



**Collegio Ghislieri**

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

*Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"*

---

*2° Corso di formazione avanzata*

# **Diagnosi e terapia molecolare delle neoplasie ematologiche**

24 - 28 gennaio 2005, Collegio Ghislieri, Pavia

*A cura di Carlo Bernasconi*

*2° Corso di formazione avanzata*

**Diagnosi e terapia molecolare  
delle neoplasie ematologiche**





**Collegio Ghislieri**

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

*Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"*

---

*2° Corso di formazione avanzata*

**Diagnosi e terapia molecolare  
delle neoplasie ematologiche**

24 - 28 gennaio 2005, Collegio Ghislieri, Pavia

*A cura di Carlo Bernasconi*

© Copyright 2004 

*Edizioni Internazionali srl*  
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia  
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120  
E-mail: [edint.edimes@tin.it](mailto:edint.edimes@tin.it)

Tutti i diritti sono riservati.  
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo  
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)  
senza il permesso scritto dell'editore.

# Indice

Prefazione .....	pag. 7
<i>C. Bernasconi</i>	

## Premesse di biologia

1. Meccanismi di trasduzione del segnale <i>G. Saglio, D. Cilloni</i> .....	» 3
2. Lo stroma midollare, citochine, interazioni cellulari, angiogenesi <i>G.L. Castoldi</i> .....	» 6
3. Regolazione dell'apoptosi <i>R. Invernizzi, E. Travaglino, C. Benatti</i> .....	» 12
4. Telomero e telomerasi: biologia e osservazioni preliminari nelle neoplasie ematologiche <i>P. Bernasconi, M. Boni, P.M. Cavigliano, S. Calatroni, I. Giardini, B. Rocca, R. Zappatore, M. Caresana, J. Quarna</i> .....	» 20
5. Nuove metodiche per l'esplorazione del genoma: gene expression profiling e proteomica <i>G. Saglio, A. Morotti, D. Cilloni</i> .....	» 30

## Leucemie acute

6. Classificazione citogenetica delle LAM: impatto prognostico e terapeutico <i>P. Bernasconi, M. Boni, P.M. Cavigliano, S. Calatroni, I. Giardini, B. Rocca, R. Zappatore, M. Caresana, J. Quarna</i> .....	» 37
7. Population-based study of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia (AML) <i>D.T. Bowen, R. Sanderson</i> .....	» 53
8. La Leucemia acuta promielocitica: paradigma per una nuova strategia terapeutica <i>F. Lo Coco</i> .....	» 58
9. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia <i>G. Martinelli, M. Malagola, M. Rondoni, P.P. Piccaluga, C. Bosi, D. Russo, M. Baccharani</i> .....	» 59
10. Approccio immunologico nella terapia della leucemia acuta mieloide <i>S. Amadori, C. Mazzone, A. Venditti</i> .....	» 70
11. Analogie e differenze nella patogenesi delle LAM e delle SMD <i>C. Bernasconi</i> .....	» 76
12. Dalla morfologia ai microarray: come e perché si sta modificando l'approccio diagnostico alle malattie emato-oncologiche <i>A. Biondi</i> .....	» 81
13. Management and new treatment options in adult ALL <i>D. Hoelzer</i> .....	» 82

## **Leucemie croniche**

14. Molecular targets in chronic myeloid leukemia  
*G. Martinelli, S. Soverini, G. Rosti, D. Cilloni, M. Baccarani* ..... » 87
15. Patogenesi della leucemia linfatica cronica (B-LLC):  
interazioni tra cellule maligne e microambiente  
*F. Calligaris-Cappio, P. Ghia* ..... » 100
16. Citogenetica molecolare della leucemia linfatica cronica  
*A. Cuneo, F. Cavazzini, G. Castoldi* ..... » 104
17. Eterogeneità della leucemia linfatica cronica:  
aspetti biologici ed implicazioni terapeutiche  
*M. Gentile, F. R. Mauro, M. S. de Propriis, A. Guarini, R. Foà* ..... » 118
18. Anticorpi monoclonali nella terapia della LLC-B:  
MabThera e MabCampath  
*M. Gobbi* ..... » 125

## **Linfomi maligni**

19. Espressioni antigeniche della differenziazione linfocitaria  
e classificazioni dei linfomi maligni  
*U. Magrini, M. Lucioni, M. Paulli* ..... » 129
20. Patogenesi molecolare dei linfomi maligni  
*G. Gaidano, D. Rossi, S. Franceschetti, A. Conconi* ..... » 133
21. Impatto clinico della diagnosi molecolare dei linfomi non-Hodgkin  
*E. Carlotti, A. Rambaldi* ..... » 138
22. Anticorpi monoclonali nella terapia dei linfomi non-Hodgkin  
*F. Lauria, F. Forconi* ..... » 141
23. Anti-idiotypic vaccination for hematological malignancies  
*R.M. Lemoli* ..... » 148

## **Mieloma multiplo**

24. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS):  
long-range experience at Mayo Clinic  
*R.A. Kyle* ..... » 153
25. Meccanismi molecolari nella patogenesi del mieloma multiplo  
e dell'amiloidosi AL  
*G. Merlini* ..... » 155
26. Genetic heterogeneity in multiple myeloma  
*H. Avet-Loiseau* ..... » 160
27. Neoangiogenesi e interazioni cellulari nella progressione  
del mieloma multiplo  
*A. Vacca, A. Pellegrino, D. Ribatti* ..... » 170
28. Talidomide e i suoi analoghi nella terapia del mieloma multiplo  
*A. Palumbo* ..... » 177

## Presentazione

Il progetto del Collegio Ghislieri “Progressi in Biologia e Medicina” ha l'obiettivo fondamentale di favorire l'incontro fra la ricerca scientifica di base e l'applicazione pratica in clinica. L'argomento del 2° corso di formazione avanzata "Diagnosi e terapia molecolare delle neoplasie ematologiche" è senz'altro conforme a questo obiettivo,

Nell'organizzazione di questo corso si è ritenuto importante fornire innanzitutto ai partecipanti essenziali e precise informazioni di ordine biologico. Durante la prima giornata verranno quindi esposti e discussi alcuni importanti aspetti di biologia cellulare: la struttura cromatinica ed il genoma umano, i meccanismi di trasduzione del segnale, le componenti del microambiente midollare, i processi che regolano l'apoptosi, il ruolo svolto dal sistema telomero-telomerasi, le nuove tecniche per l'esplorazione del genoma.

La trattazione degli argomenti riguardanti le singole neoplasie ematologiche verrà poi svolta nelle giornate successive, in sessioni distinte dedicate alle leucemie acute, leucemie croniche, linfomi maligni, mieloma multiplo. Il rationale che si è voluto seguire nell'impostazione di tale trattazione è quello di ripercorrere le tappe successive della ricerca biologica e clinica che hanno condotto, per ciascuna malattia, alle attuali acquisizioni di medicina molecolare. Per sottolineare il valore storico di tale percorso sono state programmate, nel tardo pomeriggio dei primi quattro giorni del corso, quattro letture magistrali (aperte anche a colleghi e studenti) tenute da illustri docenti che sono stati attori del progredire delle conoscenze nelle singole malattie prese in esame: Franco Mandelli per la leucemia acuta mieloide, Dieter Hoeltzer per la leucemia acuta linfatica, Robert Kyle per il mieloma multiplo, Sante Tura per la leucemia mieloide cronica.

A questi amici e a tutti i relatori del corso vanno i più vivi ringraziamenti del Collegio Ghislieri e miei personali.

*Carlo Bernasconi*

Pavia, 24 gennaio 2005





# **PREMESSE DI BIOLOGIA**



# Meccanismi di trasduzione del segnale

*Giuseppe Saglio, Daniela Cilloni*

Divisione di Medicina Interna ed Ematologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università di Torino, Ospedale San Luigi, Orbassano, Torino

Lo sviluppo di tutti gli organismi richiede la perfetta esecuzione di programmi complessi nei quali diversi geni sono attivati o repressi in specifici tipi cellulari e con una precisa sequenza temporale.

È intuitivo come questo processo debba essere regolato in modo molto preciso da un complesso network di segnali finemente regolati. Tuttavia, nonostante le accresciute conoscenze nel campo della biologia cellulare, il meccanismo coinvolto nel coordinamento dei diversi *pathways* non è completamente chiaro se non addirittura in alcuni casi completamente oscuro.

Le diverse modulazioni dell'espressione genica sono generate da segnali extracellulari che agiscono su specifici recettori di membrana. Molti di questi modulatori sono molecole solubili che agiscono in modo paracrino. Tuttavia alcune proteine coinvolte nella traduzione del segnale sono situate esse stesse alla superficie cellulare e interagiscono con recettori di superficie delle cellule adiacenti attivando segnali intracellulari. Anche le cellule che hanno ormai raggiunto lo stadio maturativo terminale cambiano costantemente il loro pattern di espressione genica poiché ricevono costantemente stimoli extracellulari che inducono l'attivazione di specifici fattori trascrizionali che a loro volta stimolano o reprimono specifici geni target.

Esistono evidenze sempre più consistenti del ruolo chiave delle proteine tirosino-chinasi nell'alterazione dei processi di proliferazione e differenziazione che caratterizzano diverse neoplasie ematologiche tra cui le leucemie acute e croniche. Le tirosino-chinasi, insieme ai recettori delle citochine rappresentano le due importanti classi di recettori di membrana. I recettori delle citochine, che posseggono un domain citosolico associato a un membro della famiglia delle tirosino-chinasi citosoliche ovvero le chinasi JAK e i recettori tirosino-chinasici (RTKs) che posseggono attività tirosino-chinasica nel domain citosolico posseggono un meccanismo di attivazione molto simile. In entrambi i casi il legame con il ligando favorisce la dimerizzazione del recettore, nella maggior parte dei casi presente in forma monometrica, che in questa forma attiva innesca un processo di autofosforilazione. Infatti nella forma monometrica inattiva l'attività TK del recetto-

re è molto bassa. Al contrario, nella forma dimerica la chinasi di una subunità è in grado di fosforilare uno o più residui vicino al domain catalico dell'altra subunità. La fosforilazione induce un cambio conformazionale che facilita il legame dell'ATP in alcuni recettori quali il recettore dell'insulina oppure o il legame di proteine substrato in recettori quali *FGF receptor*.

Tutto questo induce la fosforilazione di una seconda tirosino-chinasi. Il processo di fosforilazione della tirosina nell'activation loop è un meccanismo comune attraverso il quale vengono attivate la maggior parte delle TK.

Molte proteine TK interagiscono con proteine adattatrici, ovvero delle piccole proteine che contengono dei domains SH2, PTB o SH3 ma che non posseggono intrinseca attività chinasi. Queste proteine inducono il cross-talk tra le TKs e altre proteine responsabili dell'attivazione di pathways che sfociano ad esempio nell'attivazione di Ras.

Ras è una sorta di proteina interruttore che lega il GTP. Per essere attiva deve legare il GTP, al contrario nella forma legata al GDP è inattiva. Le proteine Ras assumono un ruolo centrale in campo oncologico poiché è noto che la presenza di mutazioni di Ras si associa allo sviluppo di neoplasie. Infatti le forme mutate non sembrano essere in grado di idrolizzare il GTP e rimangono pertanto costantemente attivate.

In seguito all'attivazione delle RTK si forma sulla superficie citosolica della membrana plasmatica un complesso contenente il recettore attivato, e le molecole adattatrici GRB2 e Sos. Questo legame porta alla localizzazione di Sos dal citosol alla membrana vicino al suo substrato Ras-GDP. Il legame tra Sos e Ras-GDP porta all'attivazione di Ras. e al conseguente innesco di una cascata mediata dalla MAP chinasi attraverso l'attivazione di Raf, MEK, La chinasi MAP, una volta entrata nel nucleo è in grado di fosforilare molte proteine tra cui fattori trascrizionali che regolano l'espressione di geni coinvolti nei processi di differenziazione cellulare, crescita proliferazione e apoptosi.

Lo stimolo con alcuni fattori di crescita quali EGF o PDGF a cellule quiescenti in fase Go del ciclo cellulare provoca un rapido aumento dell'espressione di oltre 100 geni, i cosiddetti geni della risposta precoce. Tra questi i geni che codificano per i fattori trascrizionali c-jun e c-fos che inducono l'espressione di proteine necessarie alla progressione attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare. Oltre alla chinasi MAP appartengono alla superfamiglia delle MAP chinasi anche JNKs e P38 che, come MAP sono serino-treonono chinasi attivate da RTKs nel citosol in risposta a stimoli extracellulari e in grado di traslocare nel nucleo ad attivare la trascrizione genica.

