescita, all'invasività ed all'angiogenesi tumorale *in vivo* e che *in vitro* stimola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare in assenza di siero. È stato inoltre dimostrato che cellule di HNSCC cortactina-*knock down* vengono indotte a proliferare in cocoltura con cellule derivanti dallo stesso tipo di tumore, tanto maggiormente quanto più queste ultime esprimono la cortactina; ciò suggerisce che la cortactina favorisca la produzione di fattori di crescita con azione autocrina⁷¹. Inoltre, in cellule ottenute da campioni di tumore al seno è stata evidenziata la presenza di cortactina a livello degli invadopodi⁷², protrusioni della membrana dove si concentrano le metalloproteasi, che si estendono nella ECM e facilitano l'invasione metastatica. Gli invadopodi, infatti, funzionano come siti di esocitosi per le MMPs che, una volta secrete, causano la digestione enzimatica della ECM favorendo la migrazione cellulare. Gli invadopodi hanno delle caratteristiche particolari rispetto alle altre strutture di protrusione; queste includono il coinvolgimento delle Src chinasi per la loro formazione, l'assemblamento di proteine di adesione in prossimità del macchinario di ramificazione dell'actina e la degradazione localizzata della ECM nel sito di sviluppo.

In uno studio condotto in cellule di linea di tumore al seno è stato dimostrato che l'actina e la cortactina inizialmente si accumulano nelle aree in cui la membrana cellulare si trova in contatto con la ECM. A seguito di questo stadio iniziale, il reclutamento della metalloproteasi di membrana MT1-MMP nel sito determina la formazione di un "pre-invadopodio". La conseguente degradazione della ECM da parte della

MT1-MMP ed altre proteasi segna l'inizio della maturazione dell'invadopodio, in cui si osserva un aumento MT1-MMP e una diminuzione di actina e cortactina (figura 15)⁷³.

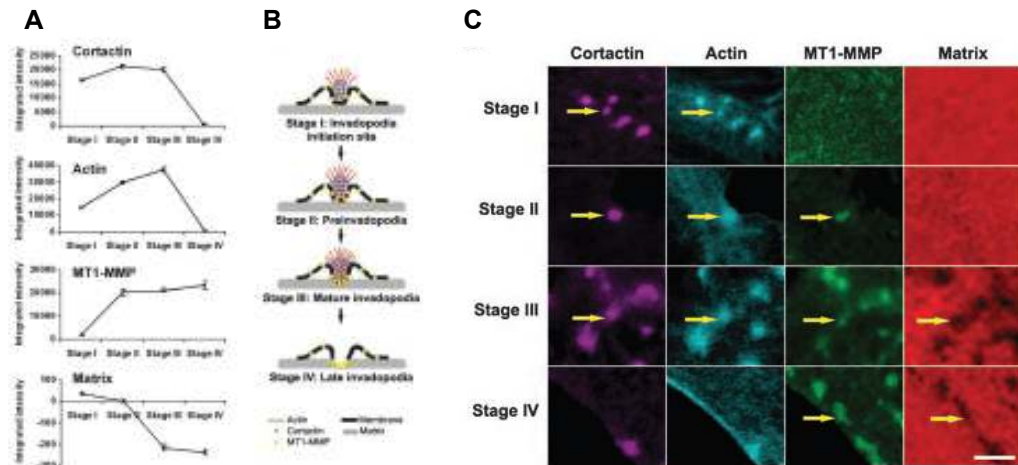


Figura 15. Modello proposto per formazione degli invadopodi. A) Valutazione dei livelli di cortactina, actina ed MT1-MMP9 e grado di degradazione della matrice extracellulare per ogni stadio di formazione degli invadopodi. Ogni proteina è stata marcata con uno specifico anticorpo e mediante microscopia confocale per ogni invadopodio è stata quantificata l'intensità di fluorescenza di cortactina, actina, MT1-MMP9 e della matrice extracellulare. B) Rappresentazione schematica dei quattro stadi di formazione degli invadopodi. C) Immagine rappresentativa dei quattro stadi di formazione degli invadopodi acquisita al microscopio confocale. Come si può osservare, nel primo stadio le due proteine colocalizzano, mentre con il procedere della formazione degli invadopodi le due proteine tendono a ridistribuirsi nella cellula (Da Vira V. Artym *et al.* Cancer Research 2006)⁷⁷.

Studi recenti hanno dimostrato, in linee cellulari di HNSCC, una correlazione tra il livello di espressione della cortactina e l'aumento del rilascio di MMP-2 ed MMP-9: una sovraespressione della cortactina in queste cellule induce un aumento della secrezione di MMP-2 ed MMP-9, mentre una ridotta espressione della cortactina correla con una diminuzione del rilascio di metalloproteasi. Un'ipotesi sul ruolo della cortactina nella secrezione di metalloproteasi riguarda il fatto che essa possa regolare l'esocitosi di vescicole secretorie contenenti MMPs, probabilmente favorendo il loro legame ai siti dell'invadopodio dove la cortactina viene concentrata. La cortactina è inoltre coinvolta nel traffico vescicolare dal *trans-Golgi network* (TGN) alla membrana plasmatica⁷¹ (figura 16).

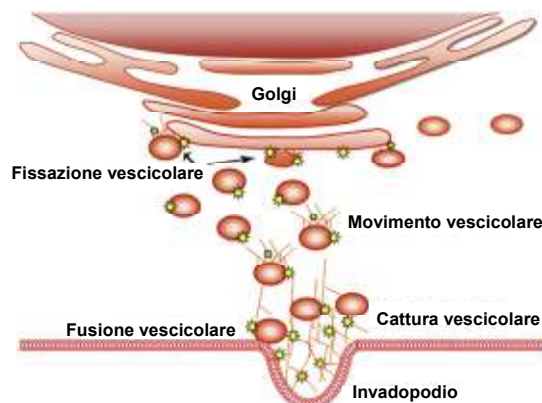


Figura 16. Modello proposto per il ruolo della cortactina negli invadopodi. Il ruolo primario della cortactina negli invadopodi consiste nel regolare la secrezione di proteasi. A livello subcellulare, la cortactina (indicata da una stella ad otto punte) può agire a diversi livelli, quali la promozione della fissazione di vescicole (contenenti MMP-9) al Golgi, l'assemblamento delle code di actina per il movimento delle vescicole verso la membrana MP, la cattura delle vescicole a livello della MP e/o la promozione della fusione delle vescicole alla MP stessa. In tutti questi processi la cortactina agisce promuovendo l'assemblamento dei filamenti di actina a livello dell'invadopodio e può inoltre fungere da connessione tra i filamenti di actina, favorendo il traffico delle proteine vescicolari come la dinamina 2. (Adattata da Clark *et al.*; Eur J Cell Biol 2008)⁷³.

La presenza elevata di cortactina negli invadopodi suggerisce, inoltre, la possibilità che essa possa svolgere un ruolo essenziale nel mediare la cattura o la fusione vescicolare⁷³. Tale ipotesi concorda con il fatto che la sovraespressione della cortactina favorisce ed aumenta la secrezione di proteasi e la degradazione della ECM associata agli invadopodi. A livello molecolare, la cortactina risulta idealmente adatta a legare i filamenti di actina e dirigere il traffico vescicolare. Questo può avvenire attraverso i seguenti potenziali meccanismi: la nucleazione dell'actina, la stabilizzazione dei filamenti di actina e/o il legame alle proteine per il traffico di membrana, come la dinamina 2⁷³.

La cortactina, infine, è coinvolta in processi di patogenesi microbica come la formazione di peduncoli di ancoraggio alla cellula bersaglio, invasione della cellula ospite, elongazione e *scattering* cellulare (processo di distacco da cellule vicine). Questo riarrangiamento actina-dipendente è stato osservato in *E.coli* enteropatogenico (EPEC)⁷⁴ ed enteroemorragico (EHEC), *Shigella*, *Cryptosporidium* ed *Helicobacter*⁷⁵.

SCOPO DELLA TESI

In questo progetto di ricerca abbiamo valutato il coinvolgimento della cortactina nella patogenesi e progressione della leucemia linfatica cronica di tipo B. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno precedentemente dimostrato che sia la Src tirosin chinasi Lyn che un suo substrato, la proteina HS1, sono sovraesprese nei linfociti B neoplastici di LLC-B e presentano alcune anomalie rispetto ai linfociti B normali. La nostra attenzione si è ora focalizzata sulla proteina cortactina in quanto omologa di HS1 e maggiore substrato delle Src-tirosin chinasi. Il nostro scopo è quello di capire se anche la cortactina sia uno dei substrati di Lyn e quindi coinvolta nella patogenesi della leucemia linfatica cronica (figura 17).

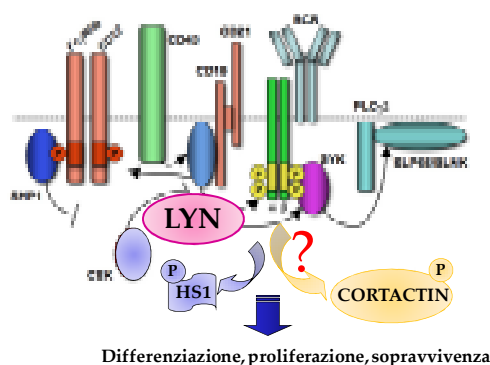


Figura 17: Rappresentazione schematica della trasduzione del segnale mediata dal BCR nei B neoplastici.

In particolare, in questa tesi abbiamo analizzato:

- l'espressione della cortactina nei linfociti B neoplastici;
- quali forme proteiche e quali varianti di *splicing* siano presenti nei linfociti B neoplastici;
- la localizzazione subcellulare della cortactina in condizioni basali e dopo stimolazione del recettore CXCR4 ed inibizione della Src chinasi Lyn;
- l'eventuale correlazione tra l'espressione della cortactina sia con l'indice di migrazione cellulare sia con la secrezione della metalloproteasi di matrice 9 (MMP9).

MATERIALI E METODI

1. Pazienti

In questa tesi sono stati analizzati 106 pazienti di età compresa tra i 32 e i 97 anni, affetti da LLC-B, afferenti all'Unità Operativa di Ematologia e Immunologia Clinica del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Padova. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in tabella I. Di ciascuno di essi sono stati valutati: la concentrazione di emoglobina, il numero delle piastrine e quello dei leucociti, la percentuale di linfociti e lo stadio clinico secondo Rai alla diagnosi. I valori dei globuli bianchi erano compresi tra 8,310 e 198,200/mm³ con una percentuale di linfociti compresa tra il 41% e il 91,4%. 24 pazienti si presentavano in stadio 0, 24 in stadio 1, 7 in stadio 2, 2 in stadio 3, 26 in stadio 4 e di 25 non è ancora stato definito lo stadio.

Mediante analisi citofluorimetrica abbiamo caratterizzato le cellule B utilizzando un pannello di AcMo diretti verso i seguenti Ag: CD5, CD19, CD23, CD38, CD79b, IgD, IgM (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) e ZAP-70 (Millipore Corporation; Billerica, MA). Tutti i linfociti B leucemici dei pazienti presi in esame erano positivi per i marcatori CD5, CD19 e CD23, tipicamente coespressi nella LLC-B e quelli di 25 soggetti lo erano anche per CD38. Mediante metodiche di biologia molecolare è stato valutato lo stato mutazionale dei geni IgV_H (SHM).

Per i nostri esperimenti, abbiamo utilizzato come controlli normali i linfociti B ottenuti dal sangue periferico di 14 soggetti sani.

Tabella 1: Caratteristiche ematochimiche, cliniche, immunofenotipiche e molecolari dei 20 pazienti analizzati.

Paziente	Età	Sesso	Stadio RAI ⁽¹⁾	wbc /mm ³	SHM ⁽²⁾	ZAP70 ⁽³⁾	% CD19/5	% CD38 ⁽⁴⁾	% IgM	% IgD
1	49	M	0	29,600	M	neg	87	82	10	52
2	65	F	0	12,790	M	pos	61	0	56	89
3	49	M	0	16,000	M	neg	72	0	0	88
4	56	M	0	10,500	nd	neg	62	6	0	7
5	80	F	0	26,000	M	neg	82	0	0	44
6	58	M	0	156,200	nd	neg	97	3	47	32
7	64	F	0	20,000	U	neg	67	1	4	3
8	74	M	0	16,840	M	neg	59	0	0	0
9	71	M	0	9,610	M	pos	40	1	14	32
10	48	F	0	32,700	U	neg	86	2	14	4
11	63	F	0	48,300	M	pos	83	45	0	12
12	54	M	0	22,460	M	neg	87	nd	nd	nd
13	80	M	0	9,300	nd	neg	51	88	66	38
14	57	M	0	23,600	U	neg	87	91	0	8
15	83	F	0	12,900	M	neg	34	1	0	75
16	81	M	0	50,100	M	neg	70	1	0	64
17	55	M	0	12,700	nd	pos	70	1	0	2
18	47	M	0	11,300	U	pos	65	11	4	11
19	50	F	0	8,300	M	neg	68	2	0	17
20	61	F	0	19,400	M	neg	86	63	25	59
21	61	M	0	9,000	M	pos	44	4	22	48
22	53	F	0	11,500	M	neg	80	28	0	1
23	58	F	0	37,500	U	neg	83	34	0	3
24	62	M	0	106,100	M	neg	97	1	44	0
25	68	M	1	73,800	M	pos	92	0	47	35
26	58	M	1	21,910	nd	neg	87	0	31	49
27	65	F	1	51,000	nd	neg	91	0	6	93
28	59	M	1	11,500	M	neg	81	4	0	0
29	67	F	1	29,500	M	neg	63	2	3	0
30	62	M	1	10,200	M	neg	57	0	80	0
31	70	F	1	17,780	M	neg	75	0	0	0
32	44	F	1	55,800	M	neg	91	0	3	0
33	54	F	1	20,370	M	neg	72	0	0	93
34	68	M	1	18,500	U	pos	86	61	45	0
35	62	M	1	27,400	nd	neg	80	14	20	59
36	66	M	1	16,800	U	neg	83	63	19	13
37	64	F	1	23,000	M	neg	85	2	10	14
38	65	F	1	13,330	M	neg	59	3	2	80
39	67	M	1	33,280	U	pos	71	80	99	94
40	67	M	1	8,300	M	pos	32	3	3	18
41	74	F	1	24,850	U	pos	86	48	74	57
42	61	F	1	29,200	M	pos	88	0	0	1
43	49	F	1	100,600	M	neg	97	0	15	42
44	57	F	1	48,500	U	pos	91	0	15	21
45	58	M	1	10,400	M	neg	53	2	1	3
46	63	M	1	33,000	U	pos	86	15	0	8
47	74	M	1	12,000	U	neg	66	5	7	16
48	64	F	2	48,700	nd	neg	89	12	31	35
49	63	F	2	25,600	M	neg	80	3	30	15
50	57	M	2	25,500	nd	neg	95	1	10	0
51	62	F	2	66,000	M	pos	64	0	7	56
52	48	F	2	44,000	U	pos	89	15	0	0

