

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA

**"SIGNIFICATO CLINICO DELL'ESPRESSIONE DELLA
PROTEINA ZAP-70 NELLE LEUCEMIE LINFATICHE
CRONICHE"**

Relatore

Prof. Sergio Amadori

Dottoranda

Irene Pasqua

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

Introduzione.....	pag. 2
L'apoptosi.....	pag.17
Ruolo delle citochine nell'apoptosi.....	pag.21
Dosaggio dell'Annessina V nel processo apoptotico.....	pag.23
Materiali e Metodi	pag.24
Risultati.....	pag.31
Discussione	pag.34
Conclusioni.....	pag.39
Bibliografia	pag.40

INTRODUZIONE

La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B) è la forma di leucemia più diffusa nei paesi occidentali, annualmente negli Stati Uniti si hanno 8100 nuovi casi e 4800 decessi; è caratterizzata dall'accumulo di cellule B monoclonali CD5⁺ che hanno l'aspetto di piccoli linfociti maturi. L'incidenza è maggiore nel sesso maschile, con un'età media di diagnosi di 65 anni. Il decorso clinico è estremamente variabile, con una sopravvivenza che oscilla tra uno e dieci anni. Alcuni pazienti sono asintomatici o presentano sintomi lievi, altri sviluppano rapidamente linfocitosi, anemia ed epatosplenomegalia, sintomi associati agli stadi più gravi della malattia, secondo la classificazione di Rai e Binet.⁴¹⁻⁴²⁻³⁻⁴

La patologia è causata da un progressivo accumulo nel sangue periferico e nel midollo osseo di piccoli linfociti B. L'origine cellulare della LLC ed i meccanismi che sottendono al suo sviluppo sono ancora in parte sconosciuti.

41.Montserrat, E., Vinolas, N., Reverter, J.C., Rozman, C. Natural History of chronic lymphocytic leukaemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1988, 30, 359-361.

42.Kay, N.E., Hamblin, T.J., Jelinek, D.F., Dewald, G.W., Byrd, J.C., Farag, S., Lucas, M., Lin, T., Chronic lymphocytic Leukemia. *Hematol.*, 2002, 193-213.

3.Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*,1975,46, 219-234.

4.Binet J.L., Auquier A. Dighiero G. et al., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer*, 1981, 48,198-206.

La tradizionale visione della LLC come malattia da accumulo di piccoli linfociti B maturi che si trovano nella fase G₀/G₁ del ciclo cellulare, CD5⁺ immunologicamente incompetenti e con prolungata sopravvivenza dovuta a inibizione dell'apoptosi, è stata rimessa in discussione da numerose recenti scoperte.

Le cellule di LLC mostrano il profilo fenotipico dei linfociti B memoria, attivati tramite l'interazione con l'antigene. Tali linfociti sono frequentemente autoreattivi e orientati alla produzione di autoanticorpi naturali polireattivi.¹⁵ Nonostante la LLC presenti un fenotipo immunologico unico e distintivo (CD5⁺, CD23⁺, immunoglobuline di superficie positive a bassa intensità), tale patologia si presenta eterogenea a livello biologico. L'eterogeneità biologica spesso si traduce in notevoli differenze cliniche in quanto alcuni pazienti presentano una malattia aggressiva ed una prognosi sfavorevole, mentre altri mostrano un comportamento clinico indolente con una normale aspettativa di vita. Differenti dati di letteratura suggeriscono un modello a tre stadi per lo sviluppo e la storia naturale della LLC. Nel primo stadio anomalie genetiche ancora non note portano alla formazione della cellula originaria clonale trasformata, la cui progenie non va in apoptosi e va in progressione attraverso favorevoli interazioni con il microambiente (stadio 2). Con il passare del tempo, l'accumulo di più numerose e pericolose anomalie genetiche favorisce la crescita di cellule neoplastiche che diventano autonome dall'influenza del microambiente (stadio 3).

15. Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, J Clin Oncol, 1999, 17, 399-408.

La trasformazione nella sindrome di Richter della LLC è il prototipo estremo dello stadio 3 e la trasformazione prolinfocitoide è l'esempio più comune di progressione dal secondo al terzo stadio. Quindi uno degli obiettivi più importanti della ricerca clinica è senz'altro quello di correlare l'andamento clinico eterogeneo con le differenti caratteristiche biologiche.

I linfociti leucemici sono scarsamente proliferanti, funzionalmente incompetenti, con prolungata sopravvivenza (anche di anni) in circolo. Quest'ultima caratteristica è legata ad un'inibizione della morte cellulare programmata (apoptosi) dovuta all'aumentata espressione della proteina del gene *bcl-2*. Infatti, nonostante l'esiguo numero di pazienti (10%) che presentano un *bcl-2* riarrangiato, nella maggior parte di essi i linfociti leucemici esprimono livelli elevati della proteina *bcl-2*. Le cellule leucemiche esprimono anche elevati livelli di un'altra proteina anti-apoptotica, BCL-xL, ma anche della proteina pro-apoptotica Bax. L'aumentata espressione della proteina *bcl-2* è un indicatore di prognosi sfavorevole ed è stata associata ad una ridotta sopravvivenza dei pazienti con LLC.²⁶

Mutazioni del gene oncosoppressore *p53* sono stati trovati nel 10-47% dei pazienti con LLC alla diagnosi. Le mutazioni di *p53* si associano in genere alla trasformazione della LLC in forme a prolinfociti, ad una scarsa risposta alla chemioterapia ed a una resistenza alla terapia con analoghi purinici e ad una ridotta sopravvivenza dei pazienti.

26. Robertson L.E., Plunkett W., McConnell K., et al., Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome, *Leukemia*, 1996, 10, 456-459.

L'iperespressione della proteina p53, analizzata con l'immunocitochimica, è stata correlata con le mutazioni del gene p53, con la malattia progressiva e con la ridotta sopravvivenza. Tutti i pazienti con una disfunzione della proteina p53 hanno anche i geni IgV_H non mutati.⁴⁴ In un nostro studio recente,²⁷ abbiamo dimostrato che elevati livelli della proteina p53 riscontrati nel plasma dei pazienti erano correlati sia ad una ridotta sopravvivenza libera da progressione che ad una ridotta sopravvivenza globale.

Il miglioramento delle tecniche di coltura e l'uso di mitogeni policlonali per la linea linfoide B ha consentito di dimostrare alterazioni del cariotipo non random in almeno il 50% dei casi. Utilizzando la tecnica di ibridazione fluorescente in situ (FISH), anomalie cromosomiche sono state diagnosticate nell'82% dei casi.⁵ Le alterazioni più comuni sono risultate la trisomia del 12 (10-15% dei casi) e la delezione di 13q a livello della banda q14 in prossimità del gene oncosoppressore Rb (20%). La maggior parte dei casi di trisomia 12 e delle delezioni (13)(q14) non sono rilevabili all'esame citogenetico classico, ma con l'uso di sonde molecolari per la regione 13q14 sono state svelate nel 46% e nel 45-55% dei casi di LLC, rispettivamente. Sempre usando la tecnica FISH, delezioni di 11q sono state trovate nel 17-20% dei pazienti e delezioni di 17p nel 7-10%.

44.Lin, K., Sherrington, P.D., Dennis, M., Matrai, Z., Cawley, J.C., Pettit, A.R. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV_H mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, 100:1404-1409.

27.Del Principe M.I., Del Poeta G., Venditti A., et al., Clinical significance of soluble p53 protein in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica*, 2004, 89,1468-1475.

5.Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*.2000, 343,1910-1916.

Le anomalie del cariotipo diventano più frequenti con il trascorrere del tempo. I geni coinvolti in queste aberrazioni non sono del tutto chiariti.

Due geni micro-RNA a livello 13q14, miR15 e miR16, sono assenti e down-regolati nella maggior parte dei casi di LLC, ma il loro effetto è ancora oscuro.²⁸ Per la trisomia 12 non si hanno dati certi sul gene coinvolto, mentre i geni coinvolti sui cromosomi 11 e 17 sono ATM e p53 rispettivamente, entrambi impegnati nei meccanismi di riparazione dei geni. La delezione 13q14 è associata ad una sopravvivenza superiore alla media, ma questo è vero solo se è una lesione unica. Naturalmente, per confermare tale dato bisogna effettuare un cariotipo completo che non è alla portata di tutti i laboratori ematologici in quanto è un tecnica di difficile esecuzione. La trisomia 12 è associata ad una morfologia atipica, in particolare LLC/LPL (leucemia prolinfocitica). La sopravvivenza di tali pazienti è quella media dei pazienti con LLC e dipende dallo stato mutazionale. La delezione 11q23 è spesso presente in pazienti giovani con linfadenopatie “bulky” (masse linfonodali >5-6 cm in diametro) e in molti studi è probante per una prognosi infausta. Tale delezione è presente in pazienti sia con geni VH mutati che non mutati. Infine la delezione 17p13 rivela la presenza di un gene p53 deleto o mutato ed è associata ad una prognosi sfavorevole con una sopravvivenza mediana inferiore a 3 anni. Tali casi sono frequentemente resistenti alle terapie e spesso rispondono all’anticorpo monoclonale anti-CD52.

28.Calin G.A., Liu C.G., Shimizu M., et al., MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-cell chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101,11755-11760.

Infine esistono altre rare anomalie cromosomiche che non hanno ancora significato prognostico definito. Le delezioni di 6q21 sono le più comuni tra queste. In genere esse sono lesioni secondarie all'interno di un gruppo a prognosi sfavorevole, ma non mostrano un valore prognostico indipendente in analisi multivariata. Di significato incerto sono le doppie e triple trisomie che coinvolgono i cromosomi 12, 16, 18 e 19.

A livello molecolare, possono essere distinti due sottotipi di LLC in base alla presenza di mutazioni somatiche nelle regioni variabili dei geni (IgV_H) delle immunoglobuline⁷. La prognosi dei pazienti nei due sottogruppi è significativamente differente: il sottogruppo con geni IgV_H non mutati presenta la prognosi peggiore.⁴³ Inoltre, l'espressione della molecola ZAP-70, una chinasi che ha in comune funzioni di segnale sia con la chinasi spleen tyrosine (Syk) che con CD38, anch'essa molecola di segnale che influenza l'esito della stimolazione del recettore della cellula B (BCR), caratterizza l'eterogeneità biologica di LLC e mostra significato prognostico: la negatività per CD38 e ZAP-70 identifica pazienti con una migliore prognosi⁷⁻⁹.

ZAP-70 fu identificato come il gene meglio in grado di distinguere i due sottogruppi. ZAP-70 (proteina associata alla catena zeta CD3 del T cell receptor con un peso molecolare di 70 kD) è una molecola utilizzata per trasmettere un segnale dal T-cell receptor alle vie a valle.

7.Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al., IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*,1999, 94,1840-1847.

43.Stevenson, F.K., Caligaris-Cappio, F. Chronic Lymphocytic leukaemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 2004,103: 4389-4395.

9.Crespo M., Bosch F., Villamor N., et al., ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2003, 348, 1764-1775.

Normalmente non è utilizzato nelle cellule B, in cui la molecola recettrice del segnale è Syk, ma in alcuni casi di LLC con geni VH non mutati, ZAP-70 sembra essere coinvolto nella trasmissione del segnale.