Oltre al segnale innescato dalla fosforilazione delle RTK, che sicuramente gioca un ruolo di primo piano nell'indurre la trascrizione genica, la cellula possiede altri meccanismi di regolazione della dell'attività trascrizionale in risposta a diversi segnali extracellulari. Tra questi il meccanismo di attivazione di NF-kB è sicuramente tra i più rilevanti.

NF-kB è un fattore trascrizionale nucleare che viene rapidamente attivato in risposta a infezioni, infiammazioni tramite il segnale indotto da citochine infiammatorie come TNFa e IL1, e in risposta a numerosi situazioni di stress come le

radiazioni ionizzanti. Nella situazione basale NF- $\kappa$ B è sequestrato nel citosol complessato alla chinasi I $\kappa$ B che ne maschera per legame diretto il segnale di localizzazione nucleare (NLS). Il complesso I $\kappa$ B è un punto di convergenza di tutti i segnali extracellulari che attivano NF- $\kappa$ B. L'attivazione di I $\kappa$ B in seguito ai diversi stimoli porta alla fosforilazione di I $\kappa$ B stesso nei residui di serina 32 e 36 per opera della chinasi IKK rendendola pertanto accessibile alle ubiquitinoligasi, che legando le fosfoserine sono in grado di indurre la degradazione operata dal proteasoma di I $\kappa$ B stesso. La degradazione di I $\kappa$ B smaschera le sequenze di localizzazione nucleare di NF- $\kappa$ B che è così libero di entrare nel nucleo e di iniziare il processo di trascrizione genica. NF- $\kappa$ B stimola la trascrizione di oltre 150 geni che codificano per citochine, chemochine e per proteine coinvolte nella regolazione della proliferazione e apoptosi. Recentemente diversi studi hanno dimostrato un'incrementata attività di NF- $\kappa$ B nei blasti di leucemia acuta. Pertanto il pathway di NF- $\kappa$ B rappresenta un ottimo target per composti selettivi in grado di inibire a diversi livelli l'attività sregolata. In particolare sono già in fase di applicazione clinica gli inibitori del proteasoma.

Le numerose conoscenze dei difetti a livello di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale che sono alla base di numerose neoplasie ematologiche offrono la possibilità di realizzare un approccio terapeutico alternativo in grado di bloccare in modo selettivo il difetto molecolare o il pathway anomalo sregolato. In alcune neoplasie di origine epiteliale con coinvolgimento del recettore per EGF, l'inibitore selettivo di questa chinasi offre attualmente nuove opportunità terapeutiche. Allo stesso modo sono in sperimentazione gli inibitori di Ras che può essere bloccato mediante degli inibitori dell'enzima farnesil transferasi. Sicuramente l'esempio di terapia molecolare più riuscita è rappresentata dall'Imatinib in grado di bloccare non solo l'attività TK di BCR-ABL nella leucemia mieloide cronica ma anche PDGFR  $\alpha$  e  $\beta$  e c-Kit.

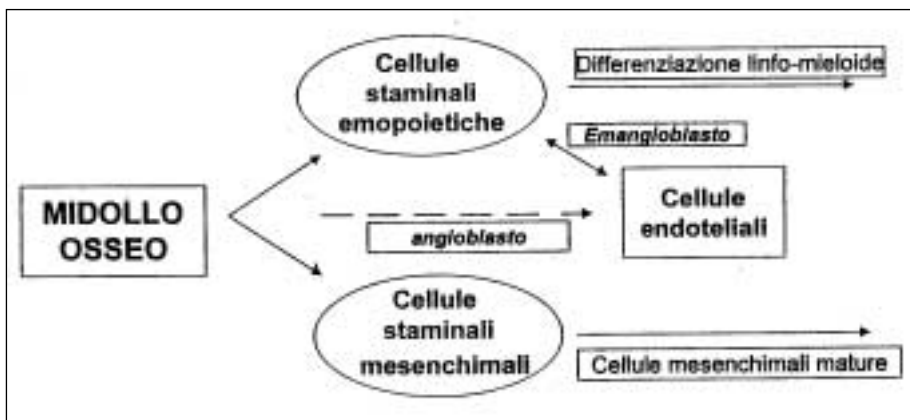
## Lo stroma midollare, citochine, interazioni cellulari, angiogenesi

Gian Luigi Castoldi

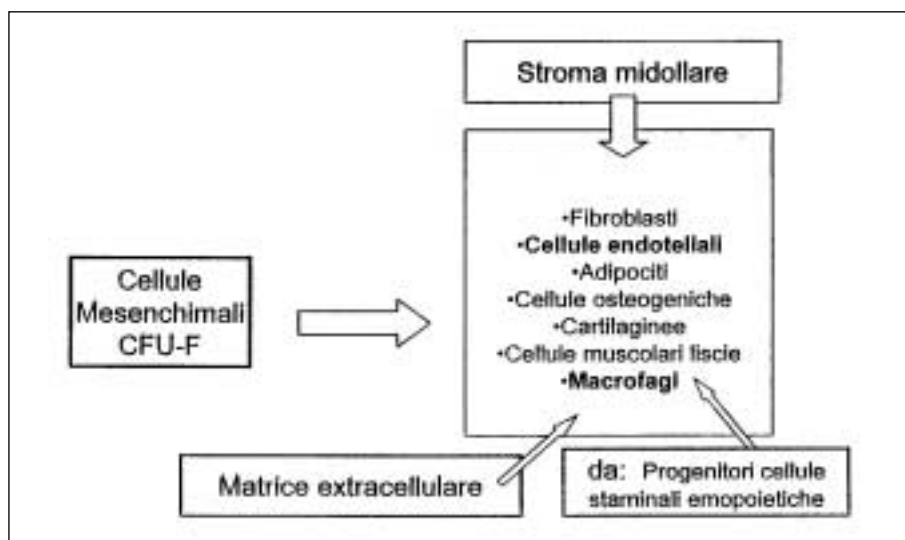
Sezione di Ematologia, Azienda Arcispedale S. Anna, Università di Ferrara

L'applicazione delle tecniche di coltura in vitro e di caratterizzazione fenotipica dei progenitori cellulari a livello di vari tessuti ha portato alla identificazione nel midollo osseo umano di almeno due popolazioni distinte di cellule staminali, quelle emopoietiche in grado di differenziarsi lungo varie filiere e di dare origine ai principali elementi maturi del sangue periferico e quelle, meno ben definite, di origine mesenchimale, considerate i progenitori di elementi facenti parte di tessuti non ematopoietici (Fig. 1).

Queste ultime cellule, identificate in colture a lungo termine, e di fatto caratterizzate dalla capacità di aderire alle superfici di plastica (*"Plastic adherent cells"*) sono considerate equivalenti alle CFU-F (*"Colony forming unit-fibroblast"*), come suggerito dai lavori pionieristici di Friedenstein (1968) e dotate della capacità di formare tessuto connettivo in tutto l'organismo, in particolare cellule fibroblasti-



**Fig. 1** - Coesistenza nel midollo osseo di due popolazioni distinte di cellule staminali (emopoietiche e mesenchimali), in grado, rispettivamente, di dare origine alle diverse filiere di cellule del sangue e a cellule mesenchimali mature, incluse le cellule dello stroma. L'origine delle cellule endoteliali è discussa a seconda della sede di riferimento (emangioblasto nell'embrione, angioblasto nel midollo adulto).



**Fig. 2** - Composizione dello stroma midollare costituito da un compartimento cellulare e da una matrice extracellulare. Il compartimento cellulare è rappresentato da elementi mesenchimali maturi, da endoteli e, per convenzione, da cellule macrofagiche (peraltro di derivazione dalle cellule staminali del sistema emopoietico).

che, osteoblastiche, condrociti, cellule muscolari lisce e cellule propriamente dello stroma con finalità di supporto delle cellule ematopoietiche in senso stretto.

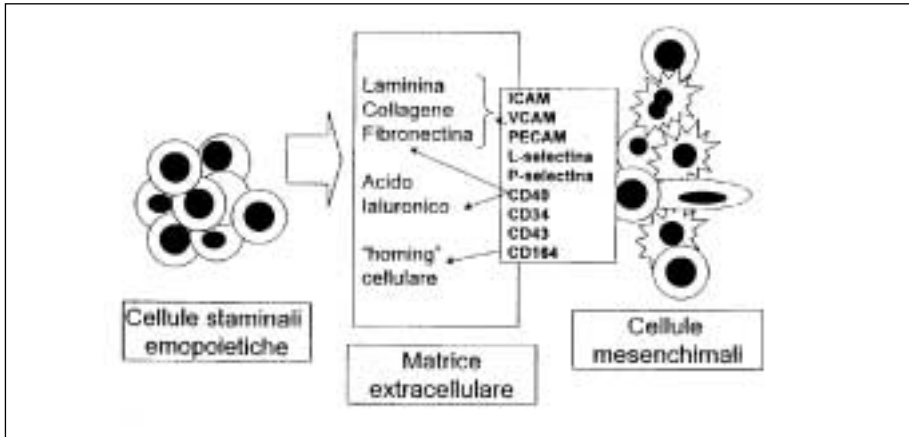
Sotto questo profilo le cellule stromali, che appaiono caratterizzate dalla espressione dell'antigene STRO-1, sono di derivazione mesenchimale e partecipano con altri elementi alla costituzione dello stroma midollare vero e proprio (Fig. 2).

A buon diritto rientrano nello stroma varie cellule comprendenti elementi di derivazione mesenchimale matura (fibroblasti, osteociti, condrociti, adipociti) ma anche macrofagi (che peraltro originano dal gruppo delle cellule emopoietiche) ed endoteli. Sulle modalità di origine di queste ultime cellule sono note alcune controversie che vorrebbero una derivazione comune dall'emoangioblasto nella fase embrionale (cioè da un progenitore a duplice valenza mesenchimale ed emopoietica) e dall'angioblasto (quindi da un elemento già indipendente dal filone ematopoietico) nella fase adulta del midollo.

Peraltro il fatto che il sistema delle cellule stromali possa essere considerato da un punto di vista funzionale del tutto simile a quello delle cellule ematopoietiche, lascia intendere che alla base dei due sistemi esistano dei meccanismi di automantenimento e di regolazione della loro differenziazione. In effetti, mentre le cellule ematopoietiche sono fenotipicamente stabili e sono sottoposte ad un continuo rinnovamento, le cellule mesenchimali (stromali) sono attivabili soltanto in certe fasi e sono dotate di grande flessibilità fenotipica in rapporto alle esigenze funzionali dei tessuti connettivi (Bianco e Robey, 2000).

Esiste una serie ben definita di rapporti fra cellule ematopoietiche e cellule mesenchimali che sono documentabili dalla espressione di vari epitopi alla superficie della cellule delle due filiere e di vari recettori e ligandi che contribuiscono





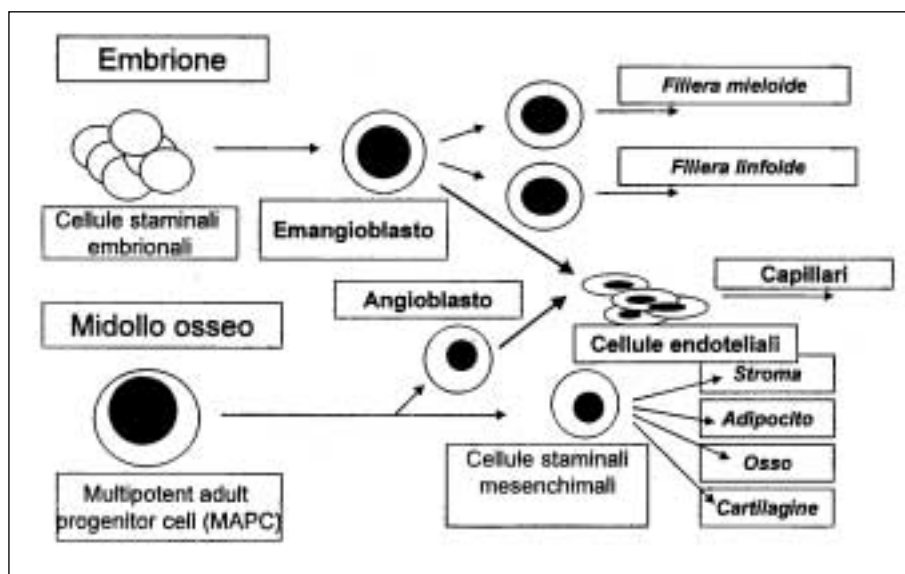
**Fig. 3** - Molecole di adesione e strutture della matrice extracellulare elaborate nella interazione fra cellule di derivazione mesenchimale dello stroma e cellule staminali emopoietiche.

alla loro interazione (Fig. 3). La attivazione reciproca di questi elementi porterebbe altresì alla elaborazione di citochine e di molecole di adesione che favorirebbero anche l'elaborazione della matrice extracellulare.