53	65	M	2	113,000	M	neg	71	3	0	67
Paziente	Età	Sesso	Stadio RAI ⁽¹⁾	wbc /mm ³	SHM ⁽²⁾	ZAP70 ⁽³⁾	% CD19/5	% CD38 ⁽⁴⁾	% IgM	% IgD
54	63	F	2	27,700	U	neg	92	1	12	6
55	74	F	3	14,200	M	neg	85	1	0	0
56	95	F	3	40,000	M	neg	57	0	58	99
57	84	M	4	22,530	M	neg	92	0	4	47
58	74	M	4	19,100	M	pos	81	4	0	0
59	76	M	4	34,800	U	pos	83	87	20	8
60	84	M	4	56,000	U	neg	95	83	0	0
61	32	F	4	21,600	U	neg	50	88	0	0
62	71	M	4	139,600	M	neg	95	0	0	0
63	63	M	4	51,700	M	pos	95	14	20	35
64	69	M	4	12,900	M	neg	84	5	0	0
65	73	M	4	39,100	U	neg	96	nd	0	9
66	43	M	4	11,220	U	pos	19	76	35	87
67	76	M	4	162,000	U	pos	80	nd	nd	nd
68	67	M	4	41,100	U	pos	95	nd	6	0
69	76	M	4	50,600	M	neg	94	5	12	1
70	68	M	4	2,910	U	pos	58	32	3	67
71	78	F	4	48,000	M	pos	86	0	47	83
72	83	M	4	50,100	U	neg	96	1	11	12
73	77	M	4	41,000	M	pos	76	0	26	12
74	78	M	4	80,000	U	pos	94	19	0	6
75	80	M	4	125,700	M	pos	88	100	66	1
76	69	F	4	70,600	U	pos	97	39	41	5
77	79	M	4	35,000	M	neg	59	0	14	14
78	57	M	4	330,000	U	pos	94	12	7	31
79	64	F	4	17,500	M	pos	73	35	73	37
80	74	M	4	17,830	M	neg	66	34	68	49
81	55	M	4	77,000	M	neg	89	71	22	71
82	73	F	nd	20,000	nd	neg	64	11	0	4
83	69	F	nd	55,000	U	neg	36	89	0	63
84	59	M	nd	39,400	U	neg	90	52	0	0
85	57	M	nd	32,890	nd	pos	90	6	0	0
86	70	M	nd	95,300	U	pos	95	2	0	0
87	58	M	nd	14,800	M	neg	87	1	0	9
88	74	F	nd	29,100	nd	neg	92	nd	nd	nd
89	82	M	nd	195,000	M	pos	81	nd	nd	nd
90	59	M	nd	73,640	M	neg	95	1	0	0
91	74	M	nd	19,490	U	pos	68	85	0	0
92	58	M	nd	8,310	U	neg	61	12	40	0
93	52	F	nd	8,530	U	neg	44	7	4	73
94	66	M	nd	nd	nd	pos	78	nd	nd	nd
95	53	M	nd	62,000	U	neg	93	61	12	4
96	60	F	nd	19,030	M	neg	62	3	27	47
97	64	M	nd	27,680	M	neg	67	nd	0	38
98	67	M	nd	125,800	U	neg	86	nd	0	0
99	70	M	nd	13,860	nd	neg	64	nd	nd	nd
100	64	M	nd	142,000	U	neg	94	1	100	9
101	79	F	nd	15,720	M	pos	65	5	0	12
102	68	F	nd	28,520	M	neg	87	1	9	31
103	61	M	nd	9,730	M	neg	55	4	30	39
104	63	M	nd	9,970	U	pos	41	64	70	42
105	49	M	nd	33,500	M	neg	89	2	0	19
106	71	M	nd	26,780	U	pos	84	63	0	14

- (1) stadiazione secondo Rai⁷⁶;
nd: non determinato;
- (2) stato mutazionale dei geni delle IgV_H (SHM): si definisce mutato lo stato con presenza di SHM in percentuale uguale o superiore al 2% rispetto alla sequenza *germline*;
mut: mutato;
unmut: non mutato;
- (3) parametro valutato mediante analisi citofluorimetrica (*cut off*>20%);
NEG: negativo;
POS: positivo.
- (4) parametro valutato mediante analisi citofluorimetrica (*cut off*>30%);
sIgM: IgM di superficie;
IgD: IgD di superficie.

2. Analisi immunofenotipica

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

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

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

Per ogni analisi sono stati acquisiti 15.000 eventi.

3. Separazione dei linfociti B dal sangue periferico

I linfociti sono stati purificati da prelievi di sangue venoso eparinato. Per isolare i linfociti B dal sangue periferico di pazienti che presentavano una percentuale di linfociti B CD19+ uguale o maggiore al 90% dei PBMC totali abbiamo impiegato la stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H) (Amersham Biosciences; San Francisco, California) (vedi paragrafo 3.1). Tale metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Le cellule mononucleate e le piastrine, a minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi ed i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta. Le piastrine sono state separate dalle cellule mononucleate mediante lavaggi successivi.

Per ottenere i linfociti B CD19+ di donatori sani o di pazienti con una percentuale di linfociti CD19 inferiore al 90% dei PBMC totali, abbiamo utilizzato il *kit* RosetteSep (StemCell Technologies; Vancouver, Canada), un *cocktail* di anticorpi diretti contro antigeni di superficie espressi dalle cellule ematopoietiche (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) e contro la glicoforina A espressa dagli eritrociti, per selezionare negativamente le cellule B dal sangue intero. Questa miscela di anticorpi si lega alle cellule non B ed ai globuli rossi creando delle immunorosette (vedi paragrafo 3.2).

3.1 Stratificazione su Ficoll/Hypaque

Il sangue periferico è stato prima diluito in rapporto 1:6, data l'alta conta leucocitaria dei pazienti con LLC-B, con sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente ed agitato delicatamente; in seguito, è stato stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si è proceduto con una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno. L'"anello" di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti a 20°C con freno (figura 18, pannello superiore); il fondello è stato risospeso in una quantità adeguata di soluzione fisiologica e le cellule sono state contate utilizzando la camera di Burkner.

3.2 Purificazione dei linfociti B mediante *kit rosettesep*

Ad ogni ml di sangue sono stati aggiunti 50 μ l di RosetteSep e si è proceduto con un'incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Il campione è stato poi diluito 1:2 con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X + 2% FBS (Fetal Bovine Serum) ed agitato delicatamente; in seguito è stato stratificato su F/H. Si è proceduto, quindi, con una centrifugazione a 900g a temperatura ambiente per 30 minuti, cui ha fatto seguito l'aspirazione dell'anello formatosi all'interfaccia F/H, contenente le cellule B. Queste ultime sono state risospese in PBS 1X + 2% FBS e centrifugate a 400g per 10 minuti (figura 18, pannello inferiore). Infine, le cellule sono state risospese in PBS 1X e contate in camera di Burker.

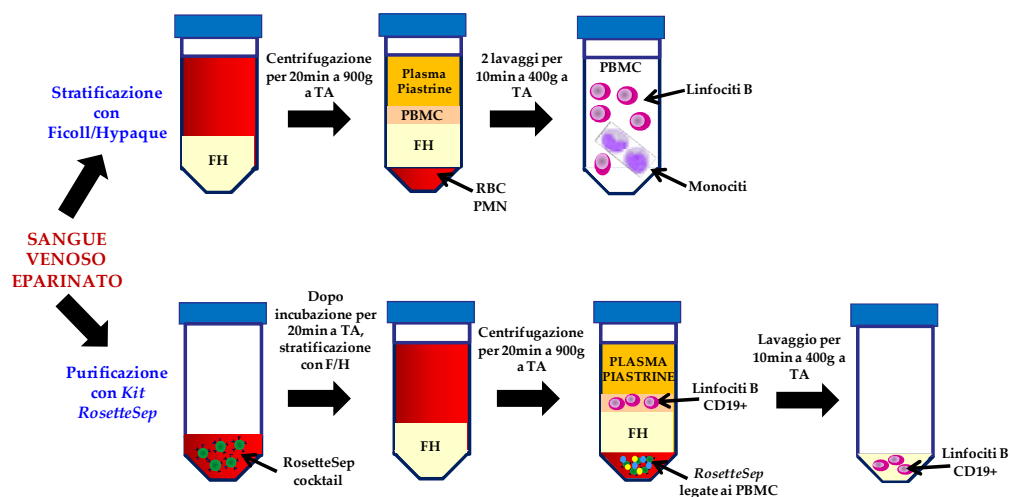


Figura 18: Isolamento delle cellule mononucleate dal sangue periferico. Stratificazione con Ficoll/Hypaque (pannello superiore). Tramite centrifugazione su F/H sono state isolate le cellule mononucleate dal sangue periferico. Le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano sopra lo strato di F/H perché hanno densità minore; al contrario, i globuli rossi (RBC) ed i granulociti (PMN) hanno una maggiore densità rispetto al F/H e si raccolgono sul fondo della provetta. **Purificazione con Kit RosetteSep (pannello inferiore).** Da sangue intero vengono isolati, per selezione negativa, i linfociti B CD19+. 10ml di sangue venoso intero sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente (TA) con 500 μ l di *RosetteSep*. A seguire, tramite stratificazione su F/H, si ottengono i linfociti B CD19+ che si concentrano subito sopra lo strato di F/H, mentre il resto delle cellule PMN e i globuli rossi (RBC), legati alle rosette, si raccolgono sul fondo della provetta.

4. Preparazione dei lisati cellulari

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

- Tris (idrossimetil) amminometano cloridrato (Tris-HCl) 50mM pH 6,8;
- Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 5mM;
- Glicerolo 10%;
- SDS (sodio dodecil solfato) 2%;
- β-mercaptoetanol 1%;
- Colorante (blu di bromofenolo o pironina) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri).

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

5. Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS

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

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

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

La piastra, delle dimensioni di 8×10cm, viene fissata nell'apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham Biosciences; San Francisco, California). La corsa elettroforetica ha una durata di circa 2 ore ad un'intensità di corrente di 25mA.

6. Western blotting

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

Dopo SDS-PAGE le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa per l'azione di un campo elettrico, ottenuto applicando all'apposito apparecchio una corrente di 350mA per 2 ore e 30 minuti. Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento è costituito da: Tris 25mM, glicina 192mM, metanolo 20% ed SDS 0.1% con pH finale pari ad 8,0 (tampone A). Al termine del trasferimento, la membrana viene lasciata per tutta la notte nel tampone di saturazione, composto da Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM ed albumina di siero bovino (BSA) 5% (tampone B), per saturare i siti aspecifici. Segue un'incubazione di 2 ore e 30 minuti, a temperatura ambiente, con l'Ac primario diluito nel seguente tampone: Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM, BSA 1% (tampone C).

Per il nostro studio abbiamo impiegato i seguenti anticorpi: anti- β -actina monoclonale (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri) ed anti-cortactina policlonale (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, California), anti-cortactina policlonale (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri) e anti-cortactina (Upstate). Sono stati successivamente eseguiti tre lavaggi di 10 minuti ciascuno a temperatura ambiente, utilizzando il tampone C addizionato di Tween 0.1%, e chiamato tampone di lavaggio. La membrana è stata, quindi, incubata per 30 minuti con un Ac secondario anti-IgG, ottenuto contro la specie animale immunizzata per avere l'Ac primario. L'Ac secondario è coniugato con l'enzima perossidasi (Amersham International Biotechnology; Buckinghamshire, Gran Bretagna) e viene opportunamente

diluito nel tampone C. Dopo aver effettuato tre ulteriori lavaggi, la membrana è stata sottoposta alla rivelazione anticorpale con il sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL) (Pierce; Rockford, Illinois): la membrana viene fatta incubare per 1 minuto con 1ml di luminolo ed 1ml di H₂O₂ che, a contatto con la perossidasi e, quindi, in corrispondenza del complesso Ag-Ac, danno luogo ad una reazione di ossidazione con emissione di luce. Sopra la membrana viene posta una lastra autoradiografica, che viene impressionata dalla luce emessa.

L'analisi densitometrica delle bande ottenute nella lastra autoradiografica è stata effettuata impiegando il programma Image J.

7. Elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE)

L'elettroforesi bidimensionale, o elettroforesi 2D, è un'altra tecnica di elettroforesi impiegata per separare una miscela di proteine. In questo caso, però, la separazione avviene in 2 dimensioni: nella prima, le proteine sono separate per punto isoelettrico, che le distingue sulla base del loro pH, nella seconda dimensione le esse vengono separate per massa molecolare.

Aliquote di 1x10⁶ linfociti B, ottenuti dal sangue periferico di pazienti di LLC-B, sono state risospese in 125µl di tampone di isoelettrofocalizzazione, composto da urea 9M, tiourea 2M, CHAPS 4% (w/v), ditiotreitolo (DTT) 65 mM, anfoliti 0,5% (v/v) (Bio-Lyte 3-10 buffer) (Biorad).

I campioni sono stati successivamente centrifugati a 12000g per 15 minuti a 20°C, quindi caricati su *strip* di 7cm a gradiente di pH immobilizzato (pH 3-10) (Biorad) e, dopo una reidratazione di 12h, sono stati sottoposti a isoelettrofocalizzazione (20000 Vh a 20°C) su Protean IEF Cell (Biorad).

Al termine della prima corsa elettroforetica, in cui le proteine sono state separate in base al loro pH, le *strip* sono state equilibrate per 10 minuti nel tampone definito di equilibratura a pH 8,8 (Tris/HCl 0,375M, pH 8,8, urea 6M, glicerolo 30% (v/v), SDS 2% (v/v), DTT 2%) e successivamente per altri 10 minuti nello stesso tampone addizionato di iodoacetammide al 2,5%. In seguito le *strip*, contenenti i campioni separati

in base al punto isoelettrico, sono state caricate su gel di poliacrilammide al 8% e sottoposti a SDS/PAGE, utilizzando l'apparato Protean II MINII (Biorad) raffreddato a 4°C, per separare i campioni in base al peso molecolare.