Anticorpi contro ZAP-70 sono disponibili e parecchi metodi sono stati approntati. L'immunoistochimica è facile ed efficace, ma soltanto semi-quantitativa; il Western-blot richiede la deplezione dei linfociti T, che ne limita l'uso. I tests in citometria a flusso sono risultati difficoltosi, poiché ZAP-70 è un antigene intracellulare cosicché le cellule devono essere permeabilizzate e i primi anticorpi utilizzati erano non coniugati come ad esempio il clone 2F3.2 (Upstate).⁹⁻¹⁰ La disponibilità odierna di anticorpi direttamente coniugati con nuovi fluorocromi più brillanti quali ALEXA 488 (clone 1E7.2 della ditta Caltag Laboratories) ha permesso di isolare pazienti ZAP-70 positivi e VH mutati con peggiore sopravvivenza rispetto a pazienti ZAP-70 negativi e VH non mutati, attribuendo a tale marcatore una forte valenza prognostica.⁸

8.Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., et al., ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2004, 351, 893-901.

9.Crespo M., Bosch F., Villamor N., et al., ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2003, 348, 1764-1775.

10.Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C., Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia : analysis of its prognostic significance, *Br J Haematol*, 1986, 62, 567-575.

Gli eventi primari della trasformazione neoplastica sono sconosciuti. Anche se le cellule della LLC possono presentare molte aberrazioni genomiche specialmente nelle fasi avanzate della malattia,⁵ non è stata ancora identificata una anomalia molecolare o citogenetica specifica della LLC.

Del tutto recentemente tre approcci completamente diversi sono stati sviluppati per tentare di chiarire questi aspetti.

Il primo riguarda un modello di topo transgenico in cui una linea esprime il gene umano TCL1 sotto il controllo di un “promoter” VH per IgH-E α permetteva di orientare l’espressione transgenica verso cellule B mature ed immature.¹⁶ All’età di 10-18 mesi questi animali transgenici si ammalavano. Le analisi, patologica e citofluorimetrica, dimostravano che gli animali transgenici avevano sviluppato una malattia molto simile alla LLC umana. Un altro promettente campo di studio riguarda l’identificazione recente della classe di geni micro RNA (miRNA), una vasta famiglia di geni, non codificanti, altamente conservati probabilmente coinvolti in processi di regolazione genica specifica la cui precisa funzione è sconosciuta. Tra di essi mir-15a e mir-16-1 sembrano giocare un ruolo nella patogenesi della LLC.¹⁷

5.Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med.*2000, 343,1910-1916.

16.Bichi R., Shinton S.A., Martin E.S., et al., Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 6955-6960.

17.Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99,15524-15529.

Infine l'esistenza di linfociti B monoclonali CD5⁺, con un fenotipo simile a quello della LLC è stato osservato nel sangue di adulti sani ed è stata riscontrata con aumentata frequenza tra i parenti dei pazienti con LLC.¹⁸

Queste cellule, simili a quelle della LLC, potrebbero semplicemente rappresentare un epifenomeno della senescenza dei linfociti e/o rappresentare l'equivalente per la LLC della patologia MGUS del mieloma multiplo.

Probabilmente il primo evento trasformante avviene in una cellula progenitrice linfoide che poi si differenzia in una cellula B matura con un B-cell receptor (BCR) funzionale. Inoltre le cellule di LLC presentano un utilizzo preferenziale di alcuni geni delle regioni variabili delle immunoglobuline (IgV_H).

V1-69, V3-07, V3-23 e V4-34 sono quelli usati più frequentemente. Recentemente l'analisi della regione 3, determinante la complementarità della catena pesante delle immunoglobuline, ha dimostrato la presenza di sequenze fortemente simili se non addirittura identiche in pazienti differenti e non correlati.¹⁹ Questa scoperta era anche associata con un utilizzo preferenziale della catena leggera (L) e simile LCD3.

18.Ghia P., Prato G., Scielzo C., et al., Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*.2004; 103:2337-2342.

19.Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M., Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005,352, 804-815.

Tenendo conto del fatto che sia L che HCDR3 partecipano al sito di legame con l'antigene, tali osservazioni, associate alla presenza di mutazioni somatiche IgV_H forniscono importante evidenza che i BCR espressi dalle cellule B siano altamente selezionati – probabilmente da uno stimolo antigenico - sollevando la possibilità che un antigene possa essere coinvolto nella patogenesi della malattia.

L'evidenza per una suscettibilità genetica della LLC è notevole e deriva dalla sua disparità etnica (la LLC è rara in Oriente ed è molto rara in Giappone) che non è modificata da elementi ambientali. Inoltre, esiste una predisposizione familiare documentata che indica un rischio tre volte maggiore, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare LLC nei parenti di primo grado dei pazienti con LLC.

Se la presenza di mutazioni somatiche indica un ruolo potenziale per l'attivazione di BCR in qualche punto della storia naturale dei pazienti con LLC mutate anche la capacità delle LLC non mutate di ricevere segnali di stimolo tramite BCR è documentata da parecchie evidenze sperimentali. L'espressione di ZAP-70 è associata con lo stato non mutato delle IgV_H, con l' mRNA indotto dall'attivazione della citidina deaminasi, enzima richiesto per la mutazione somatica e lo switching isotipico, e che è up-regolato nelle LLC non mutate; l'antigene CD38 tende ad essere più rappresentato nelle LLC non mutate.⁷

7.Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al., IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, Blood,1999, 94,1840-1847.

Quindi, l'abilità in vitro delle LLC a rispondere ai segnali mediati da BCR, come quelli forniti dal legame delle IgM di superficie, è associata allo stato mutazionale, all'espressione di CD38 ed è direttamente correlata all'espressione di ZAP-70.²⁰

Al contrario, le LLC mutate sono tipicamente non responsive alla stimolazione di BCR in vitro, simili alle cellule B che hanno subito desensibilizzazione del recettore, in seguito a stimolazione cronica da parte dell'antigene. In conclusione, le LLC non mutate sembrano presentare un BCR più competente, in quanto sono capaci di ricevere segnali di mantenimento o proliferazione, mentre le LLC mutate sono anergiche.

Inoltre, mentre tutte le cellule circolanti di LLC sono nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, lo studio della lunghezza dei telomeri e dell'attività telomerasica indica che un considerevole numero di divisioni cellulari avviene all'interno del clone leucemico.²¹

Recenti misurazioni in vivo dell'attività proliferativa del clone leucemico ha dimostrato che le cellule leucemiche nei tessuti sono marcatamente dinamiche e che non è improbabile che in alcuni casi ci sia una significativa attività proliferativa ed attività apoptotica.²²

20.Chen L., Apgar J., Huynh L., et al., ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2005, 105, 2036-2041.

21.Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, *Blood*, 2004, 103, 375-382.

22.Messmer B.T., Messmer D., Allen SL, et al., In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, *J Clin Invest*, 2005, PMID, 1571-1642.

Anche se la gran parte delle cellule di LLC sono quiescenti, prolinfociti e paraimmunoblasti proliferanti possono essere identificati in tutti i pazienti come aggregati focali (centri di proliferazione-PC) nei linfonodi e nel midollo osseo.

Queste cellule costituiscono la riserva proliferante della malattia che rifornisce il compartimento di accumulo ed è plausibile credere che l'equilibrio tra i due compartimenti controlli l'evoluzione della malattia (stabile vs a lenta crescita vs aggressiva). Le cellule proliferanti all'interno dei PC differiscono dalle cellule leucemiche quiescenti per l'espressione di parecchie molecole, tra cui la survivina regolante l'apoptosi, alcune chemochine (CCL-17 e CCL-22) e geni correlati alla proliferazione quali Ki67.

Infine, i linfociti T, soprattutto CD40L+ e quindi attivati, le cellule CD4+ e una varietà di cellule stromali sembrano avere un ruolo centrale nell'amplificare un microambiente capace sia di favorire la proliferazione all'interno dei PC dei tessuti che di inibire l'apoptosi delle cellule leucemiche all'interno del compartimento di accumulo.

Non è esagerato dire che la scoperta del significato dello stato mutazionale dei geni delle regioni variabili delle immunoglobuline (IgVH) ha rivoluzionato lo studio delle LLC.

La molecola delle Ig è codificata da parecchi geni ed è assemblata in modo tale che ogni B linfocita è diverso dagli altri. Ogni agente patogeno potenziale ha un suo linfocita partner che aspetta di incontrarlo. L'atto finale della risposta immune ha luogo nel centro germinativo dopo che l'antigene ha incontrato l'anticorpo. Sebbene la LLC sia stata classificata come una

malattia della cellula naive, pre-centro germinativo, casi con geni IgVH mutati sono ormai riconosciuti. Nei due articoli pubblicati contemporaneamente nel 1999, gli Autori ^{7,23} riscontrarono che i pazienti con geni IgVH mutati avevano una sopravvivenza media di 25 anni e invece quelli con geni IgVH non mutati sopravvivevano solo per 8 anni. Questo risultato è stato da allora confermato da parecchi altri gruppi. In seguito, per convenzione fu stabilito che i pazienti con meno del 2% di mutazioni somatiche dovevano essere annoverati tra i casi non mutati e questo perché un piccolo numero di mutazioni potrebbero rappresentare polimorfismi. In seguito paragonando le sequenze geniche delle cellule di LLC con il DNA genomico, si è visto che queste piccole variazioni non sono polimorfismi ma vere mutazioni. Sebbene l'omologia >98% sia la convenzione generalmente accettata per il sottogruppo non mutato, alcuni gruppi hanno scelto 97% o anche 95% come miglior punto di cut-off.²⁴ Infine, poiché l'analisi dello stato mutazionale è spesso di esecuzione complessa nei laboratori ematologici di routine, sono stati proposti come surrogati altri tests quali la determinazione dell'antigene CD38 e quella della proteina ZAP-70 (zeta associated protein con un peso molecolare di 70 kD).

7.Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al., IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*,1999, 94,1840-1847.

23.Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., et al., Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1999, 94,1848-1854.

24.Hamblin T.J., Orchard J.A., Davies Z.A., et al., How many somatic mutations should we allow in chronic lymphocytic leukemia with unmutated IgVH genes ? *Blood*, 2004,104, 219a.

L'espressione di CD38, molecola presente sulla membrana citoplasmatica dei linfociti B e correlata sostanzialmente ad uno stato di attivazione, può essere facilmente determinata utilizzando la citometria a flusso, e, se presente, identifica i pazienti con LLC a maggior rischio di progressione e con ridotta sopravvivenza.¹⁴ In ogni caso CD38 presenta risultati discordanti rispetto allo stato mutazionale in circa il 30% dei casi. Inoltre, la sua espressione può variare nel corso della malattia in circa un quarto dei casi.

Una volta che lo stato mutazionale dei geni delle IgVH hanno così separato la LLC-B in due sottogruppi, la domanda da porsi era se la LLC-B era una o due malattie. E' stato²⁵ riportato che la LLC-B ha un profilo di espressione genica determinato con i microarrays distinto rispetto alle altre malattie linfoproliferative croniche, ma i due sottotipi mutato e non mutato di LLC sono differenti nell'espressione di un piccolo numero di geni.

In una serie numerosa di pazienti, Rassenti e altri¹⁷ hanno dimostrato che una espressione aumentata di ZAP- 70 predice in modo più significativo la necessità di un trattamento rispetto alla presenza di uno stato mutazionale non mutato; per di più l'espressione di ZAP- 70 si mantiene costante nel tempo.

14.Del Poeta G., Maurillo L., Venditti A., et al., Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2001, 98, 2633-2639.

17.Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99,15524-15529.

25.Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., et al., Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin gene expression genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia, *J Exp Med*, 2001,194,1639-1647.