Per quanto attiene alla formazione delle cellule endoteliali due differenti percorsi sembrano caratterizzare la loro genesi dall'angioblasto adulto e, rispettivamente, embrionale. Quest'ultimo, nella fase embrionale sembra derivare da un precursore comune alle cellule staminali ematopoietiche identificato come *emangioblasto*, mentre nell'adulto l'*angioblasto* appare derivare da cellule primordiali (MAPC) in grado di dare luogo anche a cellule mesenchimali, ma non a cellule ematopoietiche (Moore, 2002), (Fig. 4).

La possibilità che cellule mesenchimali oltre che nel midollo osseo, possano essere ritrovate in circolo è stata indagata a più riprese con risultati contrastanti. Lazarus et al. (1997) hanno ottenuto risultati negativi per quanto riguarda la documentazione di cellule mesenchimali nel sangue periferico in condizioni normali, mentre Zvaifler et al. (2000) hanno potuto dimostrare la crescita di cellule fibroblastoidi in colture da sangue di soggetti sani senza aggiunta di fattori di crescita. Queste cellule erano contrassegnate da marcatori delle cellule mesenchimali quali collagene di tipo I, vimentina, endoglin (CD 105).

Una serie di ricerche interessanti ha riguardato la possibilità di ritrovare cellule mesenchimali nel midollo osseo di soggetti sottoposti a trapianto allogenico. Nella maggior parte delle ricerche effettuate le cellule mesenchimali ritrovate appartenevano al soggetto ricevente. Queste osservazioni possono trovare spiegazione nella incapacità dei regimi di condizionamento di ottenere una ablazione completa dello stroma del ricevente, o anche nella impossibilità delle cellule stromali stesse ad inserirsi a livello midollare in virtù del loro scarso numero negli espianti da infondere (2-5 cellule di derivazione mesenchimale per  $1 \times 10^6$  cellule mononucleate). È stato ipotizzato a questo riguardo anche un rigetto delle cellule mesenchimali infuse ad opera del sistema immunitario dell'ospite. Infine, a dif-

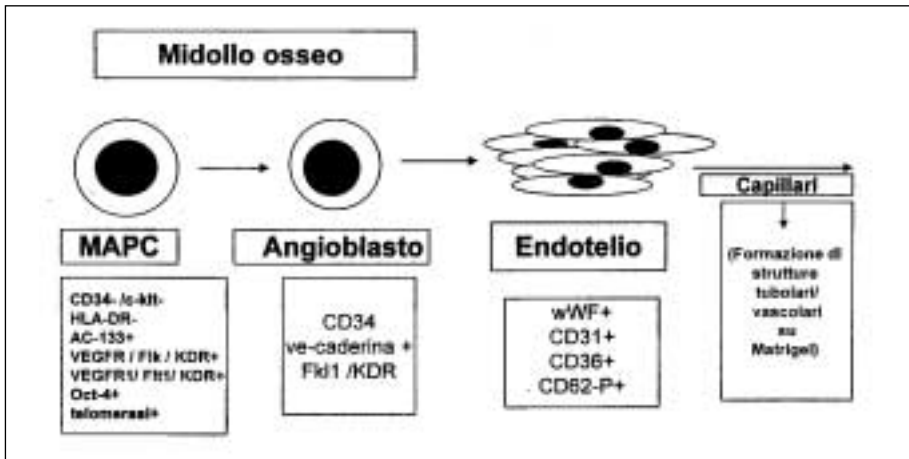


**Fig. 4** - Schema illustrante la potenziale diversa derivazione delle cellule endoteliali nell'embrione e nel midollo adulto. L'emangioblasto sembra in grado di dare luogo a cellule endoteliali e, nello stesso tempo, a cellule del sistema ematopoietico; nel midollo adulto gli endoteli deriverebbero da progenitore (angioblasto), (a sua volta originato da cellule progenitrici multipotenti - MAPC), non dotato della capacità di produrre cellule del parenchima ematopoietico.

ferenza delle cellule staminali emopoietiche, non esiste documentazione che le cellule di derivazione mesenchimale vadano ad insediarsi in nicchie privilegiate del midollo osseo, mentre è possibile, in modelli sperimentali animali, ritrovare queste cellule in numerosi organi quali polmoni, fegato, reni cervello, cartilagini, muscoli, cute.

Il fatto che alcuni elementi mesenchimali possano differenziarsi verso elementi che non fanno parte del microambiente midollare (miociti, cellule epatiche) lascia aperto il problema della persistenza a livello midollare di cellule staminali pluri-potenti, verosimilmente connesse con residui embrionali (Koc e Lazarus, 2000). Questo aspetto è stato affrontato negli anni più recenti da Reyes e Verfaillie (2001) che hanno identificato nel midollo adulto (postnatale) di esseri umani e di roditori la presenza di una cellula, unica nel suo genere, designata come MAPC ("multipotent adult progenitor cell") capace di dare luogo a cellule mesenchimali, e, separatamente, a cellule endoteliali, ma non a cellule ematopoietiche (Jiang et al. 2002, Moore, 2002) (Fig. 5).

La funzione delle cellule mesenchimali rimane ancora in larga misura da definire (Roberts, 2004); tuttavia queste cellule giocano un ruolo fondamentale nell'insediamento e nel mantenimento della funzione delle cellule staminali emopoietiche. Le cellule mesenchimali producono non solo numerosi fattori di crescita emopoietici e numerose citochine, ma anche molecole della matrice extracellulare, quali fibronectina, vimentina, laminina., essenziali nella interazione fra cellule. Il co-trapianto di cellule mesenchimali adulte ha, in effetti, dimostrato di favo-



**Fig. 5** - Caratterizzazione fenotipica della differenziazione endoteliale dall'angioblasto e dalle cellule MAPC ("multipotent adult progenitor cell").

rire l'attecchimento di cellule staminali emopoietiche in alcuni modelli animali. In altri studi, sempre in modelli animali contrassegnati da danneggiamenti cerebrali, infarto miocardico, distrofia muscolare, fratture ossee, le cellule mesenchimali, iniettate localmente, si sono dimostrate in grado di migrare nelle sedi di lesione e di differenziarsi in cellule contrassegnate da un appropriato fenotipo d'organo, talora in grado di migliorare la funzione del tessuto danneggiato. In campo umano le applicazioni sono ancora limitate: Koc et al. (2000) hanno mostrato che la co-infusione di cellule mesenchimali autologhe espanse in coltura è in grado di migliorare l'attecchimento di cellule emopoietiche in pazienti affette da neoplasie mammarie, mentre Horwitz et al. (2002) hanno mostrato che cellule mesenchimali possono contribuire al rimodellamento osseo dopo trapianto allogenico in bambini affetti da osteogenesi imperfetta.

Molti di questi aspetti riguardano il futuro della caratterizzazione ed impiego delle cellule staminali, soprattutto per quanto riguarda i meccanismi di "homing", di automantenimento e di differenziazione secondo tessuti preferenziali.

## Bibliografia

1. Bianco P, Robey P.G.: Marrow stromal cells. J.Clin.Invest., 105: 1663-1668, 2000.
2. Bianco P., Reginucci M., Gronthos S., Robey P.G.: Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications. Stem Cells, 19: 180-192, 2001.
3. Campioni D., Punturieri M., Bardi A., Moretti S., Tammiso E., Lanza F., Castoldi G.L.: "In vitro" evaluation of bone marrow angiogenesis in myelodysplastic syndromes: a morphological and functional approach. Leukemia Res., 28: 9-17, 2004.

4. Castoldi G.L., Dominici M., Campioni D., Lanza F.: Cellule staminali mesenchimali: Potenzialità evolutiva ed applicazioni cliniche. *Progr. Emat.Clin.*, 20: 63-69, 2001.
5. Deans R.J., Moseley A.B., Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses *Exp. Hematol.*, 28: 875-884, 2000.
6. Dennis J.E., Charbord P.: Origin and differentiation of human murine stroma. *Stem Cells* 20: 205-214, 2002.
7. Moore M.A.S.: Putting the neo into neoangiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 109: 313-315, 2002.
8. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNail R.Y., Muul L., Hafmann T.: Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99: 8932-8937, 2002.
9. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R Reyes M., Lenvik T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
10. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Heynesworth S.E., Caplan A.L., Lazarus H.M.: Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 18: 307-316, 2000.
11. Lazarus H.M, Heynesworth S.E., Gerson S.I., Caplan A.J.: Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J. Hematother.*, 6: 447-455, 1997.
12. Prackop D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74,1997.
13. Reyes M., Verfaillie C.M.: Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 938: 231-235, 2001.
14. Roberts J. Mesenchymal stem cells. *Vox sanguinis* 87, (Suppl. 2): 38-41, 2004.
15. Short B., Brouard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnam A., Simmons P.J.: Mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res.*, 34: 565-571, 2003.
16. Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A., Maini R.N.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.*, 2: 477-488, 2000.

## Regolazione dell'apoptosi

Rosangela Invernizzi, Erica Travaglino, Chiara Benatti

Medicina Interna ed Oncologia Medica, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

### Apoptosi: definizione e significato

Il termine apoptosi, coniato nel 1972 da Kerr et al. e derivato dai vocaboli greci  $\alpha\pi\omicron$  (da) e  $\pi\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$  (caduta), indica il processo fisiologico di morte cellulare programmata o suicidio cellulare, finalizzato a rimuovere cellule superflue o danneggiate e a mantenere un equilibrio omeostatico tra proliferazione e morte cellulare. Si differenzia dalla necrosi poichè è un processo attivo che richiede energia sotto forma di ATP ed espressione genica *de novo*, con sintesi di nuovo RNA e proteine, e culmina nell'attivazione di endonucleasi  $Ca^{++}$ -dipendenti che degradano il DNA cellulare, con formazione di frammenti oligonucleosomali. È caratterizzata da una combinazione di aspetti morfologici: addensamento della cromatina, frammentazione del nucleo, restringimento della cellula con formazione di invaginazioni citoplasmatiche e, in seguito, rottura in frammenti detti corpi apoptotici, che vengono fagocitati da parte dei macrofagi. A differenza della necrosi, l'apoptosi non induce una reazione infiammatoria.

L'apoptosi è implicata in vari processi biologici, sia fisiologici che patologici, dall'embriogenesi all'invecchiamento, dalla normale omeostasi cellulare a numerose malattie dell'uomo. Un eccesso di apoptosi caratterizza malattie neurodegenerative, ischemiche, autoimmuni, AIDS, mentre una riduzione o inibizione dell'apoptosi si osserva in molte neoplasie.

Lo studio delle basi molecolari della morte programmata e della sopravvivenza cellulare rappresenta una delle aree più affascinanti della ricerca di laboratorio e, negli ultimi anni, ha consentito di conoscere i meccanismi coinvolti nelle varie fasi del processo apoptotico. Studi comparativi in *Caenorhabditis elegans* ed in cellule di varie specie animali oltre che di mammiferi hanno dimostrato che la regolazione genetica e molecolare dell'apoptosi si è altamente conservata durante l'evoluzione.

### Meccanismi apoptotici

Schematicamente gli stadi dell'apoptosi sono rappresentati dall'iniziazione, dalla modulazione o regolazione genetica e dai meccanismi effettori. Sono considerati

stimoli tutti quegli eventi che danno inizio al programma apoptotico. I segnali di morte includono farmaci citotossici, radiazioni gamma e ultraviolette, agenti chemioterapici che danneggiano il DNA, sottrazione di fattori di crescita, varie citochine che attivano i recettori di morte come il Fas e i recettori del TNF, una condizione di ipossia, il calore, la perdita di adesione. Attraverso una varietà di percorsi questi stimoli generano caratteristici modelli di espressione genica: il destino di vita o di morte della cellula viene determinato dai cosiddetti modulatori, molecole chiave pro- o anti-apoptotiche. Si tratta di proteine regolatrici del ciclo cellulare, enzimi ad attività chinasi o fosfatasi, fattori di trascrizione e oncoproteine come la famiglia del Bcl-2 e la p53. Qualora una cellula scelga di morire vengono attivati gli effettori. I principali effettori sono rappresentati da una famiglia di proteasi denominate caspasi. L'attivazione a cascata di questi enzimi porta all'attivazione di altri effettori o direttamente al clivaggio di componenti fondamentali della cellula come DNA, proteine del citoplasma e del citoscheletro. Con la rottura di questi substrati si verificano alterazioni morfologiche e biochimiche che destinano irreversibilmente la cellula a morire.