8. Analisi dei linfociti B in microscopia confocale

Per visualizzare la distribuzione subcellulare della proteina cortactina nei linfociti B leucemici e normali, abbiamo allestito dei vetrini per microscopia confocale su cui sono state fissate le cellule da studiare. I linfociti B sono stati seminati sui pozzetti del vetrino, precedentemente ricoperti di poli-L-lisina (Sigma Aldrich; Milano, Italia), ad una concentrazione di circa 30.000 cellule/pozzetto. Per fissare le cellule sono stati aggiunti 50µl di paraformaldeide al 4% per pozzetto a temperatura ambiente per 10 minuti. Le cellule, così fissate, sono state lavate per due volte con PBS1X e permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,1% a temperatura ambiente per 4 minuti. Prima di procedere all'incubazione con l'Ac primario, i legami aspecifici sono stati saturati impiegando albumina di siero bovino (BSA) al 2% per 30 minuti. Le cellule sono state successivamente incubate per un'ora con l'anticorpo primario monoclonale IgG₁ anti-cortactina (Prodotti Gianni; Milano, Italia), con diluizione 1:150 (dalla soluzione madre 1mg/ml) e lavate per tre volte con PBS1X. Viene successivamente eseguita l'incubazione, al buio, con l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) anti-IgG₁ (CALTAG, Burlingame, CA) per cortactina. Al termine, le cellule sono state nuovamente sottoposte a tre lavaggi con PBS1X. I vetrini sono stati chiusi con vetrini coprioggetto e osservati al microscopio confocale Ultraview. Le immagini sono state acquisite ed elaborate utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging). Per gli esperimenti di colocalizzazione di cortactina e β -actina è stata inoltre utilizzata la falloidina, coniugata con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) e in grado di legare i filamenti di actina.

9. Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da 4×10^6 linfociti ottenuti dal sangue periferico dei pazienti utilizzando il protocollo "RNeasy Mini Kit Protocol" (Qiagen; Hilden, Germania), secondo le indicazioni del fornitore. I linfociti sono stati lisati utilizzando una soluzione contenente β -mercaptoetanololo e tampone di lisi e successivamente processati tramite ripetute aspirazioni con ago da 20G. Dopo aggiunta di 350 μ l di etanolo al 70%, il campione è stato trasferito in una colonnina di purificazione (fornita dal *kit*) e poi centrifugato a 10.000g per 15 secondi, con successiva eliminazione dell'eluato. Dopo l'aggiunta di 350 μ l di tampone RW1, il campione è stato nuovamente centrifugato a 10.000g per 15 secondi e l'eluato è stato eliminato. Si è proceduto poi con un'incubazione di 20 minuti con 80 μ l di soluzione contenente Dnase I. Dopo un lavaggio con 350 μ l di tampone RW1 seguito da centrifugazione a 10.000g per 15 secondi, il tubino collettore è stato sostituito. Si sono aggiunti 500 μ l di tampone RPE ed il campione è stato centrifugato a 10.000g per 15 secondi, l'eluato è stato eliminato. Dopo l'aggiunta di 500 μ l di tampone RPE si è proceduto con una centrifugazione a 15.000g per 2 minuti. La colonnina è quindi stata trasferita in provetta da 1,5ml, si sono versati 30 μ l di H₂O priva di Rnase sulla membrana di purificazione e si è eseguita una centrifugazione a 10.000g per 1 minuto, in modo da far dissociare l'RNA dalla membrana e portarlo in soluzione.

Per verificare la qualità dell'RNA ottenuto, sono stati seminati 2 μ l di campione in un gel di agarosio all'1% in tampone tris-acetato (TAE) 1X, con bromuro di etidio (10mg/ml) al 5% V/V; l'elettroforesi è stata eseguita a 60V per 20 minuti. L'RNA estratto è stato poi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro Ultrospec 1100 *pro* (Amersham Biosciences, Milano, Italia). È stata preparata una diluizione 1:200 del campione di RNA e sono state determinate le assorbanze (A) alle lunghezze d'onda di 260nm (λ dei nucleotidi) e 280nm (λ delle proteine). È stato calcolato, dunque, il rapporto A_{260}/A_{280} : in caso di un valore inferiore a 2, il preparato di RNA è contaminato da proteine e non è utilizzabile. È stata, infine, calcolata la concentrazione di RNA del campione, applicando la seguente formula:

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

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

10. Sintesi del cDNA

La retro trascrizione da mRNA a cDNA (DNA complementare) si avvale dell'enzima retrotrascrittasi, una DNA polimerasi RNA-dipendente, che genera un filamento di cDNA a partire da un mRNA usato come stampo. In questa tesi è stato utilizzato come stampo l'RNA totale e la reazione è stata eseguita in presenza di un *primer* oligo-dT, in grado di appaiarsi alla coda di poliA in 3' tipica dell'mRNA retro trasc. La retrotrascrittasi utilizzata è l'Avian Myeloblastoma Virus (AMV); questo enzima ha un'attività polimerasica 5'→3' (con RNA o DNA come stampo) ed un'attività 3'→5' di Rnasi H, che degrada il filamento di RNA della doppia elica RNA-DNA, prodotta durante la sintesi del cDNA. Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il *kit* di retro trascrizione "Reverse Transcription System" (Promega Corporation; Madison, Wisconsin). La miscela di reazione è composta da:

- 4µl di MgCl₂ 25mM;
- 2µl di tampone RT 10X;
- 2µl della miscela dei 4 deossinucleosidi trifosfati (dNTP mix) 10mM;
- 0,5µl di un enzima inibitore delle Rnasi 40µg/µl;
- 0,75µl di AMV retrotrascrittasi 25µg/µl;
- 1µl di *primer* Oligo(dT) 0,5mg/ml;
- 2µg di RNA;
- H₂O priva di Rnasi a volume finale di 20µl.

Tale miscela è stata incubata a 42°C per 15 minuti, poi posta a 95°C per 5 minuti (per bloccare la reazione) ed, infine, messa in ghiaccio per qualche minuto. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -80°C oppure utilizzato immediatamente per allestire la reazione di amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) del filamento di DNA complementare all'mRNA bersaglio (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR).

11. Valutazione dell'espressione genica della cortactina e dell'MMP9 mediante real-time RT-PCR

Dopo aver estratto e retrotrascritto l'RNA da cellule B di pazienti affetti da LLC-B, si è proceduto con la quantificazione dell'mRNA codificante la cortactina mediante real-time RT-PCR. Le amplificazioni dei geni di interesse sono state ottenute mediante ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems; Foster City, California), in un volume di 15µl. La Master Mix usata, SYBR Green PCR, fornita dalla ditta Applied Biosystems, conteneva la DNA polimerasi AmpliTaq Gold; a questa sono stati aggiunti i *primer* (5µM) ed 1,5µl di cDNA per ottenere un volume di reazione finale di 15µl.

I *primer* utilizzati per le amplificazioni della cortactina, dell'MMP9 e dell'actina sono stati:

- actina:

forward 5'- TGC CGA CAG GAT GCA GAA G -3'

reverse 5'- CTC AGG AGG AGC AAT GAT CTT GA -3'

- cortactina:

forward 5'- CCG CAG AGG ACA GCA CCTA - 3'

reverse 5'- GGC TGT GTA CCC CAG ATC GTT - 3'

- MMP9:

forward 5'- TGC CCG GAC CAA GGA TAC AG -3'

reverse 5'- TCA GGG CGA GGA CCA TAG AG -3'

Questi *primer* sono stati ottenuti usando il *software* Primer Express (Applied Biosystems).

Le condizioni di reazione sono state:

- denaturazione a 95°C per 10 minuti;
 - appaiamento a 60°C per 15 secondi;
 - estensione a 72°C per 1 secondo.
- } X 50 cicli

Ogni campione è stato amplificato in duplicato. Per ogni Master Mix è stato eseguito un controllo negativo, e sia per l'actina che per la

cortactina sono state generate due curve *standard*, usando il cDNA di cellule della linea Jurkat alle seguenti diluizioni: 1, 1:5, 1:25 e 1:125. La quantità relativa di mRNA è stata determinata per confronto con le curve *standard*. Il risultato di ciascun campione è stato normalizzato rispetto all'espressione dell'actina.

È stata inoltre generata una curva di dissociazione per distinguere gli amplificati specifici da quelli aspecifici.

12. Valutazione delle isoforme della cortactina mediante RT-PCR

Le varianti di *splicing* della cortactina (WT, SB1 ed SV2), espresse nei pazienti e nei controlli normali, sono state identificate mediante una RT-PCR, utilizzando dei *primers* che fiancheggiano la regione di *binding* per l'actina (figura 19). L'analisi è stata effettuata utilizzando il cDNA retro trascritto dall'mRNA (ved. Materiali e Metodi paragrafo 10).

Le amplificazioni sono state ottenute mediante PTC-200 DNA Engine Peltier Thermal Cycler (MJ Research; Groton, CT) in un volume di 50µl.

La mix di reazione è composta da:

- 3µl cDNA
- 3µl MgCl₂ solution 25mM
- 5µl PCR buffer II 10X
- 4µl dNTPmix 10mM
- 4µl primer forward (20pM)
- 4µl primer reverse (20pM)
- 0,5µl AmpliTaq Gold 5 U/ml
- 26,5µl H₂O priva di RNasi

I primers utilizzati per le amplificazioni delle regioni tandem repeats della cortactina (figura 19) sono stati:

forward 5'-GTC TTT CAA GAG CAT CAG ACC C-3'

reverse 5'-CTC TTT CTC CTT AGC GAG GTT TTC-3'

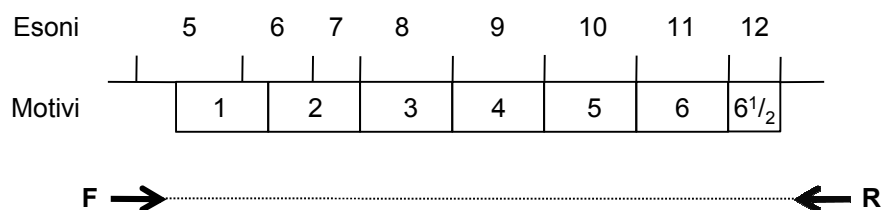


Figura 19. Regione di amplificazione dei tandem repeats della cortactina. I primers amplificano una regione di 920bp nel WT, di 807bp nel SV1 e di 662bp nel SV2.

Le condizioni di reazione sono state:

- denaturazione a 94°C per 1 secondo;
 - appaiamento a 56°C per 1.30 secondi;
 - estensione a 72°C per 2.30 secondi.
- } X 35 cicli

Per l'analisi delle bande sono stati seminati 28µl di campione in un gel di agarosio allo 0,8% in tampone TAE 1X, con bromuro di etidio (10mg/ml) al 5% V/V; l'elettroforesi è stata eseguita a 80V per circa 60 minuti.

13. Stimoli cellulari

I linfociti B isolati dal sangue periferico sono stati risospesi in terreno RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, UK) con antibiotici e senza FBS alla concentrazione di 5×10^6 /ml e messi in piastre da 12 o da 24 pozzetti. È stato aggiunto lo stimolo SDF-1α (200ng/ml) (R&D System, INC.; Minneapolis, MN) e le cellule sono state lasciate ad incubare in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5% e raccolte dopo 15 min, per gli esperimenti di fosforilazione della cortactina in gel 2D, e dopo 5h e 24h per valutare il rilascio di MMP-9 nel mezzo di coltura.

14. Analisi zimografica

La zimografia è una tecnica elettroforetica che permette la misura dell'attività gelatinolitica delle metalloproteasi presenti nel mezzo di

coltura condizionato dalle cellule o nel lisato cellulare; è una metodica semplice, sensibile e quantificabile.

L'analisi del rilascio di MMP-9 è stata eseguita incubando linfociti B neoplastici con SDF-1 α (200ng/ml) in piastre da 12 pozzetti alla concentrazione di 1×10^6 cellule in 1ml di RPMI 1640 con antibiotici, senza FBS. Dopo 5h e 24h di incubazione il sovranatante è stato raccolto e centrifugato per l'eliminazione delle cellule residue.

Aliquote da 45 μ l di campione addizionate con 15 μ l di sample buffer 4X (Tris-HCl 1.25M pH 6.8, SDS 10%, glicerolo, blu bromofenolo) sono state caricate in un gel di poliacrilammide all'8% addizionato di gelatina (substrato delle gelatinasi) (Sigma) all'1% e sottoposto a corsa elettroforetica in presenza di SDS in condizioni non riducenti. Alla fine della corsa il gel è stato sottoposto a due lavaggi da 30 minuti ciascuno in una soluzione di Triton X-100 al 2,5%. Questo trattamento consente di eliminare l'SDS dal gel e dai campioni che quindi non sono più ostacolati nella loro attività proteolitica. In seguito il gel è stato posto in un tampone di sviluppo per le gelatinasi (collagenasi buffer: Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,4) ed incubato per 16 ore a 37 °C. Terminata l'incubazione il gel è stato colorato per 30 minuti in una soluzione contenente metanolo al 30%, acido acetico al 10% e il colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham Biosciences) allo 0.5% e successivamente decolorato con la stessa soluzione priva del colorante. Le bande chiare su sfondo blu rappresentano l'attività di digestione della gelatina da parte delle gelatinasi presenti nei campioni. Le bande sono state quantificate utilizzando il sistema di analisi densitometrica GelDoc 2000 - QuantityOne software (Biorad).

15. Test di migrazione cellulare in camera di Boyden

L'attività migratoria dei linfociti B ottenuti da paziente ed indotta da specifici ligandi è stata valutata utilizzando il test di chemiotassi in microcamera di Boyden con 48 pozzetti (figura 20).

L'impiego di una micro camera per valutare la risposta chemiotattica offre i vantaggi di utilizzare un piccolo numero di cellule

(5×10^4 cellule/pozzetto) e di esaminare contemporaneamente un gran numero di stimoli o di pazienti.

La microcamera è costituita da un blocchetto di plexiglass contenente 48 pozzetti della capacità di 25-30 μ l (parte inferiore) e da un coperchio di plexiglass contenente 48 fori che, una volta montato e avvitato, forma i compartimenti superiori della capacità di 50 μ l. Un'unica microcamera consente quindi di eseguire contemporaneamente 15 esperimenti in triplicato. Il potenziale di migrazione viene valutato come capacità delle cellule di attraversare la membrana porosa che separa i due compartimenti. Nel compartimento superiore vengono seminate le cellule, mentre nel compartimento inferiore viene seminato l'agente chemiotattico. Le variabili tecniche che intervengono nell'allestimento di un test di chemiotassi sono perciò: le cellule, il filtro, il segnale chemiotattico.

In questa tesi abbiamo utilizzato, come stimolo funzionale, la chemiochina CXCL12/SDF-1 α (R&D System Inc) alla concentrazione 100ng/ml diluita in medium RPMI 1640 con antibiotici, senza FBS. Per il test di migrazione (figura 20) sono state utilizzate membrane porose di policarbonato prive di polivinilpirrolidone (pori di 3-5 μ m) ed una soluzione di fibronectina alla concentrazione finale di 5 μ g/ml. Il filtro è stato appoggiato in questa soluzione ed incubato a 37°C per 45-60 minuti, poi il filtro è stato lavato con PBS 1X e bagnato con alcune gocce di terreno.