In questo studio ZAP-70,CD38, marcatore solubile sCD23, lo stato mutazionale e le aberrazioni genomiche sono stati studiati in una serie numerosa di pazienti con LLC-B in relazione agli altri parametri di laboratorio e all'informazione clinica.

In particolare noi abbiamo sviluppato un nuovo test citofluorimetrico per la determinazione della proteina ZAP-70; abbiamo determinato l'impatto prognostico di ZAP-70,CD38,di CD23 solubile, dello stato mutazionale e dei sottogruppi citogenetici.

Inoltre, abbiamo tentato di identificare nuovi sottogruppi diagnostici combinando l'analisi di ZAP-70 e CD38 o di ZAP-70 con lo stato mutazionale.

Infine abbiamo tentato di valutare se ZAP-70 poteva sostituire l'analisi dello stato mutazionale per la prognosi.

L'APOPTOSI

L'apoptosi è un processo fisiologico con un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi tissutale; morfologicamente è caratterizzata dalla diminuzione del volume cellulare, dalla perdita delle specializzazioni di membrana, dalla condensazione del nucleo, dalla frammentazione e degradazione del DNA. La cromatina degradata si compatta in granuli che si spostano verso la periferia del nucleo ed, insieme ad altri frammenti di materiale nucleare, raggiungono la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa, fornendo alla cellula un aspetto simile a bolle (blebbing), che successivamente si staccano e vengono fagocitate dai macrofagi. La morte cellulare programmata costituisce un sistema per rimuovere le cellule

invecchiate o danneggiate ed è regolata dall'interazione di proteine che promuovono e inibiscono tale processo.

Gli aspetti morfologici dell'apoptosi sono il risultato di azioni biochimiche effettuate direttamente o indirettamente su strutture cellulari diverse (DNA, membrana plasmatica, membrana nucleare) da cistein-proteasi denominate caspasi. Le caspasi sono classificate in iniziatrici ed effettrici: sono tutte sintetizzate come zimogeni e per essere attivate necessitano di un taglio proteolitico, in conseguenza del fatto dimerizzano ed espongono i siti attivi. Sono le caspasi iniziatrici che, attivando le effettrici, portano la cellula in apoptosi.⁴⁵ La caspasi effettrice generalmente coinvolta è la caspasi 3. All'attivazione di questa si giunge attraverso due vie che vanno sotto il nome di via estrinseca e via intrinseca.

La via estrinseca dipende da fattori esterni che operano attraverso recettori situati sulla membrana plasmatica, noti come superfamiglia dei recettori di morte cellulare: FAS/CD95 e TNF-R1. Il ligando FAS/CD95 (CD95-L) è un omotrimerico che interagisce con tre molecole di CD95 a formare un trimero recettoriale attivo che cambiando di forma interagisce con la proteina FAS che a sua volta espone il dominio effettore della pro-caspasi-8, attivandola a caspasi 8. A sua volta la caspasi 8 attiva per proteolisi la caspasi 3 che agisce su specifici substrati. Uno di questi substrati è l'enzima desossiribonucleasi caspasi-dipendente (CAD) che si trova nel citosol legato ad un inibitore (c-FLIP).

45.Meinhardt, G., Wendtner, C.M., Hallek, M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. Hematol.,1999, 77: 282-293.

La caspasi 3 stacca l'inibitore, rilascia la nucleasi che trasloca nel nucleo e inizia la degradazione dei nucleosomi, portando alla frammentazione del DNA.

La via intrinseca è attivata da varie forme di stress cellulare, che comprendono danni al DNA, le radiazioni U.V., gli agenti citotossici o la privazione di citochine e di fattori di crescita. Il ruolo chiave è svolto dalle proteine della famiglia Bcl-2, divise in due gruppi sulla base dei domini che contengono. Il primo gruppo comprende le proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1 e Bag-1, localizzate sulla membrana mitocondriale e atte a promuovere la sopravvivenza cellulare. Come già precedentemente riportato, i linfociti di pazienti affetti da LLC-B presentano elevati livelli di Bcl-2 anche in assenza di traslocazione t(14,18). La causa della sovraespressione di Bcl-2 potrebbe essere almeno in parte dovuta ad una completa demetilazione di entrambe le copie del gene BCL-2; infatti, ipometilazione di un gene conduce alla sovraregolazione della sua espressione.⁴⁵ Non sempre, tuttavia, i livelli di Bcl-2 sono correlati con lo stato di mutazione del gene, in quanto sembrano coinvolti meccanismi aggiuntivi. Alcuni studiosi hanno osservato che l'eliminazione del gene BCL-2 iperespresso comporta una rapida riduzione del numero delle cellule leucemiche, inducendo apoptosi e prolungando la sopravvivenza dei pazienti, a conferma del fatto che BCL-2 può rappresentare un target specifico per la terapia tumorale.

45. Meinhardt, G., Wendtner, C.M., Hallek, M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. Hematol., 1999, 77: 282-293.

Il secondo comprende le proteine pro-apoptotiche con tre domini Bak e Bax e quelle con un solo dominio BH3 come Bad, Bid, Bik e Bim. Le proteine pro-apoptotiche agiscono inducendo la formazione di pori sulla membrana mitocondriale, che alterando la permeabilità, permettono il rilascio del citocromo-c. Quest'ultimo insieme alla molecola adattatore Apaf-1 e alla procaspasi-9, in presenza di ATP, forma un complesso chiamato apoptosoma. Questo complesso attiva per proteolisi la pro-caspasi 9 a caspasi 9 che dà inizio alla cascata delle caspasi e infine all'apoptosi.

La cooperazione tra proteine pro-apoptotiche, oltre al rilascio del citocromo-c, promuove la liberazione di ulteriori fattori apoptogeni: Apoptosis Inducine Factor (AIF) e Smac/DIABLO. La via più importante di rilascio di AIF parte dall'attivazione dell'enzima poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP-1), che funziona come "guardiano del genoma", perché riconosce il DNA danneggiato e scatena gli eventi che distruggono la cellula. In risposta a stress tossici, PARP-1 aumenta considerevolmente; questo aumento scatena il rilascio di AIF dai mitocondri, che a sua volta causa la liberazione di citocromo-c e l'attivazione delle caspasi. Se AIF trasloca nel nucleo induce la condensazione della cromatina, la frammentazione del DNA e l'apoptosi. Smac/DIABLO, invece, ha il compito di bloccare gli Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP), molecole anti-apoptotiche in grado di inibire l'attività delle caspasi.

Esiste una connessione tra la via estrinseca ed intrinseca mediata dalla caspasi 8 che è in grado di interagire con la proteina Bid, una proteina esclusivamente citosolica, che trasloca nei mitocondri e induce il rilascio del citocromo-c.

Sono state studiate altre vie apoptotiche: una via, caspasi 2 dipendente dovuta a danneggiamento del DNA, che porta alla attivazione della pro-caspasi 2; l'altra, caspasi indipendente mediata da granzima A. Trasportato nella cellula attraverso pori prodotti dalle perforine, granzima A innesca una via che porta alla frammentazione del DNA.⁴⁶⁻⁴⁷ La prosecuzione o meno nella via apoptotica dipende dalle proporzioni reciproche delle propeine pro-apoptotiche e anti-apoptotiche.⁴⁸

RUOLO DELLE CITOCINE NELL'APOPTOSI

Le citochine mediano vari tipi di risposte nei linfociti leucemici, contribuendo a regolare la sopravvivenza, la differenziazione e l'apoptosi. Il meccanismo che per esempio determina l'iperespressione di Bcl-2 non è ancora chiaro e molto probabilmente è la conseguenza di uno stimolo proveniente dal microambiente, che interagisce con il clone linfocitario attraverso processi mediati dalle citochine.

Numerosi studi hanno dimostrato che diverse citochine possono essere prodotte dal clone leucemico stesso o anche da altre cellule del sistema immunitario. *L'Interleuchina 8* (IL-8), ad esempio, agisce per via autocrina e incrementa la resistenza all'apoptosi attraverso la via Bcl-2-dipendente. IL-6 ha un'azione anti-apoptotica senza, tuttavia, interferire con l'espressione di Bcl-2 o di Bax.

46. Pontieri, G.M., Russo, M.A., Frati, L. *Patologia Generale III Edizione*, Ed Piccin, Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova.

47. Orrenius, S., Zhivotosky, B., Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4: 552-565.

48. Letai, A., Sorcinelli, M.D., Beard, C., Korsmeyer, S.J. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell*. 2004, 6: 241-249.

Inoltre, i linfociti leucemici sono capaci di secernere IL-6, i cui livelli aumentano con il progredire della malattia. IL-13, inibisce le risposte proliferative di IL-2 e protegge i linfociti B leucemici dall'apoptosi.

Altre citochine, invece, favorirebbero l'apoptosi: IL-5, la cui espressione può essere inducibile, favorisce l'apoptosi spontanea con un meccanismo dose-dipendente ancora da chiarire, e la sua azione è significativamente ridotta da IL-4. Il ruolo di IL-10 è quello di favorire l'apoptosi nelle cellule leucemiche ed è nota la sua capacità di indurre l'espressione del recettore ad alta affinità per IL-2. IL-4 è capace di impedire la proliferazione delle cellule B leucemiche in seguito a vari stimoli e le protegge sia dall'apoptosi spontanea che indotta da glucocorticoidi. Studi in vitro hanno dimostrato che i linfociti leucemici, in presenza di IL-4, sono resistenti alla somministrazione di idrocortisone ed è stata riscontrata anche l'assenza della tipica frammentazione del DNA. L'azione di IL-4 sui linfociti B in corso di LLC produce l'aumento di espressione di Bcl-2, quindi l'effetto anti-apoptotico è mediato dalla capacità di IL-4 di indurre una sovraespressione di Bcl-2.

Molte citochine sono prodotte dai linfociti T; nella maggior parte dei pazienti, le cellule T costituiscono solo il 2-5% della popolazione linfocitaria, in contrasto con la presenza, in alcuni, di livelli elevati di citochine.⁴⁵⁻⁴⁹

45.Meinhardt, G., Wendtner, C.M., Hallek, M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *Hematol.*,1999, 77: 282-293.

49.Rosi, F., Carlucci, F., Marinello, E. Tommassini, V., Pisano, B., Tabucchi, A. Perdita del controllo apoptotico in corso di leucemia linfatica cronica di tipo B. *Biologi Italiani*. 2006, 7: 26-31.

Questo permette di ipotizzare che la produzione di alcune citochine da parte del clone leucemico e la modalità di azione autocrino/paracrino, siano parte della trasformazione maligna di queste cellule.