Nella figura 1 sono presentate in dettaglio le due principali vie apoptotiche, estrinseca ed intrinseca. Nella via estrinseca il legame del ligando (CD95-L, TNF) con il suo recettore induce la formazione di un complesso di morte con conseguente attivazione delle caspasi. La via intrinseca dell'apoptosi è invece mediata dai mitocondri e controllata dai membri della famiglia del Bcl-2. Gli stimoli di morte inducono il rilascio dai mitocondri di citocromo c e altri fattori. Le vie recettoriale e mitocondriale convergono a livello dell'attivazione della caspasi 3 e interagiscono tramite la proteina Bid. Una terza via apoptotica, innescata da stress del reticolo endoplasmatico, comporta l'attivazione della caspasi 12 e quindi, a catena, delle caspasi effettrici.

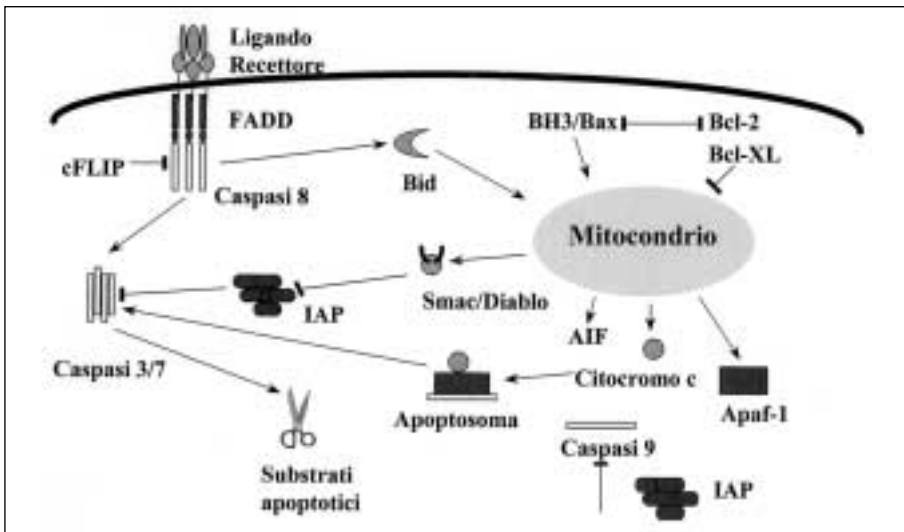


Fig. 1 - Vie apoptotiche

**Tab. 1** - Fattori che promuovono e fattori che sopprimono la vitalità cellulare.

Fattori anti-apoptotici	Fattori pro-apoptotici
IL-1, IL-6	Chemioterapia
G-CSF, GM-CSF	Radiazioni
FN- $\gamma$	IFN-a/b
Eritropoietina	TNF-a, TGF-b
Interazioni cellulari	Steroidi
p53, c-abl, ras mutanti	Ossidanti
Bcl-2, Bcl-XL	p53, c-myc, Fas <i>wild-type</i>
	Bax, Bad, Bid
	Cellule T citotossiche

L'apoptosi è regolata a vari livelli da numerosi fattori (Tab. 1). Il bilancio tra fattori che promuovono e fattori che sopprimono la vitalità cellulare è ciò che in ultima analisi determina il destino delle cellule, mentre dalla severità dell'insulto dipende la decisione di morire per apoptosi o necrosi.

### Recettori di morte

Sono attivati da stimoli estrinseci. L'interazione tra Fas (CD95/APO1) o recettore del TNF e del TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e appropriato ligando induce la trimerizzazione del recettore, la clusterizzazione del dominio di morte Fas-associato (FADD) o associato al recettore del TNF (TRADD) e la creazione di un complesso di segnalazione che induce la morte (DISC). Si ha quindi attivazione delle procaspasi 8 e 10. Gli eventi successivi dipendono dal tipo di cellula. In alcune cellule le caspasi effettrici 3 e 7 sono attivate direttamente dalla caspasi 8; in altre la forma attiva di caspasi 8 agisce tramite il clivaggio di un membro della famiglia del Bcl-2, il Bid, che induce la traslocazione e oligomerizzazione di Bax, con conseguente permeabilizzazione mitocondriale, rilascio di proteine pro-apoptotiche e successiva attivazione delle caspasi effettrici.

I segnali di morte risultanti dall'attivazione recettoriale sono regolati negativamente da un fattore di trascrizione nucleare (NF- $\kappa$ B), ad attività anti-apoptotica. Va ricordato che l'attivazione di questi recettori da parte dei rispettivi ligandi, oltre che svolgere un importante ruolo nel meccanismo dell'apoptosi, regola la proliferazione e differenziazione dei progenitori ematopoietici.

### Caspasi

Le caspasi (*cysteine aspartate-specific proteases*) rappresentano una famiglia numerosa di cisteina-proteasi, in grado di clivare i substrati in posizione C-terminale a residui di acido aspartico. Nei mammiferi si conoscono 14 caspasi, omologhe alla proteasi killer del *C. elegans*, denominata ced-3 (*cell death abnormal*). Sono sintetizzate come proenzimi inattivi e localizzate in diversi compartimenti cellulari. Si trovano in prevalenza nel citosol, ma possono localizzarsi anche nei mitocondri (procaspasi 2, 3 e 9), nel nucleo (procaspasi 2) e nell'apparato di Golgi (procaspasi 2). Si rilocalizzano per venire a contatto con i loro substrati durante l'iniziazione e l'esecuzione dell'apoptosi. L'attivazione delle caspasi è indotta da un clivaggio proteolitico tra domini con formazione di un

complesso tetrameric. Mentre nella fase di iniziazione le caspasi sono attivate da complessi che si formano in seguito all'interazione tra recettore di morte e ligando oppure, nella via intrinseca, in seguito al rilascio di fattori pro-apoptotici da parte dei mitocondri, gli esecutori finali del programma di morte cellulare sono attivati da altre proteasi (solitamente le caspasi iniziatrici) con un meccanismo a cascata e portano alla rottura di importanti costituenti cellulari, quali DNA, proteine strutturali, enzimi riparatori. Anche enzimi come granzime B, catepsina e calpaina possono determinare direttamente o indirettamente l'attivazione delle procaspasi effettrici.

A tutt'oggi sono stati identificati più di 280 substrati su cui le caspasi agiscono. È perciò importante che le caspasi non siano attivate in modo accidentale e che, una volta attivate, vengano controllate dalle proteine inibitrici dell'apoptosi.

### *Famiglia del Bcl-2*

Il Bcl-2, originariamente identificato attraverso lo studio della t(14;18) presente nel linfoma follicolare a cellule B, è il prototipo di una famiglia di geni che include almeno 20 membri, alcuni ad attività pro-apoptotica o "geni di morte" (Bak, Bax, Bcl-X<sub>S</sub>, Bid, Bad), altri ad attività anti-apoptotica o "geni di sopravvivenza" (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1). Molte delle proteine codificate da questi geni interagiscono attraverso una complessa rete di omo- ed eterodimeri e rappresentano i principali regolatori degli eventi mitocondriali che attivano la via intrinseca dell'apoptosi. Controllano inoltre la regolazione dei livelli intracellulari di Ca<sup>++</sup> mediata dal reticolo endoplasmatico. Possono modulare direttamente l'attività caspasiaca attraverso molecole adattatrici come BAR, Bap-31 e Aven.

La maggioranza dei membri della famiglia del Bcl-2 possiede un dominio trans-membrana C-terminale, con cui si inserisce sulla membrana mitocondriale esterna, sul reticolo endoplasmatico e sull'involucro nucleare. Le proteine di questa famiglia inoltre sono caratterizzate da specifiche regioni di omologia denominate domini di omologia del Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4), critici per la loro funzione. I membri ad attività anti-apoptotica contengono tutti e quattro i domini, mentre quelli ad attività pro-apoptotica sono privi di un dominio BH4, ad eccezione di Bcl-X<sub>S</sub>. Il dominio BH3 è cruciale per l'interazione tra i vari membri.

### *P53*

La p53 è un oncosoppressore che, mediante attivazione trascrizionale del gene p21<sup>waf1-cip1</sup>, causa l'arresto nelle fasi G1 e G2 del ciclo di cellule esposte ad agenti che danneggiano il DNA, con funzione quindi critica nel preservare l'integrità del genoma in risposta a trattamenti con agenti citotossici. Rappresenta anche un potente induttore della morte programmata in cellule con severo danno del DNA, mediante attivazione trascrizionale di geni PIG (*p53-induced genes*) pro-apoptotici (Bax, Fas et al.). Le basi molecolari della decisione se indurre arresto del ciclo per riparare il DNA o indurre apoptosi sono ancora sconosciute. L'attività della p53 è regolata dalla proteina MDM-2 (*mouse double minute-2*), la cui sintesi è indotta dalla p53 stessa, a cui si lega destinandola alla degradazione da parte del proteasoma.



### *Mitocondri*

I mitocondri svolgono un ruolo centrale nel processo apoptotico. L'attivazione della via mitocondriale determina una riduzione del loro potenziale di membrana ed il rilascio nel citosol dallo spazio intermembrana di vari fattori pro-apoptotici, quali citocromo c, AIF (*apoptosis-inducing factor*), Smac (*second mitochondrial activator of caspases*), OMI ed endonucleasi G. La conseguente interruzione della catena di trasporto degli elettroni porta all'aumento di concentrazione all'interno della cellula delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Le possibili modalità d'azione dei membri della famiglia del Bcl-2 nel consentire il rilascio di questi fattori sono molteplici: formazione di pori, interazione con altre proteine mitocondriali come VDAC (*voltage-dependent anion channel*) e ANT (*adenosine nucleotide transporter*), sia per la formazione di pori, che per la modulazione dell'omeostasi mitocondriale, oligomerizzazione per la formazione di canali ionici.

L'evento chiave nella via mitocondriale dell'apoptosi è rappresentato dalla traslocazione nel citosol del citocromo c, componente essenziale della catena respiratoria mitocondriale, normalmente ancorato sulla superficie esterna della membrana mitocondriale interna tramite la cardiolipina. Nel citosol il citocromo c in presenza di dATP si lega al fattore Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) e alla procaspasi 9 formando un complesso denominato apoptosoma. Si ha quindi attivazione della caspasi 9, che dà inizio alla cascata proteolitica che determina la morte cellulare.

Il fattore AIF e l'endonucleasi G contribuiscono invece alla degradazione del DNA attraverso vie caspasi-indipendenti.

I fattori Smac/DIABLO (*direct IAP-binding protein with low PI*) e HtrA2/OMI (*high-temperature requirement protein A2*) svolgono funzione pro-apoptotica antagonizzando proteine inibitrici dell'apoptosi denominate IAP.

Da notare che il trattamento citotossico, radiante e chemioterapico, può indurre apoptosi attraverso l'attivazione della via mitocondriale. L'interazione tra mitocondri e nucleo danneggiato è probabilmente mediata dalla caspasi 2, localizzata nel nucleo.

### *Proteine IAP*

Nell'uomo sono state identificate 8 proteine IAP (proteine inibitrici dell'apoptosi) e precisamente: NAIP (BIRC1), cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), survivina (BIRC5), Apollon (BRUCE o BIRC6), Livina (BIRC7) e ILP-2 (BIRC8). L'aspetto strutturale caratteristico di queste proteine è costituito dalla presenza del dominio BIR (*baculoviral-IAP-repeat*) tramite cui alcune di esse si legano direttamente a specifiche caspasi, inibendone l'attività. Proteine IAP quali XIAP, cIAP1, cIAP2 e Livina possiedono inoltre domini RING tramite cui svolgono funzione di E3 ubiquitina ligasi, determinando la ubiquitinilazione e degradazione di specifiche caspasi da parte del proteasoma.

Il fattore mitocondriale Smac, legandosi al dominio BIR delle IAP, ne antagonizza l'attività inibitoria nei confronti delle caspasi.

Le proteine IAP survivina e Apollon, contenenti un singolo dominio BIR, svol-

gerrebbero un importante ruolo di regolazione non solo dell'apoptosi ma anche della divisione cellulare. In particolare, in condizioni normali, la survivina viene espressa solo durante il ciclo mitotico, svolgendo il ruolo di proteina "passenger", essenziale per la segregazione cromosomica. In quasi tutte le neoplasie solide e leucemie umane risulta sovraespressa, contribuendo a promuovere un' aberrante vitalità cellulare e ad alterare il bilancio omeostatico tra crescita e morte cellulare. Apollon è una proteina di dimensioni molto grandi (530 kDa) associata a membrane, incluso l'apparato di Golgi, i cui aspetti funzionali sono stati in parte chiariti di recente: essendo in grado di legarsi a Smac e alla caspasi 9, determinandone l'ubiquitinilazione e favorendone la degradazione proteasomale, questa proteina svolgerebbe un ruolo essenziale nella prevenzione dell'apoptosi indotta da Smac.