Nei pozzetti inferiori della microcamera di chemiotassi sono stati aggiunti 28 μ l di medium contenente SDF-1 α . Il filtro è stato appoggiato sulla faccia interna della parte della microcamera di chemiotassi a dimensioni minori, con il lato che era stato in contatto con la fibronectina (lato F) rivolto verso l'alto.

Ai pozzetti superiori sono stati aggiunti $1,25 \times 10^5$ linfociti B in terreno RPMI senza FBS. Dopo incubazione per 2 ore a 37°C, in ambiente al 5% di CO₂, il filtro è stato staccato dal supporto e il lato "non F" è stato lavato con PBS 1X in modo da eliminare le cellule che si erano solo appoggiate. Il lavaggio è stato ripetuto 2-3 volte e poi il filtro è stato lasciato asciugare. A questo punto è stato immerso, con il lato F rivolto verso il basso, per 3 volte e per 1 secondo nei coloranti DiffQuick 1 (azzurro), DiffQuick 2 (rosso) e DiffQuick 3 (blu) (Date AG; Dudinggen, Svizzera); infine è stato lavato in soluzione fisiologica e lasciato asciugare

con il lato F rivolto verso l'alto. Il filtro è stato poi posto su un vetrino, per la lettura al microscopio. Le cellule migrate sono state quindi contate al microscopio (ingrandimento 800X).

Il risultato del test di chemiotassi viene espresso come indice di migrazione (IDM) ossia come:

$$\frac{n. \text{ di cellule migrate in presenza di stimolo}}{n. \text{ cellule migrate senza stimolo}}$$

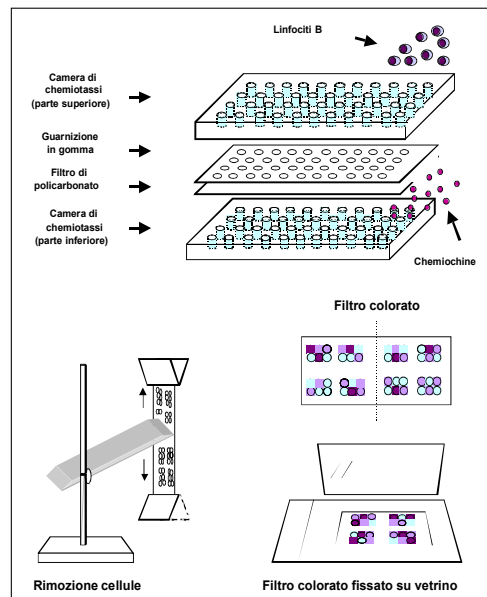


Figura 20. Rappresentazione schematica del test di chemiotassi utilizzato nella migrazione dei linfociti B. La microcamera è costituita da un blocchetto di plexiglass contenente 48 pozzetti della capacità di 25-30 μ l (parte inferiore) e da un coperchio di plexiglass contenente 48 fori che, una volta montato e avvitato, forma i compartimenti superiori della capacità di 50 μ l. Il potenziale di migrazione viene valutato come capacità delle cellule di attraversare la membrana porosa che separa i due compartimenti. Nel compartimento superiore vengono seminate le cellule, mentre nel compartimento inferiore viene seminato l'agente chemiotattico.

16. Analisi statistica

L'analisi statistica dell'espressione proteica e dell'espressione genica della cortactina nei pazienti e nei soggetti normali analizzati, è stata eseguita utilizzando il *test t* di Student o Anova test. I dati sono stati espressi come media \pm errore standard (ES) della media e sono stati considerati statisticamente significativi solo i valori con $p < 0,05$ o $p < 0,01$. La frequenza delle forme proteiche p80/85 o p70/75 e la frequenza delle isoforme di splicing WT ed SV1 sono state determinate mediante conteggio diretto dei casi.

RISULTATI

1. La cortactina è sovraespressa nei linfociti B di LLC-B

Mediante *western blotting* abbiamo valutato il livello di espressione proteica della cortactina in linfociti B purificati da sangue periferico di 14 controlli sani e di 106 pazienti con LLC-B, che non erano in terapia al momento del prelievo. Abbiamo dimostrato che la proteina è significativamente sovraespressa nei linfociti B patologici ($1,10 \pm 0,12$ ES) rispetto ai linfociti B normali ($0,19 \pm 0,06$ ES, $*p < 0,01$; test di *t*-Student; figura 21A). La sovraespressione è stata confermata anche in real-time RT-PCR (pazienti: $2,08 \pm 0,28$ ES *vs* controlli: $0,36 \pm 0,07$ ES, $*p < 0,05$ test *t*-Student, figura 21B) e mediante microscopia confocale, dove è evidente una maggiore intensità di fluorescenza nei linfociti B di LLC-B rispetto ai linfociti B normali (figura 21C).

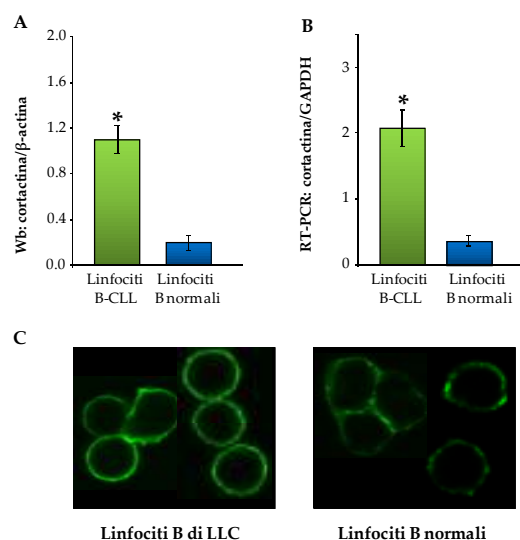


Figura 21: Valutazione dei livelli di espressione della cortactina nei linfociti B normali e neoplastici purificati da sangue periferico. A) Il lisato totale (5×10^5 per campione) dei linfociti B di 106 pazienti affetti da LLC-B e di 14 soggetti normali è stato sottoposto ad SDS-PAGE al 10%, trasferito su membrana di nitrocellulosa e rivelato in successione con anticorpi anti-cortactina e anti β -actina. Il grafico mostra le medie dei rapporti cortactina/ β -actina in cellule B neoplastiche e normali ($*p < 0,01$). **B)** Valutazione del livello di espressione dell'mRNA della cortactina tramite real-time RT-PCR nei linfociti B purificati dai controlli sani e dai pazienti con LLC-B ($*p < 0,05$). **C)**

Risultato rappresentativo della analisi al microscopio confocale della proteina cortactina (Alexa 488, verde) in cellule B normali (n=5) e neoplastiche (n=5) ottenute da sangue periferico.

2. La cortactina è maggiormente espressa nei linfociti B di pazienti a prognosi più sfavorevole

Uno dei fattori prognostici più importanti nella diagnosi della LLC-B è la valutazione della presenza (+) o assenza (-) di ipermutazioni somatiche (SHM) nei geni per la porzione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline di superficie (IgV_H)¹⁶ che ha permesso di distinguere i pazienti in due gruppi: SHM- (a prognosi sfavorevole) e SHM+ (a decorso clinico più favorevole). Al fine di verificare l'esistenza di una correlazione tra lo stato mutazione delle IgV_H ed il livello di espressione della cortactina, abbiamo comparato i livelli di espressione proteica della cortactina tra il gruppo SHM+ (n=37) e quello SHM- (n=55). Abbiamo dimostrato che pazienti con prognosi sfavorevole presentano livelli di espressione della cortactina maggiori ($1,46 \pm 0,27$ ES) rispetto a quelli con prognosi più favorevole ($0,90 \pm 0,11$ ES, * $p < 0,05$, test di *t*-Student) (figura 22A). I diversi livelli di espressione tra il gruppo di pazienti mutati (SHM+), non mutati (SHM-) e dei controlli sani sono stati confermati anche mediante test Anova (** $p < 0,01$; figura 22A). I dati di espressione ottenuti mediante *western blotting* sono stati confermati anche dai risultati ottenuti in real-time RT-PCR (figura 22B).

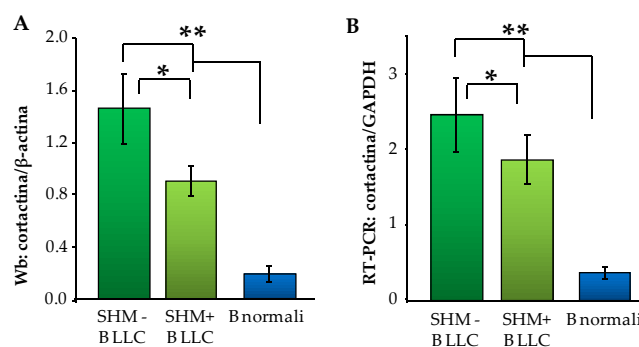


Figura 22. Valutazione del livello di espressione della cortactina nei pazienti a prognosi sfavorevole (SHM-) e prognosi favorevole (SHM+). Sulla base dello stato mutazionale delle immunoglobuline di superficie abbiamo suddiviso i pazienti analizzati in due gruppi, pazienti non mutati SHM- (n = 37) e pazienti mutati SHM+ (n = 55), considerando come *cut-off* una frequenza di mutazioni superiore al 2%. **A)** Risultati dei livelli di espressione della proteina cortactina mediante *western blotting*: SHM-: $1,46 \pm 0,27$ ES vs SHM+: $0,90 \pm 0,11$ ES, * $p < 0,05$, test *t*-Student; SHM- vs SHM+ vs normali, ** $p < 0,01$, test Anova. **B)** Risultati dei livelli di espressione dell'mRNA della cortactina mediante real-time RT-PCR: SHM-: $2,46 \pm 0,49$ ES vs SHM+: $1,87 \pm 0,32$ ES, * $p < 0,05$, test *t*-Student; SHM- vs SHM+ vs normali, ** $p < 0,05$ test Anova).

3. La cortactina non è sovraespressa dai linfociti T dei pazienti con LLC-B.

Per verificare se la sovraespressione della cortactina nei pazienti con LLC-B fosse una caratteristica esclusiva dei linfociti B neoplastici, abbiamo quantificato mediante real-time RT-PCR il livello dell'mRNA della cortactina nei linfociti T purificati da 5 pazienti con LLC-B e 5 controlli sani. Abbiamo dimostrato che l'mRNA della cortactina nei linfociti T di pazienti con LLC-B ($0,51 \pm 0,25$ ES) presenta valori confrontabili con i livelli di proteina dei linfociti normali, sia T ($0,56 \pm 0,27$ ES, $**p=ns$) che B ($0,36 \pm 0,08$ SE, $**p=ns$, figura 23).

I risultati di questa quantificazione ci permettono quindi di affermare che la sovraespressione della cortactina è una caratteristica del clone B neoplastico.

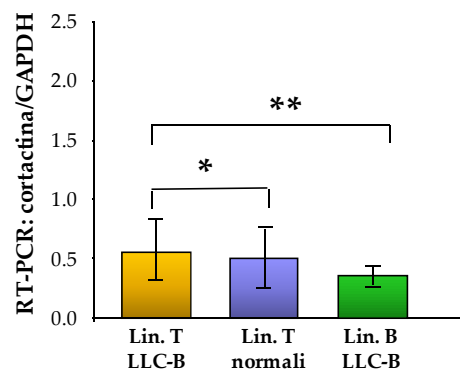


Figura 23. Valutazione dell'espressione della cortactina nei linfociti T. I grafici mostrano i livelli di mRNA, ottenuti mediante real-time RT-PCR, dei linfociti T isolati da 5 pazienti e da 5 donatori sani e dei linfociti B normali (linfociti T dei pazienti *vs* linfociti T normali $*p=ns$, test *t*-Student; linfociti T di pazienti *vs* linfociti B normali, $**p=ns$, test *t*-Student). Il dato è stato confermato anche mediante test Anova (linfociti T dei pazienti *vs* linfociti T dei controlli *vs* linfociti B dei controlli $p=ns$).

4. La cortactina presenta forme proteiche a diverso peso molecolare

Dalla letteratura è noto che nelle piastrine la cortactina in SDS-PAGE migra in due bande con un peso apparente di 80 e 85kDa (p80/p85)⁶² e che la forma di 85kDa origina dalla proteina di 80kDa a causa di modificazioni post-trascrizionali, come la fosforilazione e l'acetilazione. I risultati delle nostre indagini in *western blotting* hanno messo in evidenza la presenza nei linfociti B oltre alla forma p80/85 anche un'isoforma della cortactina con un peso molecolare di circa 70 e 75 kDa che abbiamo chiamato p70/75 (figura 24). Più precisamente abbiamo osservato che nei normali è sempre espressa la forma proteica p70/75 (N#1, figura 24); mentre i pazienti presentavano una combinazione delle diverse forme: alcuni pazienti esprimevano le forme p70/75 (LLC-B#1 e #54, figura 24), altre la p80/85 (LLC-B#30 e #65, figura 24); infine, alcuni presentavano la co-espressione delle 2 forme p70/75 e p80/85 (LLC-B#40 e #68, figura 24).

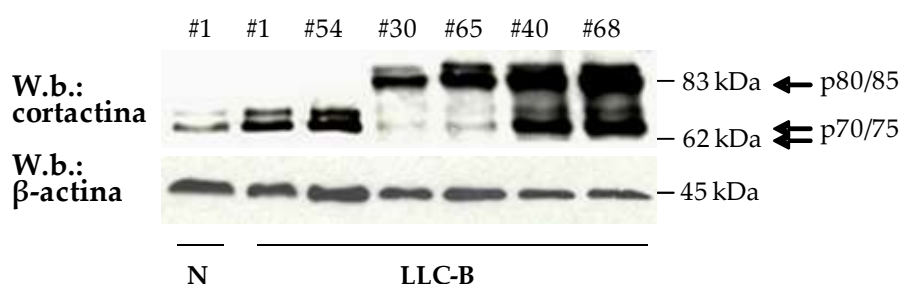


Figura 24. Espressione risultati rappresentativi della rivelazione con anticorpo anti cortactina di 1 controllo e 6 pazienti. In questa immagine si può osservare che il controllo N#1 e i pazienti #1 e #54 esprimono le isoforme p70/75; i pazienti #30 e #65 le isoforme p80/85; i pazienti #40 e #68 coesprimono tutte e 2 le forme, p70/75 e p80/85.