DOSAGGIO DELL'ANNESSINA V NEL PROCESSO APOPTOTICO

Mano a mano che il processo apoptotico progredisce, la permeabilità della membrana cellulare aumenta progressivamente. Quello che si verifica è un cambiamento conformazionale della membrana plasmatica e precisamente della sua composizione asimmetrica in fosfolipidi. Il mantenimento di tale asimmetria è un processo energia-dipendente che coinvolge enzimi chiamati flippasi, la cui attività nelle cellule apoptotiche è però bloccata da un altro enzima detto floppasi che – con un meccanismo ‘flip-flop’ – fa passare le molecole di fosfatidilserina (PS) dallo strato interno della membrana a quello esterno. L'esternalizzazione della PS – che avviene nelle prime fasi dell'apoptosi - consente la parallela internalizzazione di un colorante commerciale: questo ‘uptake’ è unidirezionale e porta all'accumulo del colorante all'interno della cellula. Mano a mano che il processo apoptotico prosegue e la cellula si riduce di volume il colorante diventa più concentrato e quindi più visibile. L'incorporazione del colorante continua fino alla fase di blebbing. Uno di questi coloranti commerciali può essere visualizzato con la luce visibile, usando un classico microscopio invertito, e può anche essere quantificato con una fotocamera digitale oppure con un colorimetro per micropiastre. L'Annessina V è una proteina con elevata affinità per la fosfatidilserina (PS) è una struttura di 35-36 kD Ca^{2+} dipendente. Poiché l'esposizione della PS sulla membrana esterna è stata associata all'inizio della fase di esecuzione dell'apoptosi, ben prima che sia possibile vedere la frammentazione del DNA, il saggio con Annessina V è considerato un

metodo di rilevazione più precoce di altri metodi basati sul DNA. La traslocazione di PS sulla superficie cellulare esterna, che si verifica con qualsiasi stimolo iniziale di apoptosi, non avviene unicamente nell'apoptosi ma anche durante la necrosi. La differenza tra queste due forme di morte cellulare consiste nel fatto che nelle fasi iniziali di apoptosi la membrana cellulare rimane intatta mentre nel momento in cui si verifica la necrosi la membrana cellulare perde la sua integrità. Se si procede alla colorazione simultanea della PS di superficie con annessina V marcata con molecole fluorescenti sia FITC che PE e di cellule necrotiche con ioduro di propidio, il saggio consente di distinguere l'apoptosi dalla necrosi in citofluorimetria o microscopia in fluorescenza. Le cellule necrotiche sono facilmente colorate sia con annessina V sia con ioduro di propizio (che invece è escluso dalle cellule normali e da quelle apoptotiche), mentre le cellule apoptotiche sono colorate solo con annessina V ⁵⁰⁻⁵¹.

MATERIALI E METODI

289 pazienti consecutivi e non selezionati, affetti da Leucemia Linfatica Cronica B (LLC-B), sono stati arruolati per questo studio dal 1990 al 2004. Tutti i pazienti rispondevano ai criteri diagnostici per la LLC-B in quanto presentavano immunoglobuline di superficie a debole intensità e positività per gli antigeni CD5 e sCD23. Il campione era costituito da 148 uomini e 141 donne con età media di 65 anni (range 37-84) al tempo della diagnosi.

50.Raynal, P., and Pollard H.B. Annexin: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochim.Biophys. Acta* 1994, 1197:63-93.

51.Vermes, I., Haanen, C., Steffen-Nakken, H., and Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995, 184: 39-51.

Cellule fresche o criopreservate sono state utilizzate per l'analisi di ZAP-70 e CD38. Campioni di siero fresco congelato sono stati utilizzati per l'analisi di sCD23 in 256 pazienti. Tutti i campioni sono stati raccolti in un singolo giorno per ogni singolo paziente e sono stati valutati per la diagnosi o prima della progressione della malattia, o prima del trattamento chemioterapico.

87 pazienti presentavano uno stadio Rai modificato basso, 189 uno stadio intermedio e 13 un alto stadio. 149 pazienti su 289 sono stati sottoposti a chemioterapia. 56 sono stati trattati con clorambucile e cortisone; i rimanenti 93 hanno ricevuto 6 cicli di fludarabina a dosi convenzionali per 5 giorni ogni 28 giorni. 34 pazienti sono deceduti per cause correlate alla LLC-B al tempo dell'analisi.

Analisi immunofenotipica

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati: anti-CD23-PE, anti-CD38-PE, anti-CD19-APC, anti-CD45-FITC, anti-CD14-PE, anti-CD95-PE a anti-CD10-FITC (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA).

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state analizzate in citometria a flusso per l'espressione contemporanea di CD19/CD5/CD38 e CD19/CD5/CD23.²¹

21.Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, *Blood*, 2004, 103, 375-382.

La proteina ZAP-70 e' stata determinata in citometria a flusso. Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state fissate e permeabilizzate con un reagente commerciale Fix e Perm kit (Caltag Laboratories, Burlingame,CA).

Le cellule sono state messe in due provette e incubate la prima con 10 µl di anticorpo isotipico di topo IgG1 coniugato con il colorante Alexa fluor 488; la seconda con 10 µl di anticorpo monoclonale anti-ZAP-70 coniugato con Alexa fluor 488 (clone 1E7.2 isotipo IgG1) per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo due lavaggi con PBS le cellule nella prima provetta sono state trattate con i controlli isotipici di topo IgG1 PerCP, APC, PE mentre le cellule nella seconda provetta erano incubate con 10µl di CD19 PerCP, 10 µl di CD5 APC e 3 µl CD3 PE piu' 3 µl di CD56 PE (Becton Dickinson) per 15 minuti a temperatura ambiente.

Infine i campioni sono stati analizzati con il citofluorimetro a flusso FACS Calibur (Becton Dickinson) con un gate regione di analisi sulla fluorescenza 2 detector di modo che almeno 5000 cellule T e natural killer venissero analizzate per ogni campione.

L'analisi ZAP-70 effettuata con il software CellQuest ¹⁵ e' mostrata nella figura 1A.

La figura 1B mostra i livelli di espressione di ZAP-70 nei linfociti in quattro pazienti con LLC assieme ai livelli di stato mutazionale dei geni IgV_H

15.Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, J Clin Oncol, 1999, 17, 399-408.

Test d immunoenzimatica

Il test immunoenzimatico del antigene CD23 (sCD23) solubile e' stato effettuato con una metodica standard.²¹ La soglia di positività e' stata fissata al valore di sCD23 superiore a 70 U /ml.

FISH in interfase

Test di ibridizzazione separati sono stati effettuati per loci sui cromosomi 11 12 13 e 17. Per i cromosomi 11 (q23,) 13 e 17 sono stati utilizzati probes commerciali (ATM-2,Rb-1, e p53 rispettivamente), (Vysis, London,United Kingdom).

Un probe per il DNA CEP12 legato al colorante SpectrumGreen e' stato utilizzato per visualizzare la aneuploidia del cromosoma 12.

LSIp53, legato al colorante SprectrumOrange (Vysis), e' stato utilizzato per valutare la delezione del cromosoma 17 p13.1.

Noi abbiamo usato linfociti del sangue periferico separati con una centrifugazione per gradiente di densità, trattati con soluzione ipotonica (KCl) e fissati con metanolo-acido acetico.

I vetrini sono stati messi su una piastra a 80° C per venti minuti e disidratati per due minuti con etanolo al 70%, 80% e 100% e infine essiccati all'aria.

21.Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, Blood, 2004, 103, 375-382.

I vetrini sono stati posti su una piastra preriscaldata a 37° C e, ciascuno di essi, è stato incubato con 5 µl di probe in soluzione tamponata. Successivamente i vetrini sono stati sigillati con un coprioggetto e inseriti nella macchina per l'ibridizzazione (Vysis Hybrite machine). La denaturazione è stata effettuata a 68° C per 5 minuti e l'ibridizzazione a 37° C per tutta la notte. I vetrini sono stati lavati con una soluzione 0.4x SSC/0.3%NP-40 per 2 minuti a 71° C e, successivamente, con una soluzione 2 x SSC a temperatura ambiente. Infine i nuclei sono stati contrastati con 4',6' - diamidino-2-phenilindole (DAPI) e i segnali visualizzati con microscopio Olympus BX51.

Sono state esaminate 200 cellule in interfase con spot di fluorescenza ben definiti.

Analisi dello stato mutazionale IgV_H

L'RNA totale fu estratto e retrotrascritto.²² I cDNA risultanti, testati per la sintesi della prima elica²³, sono stati amplificati utilizzando una miscela di primers di appaiamento di senso sia per il V_H 1, attraverso la sequenza leader V_H6, che all'estremità 5' di V_H 1 tramite V_H6 FR1.⁶⁻²⁴

6.Hamblin T.J., Orchard J.A., Gardiner A., et al., Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL, *Blood*, 2000, 95, 2455-2457.

22.Messmer B.T., Messmer D., Allen SL, et al., In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, *J Clin Invest*, 2005, PMID, 1571-1642.

23.Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., et al., Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1999, 94,1848-1854.

24.Hamblin T.J., Orchard J.A., Davies Z.A., et al., How many somatic mutations should we allow in chronic lymphocytic leukemia with unmutated IgVH genes ? *Blood*, 2004,104, 219a.

Questi primers sono stati coniugati ad una miscela di primers antisenso complementari alla regione della linea germinale J_H .²⁶

I prodotti amplificati e purificati, inseriti nella PCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Milano, Italia) sono stati amplificati in cellule competenti TOP10 One Shot e clonati. (Invitrogen).

I DNA plasmidici sono stati isolati da colonie in modo random e sequenziale usando un sequenziatore automatico di DNA (ABI PRISM 3100; Applied Biosystem, Foster City, CA). Il confronto tra le sequenze ottenute e quelle dei vari geni della linea germinale IgV_H fu effettuato tramite la banca dati IgBLAST utilizzando il software di analisi sequenziale Mac Vector 7.1 (Accelrys; Symantec San Diego, CA). Solo nel momento in cui veniva identificato lo stesso riarrangiamento V_HDJ_H in almeno 5 - 10 cloni, una data sequenza IgV_H veniva ulteriormente analizzata. L'allineamento delle sequenze IgV_H , utilizzabili per ciascun paziente, spesso rivelavano, per le mutazioni condivise da tutti i trascritti analizzati, un numero di mutazioni unico o parzialmente condiviso.

Per questa ragione, tutte le analisi mutazionali sono state condotte in ognuno dei trascritti IgV_H separatamente, e la percentuale di mutazioni assegnate ad un dato LLC-B è stato il valore medio della percentuale di mutazioni trovate in ogni trascritto. Le sequenze V_H che si discostavano più del 2% dai geni della linea germinale corrispondente sono stati definiti come mutati.

26. Robertson L.E., Plunkett W., McConnell K., et al., Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome, *Leukemia*, 1996, 10, 456-459.

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate al termine della raccolta dati.

La correlazione tra gli stadi di Rai modificati o linfadenopatia/splenomegalia o la β_2 -microglobulina e le percentuali di ZAP-70 sono state effettuate con il test di Fisher a due code.

Allo stesso modo sono state analizzate le associazioni tra ZAP-70 e stato mutazionale o i sottogruppi citogenetici.

Le correlazioni tra le percentuali di ZAP-70 o CD38 e la risposta alla fludarabina sono state determinate mediante il test di regressione logistica per variabili categoriche.

Il coefficiente di Spearman e' stato utilizzato per quantificare il grado di associazione tra le percentuale di ZAP-70 e di CD38 o di CD23 solubile.

La risposta e' stata valutata con i criteri del National Cancer Institute Working Group.

La sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale sono state valutate con il metodo di Kaplan e Meier e il paragone tra i diversi gruppi è stato effettuato tramite il log-rank test. Il modello di regressione proporzionale di Cox e' stato utilizzato per valutare l'effetto indipendente delle covariabili trattate come dicotomiche sulla sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale.

RISULTATI

ZAP-70, CD38, sCD23 , stato mutazionale IgVH e FISH

Come riportato in letteratura ¹⁵⁻¹⁷⁻²⁸ una popolazione di cellule di LLC e' stata considerata positiva per ZAP-70 quando almeno il 20% delle cellule B esprimevano l'antigene. 104 pazienti erano considerati ZAP-70 positivi (36%) e 185 ZAP-70 negativi (64%).