### Proteasoma

Il proteasoma 26S è una proteasi di grandi dimensioni (2,5 MDa) costituita da una porzione di 20S ad attività proteolitica ricoperta ad una o entrambe le estremità da una porzione regolatoria 19S (Fig. 2). La sua attività si esplica solo nei confronti di substrati destinati alla distruzione dal legame con la proteina ubiquitina

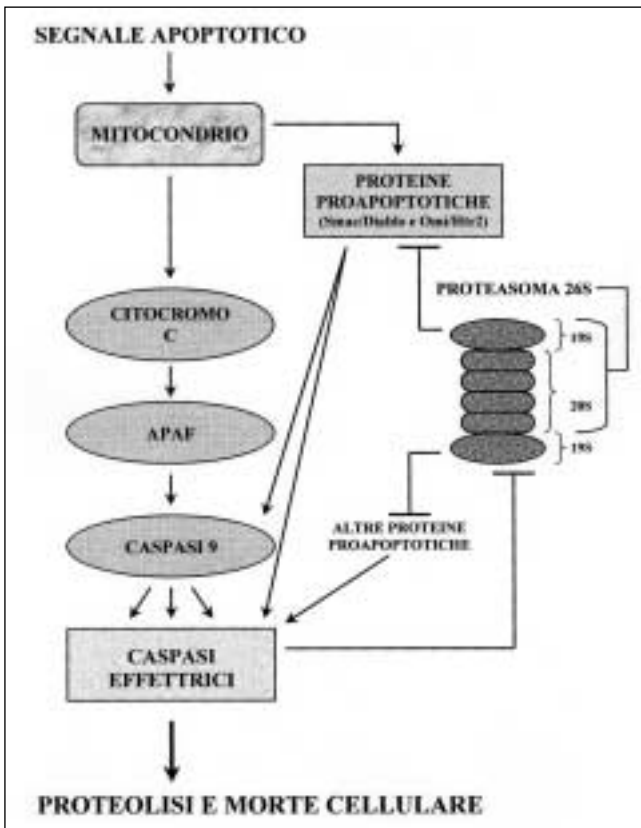


Fig. 2 - Ruolo del proteasoma nell'apoptosi

ed è quindi altamente selettiva e specifica. Interviene nel controllo di vari processi fisiologici, inclusi lo sviluppo embrionale, il ciclo cellulare e l'espressione genica. Per quanto riguarda il processo apoptotico, il sistema ubiquitina-proteasoma contribuisce a prevenire la prematura morte cellulare distruggendo varie proteine pro-apoptotiche, così da mantenerne bassi i livelli intracellulari ed evitare un'attivazione ectopica della cascata apoptotica. I substrati su cui agisce sono rappresentati da molecole regolatorie quali p53, membri pro-apoptotici della famiglia del Bcl-2, proteine IAP e Smac. L'induzione dell'apoptosi da parte di opportuni stimoli determina inattivazione del proteasoma per clivaggio delle sue proteine da parte delle caspasi, con conseguente incapacità a riconoscere e quindi a distruggere i substrati ubiquitinilati. Si determina così un ulteriore accumulo di molecole pro-apoptotiche, con conseguente amplificazione del segnale apoptotico.

### **Disregolazione dell'apoptosi nelle neoplasie e implicazioni terapeutiche**

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che una difettosa apoptosi può contribuire all'insorgenza delle neoplasie, determinando un'alterazione del bilancio tra proliferazione e morte cellulare. Poiché la risposta alle attuali terapie anti-neoplastiche (chemioterapia e terapia radiante) dipende dalla tendenza all'apoptosi delle cellule, una riduzione dell'apoptosi, oltre che importanza fisiopatologica, ha implicazioni terapeutiche, potendo condizionare l'insorgenza di chemio- e radioresistenza.

Le anomalie responsabili del difetto di apoptosi nelle neoplasie sono in parte note (Tab. 2).

Sulla base di queste recenti acquisizioni molecolari sono stati proposti nuovi approcci terapeutici in grado di modulare l'apoptosi a diversi livelli (Tab. 3), da impiegare in associazione alle terapie citotossiche tradizionali per potenziarne l'efficacia. Alcuni trattamenti sono attualmente in corso di sperimentazione clinica, come l'uso di oligonucleotidi antisenso contro l'RNAm del Bcl-2 nel linfoma follicolare e nel Ca della mammella; altri sono stati utilizzati solo in studi preclinici, come ad esempio il TRAIL, che si è mostrato efficace contro cellule di mieloma, leucemia linfatica cronica e linfoma di Burkitt, ma il cui impiego clinico è ostacolato dalla potenziale epatotossicità. Risultati molto promettenti sono stati ottenuti recentemente con l'impiego di un inibitore del proteasoma, il bortezomid, nella terapia del mieloma multiplo.

**Tab. 2** - Patogenesi del difetto di apoptosi nelle neoplasie.

- 
- Riduzione di citochine che promuovono l'apoptosi e/o aumento di citochine che promuovono la sopravvivenza
  - *Down*-regolazione dei recettori di morte (Fas)
  - Sovraespressione di geni anti-apoptotici (Bcl-2, survivina)
  - Mutazione di geni apoptosi-correlati (p53, caspasi)
  - Difetti nel segnale apoptotico
  - Incontrollata degradazione di proteine da parte del proteasoma
-

**Tab. 3** - Approcci terapeutici.

- 
- Oligonucleotidi anti-senso (Bcl-2, survivina)
  - TRAIL ricombinante
  - Inibitori delle caspasi
  - Terapia genica (*up*-regolazione di Bax)
  - Inibitori di Bcl-2 e Bcl-XL
  - Inibitori delle IAP
  - Inibitori del proteasoma
- 

La ricerca in questo campo appare molto stimolante, anche se ostacolata dalla eterogeneità delle neoplasie e dalla variabilità clonale delle stesse. Una migliore comprensione dei complessi meccanismi molecolari che regolano il fenomeno apoptotico potrebbe consentire in futuro l'introduzione di nuove più efficaci strategie terapeutiche.

### **Bibliografia essenziale**

1. Fadeel B., Orrenius S., Zhivotovsky B: The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000; 14: 1514-25.
2. Hengartner M.O.: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.
3. Igney FH., Krammer PH.: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 277-88.
4. Nicholson D.W.: From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407: 810-16.
5. Okada H., Mak T.W.: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 592-603.
6. Reed J.C.: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2941-53.
7. Reed J.C.: Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.
8. Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P.: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23: 2861-74.
9. Sun X.M., Butterworth M., MacFarlane M., Dubiel W., Ciechanover A., Cohen G.M.: Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* 2004; 14: 81-93.
10. Zhang H.G., Wang J., Yang X., Hsu H.C., Mountz J.D.: Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 2004; 23: 2009-15.

# Telomero e telomerasi: biologia e osservazioni preliminari nelle neoplasie ematologiche

*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,  
Silvia Calatroni, Ilaria Giardini, Barbara Rocca, Rita Zappatore,  
Marilena Caresana, Jessica Quarna*

Dipartimento di Scienze Ematologiche, Pneumologiche, Cardiovascolari Mediche e Chirurgiche,  
Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

## Introduzione

Il materiale genetico delle cellule eucariotiche è organizzato nei cromosomi. Questa suddivisione determina un elevato tasso di ricombinazione e un casuale rimescolamento del materiale genetico durante la riproduzione. Ciò consente di aumentare la diversità genetica all'interno della popolazione, ma la struttura lineare dei cromosomi pone alla cellula i seguenti problemi:

1. come proteggere il DNA situato a livello delle estremità libere dei cromosomi da processi di degradazione e di fusione?
2. come replicare il DNA situato a livello di tali regioni?

Entrambi i problemi vengono risolti dai telomeri, complessi di DNA e proteine che formano un cappuccio a livello dell'estremità dei cromosomi. In tal modo i telomeri impediscono la degradazione dell'estremità cromosomiche ad opera di nucleasi e lo sviluppo di ricombinazioni cromosomiche aberranti. Inoltre consentono alla cellula di distinguere tra rotture casuali del DNA ed estremità naturali dei cromosomi, permettono una normale segregazione dei cromosomi durante la mitosi e durante la meiosi, un normale attacco dei cromosomi alla matrice nucleare, il superamento di quello che va sotto il nome di "end-replication problem". Per comprendere cosa sottintende questo termine bisogna ricordare che nel 1908 Carrel aveva proposto che le cellule dei vertebrati fossero immortali, ma questo concetto venne smentito nel 1961 da Hayflick e Moorehead. Questi Autori dimostrarono che le cellule somatiche normali presentano una fase proliferativa di durata limitata e strettamente dipendente dal numero di divisioni cellulari. Dopo un certo numero di divisioni la cellula entrerebbe in uno stato definito di senescenza replicativa. Nel 1973 Olovnikov ipotizzò che il limite di Hayflick ("Hayflick limit") dipendesse dal progressivo esaurimento dei geni (telogeni o telomeri) situati a livello dell'estremità dei cromosomi. Tale ipotesi è stata con-

fermata dalla moderna osservazione che la DNA polimerasi sintetizza il DNA procedendo unicamente nella direzione  $5' \rightarrow 3'$  e necessita di una breve sequenza di RNA per iniziare la sintesi del DNA stesso. Pertanto la DNA polimerasi consente la normale replicazione di un'unica catena di DNA mentre sintetizza l'altra ("lagging strand") in modo incompleto. Ad ogni divisione cellulare il materiale genetico situato all'estremità cromosomiche viene perso progressivamente. Tale fenomeno è quello che viene appunto definito "end replication problem". Nel 1988 furono identificate le sequenze telomeriche e venne ulteriormente confermata l'ipotesi di Olovnikov. Ad ogni divisione cellulare il DNA telomerico, corrispondente ai telogeni di Olovnikov, si accorcia di circa 25-200 paia di basi (bp). Pertanto la lunghezza dei telomeri rappresenta un indicatore molecolare della potenzialità proliferativa della cellula e dal 1990 in poi la progressiva erosione dei telomeri è considerata il "mitotic clock" della cellula.

I meccanismi attraverso i quali l'accorciamento della lunghezza dei telomeri induce la senescenza replicativa o addirittura la morte cellulare programmata (apoptosi) sono stati solo parzialmente chiariti. Il gene TP53, mappato in 17p13, ed il gene Rb, mappato in 13q14, svolgono un ruolo fondamentale a tale riguardo. Tali geni impediscono la replicazione di cellule che hanno compiuto diverse divisioni e che sono perciò predisposte a mutazioni geniche indotte dall'instabilità cromosomica. Tuttavia, cellule che presentano la perdita o la mutazione di uno dei geni oncosoppressori riportati riescono a sopravvivere e sviluppano un'importante instabilità genomica che attraverso rotture e fusioni cromosomiche successive porta all'acquisizione di sempre maggiori alterazioni geniche. Durante questa fase chiamata "crisis" la maggior parte delle cellule muore per apoptosi, ma alcune cellule sopravvivono essendo capaci di mantenere stabile la lunghezza dei propri telomeri. Questo risultato viene raggiunto attraverso l'attivazione costitutiva della telomerasi o attraverso un meccanismo che va sotto il nome di "alternative lengthening of telomeres, ALT", probabilmente dipendente dalla ricombinazione.

### **Telomeri: struttura e funzione**

Nel 1978 Blackburn descrisse per la prima volta le sequenze di DNA ripetitivo situate a livello delle regioni telomeriche della *Tetrahymena*. Nell'uomo i telomeri sono formati da sequenze ripetitive  $5'$ -TTAGGG- $3'$  non codificanti a doppia catena della lunghezza di 2-30 kilobasi (Kb) e da un tratto di 50-150 nucleotidi ("nucleotide overhangs") di sequenze ripetitive  $5'$ -TTAGGG- $3'$  a singola catena. La stabilità del telomero dipende dal legame non covalente che si crea tra tali strutture a doppia ed a singola catena con le due proteine, TRF1 ("telomeric repeat binding factor 1) e TRF2. La prima, codificata da un gene che mappa in 8q13, reprime la telomerasi e impedisce l'allungamento dei telomeri quando questi raggiungono una dimensione critica. L'azione di TRF1 è mediata da un lato dalla tankirasi (TRF1-interacting, ANKYrin-related ADP-ribose polymerase) che favorisce il distacco di TRF1 dal telomero rendendo quest'ultimo accessibile alla telomerasi e dall'altro dalla proteina TIN2 "TRF1-interacting nuclear protein 2" che favorisce il legame al DNA telomerico. Viceversa, TRF2, codificata da un

gene che mappa in 16q22.1, impedisce la fusione cromosomica mantenendo la struttura a singola catena delle code ricche di guanina. È probabile che le proteine TRF1 e TRF2 formino un sostegno per un complesso multiproteico più grande, di cui fa parte la tankirasi. Inoltre è stato osservato che il DNA telomerico umano può riavvolgersi su se stesso formando quello che viene definito “t-loop”, con le code ricche in guanina che invadono le sequenze ripetitive a doppia catena formando il “D-loop”. Le proteine TRF1 e TRF2 potrebbero stabilizzare e rendere possibile lo sviluppo di “t- e D-loops”. Un’altra proteina che interagisce con i telomeri è una subunità di una proteina chinasi DNA dipendente, l’eterodimero Ku. La funzione dei telomeri è già stata descritta.