Dato che finora nessun gruppo aveva mai riportato la presenza delle bande a 70 e 75kDa, abbiamo validato i nostri dati utilizzando tre diversi anticorpi anti-cortactina (vedi Materiali e Metodi). In figura 25 sono riportati i risultati delle indagini in *western blotting* con i 3 diversi anticorpi. Come è possibile vedere tutti e 3 gli anticorpi hanno riconosciuto le stesse forme della cortactina: nel paziente #11 la forma p70/75, nei pazienti #92 e #101 la forma p80/85 e nei pazienti #23 e #70 la co-espressione di entrambe le forme (figura 25).

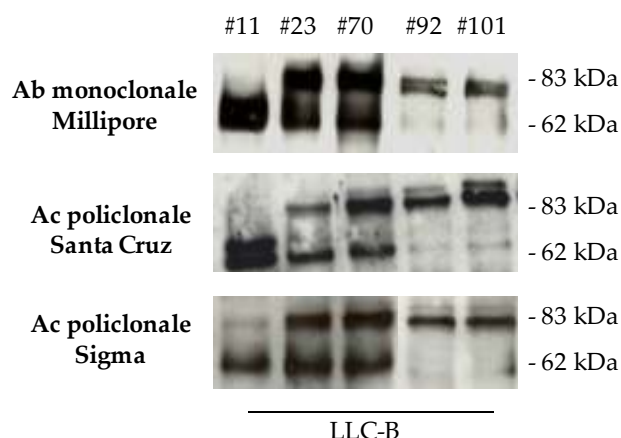


Figura 25. Conferma con 3 diversi anticorpi delle isoforme proteiche della cortactina. Aliquote di 5×10^6 di linfociti B ottenuti da sangue periferico di 5 pazienti con LLC-B sono stati caricati in triplicato e sono stati sottoposti a *western blotting*. Le tre membrane ottenute sono state rivelate ognuna per un tipo di anticorpo: una membrana rivelata con anti-cortactina monoclonale della ditta Millipore, una con anti-cortactina policlonale della ditta Santa Cruz e una con anti-cortactina policlonale della ditta Sigma.

Vista la differenza di peso osservata nei nostri campioni (sani e patologici), abbiamo investigato quali forme della cortactina fossero espresse in differenti cellule di origine ematopoietica (piastrine, linfociti T, *natural killer* NK e monociti) purificate da 5 donatori sani e in tre linee cellulari (Jurkat, K562 e Raji). Come atteso⁶², nelle piastrine la proteina migra in SDS-PAGE nelle due forme p80 e p85 (Ptl, figura 26). Nei linfociti T, NK e monociti, ma anche nelle cellule di linea Jurkat e Raji abbiamo dimostrato che la cortactina è presente nella forma 70/75 (figura 26). Infine, nelle cellule di linea K562 la proteina presenta tutte e quattro le forme p80/85 e p70/75 (figura 26).

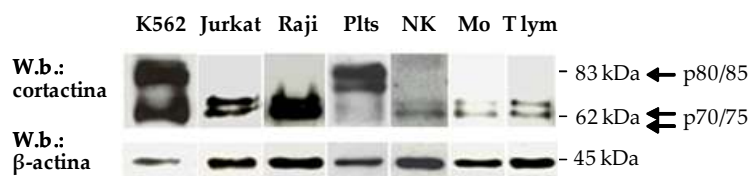


Figura 26. Espressione della cortactina in cellule di linea e in cellule normali della linea ematopoietica. Aliquote da 5×10^6 di cellule ematopoietiche di linea K562, Jurkat e Raji e cellule della linea ematopoietica (linfociti T, NK e monociti), ottenute da soggetti normali, sono state sottoposte a SDS-PAGE, trasferite su membrana di nitrocellulosa e rivelate in successione con anti-cortactina policlonale e anti- β -actina monoclonale. Nell'immagine: le cellule K562 presentano tutte e quattro le forme p70/75 e p80/85; le cellule Jurkat, Raji, NK (*natural killer*), monociti (Mo) e linfociti T presentano solo le forme p70/75; le piastrine (Plts) presentano solo le forme p80/85.

I nostri dati suggeriscono quindi che questa proteina venga espressa con un peso molecolare diverso a seconda del tipo cellulare considerato; in modo particolare abbiamo osservato che i linfociti B normali presentano la forma p70/75, diversamente dai linfociti B neoplastici, che possono esprimere anche la forma p80/85. Abbiamo, quindi, calcolato in quale percentuale i pazienti esprimono queste forme. Abbiamo definito che nel 56% dei pazienti analizzati è presente solo la forma proteica p70/75, nel 13% solo la forma proteica p80/85 e, infine, nel 31% vi è la coespressione di tutte e 2 le forme proteiche p70/75 e p80/85, per un totale di 44% dei pazienti che esprimono la forma p80/85 (figura 27).

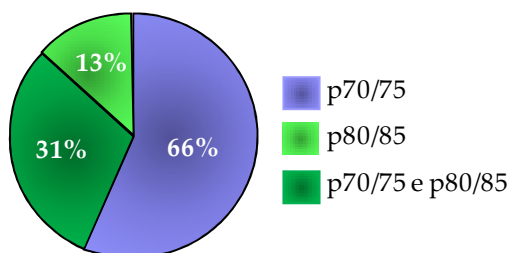


Figura 27. Percentuale di espressione delle forme proteiche della cortactina nel totale dei pazienti analizzati. Il grafico è stato ottenuto calcolando in percentuale quanti pazienti esprimono solo le forme p70/75 (settore azzurro), solo le forme p80/85 (settore verde chiaro) ed entrambe le forme p70/75 e p80/85 (settore verde scuro).

Alla luce di tali dati, abbiamo suddiviso i nostri pazienti in due gruppi: pazienti che esprimono solo la proteina p70/75 (gruppo 1, n=52) e pazienti che esprimono quella p80/85 (gruppo 2, n=40). L'analisi densitometrica della forma proteica p80/85 presenti nei pazienti del gruppo 2 mette in evidenza come sia espressa a livelli maggiori ($1,10 \pm 0,11$ ES) rispetto a quella p70/75 espressa dal gruppo 1 ($0,63 \pm 0,09$ ES $p < 0,05$, test *t*-Student, figura 28) e dai controlli normali ($0,19 \pm 0,06$ ES, $**p < 0,001$, test *t*-Student, figura 28).

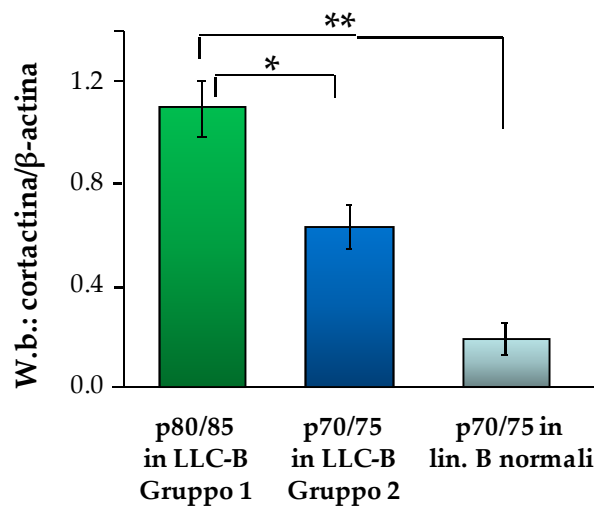


Figura 28. Valutazione densitometrica delle forme p80/85 espresse nei linfociti B patologici rispetto alle forme p70/75 espresse dai linfociti B sia patologici che normali. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: gruppo 1, pazienti che esprimono solo la forma p70/75 e gruppo 2, pazienti che esprimono la forma p80/85. L'analisi densitometrica ha rivelato che la forma p80/85 nei pazienti del gruppo 2 è espressa a livelli maggiori della forma p70/75 espressa nei pazienti del gruppo 1 e nei controlli normali. (p80/85 nei pazienti *vs* p70/75 nei pazienti, * $p < 0,05$, test *t*-Student p80/85 nei pazienti *vs* p70/75 nei controlli, ** $p < 0,001$, test *t*-Student).

I dati finora ottenuti hanno dimostrato che la cortactina non solo è sovraespressa nei linfociti B neoplastici, ma anche che il 44% dei pazienti esprime la forma proteica p80/85 mai è espressa nelle cellule B normali.

5. Le isoforme p75 e p85 originano dalle isoforme p70 e p80 per modificazioni post trascrizionali

In letteratura è riportato che la cortactina è soggetta a modificazioni post-trascrizionali come acetilazione e fosforilazione; in particolare, è stato dimostrato che l'isoforma p85 origina dalla p80 per eventi di fosforilazione, determinando in SDS-PAGE la presenza di due bande a diverso peso molecolare ⁶².

Per caratterizzare meglio le diverse isoforme proteiche che osserviamo in *western blotting*, in collaborazione con il gruppo della Prof. Brunati (Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova), abbiamo impiegato la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale (2DE) che permette la separazione delle proteine non solo in base al loro peso

molecolare, ma anche in base al loro punto isoelettrico (pI). Per la nostra indagine abbiamo selezionato 4 pazienti che presentano in SDS-PAGE entrambe le forme proteiche p70/75 e p80/85 e 3 controlli normali e 3 pazienti che in SDS-PAGE presentano solo le bande a 70 e 75kDa.

In questa indagine abbiamo osservato che nei campioni in cui la cortactina in SDS-PAGE migra nelle forme p70 e p75 (figura 29, pannello inferiore, campioni N#01 e LLC#31), in 2DE la proteina migra ad un peso molecolare di circa 70kDa, ma in 4 spots, secondo il loro diverso punto isoelettrico (figura 29 pannello superiore). Invece nei campioni in cui la proteina migra in SDS-PAGE in entrambe le forme (p70/75 e p80/85, figura 29 pannello inferiore, campione LLC#56) in 2DE la proteina migra con peso molecolare apparente di 70 e 80kDa e per ogni peso molecolare in 4 spots (figura 29, pannello superiore).

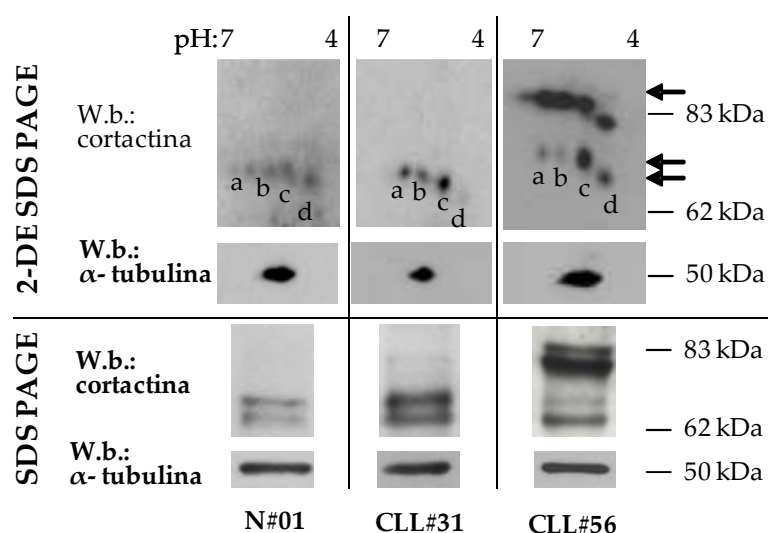


Figura 29. Confronto della migrazione della cortactina in gel 2DE (pannello superiore) e in western blotting (pannello inferiore). I lisati proteici di 7 pazienti di LLC-B sono stati separati in elettroforesi bidimensionali con un gel al 10% e un range di pH 4-7 (2DE, pannello superiore) ed in SDS-PAGE con un gel al 10% (SDS-PAGE, pannello inferiore). I due pannelli permettono il confronto tra i risultati ottenuti in gel 2DE e quelli ottenuti dalla migrazione della cortactina in SDS-PAGE.

I risultati ottenuti suggeriscono, quindi, che la proteina sia espressa in due forme principali del peso apparente di 70 e 80kDa e che le due bande a 75 e 85kDa siano la conseguenza di modificazioni post-trascrizionali che ne alterano il pI, facendo quindi migrare le proteine con un peso molecolare e pI diversi. Poiché in letteratura è dimostrato che la

forma proteica a 85kDa origina da quella a 80kDa per fosforilazione tirosinica ad opera di diverse Src tirosin chinasi⁶², i risultati da noi ottenuti sembrano suggerire che anche la forma p75 possa originare dalla p70 per eventi di fosforilazione post-trascrizionale.

6. Caratterizzazione delle varianti di splicing nei linfociti B normali e patologici

Van Rossum *et al.* hanno dimostrato la presenza, oltre della forma *wilde type* (WT) dell'mRNA della cortactina, di altre due varianti di *splicing* della cortactina, che differiscono per il numero di ripetizioni nella regione in *tandem repeats* legante la F-actina: l'isoforma SV1, mancante della sesta ripetizione e l'isoforma SV2, mancante della quinta e sesta ripetizione (figura 30A). Hanno inoltre dimostrato che queste varianti presentano una ridotta affinità di legame per la F-actina e per questo le cellule che le esprimono mostrano una minor capacità di migrazione rispetto a quelle cellule che esprimono l'isoforma WT. Abbiamo quindi voluto investigare, mediante RT-PCR, utilizzando primers⁵⁹ che fiancheggiano la regione codificante l'intero dominio di legame per l'actina (figura 30A), quali varianti di mRNA fossero espresse nei nostri campioni. Le varianti di *splicing* SV1 ed SV2, mancanti rispettivamente di 1 o 2 repeats nel dominio, amplificano un prodotto di PCR di dimensioni diverse rispetto all'mRNA WT.

In questa indagine abbiamo dimostrato che circa il 57% dei linfociti B neoplastici analizzati (n=21) coesprime le isoforme WT ed SV1, il 47% solo la SV1, mentre tutti i nostri controlli normali esprimono solo l'isoforma SV1 (figura 30B). Dalla letteratura, l'isoforma SV2 è di difficile individuazione ed infatti solo un controllo normale e nessun linfocita B patologico da noi analizzati la esprimono.