Per confermare la stabilità dell'espressione di ZAP-70, durante il corso della malattia, sono stati analizzati campioni sequenziali da 32 pazienti (2-3 campioni per paziente) entro un periodo variabile da 4 a 36 mesi. In 28 su 32 casi l'espressione di ZAP-70 mostrava differenze inferiori al 10%. La % di cellule B che esprimevano CD38 variava da 0% a 87 % e la soglia di positività era fissata al 30% come precedentemente riportato. ²¹

67 pazienti (23%) erano CD38⁺e 222 pazienti (77%) erano CD38⁻. Infine sCD23 era superiore a 70 U/ml in 82 pazienti (32%) e inferiore a 70 U/ml in 172 pazienti (68%).

15.Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, *J Clin Oncol*, 1999, 17, 399-408.

17.Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99,15524-15529.

21.Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, *Blood*, 2004, 103, 375-382.

28.Calin G.A., Liu C.G., Shimizu M., et al., MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101,11755-11760.

La correlazione di Spearman tra le % di positività di ZAP-70 e quelle di CD38 era pari a $r = 0.35$ ($P < 0.001$) e quella tra ZAP-70 e i livelli di sCD23 era pari a $r = 0.32$ ($P < 0.001$), indicando una correlazione diretta moderata.

Inoltre in 140 pazienti analizzati sia per le mutazioni IgVH e l'espressione di ZAP-70 il 93% dei pazienti con bassi livelli di ZAP-70 presentavano mutazioni IgVH superiori al 2% ($P < 0.001$) confermando una correlazione molto stretta.

Ugualmente, 85 su 101 pazienti $CD38^-$ presentavano mutazioni IgVH superiori al 2% ($P < 0.001$). Infine anche i livelli bassi di sCD23 erano significativamente correlati con lo stato mutato delle IgVH (66/76, con sCD23 < 70 U/mL presentavano mutazioni IgVH $> 2\%$, $P < 0.001$).

157 pazienti erano analizzati mediante la FISH in interfase per valutare le delezioni riguardo ai cromosomi 17p13, 11q23, 13q14 e la trisomia della banda 12q13. Riguardo a sottogruppi citogenetici, 85 pazienti (54%) presentavano un cariotipo normale e 42 (27%) presentavano 13q-. 30 pazienti (19%) presentavano trisomia 12 (16 pazienti), 11q- (11 pazienti) e 17p- (3 pazienti). Esisteva una correlazione significativa tra positività di ZAP-70 e sottogruppo citogenetico ad alto rischio comprendente trisomia 12, 11q-, 17p- ($P = 0,002$).

ANDAMENTO CLINICO

Non era riscontrata nessuna correlazione significativa tra sesso e positività di ZAP-70. Abbiamo trovato associazioni significative tra ZAP-70, superiore al 20%, e stadio di Rai modificato intermedio/alto ($P < 0.001$) (tab.1) o tra ZAP-70 e la presenza di linfadenopatie multiple profonde e/o splenomegalia

($P < 0.001$) (tab.1) e tra ZAP-70 e livelli elevati di $\beta 2$ -microglobulina ($P < 0.001$; Tab1).

Il tempo di raddoppiamento linfocitario, inferiore a 12 mesi, era osservato in 27 pazienti: 19/27 (70%) avevano valori elevati di ZAP-70 ($P < 0.001$). Inoltre 80/104 pazienti (77%) ZAP-70⁺ erano trattati per la loro malattia mentre soltanto 64/185 (35%) ZAP-70⁻ erano trattati. 93 pazienti erano trattati mensilmente con sei cicli per cinque giorni di fludarabina a dosi convenzionali e ottenevano una percentuale di remissione completa pari al 46%. Una percentuale più elevata di remissioni complete era riscontrata sia nei pazienti ZAP-70⁻ che in quelli CD38⁻ (Tab.2). Una minore sopravvivenza, libera da progressione, era osservata nei pazienti ZAP-70⁺ ($P < 0.001$ fig.2a), in quelli CD38⁺ ($P < 0.001$ fig.2b) e, infine, in quelli con valori elevati di sCD23 ($P < 0.001$ fig.2c).

Ugualmente una sopravvivenza globale più breve era osservata nei pazienti ZAP-70⁺ ($P < 0.001$ fig.3a), in quelli CD38⁺ ($P < 0.001$ fig.3b) e meno significativamente nei casi sCD23⁺ ($P = 0.013$ fig.3c).

La positività o negatività contemporanea di ZAP-70 e CD38 permetteva di identificare due sottogruppi di pazienti, il primo a cattiva prognosi ed il secondo a buona prognosi riguardo sia alla sopravvivenza libera da progressione ($P < 0.001$ fig.4a) che alla sopravvivenza globale ($P < 0.001$ fig 4b).

Riguardo alle aberrazioni genetiche, abbiamo osservato una sopravvivenza libera da progressione, più breve nei pazienti con anomalie genetiche sfavorevoli quali 17p-,11q- e trisomia 12, globalmente definite come

sottogruppo ad alto rischio, rispetto ai pazienti con cariotipo normale ($P = 0.004$ fig.5a). I pazienti con 13q- mostravano un andamento clinico intermedio. Inoltre la positività per ZAP-70 era associata con una sopravvivenza libera da progressione significativamente più breve sia all'interno del cariotipo normale ($P < 0.001$ fig.5b) che all'interno del sottogruppo ad alto rischio ($P = 0.02$ fig.5c). Infine, abbiamo effettuato una analisi multivariata secondo il modello di Cox riguardo alla sopravvivenza libera da progressione e alla sopravvivenza globale. Riguardo alla sopravvivenza libera da progressione, ZAP-70, sCD23 e stadi di Rai modificato erano confermati fattori prognostici indipendenti (tab 3). Riguardo alla sopravvivenza globale soltanto ZAP-70 era un fattore prognostico indipendente, laddove CD38 mostrava un trend verso la significatività statistica (Tab. 4).

DISCUSSIONE

L'espressione di ZAP-70, determinata in citometria a flusso, e' stata identificata in numerosi studi come fattore importante predittivo di progressione di malattia e di sopravvivenza nella LLC-B. ¹⁻¹⁵⁻¹⁷⁻²⁸

1. Jaffe E.S. H.N., Stein H., Vardiman J.W., Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001

15. Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, J Clin Oncol, 1999, 17, 399-408.

17. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99, 15524-15529.

28. Calin G.A., Liu C.G., Shimizu M., et al., MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-cell chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101, 11755-11760.

Noi abbiamo usato una metodica citofluorimetrica, ben standardizzata,¹⁵ per la determinazione di ZAP-70 ma l'utilizzo di un nuovo fluorocromo Alexa Fluor, direttamente coniugato con l' anticorpo monoclonale anti ZAP-70 clone 1E7.2, ci ha permesso di ottenere un segnale più chiaro e potente di quello normalmente ottenuto con anticorpi non coniugati come il clone 2F3.2.

Gibbs ed altri²⁹ hanno dimostrato che l'anticorpo antiZAP-70 clone 1E7.2 e il metodo di fissazione e permeabilizzazione con il kit Fix e Perm erano i più semplici da utilizzare e la combinazione più sensibile e specifica. Quindi questa combinazione può fornire un metodo citofluorimetrico standardizzato che potrebbe essere introdotto nell'effettuazione di un pannello di routine per l'immunofenotipo della LLC in un laboratorio di diagnostica clinica. Per di più questo miglioramento tecnologico ha permesso di definire un cutoff ottimale in termini di percentuali di cellule ZAP-70⁺ in grado di suddividere i pazienti con LLC-B in due sottogruppi con andamento clinico diverso. Inoltre i livelli di espressione di ZAP-70 erano stabili nel tempo nella maggior parte dei pazienti, in nessuno dei quali le variazioni nell'espressione di ZAP-70 superava il cutoff del 20%.

29.Rai K.R., Peterson B.L., Appelbaum F.R., et al., Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia, N Engl J Med, 2000, 343,1750-1757.

Sebbene i dati in letteratura ¹⁷⁻³⁰ indichino un certo grado di variabilità nell'espressione di ZAP-70, la predizione di prognosi, fatta alla diagnosi, non cambia nella maggior parte dei casi.

Comunque ulteriori analisi nel tempo di ZAP-70 e la standardizzazione dei protocolli di citometria a flusso sono necessari per risolvere questo punto. Noi abbiamo dimostrato che l'espressione di ZAP-70 era correlata significativamente con l'antigene CD38; entrambi questi due marcatori sono maggiormente espressi nelle LLC-B non mutate e rappresentano un fenotipo LLC-B maggiormente attivato. Probabilmente il sottogruppo di LLC-B che esprime ZAP-70 e CD38 può essere rappresentativo di una continua stimolazione in vivo, la quale spiegherebbe il decorso di malattia più aggressivo osservato in questi pazienti.¹⁰ Chen e altri¹¹ hanno dimostrato che l'espressione di ZAP-70 è associata con un incremento del segnale tramite il recettore della cellula B nella LLC-B. Questo incremento del segnale intracellulare potrebbe influenzare sia la sopravvivenza che la proliferazione delle cellule B giustificando una tendenza verso una progressione della malattia.

10.Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C., Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia : analysis of its prognostic significance, Br J Haematol, 1986, 62, 567-575.

11.Keating M.J., Kantarjan H., Freireich E.J., O'Brien S., The serum β_2 -microglobulin (β_2m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL), Blood,1995, 606a.

17.Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99,15524-15529.

30.Rossi J.F., van Hoof A., de Boeck K., et al., Efficacy and safety of oral fludarabine phosphate in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia, J Clin Oncol, 2004, 22 ,1260-1267.

Il nostro studio conferma l'associazione significativa di ZAP-70 nelle LLC-B e i geni IgVH non mutati, in accordo con i risultati di altri studi ¹⁵⁻¹⁷ anche se i meccanismi che potrebbero spiegare la relazione tra ZAP-70 e stato mutazionale IgVH sono ancora sconosciuti. Nel nostro studio abbiamo dimostrato inoltre una significativa correlazione tra aberrazioni citogenetiche sfavorevoli e l'espressione di ZAP-70.

Dal punto di vista clinico l'espressione di ZAP-70 era significativamente correlata con gli stadi di Rai più avanzati, con importanti linfadenopatie profonde, splenomegalia e più breve tempo di raddoppiamento linfocitario, tutti segni di malattia attiva ed aggressiva. Inoltre vi era un più grande numero di pazienti ZAP-70⁺ sottoposti a trattamento al tempo della nostra analisi rispetto ai pazienti ZAP-70⁻. Inoltre, le percentuali di risposta completa alla fludarabina erano significativamente correlate sia con le percentuali di ZAP-70⁺ che con l'espressione di CD38, confermando che questi marcatori biologici possono essere utilizzati per predire la chemiosensibilità dei pazienti con LLC-B. Abbiamo, inoltre, dimostrato che la positività di ZAP-70 era significativamente correlata ad un andamento clinico sfavorevole sia per quanto riguarda la sopravvivenza libera da progressione che per la sopravvivenza globale, in accordo con gli studi di Crespo, Orchard e Rassenti. ¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷

15. Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, *J Clin Oncol*, 1999, 17, 399-408.

16. Bichi R., Shinton S.A., Martin E.S., et al., Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 6955-6960.

17. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 15524-15529.