### **Telomerasi: struttura e funzioni**

La telomerasi è una trascrittasi inversa terminale specializzata che presenta una massa molecolare di circa 1000 kDa. Tale ribonucleoproteina è formata da una catena di RNA (hTERC) e da un enzima (hTERT). Quest’ultimo sintetizza le sequenze ripetitive situate all’estremità 3’ dei cromosomi umani utilizzando hTERC come template.

#### *RNA telomerastico (hTERC)*

Meglio noto come “human telomerase RNA component” (hTERC). È codificato da un gene a singola copia mappato a livello della banda 3q26.3. La presenza di aree ricche in guanina, “CpG islands”, a livello della regione che promuove la trascrizione del gene fa supporre che l’espressione di quest’ultimo dipenda dai livelli di metilazione del DNA. Inoltre la medesima regione presenta aree di legame con i recettori per i glucorticoidi, per il progesterone e per gli androgeni e per fattori trascrizionali coinvolti nell’emopoiesi e nella leucemogenesi. Nell’uomo il trascritto maturo di hTERC è lungo 451 nucleotidi e non presenta la poliadenilazione. hTERC contiene un’intera sequenza e i 5/6 di una sequenza complementare a quella del telomero, cioè la sequenza 5’-CUAACCCUAAC-3’ lunga 11 nucleotidi. Si ritiene che hTERC si leghi alla sequenza ripetitiva terminale del DNA telomerico alla cui estremità 3’ vengono poi aggiunti ad opera della subunità catalitica della telomerasi desossinucleotidi. Successivamente hTERC si sposta all’estremità 3’ appena sintetizzata del telomero e la sintesi prosegue.

#### *Attività catalitica (hTERT)*

hTERT significa “human telomerase reverse transcriptase”. È una proteina del peso molecolare di 127 kDa e lunga 1132 amminoacidi, codificata da un gene a singola copia mappato a livello della banda 5p15.33 e lungo 16 esoni. La regione che promuove la trascrizione del gene contiene siti di legame per vari fattori trascrizionali. Gli estrogeni e la proteina c-myc fanno aumentare l’espressione di hTERT, mentre la metilazione delle “CpG islands” del promotore del gene e la de-acetilazione degli istoni la fanno diminuire. Altri meccanismi che regolano l’espressione del gene sono fenomeni di “splicing” alternativo e processi di fosforilazione e defosforilazione. Un repressore dell’espressione di hTERT è mappato a livello delle braccia corte del cromosoma 3.

## Telomeri e telomerasi nella cancerogenesi

Abbiamo già descritto l'importante ruolo svolto dai telomeri e dalla telomerasi nella trasformazione e crescita neoplastica. Dati recenti, ottenuti utilizzando modelli murini, indicano che il tipo di cellula e l'attivazione di oncogeni specifici siano inizialmente capaci di garantire la trasformazione neoplastica quando i telomeri sono di dimensioni sufficientemente lunghe. Tuttavia, tutti questi modelli sperimentali hanno dimostrato che alla fine in ogni caso si giunge all'attivazione della telomerasi che quindi è assolutamente necessaria per la crescita tumorale a lungo termine. Vi sono poi prove che i meccanismi di mantenimento della lunghezza dei telomeri mediati da hTERT e da "ALT" non siano equivalenti dal punto di vista funzionale. Questa ipotesi si basa su due osservazioni:

1. La maggior parte delle neoplasie presenta l'attivazione di hTERT, ma il 10-15% dei tumori presenta l'attivazione del processo noto come "ALT". In realtà, l'attivazione di hTERT o dell'altro meccanismo varierebbe a seconda del tipo di tessuto che subisce la trasformazione neoplastica. Le neoplasie di derivazione dal tessuto epiteliale presentano l'attivazione di hTERT, che è da sola sufficiente a promuovere la cancerogenesi attraverso l'attivazione di H-RAS, mentre quelle di derivazione dal tessuto mesenchimale presentano l'attivazione del processo noto come "ALT". Le cellule in cui è operante quest'ultimo meccanismo sono caratterizzate da un elevato grado di variabilità nella lunghezza dei telomeri e dalla presenza di corpi nucleari ALT-associati tipicamente osservati nella leucemia acuta promielocitica (LAP). Questi ultimi sono costituiti da DNA telomerico e da proteine coinvolte nei processi di ricombinazione e di replicazione del DNA.
2. La popolazione cellulare con l'attivazione del processo noto come "ALT" presenterebbe sia telomeri particolarmente lunghi che telomeri particolarmente corti. In queste cellule per l'attivazione di "ALT" i telomeri da molto corti potrebbero diventare relativamente lunghi ma rimarrebbero soggetti ad un continuo logoramento. Pertanto la capacità proliferativa e la sopravvivenza di queste cellule sarebbero proprio limitate dall'alterata funzionalità dei telomeri, responsabile dello sviluppo di traslocazioni complesse dimostrabili con l'indagine citogenetica. Al contrario la popolazione cellulare che presenta l'attivazione di hTERT presenta telomeri perfettamente funzionali. Perciò è questa la via che la cellula neoplastica tende ad utilizzare per avere telomeri di sufficiente lunghezza e normalmente funzionanti.

Dati recenti indicano che il ruolo di hTERT nel promuovere una neoplasia non consiste solo nel mantenere telomeri di normale lunghezza, ma anche nello svolgere altre funzioni. Infatti:

- fibroblasti umani che esprimono un allele oncogenico di H-RAS e l'antigene T grande e t piccolo di SV40 acquisiscono la capacità di crescere in modo non aderente ma non vanno incontro a trasformazione neoplastica. Quest'ultima avviene unicamente con l'aggiunta di hTERT o di una versione di hTERT che non è in grado di indurre l'allungamento dei telomeri. (Stewart, 2002);



- in tumori murini con processo “ALT” attivato ma privi di mTERC e di CDKN2A (p15<sup>INKa</sup>) Chang e collaboratori hanno osservato che ALT è insufficiente da solo a dare la trasformazione neoplastica che invece avviene quando si ha la ricostituzione della telomerasi attraverso l’aggiunta di mTERC. Pertanto la telomerasi è assolutamente necessaria per una normale funzionalità dei telomeri come già più sopra riportato;
- nel topo, che presenta telomeri sufficientemente lunghi e quindi non in grado di influenzare la trasformazione maligna, quest’ultima si verifica solo quando si ha un’elevata attività telomerasica;
- il livello di telomerasi sarebbe strettamente correlato allo stadio di molte neoplasie umane, facendo ipotizzare che un’aumentata attività della telomerasi possa giocare un ruolo aggiuntivo nella progressione delle neoplasie.

Non si conoscono altri meccanismi con cui la telomerasi induce la trasformazione neoplastica. È stato però recentemente riportato che le cellule che presentano l’attività catalitica di hTERT sono più resistenti agli stimoli che inducono l’apoptosi. La telomerasi potrebbe anche stabilizzare le alterazioni cromosomiche aggiuntive che si sono sviluppate dopo il periodo chiamato “crisis” favorendo la proliferazione di un clone immortale oppure il mantenimento di quelle anomalie citogenetiche che garantiscono un più aggressivo comportamento clinico della neoplasia.

### **Telomeri e telomerasi nelle cellule emopoietiche**

Dieci anni fa circa venne dimostrato che la lunghezza dei telomeri nelle cellule staminali emopoietiche è strettamente correlata all’ontogenesi e alla loro età. Infatti le cellule staminali presenti nel fegato fetale e nel sangue del cordone ombelicale presentano telomeri più lunghi di 4 Kb rispetto a quelli delle cellule staminali presenti nel midollo osseo adulto o nel sangue periferico. Pertanto sebbene tali cellule possiedano quella che va sotto il nome di “self-renewal capacity” anch’esse hanno una potenzialità replicativa limitata man mano che l’individuo invecchia. Si ritiene che le cellule staminali emopoietiche possano andare incontro a 100-5000 divisioni. L’accorciamento dei telomeri è rapido dopo il primo anno di vita (dopo 15-30 divisioni cellulari), mostra un lento declino fino a 50-60 anni dopodiché torna ad essere rapido. L’erosione dei telomeri è anche più rapida prima della nascita essendo pari a circa 240 paia di basi (bp) alla settimana. Il fenomeno avviene poi più rapidamente nei linfociti che non nei granulociti, indicando una più precoce compromissione delle funzioni immunologiche. La lunghezza media dei telomeri nelle cellule staminali emopoietiche è geneticamente determinata e varia non solo tra i diversi individui ma anche all’interno di una stessa cellula. Per una normale emopoiesi è necessario che la cellula emopoietica presenti un minimo di sequenze ripetitive a livello dei telomeri, ma la sua vitalità e la stabilità cromosomica dipende unicamente dal telomero più corto piuttosto che dalla lunghezza media dei telomeri. La presenza di un minimo di sequenze telomeriche impedisce l’attivazione di quel processo che va sotto il ter-

mine di “telomere checkpoint”, che controlla la progressione della cellula staminale lungo le varie fasi del ciclo cellulare e la sua divisione.

Le cellule staminali che progrediscono lungo le varie fasi del ciclo cellulare presentano una certa attività telomerastica che si riduce progressivamente nella loro progenie di cellule più mature. In presenza di citochine però si ha un nuovo aumento dell'espressione della telomerasi. Anche la cellula tumorale, che presenta un'elevata capacità di autorinnovamento possiede una telomerasi costitutivamente espressa e anche in questo caso tale attività si riduce progressivamente quando s'induce la differenziazione della cellula tumorale stessa, utilizzando acido all-trans retinico (ATRA) o dimetilsulfossido (DMSO). In conclusione l'attivazione costitutiva della telomerasi può essere considerata un marcatore della potenziale capacità della cellula di automantenersi (“self-renewal”). Quindi la possibilità di aumentare costitutivamente l'espressione della telomerasi potrebbe essere sfruttata per espandere le cellule staminali emopoietiche ed i loro progenitori in vista di un loro possibile impiego in campo trapiantologico o nella medicina rigenerativa.

L'attivazione della telomerasi nelle cellule staminali emopoietiche non implica telomeri stabili e di normale lunghezza. In questo caso l'aumentata espressione della telomerasi è insufficiente ad impedire l'erosione dei telomeri, ma è importante perché la cellula sopravviva senza proliferare. È stato recentemente riportato che l'aumentata espressione di hTERT allunga la longevità dei T-linfociti.

## **Telomeri e telomerasi nelle neoplasie ematologiche**

### *Leucemie acute*

Alla diagnosi il 75% dei pazienti con leucemia acuta linfoide o mieloide presenta un aumento dell'attività telomerastica, che potrebbe dipendere dall'intensa attività proliferativa delle cellule leucemiche. L'attività telomerastica è comunque di solito inferiore rispetto a quella osservata nei tumori solidi. Nella maggior parte dei casi i telomeri sono di breve lunghezza. Un numero sempre crescente di Autori ha descritto l'associazione tra sequenze telomeriche ripetitive interstiziali e traslocazioni cromosomiche nelle LA. Nonostante ciò il ruolo svolto da tali sequenze telomeriche nella patogenesi e nella definizione delle caratteristiche biologiche e cliniche della malattia sono tuttora sconosciute.

Vari studi hanno dimostrato che il livello di attività telomerastica ha valore prognostico indipendente. Difatti i pazienti con elevata attività telomerastica presentano una probabilità di ottenere una remissione completa (RC) ed una sopravvivenza inferiori rispetto a quelle dei pazienti con normale attività. Inoltre il livello di telomerasi è strettamente correlato al decorso clinico. I pazienti che raggiungono la RC presentano normali livelli di telomerasi, ma questa torna ad aumentare qualora si verifichi una ripresa della malattia.