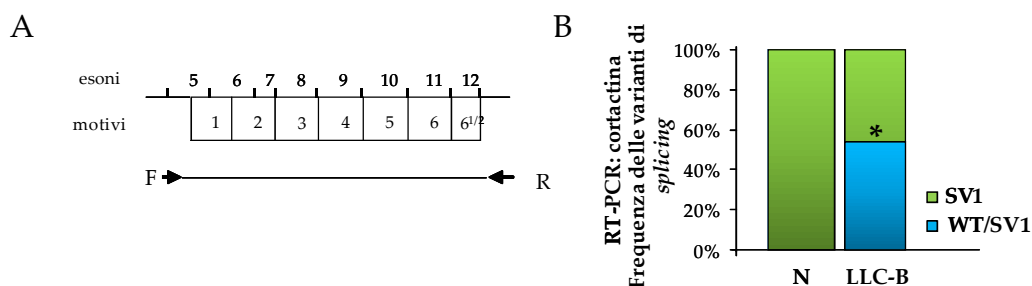


Figura 30. Identificazione delle varianti di *splicing* nei pazienti di LLC-B. A) L'immagine rappresenta la mappa degli esoni (5-12) che codificano per la regione legante l'actina. I boxes numerati da 1 a 6^{1/2} rappresentano i motivi ripetuti nella regione di legame per l'actina e sono costituiti da 37 amminoacidi ciascuno. I primers che abbiamo utilizzato sono in grado di identificare le isoforme in funzione del diverso peso molecolare dei prodotti di PCR: infatti amplificano una regione di 920bp per l'mRNA WT, di 807bp per l'mRNA SV1 e di 662bp per l'mRNA di SV2. B) Nel grafico è riportata la percentuale dei pazienti e dei controlli che esprimono l'mRNA WT (blu) e che coesprime le varianti WT-SV1 (verde). Le differenze tra le percentuali dei pazienti che esprime l'mRNA WT (57%) rispetto la percentuale dei normali (0%) è risultata significativa (Fisher exact test, *p<0,01). N=normali; LLC=pazienti con LLC-B.

7. Corrispondenza tra varianti di *splicing* e forme proteiche

Dopo aver osservato che la proteina viene espressa in forme con diversi pesi molecolari e che l'mRNA viene trascritto in 2 varianti diverse, abbiamo voluto indagare un'eventuale corrispondenza tra le varianti di *splicing* (WT ed SV1) e le forme proteiche (p70/75 e p80/85). I nostri dati ottenuti in SDS-PAGE, 2DE e RT-PCR sembrano suggerire che la variante di *splicing* WT dia origine alla forma proteica p80/85, mentre l'mRNA SV1 origina la proteina p70/75. Infatti abbiamo osservato la presenza di una stretta corrispondenza tra l'mRNA (figura 30 pannello superiore) e la migrazione della proteina in SDS-PAGE (figura 30 pannello inferiore): nelle cellule dove sono espresse le varianti di *splicing* WT-SV1, la proteina migra nelle forme p80/85 e p70/75, mentre i casi in cui è espressa solo la variante WT o SV1, la cortactina presenta solo la forma p80/85 o p70/75 (figura 31).

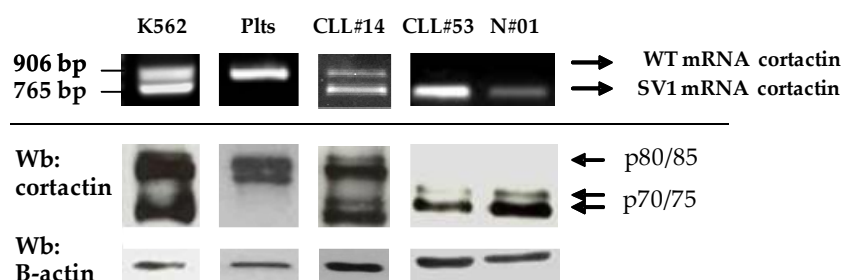


Figura 31. Confronto tra le varianti di *splicing* dell'mRNA e le forme proteiche. Nel pannello superiore sono riportati i risultati rappresentativi delle RT-PCR effettuate con il cDNA della linea cellulare K562, delle piastrine (Plts) ottenute da sangue periferico di soggetti sani e dei linfociti B sia di pazienti (LLC#14 e #53) che di soggetti sani (N#01). Il pannello inferiore mostra la rivelazione in SDS-PAGE con anti-cortactina dei lisati proteici degli stessi campioni analizzati in RT-PCR. Dal confronto diretto si può osservare quando in SDS-PAGE è presente la forma proteica p80/85 viene trascritto l'mRNA WT, mentre quando è presente la proteina p70/75 viene trascritto l'mRNA SV1.

8. L'espressione della cortactina correla con l'indice di migrazione delle cellule B neoplastiche.

È noto che in molti tumori la cortactina si trova sovraespressa e che elevati livelli della proteina possono aumentare la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali favorendone, così, l'invasione nei tessuti⁶⁵. Partendo da questo presupposto, abbiamo indagato se la sovraespressione della cortactina potesse influenzare la capacità di migrazione anche nei linfociti B di LLC. A questo scopo abbiamo analizzato l'indice di migrazione cellulare attraverso test di chemotassi utilizzando come stimolo la chemochina CXCL12/SDF-1 α , poiché è dimostrato che il suo recettore specifico, CXCR4, nei linfociti B di LLC-B è costitutivamente attivo¹² e che la cortactina in cellule HEK293 è importante nel mediare la migrazione cellulare indotta dall'interazione SDF1 α -CXCR4⁶⁶.

In questo studio sono stati analizzati i linfociti B di 10 pazienti di LLC e di 4 soggetti sani. Per i vari campioni presi in esame è stato considerato l'indice di migrazione (IdM= cellule migrate in presenza di stimolo/cellule migrate in assenza di stimolo) misurato con una camera di Boyden (vedi Materiali e Metodi) in funzione del livello di espressione della cortactina determinato in *western blotting* (tabella 2).

Tabella 2

Paziente	Cortactina in W.B.	IdM ²
CTR ³	0.22 ± 0.20	1.22 ± 0.97
LLC#1	0.02	1.56
LLC#2	0.54	1.02
LLC#6	1.84	9.77
LLC#8	0.49	1.15
LLC#9	0.61	5.86
LLC#10	0.24	2.18
LLC#11	0.28	1.04
LLC#14	0.33	1.44
LLC#15	0.92	4.38
LLC#16	1.21	6.00

r=0.9

Tabella 2: Correlazione tra l'indice di migrazione e il livello di espressione della cortactina in *western blotting*. ¹Livello di cortactina ottenuta in *western blotting* (WB); ²IdM: Indice Di Migrazione; ³CTR: in tabella viene riportata la media dei 4 soggetti sani presi in esame in questo lavoro.

Abbiamo osservato che i linfociti B dei pazienti mostrano una capacità di migrazione variabile in risposta allo stimolo con CXCL12/SDF-1 α , l'IdM varia infatti da 1,02 a 9,77. Mettendo in relazione l'indice di migrazione in funzione della quantità di cortactina ottenuta in *western blotting*, abbiamo dimostrato che a livelli crescenti di proteina corrisponde un IdM maggiore in presenza di SDF1 α , che presentavano un basso livello di espressione della cortactina, sono risultati avere un IdM basso (figura 32).

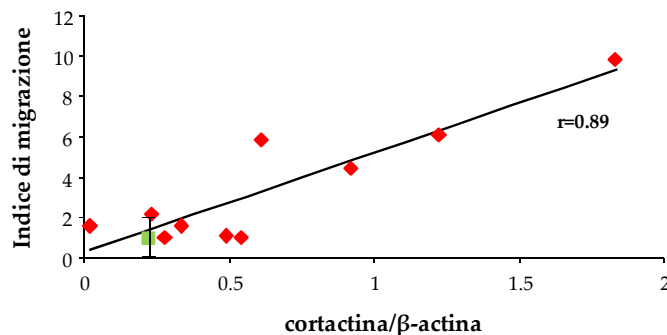


Figura 32. Indice di migrazione in relazione all'espressione della cortactina. La capacità di rispondere allo stimolo chemotattico è stato valutato come capacità delle cellule di attraversare una membrana porosa che separa due compartimenti, in uno sono posti i linfociti B e nell'altro la chemochina CXCL12/SDF-1 α . L'indice di migrazione viene calcolato come numero di cellule migrate sotto stimolo in funzione del numero di cellule migrate in assenza di stimolo. Comparando l'IdM cellulare con la quantità di cortactina espressa è possibile osservare un andamento crescente (in rosso) della capacità di migrazione cellulare in relazione ad un aumento della proteina. In verde è indicata la media degli IdM dei 4 controlli sani (CTR) analizzati.

9. L'espressione della cortactina correla con il rilascio della metallo proteasi di matrice 9 (MMP-9) da parte delle cellule B neoplastiche.

In letteratura è riportato che in linee cellulari di HNSCC il livello di espressione della cortactina correla con l'aumento del rilascio di MMP-2 e MMP-9: una sovraespressione della cortactina in queste cellule induceva un aumento della secrezione di MMP-2 e MMP-9, mentre una ridotta espressione della cortactina correlava con una diminuzione del rilascio di metalloproteasi⁷³. Quindi abbiamo valutato se tale correlazione fosse presente anche nei linfociti B neoplastici di LLC. A tale scopo i linfociti B di 14 pazienti con LLC-B, non sottoposti a chemioterapia al momento dell'analisi, sono stati incubati per 24 ore in terreno di coltura e la quantità di MMP-9 rilasciata nel mezzo è stata quantificata mediante zimografia. L'esperimento è stato condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Garbisa (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova). Come controllo nel nostro esperimento, abbiamo utilizzato la chemochina CXCL12/SDF-1 α , poiché essa stimola nella cellula B la produzione della metallo proteasi di matrice-9 (MMP-9)⁵⁵. I risultati ottenuti dall'analisi zimografica hanno confermato come la chemochina CXCL12/SDF-1 α stimoli il rilascio di MMP-9, ma anche hanno messo in evidenza come le cellule B neoplastiche abbiano una diversa capacità di rilasciare l'MMP9 e questo indipendentemente dalla presenza o assenza dello stimolo. In particolare, alcuni pazienti presentavano un abbondante rilascio di MMP-9 nel mezzo, mentre altri un rilascio nullo o poco apprezzabile (figura 33).

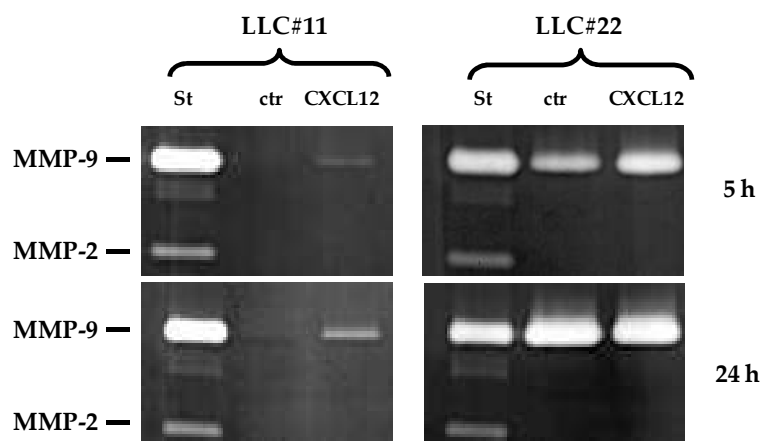


Figura 33. Livelli di espressione di MMP-9. In figura sono riportati due esempi rappresentativi di linfociti B di LLC analizzati mediante zimografia in assenza ed in presenza di CXCL12/SDF-1 α , dopo 5 e 24 ore. Come si può osservare, il paziente #11, in assenza di stimolo, presenta un rilascio poco apprezzabile di MMP-9, contrariamente al paziente #22. Per entrambi è, invece, apprezzabile lo stimolo indotto dalla chemochina seppure la quantità rimanga a livelli bassi per il paziente #11. St: cellule di usate come standard; ctr: controlli normali; CXCL12: cellule stimulate con la chemochina CXCL12.

Alla luce di questi risultati, i pazienti sono stati suddivisi in 2 sottogruppi; quelli con un abbondante rilascio di MMP-9 (+) e quelli (n=5) con rilascio nullo o poco apprezzabile (-). Per questi pazienti è stato anche valutato il livello di espressione della cortactina in *western blotting* (tabella III).

Tabella III

Pazienti	Cortactina in W.B. ²	Attività di MMP-9 ³	Livelli di mRNA MMP-9 ⁴
LLC#1	0.02	-	0.6
LLC#8	0.49	-	1.0
LLC#11	0.28	-	0.0
LLC#13	0.38	-	0.0
LLC#75	0.24	-	0.5
LLC#3	2.02	+	5.7
LLC#4	2.39	+	3.9
LLC#5	3.00	+	7.6
LLC#6	1.84	+	3.7
LLC#7	2.24	+	4.0
LLC#22	1.66	+	0.9
LLC#16	1.21	+	3.5
LLC#18	1.46	+	1.2
LLC#20	1.42	+	9.5

Tabella 3. Correlazione tra l'espressione della cortactina e la produzione di MMP-9 dopo 24h di incubazione con e senza stimolo chemotattico. ¹Livello di cortactina ottenuta in *western blotting* (WB); ²(+): presenza di secrezione di MMP-9; (-): assenza di secrezione di MMP-9 o dato non apprezzabile; livelli di mRNA dell'MMP9 nei linfociti B appena purificati ottenuti mediante real-time RT-PCR.

I risultati ottenuti dagli esperimenti di *western blotting* e zimografia mostrano chiaramente come la mancata o la minima produzione di MMP-9 sia associata ad un basso livello di espressione della cortactina, mentre una produzione maggiore di MMP-9 si associ ad elevati livelli di espressione della proteina (figura 34).

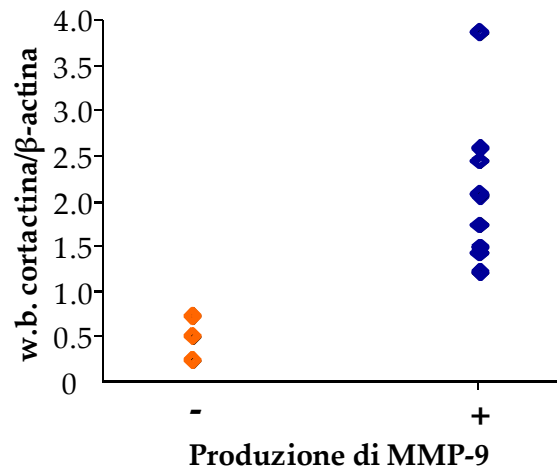


Figura 34. Espressione della cortactina in funzione della produzione di MMP-9. La figura mette in relazione la presenza (+) o assenza (-) della secrezione di MMP-9 con il livello di espressione della proteina, analizzato in *western blotting*. La differenza delle medie dell'espressione della cortactina nei pazienti con poco rilascio di MMP9 ($0,27 \pm 0,18$) è significativamente inferiore rispetto a quelle dei pazienti con abbondante rilascio di MMP9 ($1,91 \pm 0,56$ test *t*-Student).

Inoltre, abbiamo anche valutato i livelli di espressione dell'mRNA dell'MMP-9 delle cellule messe in coltura per 24 ore, dimostrando una stretta corrispondenza tra i livelli di mRNA, quantificati mediante real-time RT-PCR, e l'attività dell'MMP-9, ottenuta dall'analisi zimografica (tabella 2).