Per di più anche l'espressione elevata di CD38 e gli elevati livelli di sCD23 erano significativamente associati sia ad una ridotta sopravvivenza libera da progressione che ad una ridotta sopravvivenza globale, confermando i nostri precedenti risultati.²¹

L'analisi combinata di ZAP-70 e di CD38 infine ci permetteva di separare i nostri pazienti in tre sottogruppi: ZAP-70⁻/CD38⁻ con un andamento clinico molto favorevole, ZAP-70⁺/CD38⁺ a prognosi molto sfavorevole, e pazienti discordanti ZAP-70/CD38 con un andamento clinico intermedio. Ancora il nostro studio ha confermato l'importanza prognostica dell'analisi dei cromosomi mediante FISH nella LLC-B dimostrando una più lunga sopravvivenza libera da progressione nel cariotipo normale e nella delezione 13q rispetto alle aberrazioni genetiche ad alto rischio, come la trisomia 12,11q- e 17p- come è stato precedentemente riportato.¹⁹⁻²⁰ A tutt'oggi non ci sono studi importanti sul significato prognostico combinato di ZAP-70 e citogenetica nella LLC-B.² Nel nostro studio la proteina ZAP-70 ha confermato una importante capacità predittiva poiché ci consente di distinguere pazienti con una più breve sopravvivenza libera da progressione o con una breve sopravvivenza globale all'interno del cariotipo normale e del sottogruppo ad basso rischio, laddove la progressione era eterogenea.

2. Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M., Kay N., Keating M.J., O'Brien S., Rai K.R., National Cancer Institute-sponsored Working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment, *Blood*, 1996, 87, 4990-4997.

19. Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M., Chronic lymphocytic leucemia. *N Engl J Med*, 2005, 352, 804-815.

20. Chen L., Apgar J., Huynh L., et al., ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2005, 105, 2036-2041.

21. Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, *Blood*, 2004, 103, 375-382.

Il significato prognostico indipendente dell' espressione di ZAP-70 sul decorso clinico dei pazienti con LLC-B era infine corroborato dall'analisi multivariata riguardo alla sopravvivenza libera da progressione e alla sopravvivenza globale (Tab.3-4).

CONCLUSIONI

Il nostro studio dimostra che l'aumentata espressione di ZAP-70 da parte delle cellule LLC-B e' un fattore predittivo di progressione di malattia più significativo rispetto alla presenza di CD38 e di sCD23. Per di più ZAP-70 e' in grado di predire un decorso clinico diverso all'interno dei gruppi citogenetici in interfase. I nostri risultati suggeriscono un ruolo prognostico superiore di ZAP-70 rispetto a CD38 e allo stato mutazionale IgV_H .

Per di più questo parametro può essere determinato facilmente e rapidamente in citometria a flusso anche se ulteriori studi sono necessari per sviluppare un protocollo citofluorimetrico standardizzato. Inoltre poichè l'espressione di ZAP-70 sembra essere stabile nel tempo potrebbe essere usato, al momento della diagnosi, per identificare pazienti a maggior rischio di una precoce progressione di malattia. Infine, nella larga prevalenza dello stadio di Rai intermedio, riscontrato nella nostra serie di pazienti (189/289,65%), rafforza l'importanza della determinazione di ZAP-70. Poichè pazienti che appartengono a questo stadio possono avere sia un decorso indolente che rapido ed aggressivo, l'informazione sui livelli di espressioni di ZAP-70, può essere di grande aiuto per il clinico, per selezionare quali pazienti siano eleggibili o no, per il trattamento. Trials clinici di trattamento, stratificati in base a marcatori prognostici quali ZAP-70, sono ora sicuramente indispensabili. ³⁸

Bibliografia

1. Jaffee E.S. H.N., Stein H., Vardiman J.W., Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2001
2. Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M., Kay N., Keating M.J., O'Brien S., Rai K.R., National Cancer Institute-sponsored Working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment, *Blood*, 1996, 87, 4990-4997.
3. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1975, 46, 219-234.
4. Binet J.L., Auquier A. Dighiero G. et al., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer*, 1981, 48, 198-206.
5. Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*. 2000, 343, 1910-1916.
6. Hamblin T.J., Orchard J.A., Gardiner A., et al., Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL, *Blood*, 2000, 95, 2455-2457.
7. Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al., IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1999, 94, 1840-1847.
8. Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., et al., ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of

- disease progression in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2004, 351, 893-901.
9. Crespo M., Bosch F., Villamor N., et al., ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2003, 348, 1764-1775.
 10. Montserrat E., Sanchez-Bisno J., Vinolas N., Rozman C., Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia : analysis of its prognostic significance, *Br J Haematol*, 1986, 62, 567-575.
 11. Keating M.J., Kantarjan H., Freireich E.J., O'Brien S., The serum κ_2 -microglobulin (κ_2m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Blood*, 1995, 606a.
 12. Sarfati M., Chevret S., Chastang C., et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1996, 88, 4259-4264.
 13. Hallek M., Langenmayer I., Nerl C., et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1999, 93, 1732-1737.
 14. Del Poeta G., Maurillo L., Venditti A., et al., Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2001, 98, 2633-2639.
 15. Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, *J Clin Oncol*, 1999, 17, 399-408.

16. Bichi R., Shinton S.A., Martin E.S., et al., Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99, 6955-6960.
17. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99,15524-15529.
18. Ghia P., Prato G., Scielzo C., et al., Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. Blood.2004; 103:2337-2342.
19. Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M., Chronic lymphocytic leucemia. N Engl J Med, 2005,352, 804-815.
20. Chen L., Apgar J., Huynh L., et al., ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia, Blood, 2005, 105, 2036-2041.
21. Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, Blood, 2004, 103, 375-382.
22. Messmer B.T., Messmer D., Allen SL, et al., In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, J Clin Invest, 2005, PMID, 1571-1642.
23. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., et al., Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, Blood, 1999, 94,1848-1854.

24. Hamblin T.J., Orchard J.A., Davies Z.A., et al., How many somatic mutations should we allow in chronic lymphocytic leukemia with unmutated IgVH genes ? *Blood*, 2004,104, 219a.
25. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., et al., Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin gene expression genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia, *J Exp Med*, 2001,194,1639-1647.
26. Robertson L.E., Plunkett W., McConnell K., et al., Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome, *Leukemia*,1996,10, 456-459.
27. Del Principe M.I., Del Poeta G., Venditti A., et al., Clinical significance of soluble p53 protein in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica*, 2004, 89,1468-1475.
28. Calin G.A., Liu C.G., Shimizu M., et al., MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101,11755-11760.
29. Rai K.R., Peterson B.L., Appelbaum F.R., et al., Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2000, 343,1750-1757.
30. Rossi J.F., van Hoof A., de Boeck K., et al., Efficacy and safety of oral fludarabine phosphate in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol*, 2004, 22 ,1260-1267.
31. O'Brien S.M., Kantarjian H.M., Cortes J., et al., Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol*, 2001, 19, 1414-1420.
32. Lundin J., Kimby E., Bjorkholm M., et al., Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-

- 1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), *Blood*, 2002, 100, 768-773.
33. O'Brien S.M., Kantarjian H., Thomas D.A., et al., Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol*, 2001, 19, 2165-2170.
34. Byrd J.C., Peterson B.L., Morrison V.L., et al., Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712), *Blood*, 2003, 119, 976-984.
35. Del Poeta G., Del Principe M.I., Irno Consalvo M.A., et al., The addition of rituximab to fludarabine improves clinical outcome in untreated patients with ZAP-70 negative chronic lymphocytic leukemia, *Cancer*, 2005, 104, 2743-2752.
36. Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., et al., Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol*, 2005, 23, 4079-4088.
37. Wierda W., O'Brien S., Wen S., et al., Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol*, 2005, 23, 4070-4078.
38. Montserrat E., Role of auto- and allotransplantation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematol/Oncol Clin North Am*, 2004, 18, 915-926.
39. Milligan D.W., Fernandes S., Dasgupta R., et al., Autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and

- achieve a high percentage of molecular responses. Results of MRC Pilot Study, *Blood*, 2005, 105, 397-404.
40. Schetelig J., Thiede C., Bornhauser M., et al., Evidence of graft versus leukaemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group, *J Clin Oncol*, 2003, 21, 2747-2753.
41. Montserrat, E., Vinolas, N., Reverter, J.C., Rozman, C. Natural History of chronic lymphocytic leukaemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1988, 30, 359-361.
42. Kay, N.E., Hamblin, T.J., Jelinek, D.F., Dewald, G.W., Byrd, J.C., Farag, S., Lucas, M., Lin, T., Chronic lymphocytic Leukemia. *Hematol.*, 2002, 193-213.
43. Stevenson, F.K., Caligaris-Cappio, F. Chronic Lymphocytic leukaemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 2004, 103: 4389-4395.
44. Lin, K., Sherrington, P.D., Dennis, M., Matrai, Z., Cawley, J.C., Pettit, A.R. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV_H mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, 100: 1404-1409.
45. Meinhardt, G., Wendtner, C.M., Hallek, M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *Hematol.*, 1999, 77: 282-293.
46. Pontieri, G.M., Russo, M.A., Frati, L. *Patologia Generale III Edizione*, Ed Piccin, Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova.
47. Orrenius. S., Zhivotosky, B., Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4: 552-565.

48. Letai, A., Sorcinelli, M.D., Beard, C., Korsmeyer, S.J. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell*. 2004, 6: 241-249.
49. Rosi, F., Carlucci, F., Marinello, E. Tommassini, V., Pisano, B., Tabucchi, A. Perdita del controllo apoptotico in corso di leucemia linfatica cronica di tipo B. *Biologi Italiani*. 2006, 7: 26-31.
50. Raynal, P., and Pollard H.B. Annexin: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1197:63-93.
51. Vermes, I., Haanen, C., Steffen-Nakken, H., and Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995, 184: 39-51.

Tabella 1. Stadi Rai modificati o linfadenopatia/splenomegalia o β_2 -microglobulina e percentuali di ZAP-70

Basso stadio Rai (n= 87; 30%)	Int/Alto stadio Rai § (n=202; 70%)	Linfadenopatia/Splenomegalia § Presente (n=101;35%) Assente (n=188;65%)	β_2 -micro(mg/ml)§ >2.2 (n=121;46%) <2.2 (n=144;54%)
ZAP-70*			
> 20% (n=104; 36%)	12 (12%)	66 (63%)	56 (46%)
< 20% (n=185; 64%)	75 (41%)	35 (19%)	65 (54%)
		38 (37%)	31 (22%)
		150 (81%)	113 (78%)

n indica il numero dei campioni

§ determinato dal two-tailed Fisher exact test

*Per stadio di Rai , $P < 0.00001$; per linfadenopatia/splenomegalia, $P < 0.00001$; per β_2 -microglobulina, $P = 0.00002$.

Table 2. Risposta Completa, parziale o nessuna risposta alla fludarabina e espressione di ZAP-70 o CD38

Variable	RC (n= 43)	RP (n= 36)	NR (n= 14)
ZAP-70 *			
>20% (n=104)&	31% (13-55)	43% (23-64)	25% (12-44)
<20% (n=185)	64% (34-82)	33% (14-57)	2% (0.5-8)
CD38 °			
>30%	19% (6-36)	50% (26-72)	31% (11-53)
<30%	61% (35-83)	33% (13-51)	6% (1-21)

RC indica remissione completa; RP, remissione parziale; NR, nessuna risposta o progressione; n, numero di osservazioni.

*P = 0.0037.

° P = 0.00004.