### *Sindromi mielodisplastiche*

Si tratta di un disordine oncoematologico caratterizzato da livelli di telomerasi più bassi rispetto a quelli osservati nelle LA, ma più alti rispetto a quelli riscon-

trabili nelle cellule del midollo osseo di soggetti sani. La maggior parte degli Autori ha pertanto focalizzato la propria attenzione sulla lunghezza dei telomeri, parametro indipendente dalla percentuale di blasti midollari e forse strettamente correlato all'alta incidenza (20-30%) di cariotipi complessi (con più di tre alterazioni cromosomiche) dal momento che questi ultimi potrebbero essere causati da telomeri di lunghezza ridotta. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che geni situati nelle vicinanze di telomeri accorciati possono andare incontro ad un processo di silenziamento, similmente a quanto avviene con la metilazione genica. La "fluorescence in situ hybridization" (FISH) ha dimostrato che i granulociti dei pazienti con SMD presentano telomeri più corti rispetto a quelli di pazienti della stessa età che invece presentano una sindrome da insufficienza midollare. Ciò è probabilmente dovuto al rapido turn-over delle cellule staminali displastiche. Pertanto i corti telomeri che si osservano nelle SMD potrebbero essere espressione del numero di divisioni cellulari compiute dalla cellula staminale e della sua instabilità genomica. Un'associazione ricercata è stata quella tra attività telomerasica e livelli di apoptosi. Dati recenti indicano che l'attivazione dell'apoptosi si associa ad una scarsa espressione di hTERT e i pazienti con elevati livelli di caspasi 3 ma bassi livelli di hTERT sono quelli a prognosi peggiore. La correlazione tra lunghezza dei telomeri e comparsa di anomalie citogenetiche e molecolari al momento della progressione della malattia rappresenta un importante campo di ricerca.

#### *Leucemia mieloide cronica*

Le cellule dei pazienti con LMC presentano telomeri di lunghezza significativamente più breve rispetto a quella delle cellule di soggetti sani; inoltre la lunghezza dei telomeri è strettamente correlata alla fase della malattia: le cellule di pazienti con LMC in fase cronica presentano telomeri più lunghi rispetto a quelli delle cellule di pazienti con LMC in crisi blastica. La presenza di telomeri corti già durante la fase cronica si associa ad una più rapida evoluzione verso la crisi blastica, ma non sembra avere alcun impatto sulla sopravvivenza. Tuttavia, uno studio recente, il primo che ha correlato la riduzione di lunghezza dei telomeri ad un'aumentata attività telomerasica, ha dimostrato che tra i pazienti trattati con alfa interferone quelli con telomeri accorciati presentano la più breve sopravvivenza. Un altro studio condotto in un gruppo limitato di pazienti ha osservato che i pazienti che mantengono telomeri di lunghezza ridotta prima e dopo terapia con alfa interferone non raggiungono la remissione citogenetica, raggiunta invece da quei pazienti che presentano corti telomeri alla diagnosi ma una normale lunghezza dei telomeri dopo alfa interferone. Uno studio ancora più recente ha dimostrato che un'alta attività telomerasica già durante la fase cronica si associa ad una più rapida evoluzione verso la crisi blastica e ad una breve sopravvivenza.

È stato inoltre proposto che la resistenza all'imatinib mesilato possa dipendere dal fatto che quest'ultima molecola inibisce l'attività kinasica di BCR/ABL ma non blocca altre vie di segnale. Particolarmente importante a tale riguardo è l'osservazione che il trattamento prolungato con imatinib mesilato potrebbe causare

l'attivazione della telomerasi con recupero delle capacità proliferative della cellula. Vari recenti studi hanno riportato una continua interazione tra telomerasi, BCR/ABL e protein chinasi C. In particolare BCR/ABL svolge un'azione inibitoria nei confronti della telomerasi, mentre la proteina chinasi C attiva la telomerasi. L'imatinib mesilato avendo una scarsa azione nei confronti della proteina chinasi C ed essendo un potente inibitore di BCR/ABL potrebbe indurre l'attivazione della telomerasi stessa.

### *Malattie linfoproliferative*

I telomeri delle cellule di leucemia linfatica cronica sono normali o più corti del normale mentre i livelli di telomerasi sono bassi nella maggior parte dei pazienti, specie in quelli con malattia in stadio iniziale. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che le cellule hanno raggiunto un buon livello di differenziazione o sono per la maggior parte nella fase G0 del ciclo cellulare. Tuttavia già negli stadi iniziali una piccola quota di pazienti tende ad avere alti livelli di telomerasi. Si tratta di pazienti che esprimono ZAP70 all'immunofenotipo e che sono poco responsivi alla terapia. Tutti i pazienti in stadio avanzato tendono ad avere alti livelli di attività telomerasica.

Nei pazienti con linfomi non-Hodgkin i livelli di attività telomerasica devono essere attentamente valutati. Infatti l'attività telomerasica associata ad una fisiologica iperplasia del tessuto linfoide tonsillare è superiore a quella che si associa al tessuto linfomatoso. Inoltre le cellule del centro germinativo presentano alti livelli di telomerasi. Pur con tutti questi limiti il 50% circa dei pazienti con linfoma B presenta elevati livelli di telomerasi, più alti nelle forme di grado elevato che nelle forme a basso grado di malignità.

### **Telomerasi come possibile bersaglio terapeutico**

Come abbiamo visto la cellula tumorale presenta una riattivazione della telomerasi e proprio per questo motivo hTERT potrebbe diventare un ottimo bersaglio di terapia antitumorale. Infatti recentemente gli inibitori della telomerasi sono stati proposti come nuovi farmaci antitumorali. Vari studi condotti su linee cellulari o su cellule leucemiche fresche, prelevate direttamente ai pazienti, hanno valutato i rapporti tra espressione di hTERT ed induttori della differenziazione cellulare, primo tra tutti l' ATRA, molecola che assieme alle antracicline ha modificato la prognosi dei pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica. L' ATRA è il ligando naturale per i recettori nucleari dell'acido retinoico (RAR), mentre l'acido 9-cis retinico si lega sia ai recettori nucleari (RAR) che ai recettori X (RXR) dell'acido retinico. È stato dimostrato che il trattamento con ATRA a dosi farmacologiche determina accorciamento della lunghezza dei telomeri, instabilità cromosomica e blocco della proliferazione cellulare se l'espressione di hTERT e conseguentemente l'attività telomerasica si riducono al 10-40%. Se invece l'espressione di hTERT e della telomerasi si mantengono al di sopra del 40%, dopo un periodo di arresto della crescita cellulare indotto dall'accorciamento dei telomeri, queste linee cellulari possono sopravvivere riattivando la telomerasi.

Pertanto gli effetti osservati sono dipendenti dalla dose di ATRA impiegato. Studi più recenti condotti sulle stesse linee cellulari hanno poi indicato che il trattamento prolungato di tali linee cellulari con ATRA e con agonisti recettore-specifici dell'acido retinico è capace di bloccare più efficacemente l'espressione di hTERT e quindi d'indurre la morte cellulare. In pratica il legame dell'ATRA ai recettori RAR e dell'agonista ai recettori RAR e RXR è il modo più efficace d'inibire hTERT. Sul piano clinico il trattamento combinato appena indicato potrebbe tradursi nella possibilità di ottenere una remissione completa anche nei pazienti con LAP resistente all'ATRA e di evitare gli effetti collaterali indotti dagli alti dosaggi di ATRA (Sindrome da ATRA).

La riattivazione della telomerasi anche nella cellula tumorale ne fa un ottimo bersaglio di terapia antileucemica. Tra le molecole più promettenti in tal senso bisogna ricordare la telomestatina (SOT-095), sostanza naturale sintetizzata dal microorganismo *Streptomyces Anulatus*. È un agente che stabilizza le strutture quadruplex ricche di guanina ("G-quadruplex structures") che si sviluppano a partire dai "3' G-overhangs" telomerici. Questi ultimi sono costituiti da sequenze ripetitive ricche di guanina che si avvolgono attorno ad un core di guanina che presenta una configurazione planare costituita da tetradi tenute insieme da ponti di idrogeno. Particolari condizioni ioniche favoriscono lo sviluppo delle strutture quadruplex che inibiscono l'attività della telomerasi. La telomestatina, che possiede una struttura simile alle "G-quadruplex structures" agirebbe facilitandone la formazione o catturando le "G-quadruplex structures" appena formatesi, sequestrando le molecole a singola catena  $d[T_2AG_3]_n$ . Dati recenti indicano che la telomestatina è capace di bloccare l'espressione della telomerasi nelle cellule Ph1 positive, inducendo un'accorciamento della lunghezza dei telomeri e l'apoptosi. Tale effetto sembra essere mediato dall'attivazione del gene dell'ataxia teleangectasica (ATM) che partecipa ad uno dei meccanismi che controllano i danni indotti nel DNA da agenti genotossici. Utilizzando linee cellulari leucemiche e cellule leucemiche fresche è stato recentemente osservato che la telomestatina è in grado di bloccare la crescita in vitro di tali cellule, rendendo queste ultime particolarmente sensibili all'azione di daunorubicina e citosina arabinoside, chemioterapici usualmente impiegati nella terapia delle leucemie acute e di altri disordini onco-ematologici. La telomestatina determina un'accorciamento dei telomeri e l'apoptosi indipendentemente dal citotipo FAB di LAM. Nei pazienti in cui quest'ultima è preceduta da una fase di mielodisplasia tali effetti sono meno significativi pur manifestandosi. È stato osservato che nelle LAM l'attività telomerasica non è così elevata come nei tumori solidi ed è stato ipotizzato che l'efficacia della telomestatina sia legata sia all'interazione con le "G-quadruplex structures" situate a livello telomerico, sia al fatto che queste stesse strutture sono presenti a livello di geni che svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi dei disordini oncoematologici. Tra questi geni bisogna ricordare c-MYC e c-ABL1. L'efficacia della telomestatina potrebbe dipendere quindi dipendere anche dalla sua capacità di bloccare la trascrizione di tali geni.

**Bibliografia essenziale**

1. Dhaene K., Van Marck E., Parwaresch R.: Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 437: 1-6, 2000.
2. Blasco M.A., Hahn W.C.: Evolving views of telomerase and cancer. *Trends in Cell Biol.* 13: 289-294, 2003.
3. Chang S., De Pinho R.A.: Telomerase extracurricular activities. *Proc in Natl Aca of Sci USA* 99: 12520-12522, 2002.
4. Elwood N.J.: Telomere biology of human hematopoietic stem cell. *Cancer Control* 11: 77-85, 2004.
5. Ohyashiki J.H., Sashida G., Tauchi T., Ohyashiki K.: Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21:680-687, 2002.
6. Vestorvsek S., Kantarjian H., Manshour T., et al.: Increased telomerase activity is associated with shorter survival in patients with chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Cancer* 97: 1248-1252, 2003.
7. Liu L., Berletch J.B., Green J.G., et al.: Telomerase inhibition by retinoids precedes cytodifferentiation of leukaemia cells and may contribute to terminal differentiation. *Molecular Cancer Ther* 3: 1003-1009, 2004.
8. Tauchi T., Shuin-ya K., Sashida G., et al.: Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* 22: 5338-5347, 2003.

## Nuove metodiche per l'esplorazione del genoma: gene expression profiling e proteomica

*Giuseppe Saglio, Alessandro Morotti, Daniela Cilloni*

Divisione di Medicina Interna ed Ematologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università di Torino, Ospedale San Luigi, Orbassano, Torino

Le leucemie mieloidi acute rappresentano un gruppo di malattie maligne che originano dai precursori delle cellule ematopoietiche, che si presenta molto eterogeneo sia per caratteristiche cliniche che per risposta alla terapia e quindi per risultato clinico finale. Nelle ultime due decadi, la ricerca ha generato un ricco e complesso insieme di conoscenze, che ha permesso di stabilire che le leucemie, così come altre forme di cancro, sono malattie che hanno origine da specifiche mutazioni genomiche. Fra queste, vi sono mutazioni dominanti che colpiscono gli oncogeni e che determinano un guadagno di funzione e altre mutazioni recessive che colpiscono geni oncosoppressori e che determinano perdita di funzione. Queste conoscenze hanno notevolmente contribuito a dissecare la complessità biologica e clinica delle AML (1). Tuttavia, l'era iniziata con il completamento dell'opera di sequenziamento dell'intero genoma umano offre prospettive nuove e particolarmente promettenti che derivano dall'impiego di nuove tecnologie di esplorazione del genoma quali il "gene expression profiling" e la proteomica (2, 3).

### Gene expression profiling

Il "gene expression profiling" si basa sull'osservazione che soltanto una frazione dei geni presenti nel genoma è attivamente trascritta in RNA messaggero (mRNA) in determinati tipi di cellula. Questo pattern di espressione dipende principalmente dalla linea differenziativa e dalla fase di differenziazione delle cellule, ma anche dall'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale e dall'influenza di stimoli extracellulari dovuti ad ormoni, a fattori di crescita, a citochine e anche a farmaci. In generale, i "tipi" di mRNA espressi in una cellula riflettono il corrispondente patrimonio di proteine e quindi, il pattern d'espressione dei geni rispecchia in modo piuttosto preciso la biologia delle cellule normali e di quelle leucemiche. Per la determinazione del "gene expression profiling" (profilo molecolare degli RNA espressi in un dato campione) si usano DNA microarrays che possono misurare simultaneamente anche l'espressione di tutti i circa 30.000 geni presenti nel genoma umano.