Come ultima analisi, abbiamo valutato, mediante real-time RT-PCR, il livello di espressione di mRNA dell'MMP-9 *in vivo*, ossia in cellule B neoplastiche purificate al momento del prelievo. Abbiamo osservato che il gruppo di pazienti caratterizzati da un minimo rilascio di MMP-9 dopo incubazione *in vitro* e da bassi livelli di espressione della cortactina presentavano bassi livelli di espressione dell'mRNA di MMP-9 anche *in vivo* ($0,032 \pm 0,046$); al contrario, quei pazienti che presentavano abbondante rilascio di MMP-9 *in vitro* associato ad alti livelli di espressione della

cortactina esibivano anche *in vivo* più alti livelli di mRNA dell'MMP-9 ($0,51 \pm 0,26$; test di *t*-Student $p < 0,01$) (figura 35 e tabella 3).

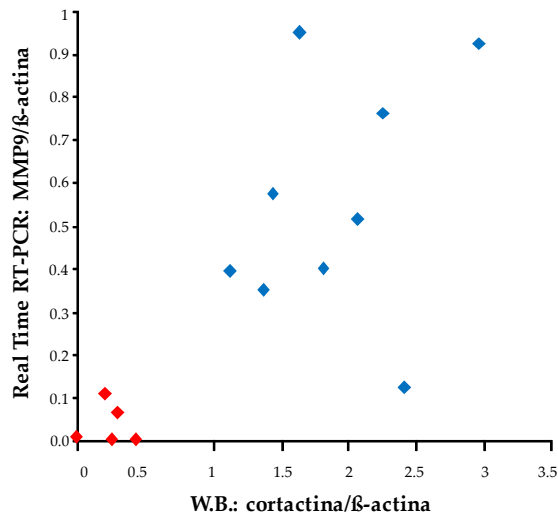


Figura 35. Valutazione *in vivo* della quantità di mRNA dell'MMP-9 in cellule B di LLC. In blu sono riportati i valori ottenuti dall'analisi del livello di espressione dell'mRNA dell'MMP-9 *in vivo* nei linfociti B di pazienti di LLC con un abbondante rilascio di MMP-9 (+). In rosso sono riportati i valori ottenuti dall'analisi condotta su linfociti B con una secrezione nulla, o non apprezzabile, di MMP-9. Come è possibile osservare, ad un aumento del livello di espressione della cortactina corrisponde un aumento di espressione dell'mRNA dell'MMP-9.

Questo risultato suggerisce che già *in vivo* esista una correlazione tra l'espressione della cortactina e la trascrizione dell'MMP9 e che l'abbondante produzione di MMP9 che osserviamo nei nostri esperimenti non sia solo un artefatto dovuto alla incubazione *in vitro* delle cellule.

10. La cortactina è localizzata in maniera anomala nel citosol dei linfociti B di LLC-B

Nelle cellule tumorali, durante la migrazione, la cortactina è localizzata in strutture definite invadopodi e la loro formazione rappresenta una fase importante nel processo di invasione e metastasi. Nei linfociti B di LLC-B la formazione degli invadopodi è stimolata dalla presenza della chemochina CXCL12/SDF-1 α e guidata dall'actina a livello del leading edge⁵⁵. I dati finora dimostrati sembrano indicare che la

sovraespressione della cortactina correli con l'indice di migrazione e la produzione di MMP9 *in vitro*, suggerendo un suo ruolo nell'aggressività del clone neoplastico. Allo scopo, quindi, di capire il ruolo della cortactina nel movimento delle cellule B, abbiamo valutato mediante microscopia confocale la localizzazione subcellulare della cortactina e dell'actina in diversi tipi di cellule prima e dopo stimolo con CXCL12/SDF-1 α . Come atteso nelle cellule di linea K562, Jurkat, HS5 e linfociti B normali in condizioni basali la cortactina e l'actina colocalizzano (figura 36, pannello A). Dopo 15 minuti di stimolo con CXCL12/SDF-1 α , è visibile sia una deformazione cellulare, indice di risposta allo stimolo, sia una ridistribuzione nel citosol delle due proteine: la cortactina sembra allontanarsi dal leading edge, dove invece si concentra l'actina (figura 36, pannello B). Diversamente, nei linfociti B neoplastici osserviamo che già in assenza di stimolo chemotattico la cortactina e l'actina non colocalizzano (figura 36, pannello C) e che dopo stimolo, come si verifica per le altre cellule, l'actina si accumula negli invadopodi e la cortactina migra dalla parte opposta, nell'uropodio (figura 36, pannello D).

Quanto finora dimostrato suggerisce che la cortactina nei linfociti B neoplastici abbia una regolazione alterata che ne influenzi la sua normale attività. È possibile che la mancata interazione tra la cortactina e l'actina, per cui presenta specifici siti di legame, sia dovuta a modificazioni conformazionali indotte con molta probabilità dalla presenza di gruppi fosforici e/o acetilici. Infatti è stato dimostrato che la fosforilazione in serina facilita il legame alla F-actina⁶³, mentre quella in tirosina ne impedisce l'interazione⁶³.

Alla luce del fatto che nei linfociti B neoplastici la Src chinasi Lyn è espressa in maniera anomala e costitutivamente attiva⁵⁰ e che la cortactina è uno dei più importanti substrati delle Src tirosin chinasi, abbiamo valutato il comportamento ed il livello di fosforilazione in Tyr421 della cortactina dopo inibizione di Lyn con il suo inibitore specifico PP2. A questo scopo abbiamo pre-incubato i linfociti B patologici di con PP2 per 20 minuti e successivamente per 15 minuti con la chemochina CXCL12/SDF-1 α , che è dimostrato indurre la fosforilazione dei residui tirosinici della cortactina⁶⁰. I dati di *western blotting* evidenziano che la cortactina p70/75 nei linfociti B neoplastici è fosforilata in Tyr421 e che questa fosforilazione aumenta dopo stimolo con CXCL12/SDF-1 α . La

presenza dell'inibitore PP2, invece, ha indotto una diminuzione della fosforilazione della banda p75, anche in presenza dello stimolo con la chemochina (figura 37).

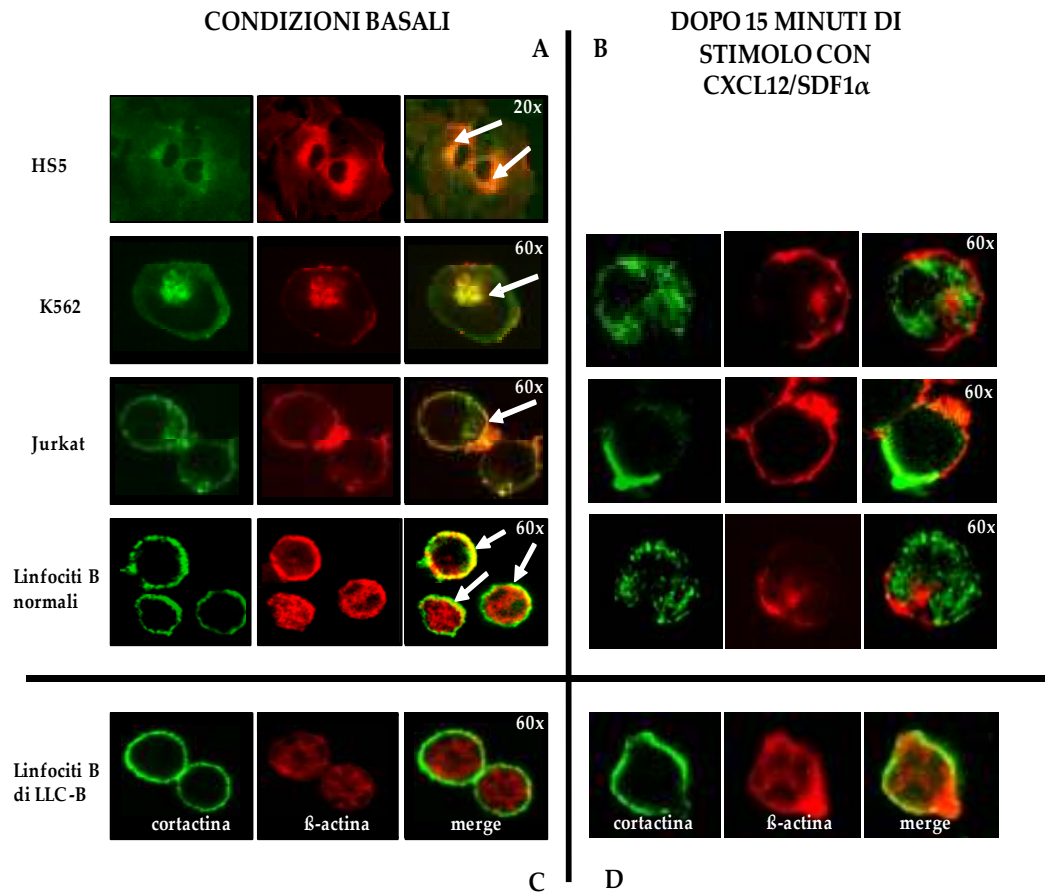


Figura 36. Localizzazione della cortactina e dell'actina in condizioni basali e dopo stimolo con CXCL12/SDF-1 α . La figura è rappresentativa di esperimenti condotti su cellule HS5, K562, Jurkat, linfociti B normali e di LLC-B. Sono stati allestiti vetrini per microscopia confocale utilizzando anticorpi anti-cortactina (FITC, verde) e falloidina per actina (TRITC, rosso). I pannelli A e C mostrano cellule in condizioni basali, mentre i pannelli B e D mostrano le cellule stimulate con CXCL12/SDF-1 α . Come si può notare nel pannello A in tutte le cellule la cortactina (verde) e l'actina (rossa) colocalizzano in condizioni basali (giallo, freccia bianca), mentre dopo stimolo con CXCL12/SDF-1 α (pannello B) le due proteine si ridistribuiscono all'interno del citosol. I pannelli C e D mostrano come nei linfociti B neoplastici la cortactina e l'actina, sia in condizioni basali (pannello C) che dopo stimolo (pannello D), non colocalizzano.

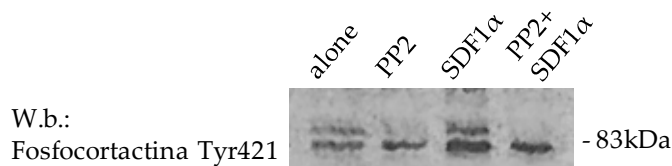


Figura 37. Rivelazione con anti-fosfocortactina (Tyr421). 1×10^6 di linfociti B ottenuti da sangue periferico di paziente sono stati stimolati per 15 minuti con CXCL12/SDF-1 α per 20 minuti con PP2 e con PP2 e CXCL12/SDF-1 α in successione. Dopo le diverse incubazioni le cellule sono state raccolte per la preparazione dei lisati proteici. I lisati proteici sono stati sottoposti a *western blotting* e la rivelazione con anti-fosfocortactina Tyr 242 policlonale mette in evidenza la scomparsa della forma fosforilata p85 dopo incubazione con PP2.

Abbiamo anche osservato che lo stimolo con il PP2 impedisce la ricolocalizzazione della cortactina: dopo stimolo con CXCL12/SDF-1 α , infatti, non solo non si assiste alla migrazione della cortactina e della actina, rispettivamente verso l'uropodio e leading edge, ma anche le due proteine colocalizzano (figura 38).

Questi risultati preliminari sembrano suggerire che la proteina nei linfociti B neoplastici possa essere fosforilata a livello dei residui tirosinici da parte della Src tirosin chinasi Lyn già in condizioni basali e che questa fosforilazione impedisca il legame della F-actina, contribuendo alla anomala localizzazione della cortactina nei linfociti B neoplastici.

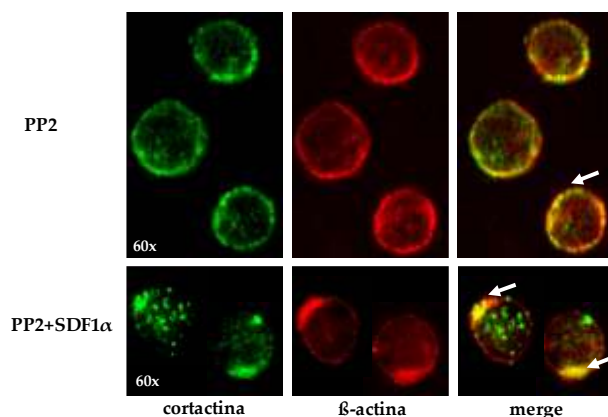


Figura 38: Localizzazione della cortactina e β -actina dopo incubazione con PP2. La figura è rappresentativa di esperimenti condotti su linfociti B neoplastici e dimostra come dopo incubazione con PP2 le due proteine colocalizzano anche in presenza dello stimolo CXCL12/SDF1 α (giallo, freccia bianca).

DISCUSSIONE

La cortactina è una proteina del citoscheletro coinvolta nella polimerizzazione dell'actina e nella migrazione cellulare. È sovraespressa in molti tumori e tale sovraespressione correla con una maggiore aggressività della cellula neoplastica ed una prognosi peggiore dei pazienti^[61]. In questo progetto di ricerca abbiamo studiato se la proteina cortactina fosse coinvolta nella patogenesi della leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B), un disordine linfoproliferativo cronico caratterizzato dall'accumulo di linfociti B monoclonali, dovuto sia ad un'aumentata proliferazione, sia ad un difetto nei meccanismi di morte cellulare programmata^[1]. La quantificazione del livello di espressione di questa proteina in 106 pazienti affetti da LLC-B, ha dimostrando che è sovraespressa nei linfociti B patologici rispetto ai linfociti B dei 14 soggetti normali presi in analisi. Inoltre abbiamo trovato che la cortactina si trova maggiormente espressa nei linfociti B dei pazienti in cui non è avvenuto il processo di ipermutazione somatica (SHM-) e che quindi sono caratterizzati da una prognosi più severa. Sembra quindi che, come dimostrato in altre patologie^[61], anche nella LLC la sovraespressione della cortactina possa promuovere la progressione della malattia ed un decorso peggiore per i pazienti.