& IC 95%

Tabella 3. Analisi multivariata della sopravvivenza libera da progressione

Variable	Hazard ratio	P	95% IC
ZAP-70	16.05	.00006	5.68-49.23
sCD23	7.21	.007	2.55-22.35
Stadi Rai Modificati	7.04	.008	1.98-21.43

Tabella 4. Analisi multivariata della sopravvivenza globale

Variable	Hazard ratio	P	95% IC
ZAP-70	10.96	.0009	3.76-31.85
CD38	3.29	.06	1.12-10.22

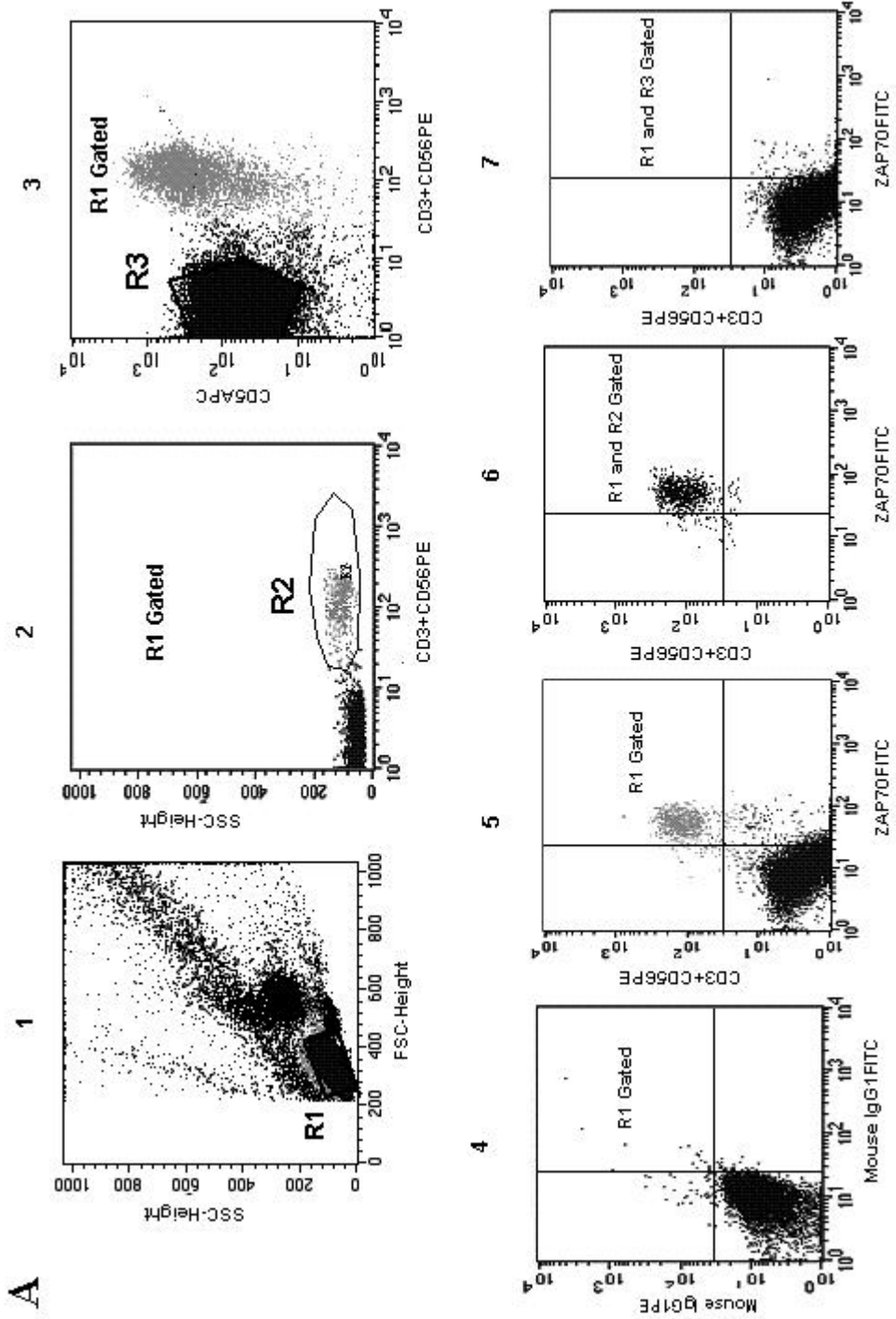


Fig.1 Metodo citofluorimetrico per la determinazione della proteina ZAP-70

B

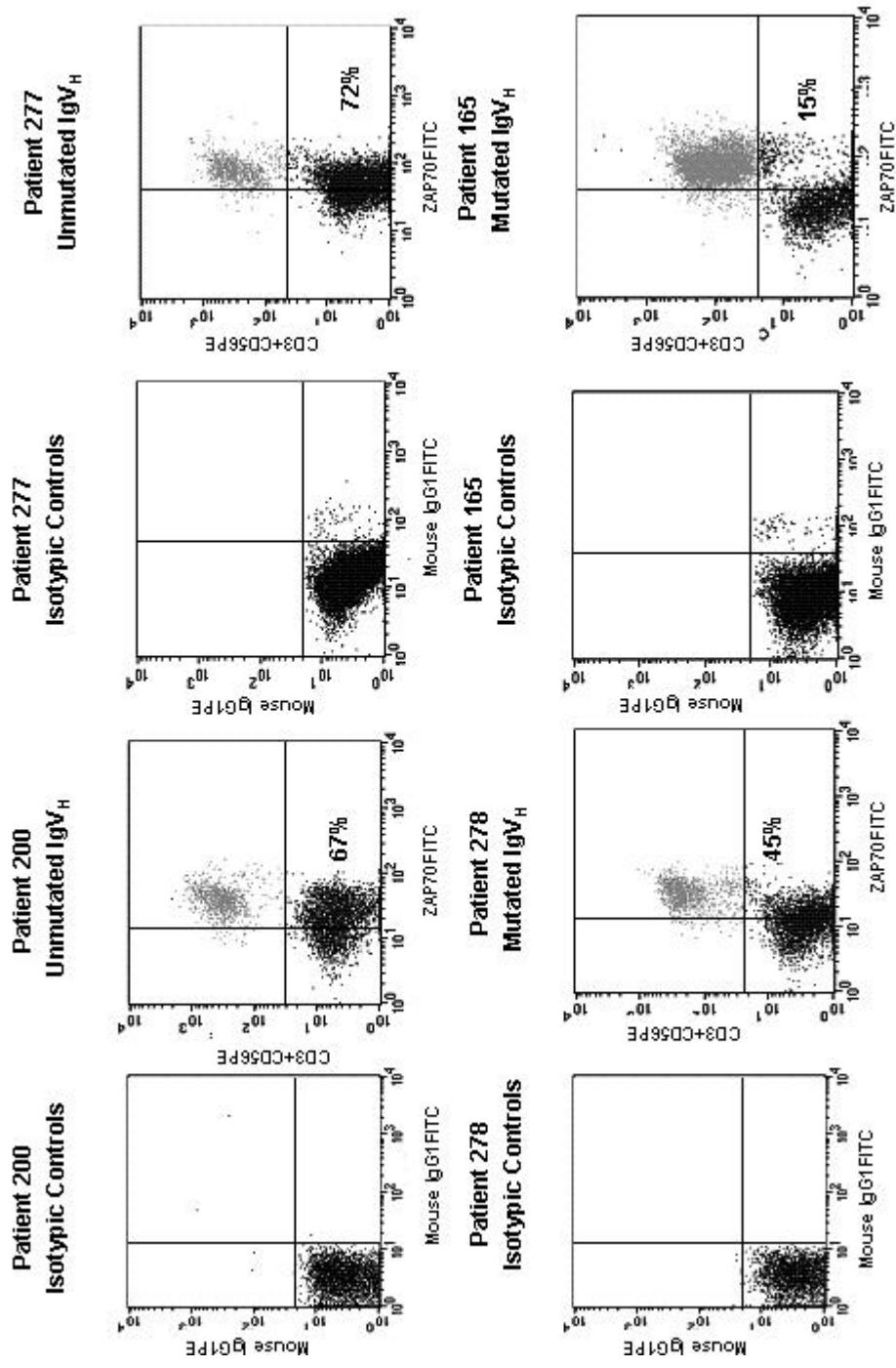
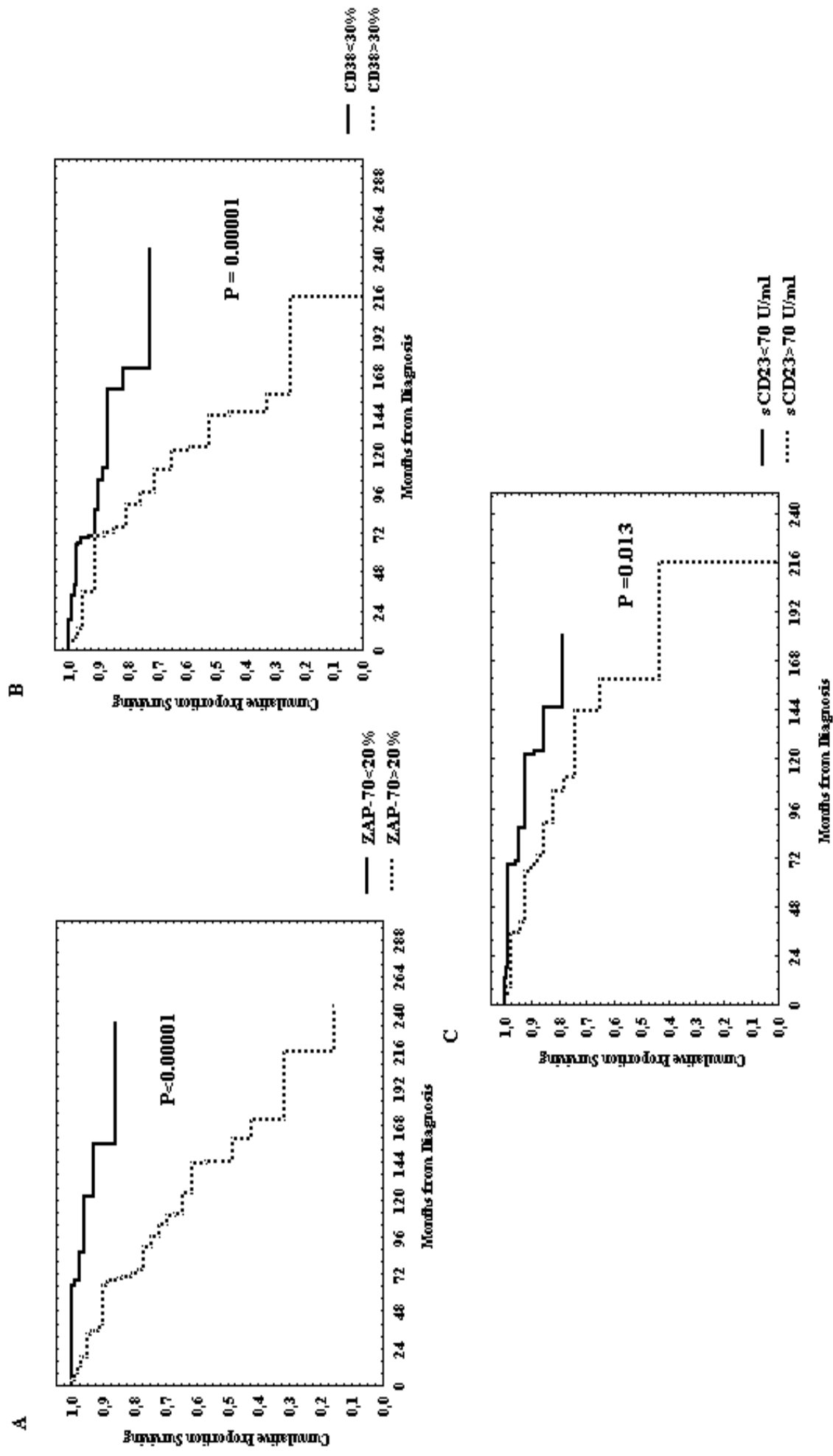