Determinante nella progressione di molte patologie è il processo di metastasi, in cui un ruolo chiave è giocato dalla regolazione della migrazione cellulare. In molte neoplasie la sovraespressione della cortactina aumenta la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali favorendone, così, l'invasione nei tessuti^[61]. In questo progetto abbiamo valutato se vi fosse un'associazione tra l'espressione della cortactina e la capacità dei linfociti B patologici di rispondere ad uno stimolo chemiotattico. A tale scopo, abbiamo stimolato le cellule B di paziente con la chemochina CXCL12/SDF1 α : in primo luogo perché i linfociti B di LLC-B esprimono costitutivamente il suo specifico recettore CXCR4⁷⁷; in secondo luogo, perché è dimostrato che la cortactina è coinvolta nel signaling mediato da CXCR4^[70]. Mediante test di chemotassi condotti sulle cellule B patologiche abbiamo osservato un andamento crescente della capacità di migrazione cellulare, quando presente lo stimolo, in relazione

ad un aumento di espressione proteica suggerendo che una sovraespressione della cortactina potrebbe contribuire alla maggiore invasività della cellula B neoplastica. A sostegno di questa ipotesi, anche la quantificazione dell'attività della metalloproteasi MMP9 rilasciata nel mezzo di coltura dai linfociti B ha evidenziato una correlazione con il livello di espressione della cortactina. Le metalloproteasi sono fattori importanti nell'aggressività e invasività delle cellule neoplastiche, in quanto una volta secrete degradano la matrice extracellulare favorendo la motilità cellulare. Uno studio effettuato in linee cellulari di HNSCC, ha dimostrato che la sovraespressione della cortactina correlava con un aumento della secrezione di MMP-2 e MMP-9^[75]. Il nostro studio ha messo in evidenza come anche nella LLC-B esista una correlazione tra i livelli di espressione della cortactina e la capacità dei linfociti B di rilasciare nel mezzo di coltura la metalloproteasi MMP-9: infatti un abbondante rilascio di MMP-9 correlava con un'elevata espressione della proteina, mentre una minima o assente produzione di MMP-9 correlava con una bassa espressione della cortactina.

Nelle cellule tumorali la sovraespressione non è l'unica modalità con la quale la cortactina regola la sua attività. Infatti è noto dalla letteratura che l'espressione di varianti di splicing alternativo della cortactina e la presenza di gruppi fosforici o acetilici possono modularne il suo legame alla F-actina e quindi influenzarne il coinvolgimento nel movimento cellulare^[63,64]. Van Rossum *et al.* hanno individuato la presenza di tre varianti di splicing della cortactina: wilde type (WT), SV1, isoforma mancante della sesta ripetizione nella regione legante l'actina, e SV2, isoforma mancante della quinta e sesta ripetizione. In particolare, hanno dimostrato che le cellule esprimenti le due isoforme SV1 o SV2 mostrano una ridotta capacità di migrazione rispetto a quelle che esprimono l'isoforma WT^[63]. Noi abbiamo osservato che la maggior parte dei pazienti esprime contemporaneamente le varianti WT ed SV1, mentre i linfociti B normali esprimono solo l'isoforma SV1. Sembra quindi che anche nei linfociti B la mobilità cellulare possa essere regolata oltre che dalla sovraespressione della cortactina anche dalla trascrizione dell'mRNA WT, che non è mai espresso nei linfociti B normali e che, secondo i dati di letteratura, conferisce maggior capacità alle cellule neoplastiche di rispondere allo stimolo dell'*CXCL12/SDF1 α* .

Un altro aspetto fondamentale per la regolazione dell'attività della cortactina è la sua fosforilazione in Ser e Tyr. In cellule di linea è stato dimostrato che la cortactina in condizioni basali è maggiormente fosforilata in residui di Ser ed in questa condizione colocalizza con l'actina⁶⁴. Durante il movimento cellulare, dopo stimolo con la chemochina SDF1 α o l'attivazione delle Src kinasi, aumenta la fosforilazione in Tyr, con decolocalizzazione dall'actina, la formazione degli pseudopodi ed il rilascio dell'MMP9⁷². Anche nei linfociti B di LLC-B la formazione degli invadopodi è stimolata dalla presenza della chemochina CXCL12/SDF-1 α , prodotta dalle cellule stromali e "nurse like" del midollo osseo ed è guidata dall'actina a livello del leading edge⁵⁵. Mediante microscopia confocale, abbiamo osservato che nei linfociti B neoplastici la cortactina, anche in condizioni basali, non colocalizza con l'actina, a differenza dei linfociti B normali dove invece è evidente la loro colocalizzazione. Lo stimolo con il CXCL12 invece ha stimolato sia nella cellula neoplastica che in quella normale l'allungamento della cellula con la migrazione della cortactina nell'uropodio e dell'actina nell'invadopodio. Il fatto che le due proteine in condizioni basali non interagiscano, nonostante presentino siti specifici di legame, contribuisce a sostenere l'ipotesi che la cortactina nei linfociti B neoplastici possa presentare una regolazione alterata che ne influenza la sua normale attività. Poiché nei linfociti B patologici la Src tirosin chinasi Lyn è sovraespressa e costitutivamente attiva⁵⁰, è possibile che intervenga a mantenere la cortactina iperfosforilata in tirosina, impedendo il legame con la F-actina. A sostegno di questa ipotesi, il trattamento delle cellule neoplastiche con PP2, un inibitore specifico delle Src kinasi, ha indotto una diminuzione della fosforilazione in Tyr della cortactina e la colocalizzazione della cortactina con l'actina anche dopo stimolo con il CXCL12.

In conclusione, in questo progetto di tesi abbiamo dimostrato che la cortactina è maggiormente espressa nei linfociti B di pazienti con LLC-B, soprattutto in quelli a prognosi sfavorevole; abbiamo trovato che, a differenza dei controlli normali esprimenti solo la variante di *splicing* SV1, la maggior parte dei pazienti presenta la variante WT, noto dalla letteratura conferire maggior mobilità alle cellule di HNSCC. Inoltre, abbiamo osservato che la sua sovraespressione correla con l'indice di migrazione cellulare in risposta allo stimolo chemiotattico, con la

produzione di MMP9, un enzima di importanza centrale nella mobilità cellulare e nel processo metastatico. Sembra inoltre che anche un'alterata fosforilazione della proteina mediata dalla Src kinasi Lyn possa essere coinvolta nei processi da essa mediati. I dati ottenuti comunque convergono tutti nell'affermare un ruolo negativo della cortactina nel decorso della leucemia linfatica cronica suggerendo un suo coinvolgimento nella patogenesi della LLC-B.

BIBLIOGRAFIA

1. Herrinton LJ. Epidemiology of the Revised European-American Lymphoma Classification subtypes. *Epidemiol Rev.* 1998;20:187-203.
2. Landgren O, Gridley G, Check D, Caporaso NE, Morris Brown L. Acquired immune-related and inflammatory conditions and subsequent chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;139:791-798.
3. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellekjaer L, Gridley G, Goldin LR, Engels EA. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007;109:2198-2201.
4. Boggs DR, Chen SC, Zhang ZN, Zhang A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am J Hematol.* 1987;25:349-354.
5. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351:893-901.
6. Wiernik PH, Ashwin M, Hu XP, Paietta E, Brown K. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;113:407-414.
7. Barcellini W, Capalbo S, Agostinelli RM, Mauro FR, Ambrosetti A, Calori R, Cortelezzi A, Laurenti L, Pogliani EM, Pedotti P, Liso V, Girelli G, Mandelli F, Zanella A. Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2006;91:1689-1692.
8. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Dohner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai K. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107:859-861.
9. Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De Rossi A. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia.* 2007;21:965-972.
10. Landgren O, Pfeiffer RM, Stewart L, Gridley G, Mellekjaer L, Hemminki K, Goldin LR, Travis LB. Risk of second malignant neoplasms among lymphoma patients with a family history of cancer. *Int J Cancer.* 2007;120:1099-1102.
11. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87:4990-4997.

12. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, Caruso R, Giannarelli D, Monarca B, Romani C, Baroni CD, Mandelli F. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica*. 1994;79:334-341.
13. Dreger P, Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:985-992.
14. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia: a clinicopathological reappraisal. *Blood Cells*. 1987;12:339-353.
15. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88:4259-4264.
16. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847.
17. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002;100:1177-1184.
18. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*. 2000;79:157-173.
19. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:181-186.
20. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639-1647.
21. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes,

inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101:4944-4951.

22. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:1764-1775.

23. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, Maravelaki S, Owusu-Ankomah K, Swansbury J, A'Hern R, Brito-Babapulle V, Catovsky D. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2005;104:2124-2132.

24. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.

25. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, Flinn IW, Tallman MS, Appelbaum FR, Larson RA, Paietta E, Jelinek DF, Gribben JG, Byrd JC. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007;25:799-804.

26. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1410-1416.

27. Ricca I, Rocci A, Drandi D, Francese R, Compagno M, Lobetti Bodoni C, De Marco F, Astolfi M, Monitillo L, Vallet S, Calvi R, Ficara F, Omede P, Rosato R, Gallamini A, Marinone C, Bergui L, Boccadoro M, Tarella C, Ladetto M. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2007;21:697-705.

28. Ward BP, Tsongalis GJ, Kaur P. MicroRNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Exp Mol Pathol*.

29. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338:1506-1514.

30. Jaksic B, Brugiatielli M, Krc I, Losonczi H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kusec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international

multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer*. 1997;79:2107-2114.

31. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92:1165-1171.

32. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1750-1757.

33. Dillman RO, Mick R, McIntyre OR. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *J Clin Oncol*. 1989;7:433-438.

34. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001;98:2319-2325.

35. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Blasinska-Morawiec M, Krykowski E, Dmoszynska A, Mrugala-Spiewak H, Skotnicki AB, Nowak W, Konopka L, Ceglarek B, Maj S, Dwilewicz-Trojaczek J, Hellmann A, Urasinski I, Zdziarska B, Kotlarek-Haus S, Potoczek S, Grieb P. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood*. 2000;96:2723-2729.

36. Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3580-3589.

37. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Paietta EM, Hussein MA, Appelbaum FR, Larson RA, Moore DF, Jr., Tallman MS. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007;25:793-798.

38. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm*. 1997;12:177-186.

39. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2001;7:709-723.

40. Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lerner S, Albitar M, Kantarjian H, Keating M. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:4070-4078.
41. Keating JF, Werier J, Blachut P, Broekhuysen H, Meek RN, O'Brien PJ. Early fixation of the vertically unstable pelvis: the role of iliosacral screw fixation of the posterior lesion. *J Orthop Trauma*. 1999;13:107-113.
42. Montillo M, Cafo AM, Tedeschi A, Brando B, Oreste P, Veronese S, Rossi V, Cairoli R, Pungolino E, Morra E. Safety and efficacy of subcutaneous Campath-1H for treating residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia responding to fludarabine. *Haematologica*. 2002;87:695-700; discussion 700.
43. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med*. 2002;347:452-453.
44. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Bociek RG, Pavletic S, Rai KR. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2007;25:1114-1120.
45. Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Martino R, Nomdedeu J, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Sierra J, Montserrat E. Allogeneic stem-cell transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:3433-3438.
46. Kitamura D, Kaneko H, Miyagoe Y, Ariyasu T, Watanabe T. Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:9367-9379.
47. Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:673-682.
48. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia*. 1995;9:1227-1232.
49. Cragg MS, Chan HT, Fox MD, Tutt A, Smith A, Oscier DG, Hamblin TJ, Glennie MJ. The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood*. 2002;100:3068-3076.
50. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. Chronic

lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest.* 2005;115:369-378.

51. Trentin L, Frasson M, Donella-Deana A, Frezzato F, Pagano MA, Tibaldi E, Gattazzo C, Zambello R, Semenzato G, Brunati AM. Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;112:4665-4674.

52. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol.* 2002;32:1403-1413.

53. Trentin L, Agostini C, Facco M, Piazza F, Perin A, Siviero M, Gurrieri C, Galvan S, Adami F, Zambello R, Semenzato G. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest.* 1999;104:115-121.

54. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood.* 2006;107:3584-3592.

55. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood.* 2006;108:3143-3151.

56. Zhan X, Haudenschild CC, Ni Y, Smith E, Huang C. Upregulation of cortactin expression during the maturation of megakaryocytes. *Blood.* 1997;89:457-464.

57. Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775:263-273.

58. Shvetsov A, Berkane E, Chereau D, Dominguez R, Reisler E. The actin-binding domain of cortactin is dynamic and unstructured and affects lateral and longitudinal contacts in F-actin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009;66:90-98.

59. van Rossum AG, de Graaf JH, Schuuring-Scholtes E, Kluin PM, Fan YX, Zhan X, Moolenaar WH, Schuuring E. Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration. *J Biol Chem.* 2003;278:45672-45679.

60. Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:25770-25776.
61. Head JA, Jiang D, Li M, Zorn LJ, Schaefer EM, Parsons JT, Weed SA. Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2003;14:3216-3229.
62. Fontenay-Roupie M, Huret G, Loza JP, Adda R, Melle J, Maclouf J, Dreyfus F, Levy-Toledano S. Thrombopoietin activates human platelets and induces tyrosine phosphorylation of p80/85 cortactin. *Thromb Haemost.* 1998;79:195-201.
63. Campbell DH, Sutherland RL, Daly RJ. Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res.* 1999;59:5376-5385.
64. Vidal C, Geny B, Melle J, Jandrot-Perrus M, Fontenay-Roupie M. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood.* 2002;100:4462-4469.
65. Weaver AM. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett.* 2008;265:157-166.
66. Luo C, Pan H, Mines M, Watson K, Zhang J, Fan GH. CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 2006;281:30081-30093.
67. Brookes S, Lammie GA, Schuuring E, de Boer C, Michalides R, Dickson C, Peters G. Amplified region of chromosome band 11q13 in breast and squamous cell carcinomas encompasses three CpG islands telomeric of FGF3, including the expressed gene EMS1. *Genes Chromosomes Cancer.* 1993;6:222-231.
68. Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, Durkin ME, Popescu NC. Amplification and overexpression of the EMS 1 oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn.* 2003;5:48-53.
69. Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suarez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3177-3182.
70. Hsu NY, Yeh KT, Chiang IP, Pai LY, Chen CY, Ho HC. Cortactin overexpression in the esophageal squamous cell carcinoma and its involvement in the carcinogenesis. *Dis Esophagus.* 2008;21:402-408.
71. Clark ES, Brown B, Whigham AS, Kochaishvili A, Yarbrough WG, Weaver AM. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression

levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene*. 2009;28:431-444.

72. Desmarais V, Yamaguchi H, Oser M, Soon L, Mouneimne G, Sarmiento C, Eddy R, Condeelis J. N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66:303-316.

73. Clark ES, Weaver AM. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol*. 2008;87:581-590.

74. Cantarelli VV, Takahashi A, Akeda Y, Nagayama K, Honda T. Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect Immun*. 2000;68:382-386.

75. Selbach M, Backert S. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol*. 2005;13:181-189.

76. Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990;4:447-456.

77. Barretina J, Junca J, Llano A, Gutierrez A, Flores A, Blanco J, Clotet B, Este JA. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Ann Hematol*. 2003;82:500-505.