Fig. 2b Livelli di espressione di ZAP-70 in 4 casi di LLC



7 Fig. 2 Sopravvivenza libera da progressione in base all'espressione di ZAP-70, CD38 e sCD23

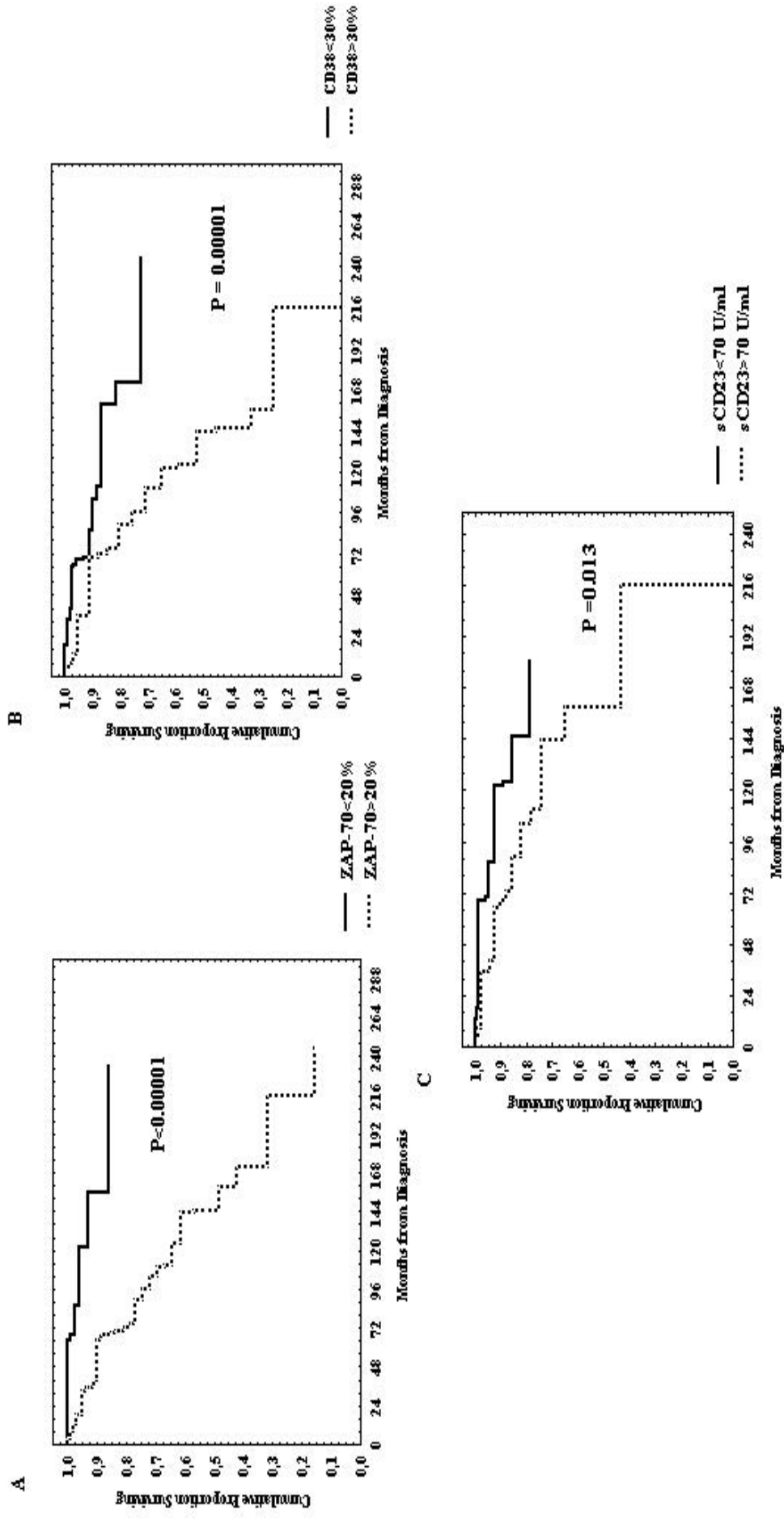


Fig. 3 Sopravvivenza globale in base all'espressione di ZAP-70, CD38 e sCD23

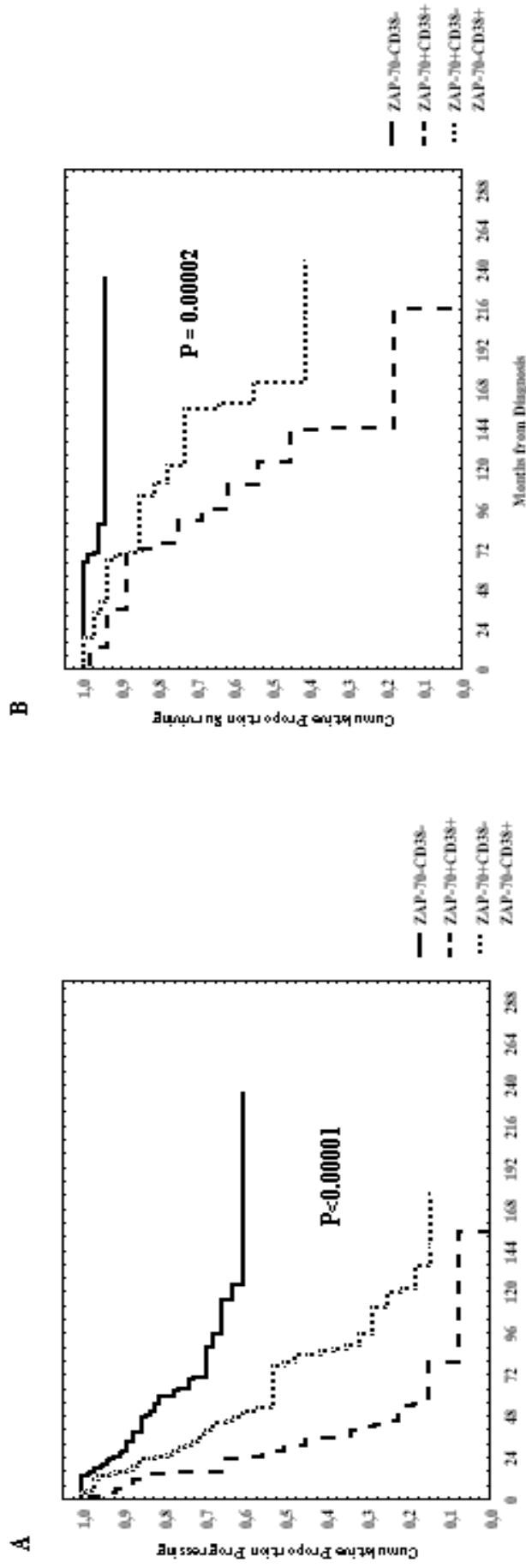
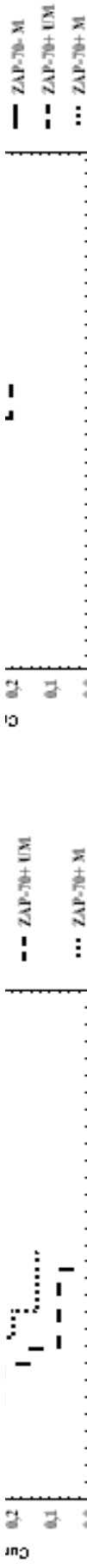


Fig. 4. Sopravvivenza libera da progressione (a) e sopravvivenza globale in base alle espressioni combinate di ZAP-70 e di CD38



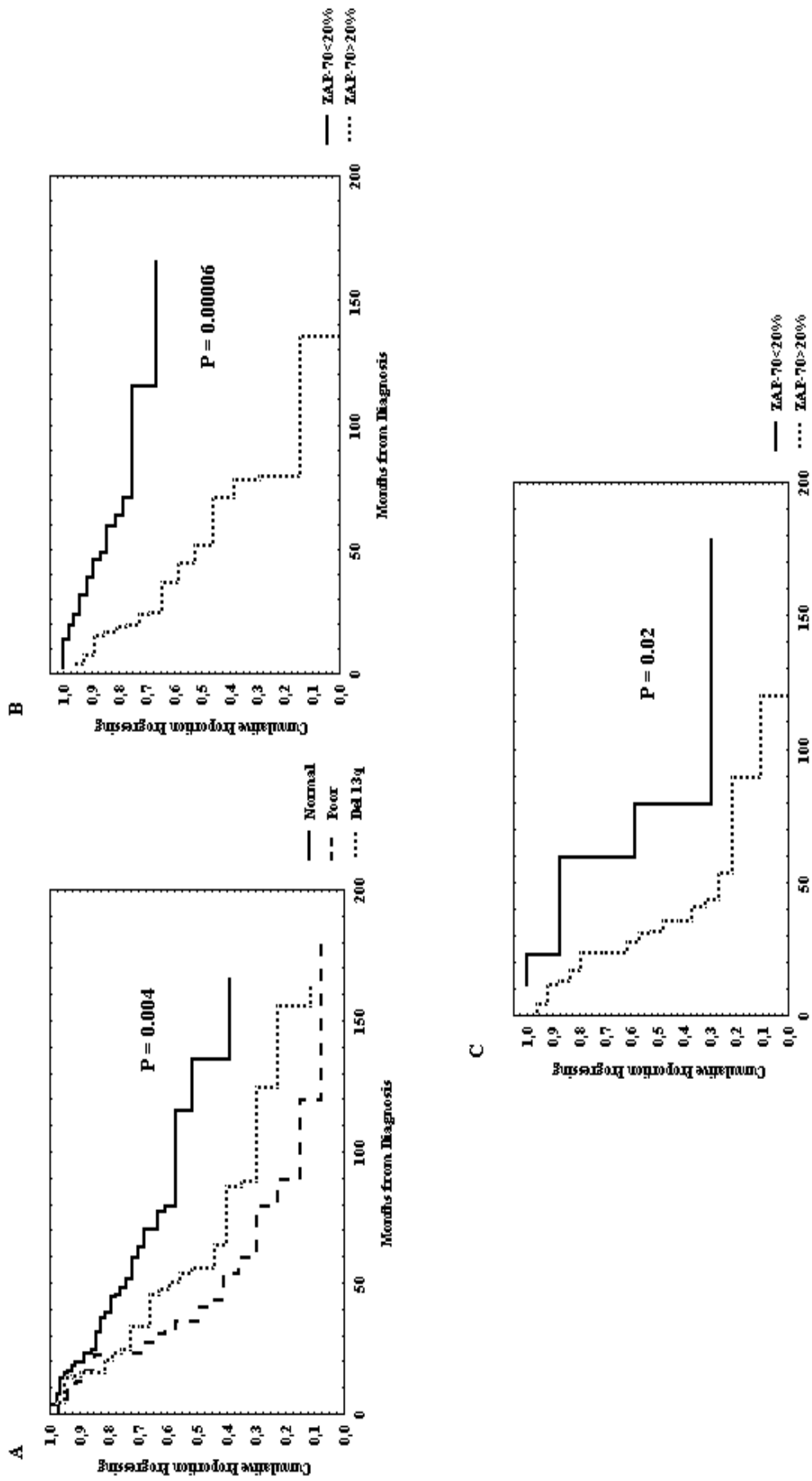


Fig. 5 Sopravvivenza libera da progressione in base alle diverse classi citogenetiche (a) e in base all'espressione di ZAP-70 all'interno della classe citogenetica normale (b) e all'interno di quella ad alto rischio (c).