I microarrays del DNA vengono prodotti in due tipi principali di piattaforme. Il primo è basato su lastre di vetro siliconato microscopiche sulle quali sono depositati cDNAs o oligonucleotidi lunghi in genere 70-80 oligomeri. Il secondo è basato su tecniche fotolitografiche in grado di sintetizzare oligonucleotidi di 25 basi su una lastra di silicio (tecnologia brevettata da Affymetrix). Una delle differenze principali tra le due tecnologie interessa il modo di valutazione dei livelli di trascrizione genica: da un lato si effettua un paragone tra l'espressione di specifici RNA in campioni diversi o tra campioni patologici e campioni normali, dall'altra si può effettuare una quantificazione assoluta dei trascritti espressa in unità convenzionali rispetto a geni di riferimento (metodo Affymetrix). Queste differenze danno origine a vantaggi e svantaggi specifici, che devono essere considerati con attenzione in relazione al tipo di studio che si vuole effettuare prima della scelta di uno o dell'altro metodo.

Due sono i metodi statistici generalmente usati per classificare i campioni in base al loro profilo di espressione genica. Nel primo approccio, detto "unsupervised", diversi sottogruppi di campioni vengono raggruppati in base al fatto che hanno un pattern di espressione simile. Nel secondo approccio, detto "supervised", si usano metodi statistici per valutare la differenza di espressione genica in campioni provenienti da casi già distinti sulla base di altri specifici parametri (dati clinici, traslocazioni cromosomiche, etc.).

Molti ricercatori si stanno impegnando nell'uso della tecnologia dei microarrays per studiare l'espressione genica nelle leucemie acute. Gli obiettivi di questi studi sono quelli di capire la biologia intrinseca di queste malattie, allo scopo di migliorare la classificazione alla diagnosi sulla base di marcatori in grado di stabilire meglio la prognosi e il rischio di resistenza alle terapie attualmente in uso. Inoltre si ritiene che questo tipo di indagine possa aiutare ad identificare nuovi potenziali bersagli per approcci di terapia molecolarmente mirata. Tali obiettivi richiedono ovviamente lo studio di grandi casistiche di pazienti caratterizzati in modo adeguato dal punto di vista citogenetico e molecolare e seguiti con un dettagliato follow-up clinico.

Al momento tuttavia i risultati finora ottenuti da questo tipo di studi sono stati significativi solo in alcuni settori dell'oncoematologia, in particolare per quanto riguarda la caratterizzazione e la subclassificazione dei Linfomi Diffusi a Grandi cellule (4). Nel settore delle LMA i risultati sono ancora preliminari e spesso non univoci (3, 5-10). In particolare, mentre alcuni autori utilizzano un approccio "unsupervised" e ritengono di identificare una serie di geni la cui espressione correla con l'andamento clinico indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di altri marcatori genetici quali specifiche traslocazioni tradizionalmente utilizzate come marcatori prognostici, altri autori puntano su un approccio "supervised" paragonando campioni già caratterizzati citogeneticamente e molecolarmente. In alcuni di questi studi i risultati appaiono molto interessanti e portano a ritenere che sarà a breve possibile determinando l'espressione di un numero molto limitato di geni (anche solo una decina) avere un facile e accurato sistema classificativo delle leucemie acute che permetterà non solo di distinguere banalmente le mieloidi dalle linfoidi, ma soprattutto di identificare nel loro ambito alcuni sottogruppi specifici



come quelli caratterizzati da specifiche traslocazioni (5, 6). Alcuni di questi gruppi peraltro si collocano addirittura in categorie a sè stanti. È il caso delle leucemie caratterizzate da un riarrangiamento del gene MLL il cui “gene expression profiling” si presenta come distinto sia dalle leucemie mieloidi che da quelle linfoidi e che paiono originare da un progenitore estremamente immaturo della linea ematopoietica (7). Il “gene expression profiling” ha anche rivelato una inaspettata e fondamentale differenza biologica nell’ambito delle LMA con trisomia del cromosoma 8 isolata (8). Un secondo aspetto applicativo che può essere intravisto e che è altrettanto se non più importante, è lo sviluppo di chips in grado di stabilire attraverso l’analisi dell’espressione di un numero limitato di geni significativi, le probabilità di risposta (o di resistenza) a specifiche terapie e quindi in ultima analisi di determinare la prognosi e di guidare il tipo di approccio terapeutico migliore. Facendo seguito al primo lavoro di Gulop et al. (3) molti altri gruppi si sono impegnati in questo settore. Un lavoro particolarmente significativo a questo riguardo è quello che ha permesso di identificare nell’ambito delle AML “therapy-related” due sottogruppi a prognosi diversa e che solo il “gene expression profiling” permette di discriminare in quanto non direttamente correlato con altre differenze immunofenotipiche o categorie citogenetiche (9). Risultati molto interessanti sono stati recentemente ottenuti anche nell’ambito delle LMA pediatriche (10). Ci sembra interessante sottolineare che molti, anche se non tutti, i geni che vengono attualmente evidenziati come responsabili di resistenza alla terapia o associati ad una cattiva prognosi presentano specifici connotati funzionali, in quanti sono geni coinvolti nel processo di proliferazione (particolarmente nella regolazione del ciclo cellulare) o nel processo di apoptosi. Questo aspetto si prospetta particolarmente importante nell’era dello sviluppo della terapia mirata contro specifici bersagli molecolari. È anche probabile che una volta esauriti gli studi preliminari che richiedono l’analisi dell’espressione di migliaia di geni e una volta stabiliti quali tra questi geni sono quelli veramente significativi, l’analisi possa essere effettuata attraverso sistemi in grado di determinare simultaneamente l’espressione di un numero più limitato di geni, ma in modo più preciso. Questi sistemi si basano sull’impiego di piattaforme di Real Time Quantitative PCR (RQ-PCR) e possono analizzare anche 368 geni simultaneamente.

### **Proteomica**

Parallelamente all’espansione del “gene expression profiling” anche la proteomica (che si è sviluppata inizialmente dalla visualizzazione di semplici gel d’elettroforesi bidimensionali) è stata grandemente rivalutata grazie all’introduzione della spettrometria di massa e alla disponibilità in rete delle grandi banche dati di proteine (11). Attualmente, per mezzo di tecnologie più specializzate quali la cromatografia multidimensionale e la spettrometria totale, migliaia di proteine possono essere identificate e possono essere quindi ottenute informazioni molto specifiche sulla loro espressione differenziale nei diversi tipi cellulari. Analogamente al “gene expression profiling” la proteomica è utile ad identificare le proteine preposte ai vari processi che avvengono all’interno delle cellule,

anche se l'analisi da sola non fornisce necessariamente informazioni circa la funzione delle proteine espresse (12). Tuttavia, la proteomica con alcuni accorgimenti in alcune circostanze può fornire la possibilità di studiare le interazioni fisiche delle diverse proteine. La proteomica quindi è utile per sia le indagini su grande scala delle proteine che per gli studi dettagliati sui rapporti funzionali fra le proteine di interesse. Al momento, anche se tecniche di proteomica sono e sono state molto usate in esperimenti che si prefiggono di chiarire la funzioni e le interazioni di singole proteine all'interno delle cellule, non sono ancora stati pubblicati studi che utilizzano il "protein expression profiling" a scopi clinico-applicativi nelle LA. In parte questo è dovuto al fatto che lo studio delle proteine è di fondo più difficile e complicato di quello degli acidi nucleici e mal si presta ad un uso routinario nella pratica clinica. Tuttavia è evidente che lo studio della proteomica e del "gene expression profiling" si complimentano a vicenda e che dal loro uso combinato possono derivare informazioni ancora più complete sulla biologia delle cellule leucemiche. Questi dati saranno utili a scoprire la base delle informazioni che un giorno recheremo anche a scopi clinici, indipendentemente dal tipo di test che utilizzeremo e che sarà comunque condizionato da parametri quali la facilità, la semplicità e la riproducibilità di esecuzione.

### **Bibliografia essenziale**

1. Bloomfield C.D., Herzig G.P., Caligiuri M.D.: Introduction: Acute leukemia: recent advances. *Semin Oncol.* 1997; 24(1): 1-2.
2. Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D.: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14863-14868.
3. Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., et al.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537.
4. Rosenwald A., Wright G., Wing C., et al.: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Eng J Med* 2002; 346: 1937-1946.
5. Schoch C., Kohlmann A., Schnittger S., et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad U S A.* 2002; 99: 10008-10013.
6. A., Schoch C., Schnittger S., et al.: Molecular characterization of Acute Leukemias by use of microarray technology. *Gene Chrom Cancer* 2003; 37: 396-405.
7. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genetics.* 2002; 30: 41-47.
8. Virtaneva K., Wright F.A., Tanner S.M., et al.: Expression profiling reveals fundamental biologic differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 11124-11129.

9. Qian Z., Fernald A.A., Godley L.A., Larson R.A., Le Beau M.M.: Expression Profiling of CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Reveals Distinct Subtypes of Therapy-Related AML, *Proc Natl Acad USA* 2002; 99: 14925-14930.
10. Yagi T., Morimoto A., Educhi M. et al.: Identification of a gene expression signature associated with prognosis of pediatric AML. *Blood* 2003; pre-published online May 8.
11. Takahashi N., Kaji H., Yanagida M., et al. Proteomics: advanced technology for the analysis of cellular function. *J Nutr* 2003; 133: 2090S-2096S.
12. Pawson T., Nash P.: Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains *Science* 2003; 300: 445-452.

# **LEUCEMIE ACUTE**



## Classificazione citogenetica delle LAM: impatto prognostico e terapeutico

*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,  
Silvia Calatroni, Ilaria Giardini, Barbara Rocca, Rita Zappatore,  
Marilena Caresana, Jessica Quarna*

Dipartimento di Scienze Ematologiche, Pneumologiche, Cardiovascolari Mediche e Chirurgiche,  
Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

### Introduzione

Notevoli progressi sono stati compiuti in questi ultimi trent'anni nella comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono la patogenesi delle LAM. È stato dimostrato che per lo sviluppo della malattia è necessaria la mutazione di geni ["fms-like tyrosine kinase 3" (FLT3), c-KIT, N-RAS] che codificano per proteine ad attività tirosina chinasi, con conseguente attivazione costitutiva della proteina stessa, e di geni [AML1, GATA1, "CCAAT/enhancer binding protein alpha"(CEBPA)] che codificano per fattori trascrizionali necessari per una normale maturazione delle cellule emopoietiche. La citogenetica convenzionale ha avuto un ruolo fondamentale nell'identificazione di quest'ultima classe di geni. L'analisi cromosomica ha infatti individuato traslocazioni bilanciate non casuali strettamente correlate ad un particolare citotipo FAB di LAM o associate a entità clinico-biologiche peculiari all'interno di uno stesso citotipo. Successivamente, metodiche di biologia molecolare hanno consentito d'identificare i geni mappati a livello dei punti di rottura della traslocazione e di dimostrare che il risultato del riarrangiamento cromosomico è costituito dalla creazione di geni di fusione che alterano la normale funzione di entrambi i geni coinvolti nella traslocazione. Le due classi di mutazioni geniche più sopra riportate cooperano per la patogenesi delle LAM: la mutazione dei geni che codificano per le tirosine chinasi garantisce l'eccessiva proliferazione della popolazione neoplastica, quella dei geni che codificano per fattori trascrizionali garantisce invece il blocco differenziativo.

La migliore conoscenza delle basi molecolari della malattia ha determinato un significativo e progressivo sviluppo della terapia delle LAM. La moderna chemioterapia induce una remissione nel 50-80% dei pazienti con LAM de novo, ma nonostante la terapia di consolidamento la maggior parte dei pazienti può presentare una ripresa della malattia. Ciò ha portato alla continua ricerca di parametri biologici e clinici che possano guidare le scelte terapeutiche, predire la risposta alla chemioterapia ed il possibile decorso clinico della malattia. I parametri

che sino ad oggi hanno presentato un rilevante significato prognostico nelle LAM sono stati l'età, l'assetto cromosomico della popolazione leucemica, il valore dei globuli bianchi e la risposta alla chemioterapia d'induzione. Varie casistiche hanno però dimostrato che il cariotipo è il fattore prognostico di gran lunga più importante. Infatti, l'assetto citogenetico consente di suddividere i pazienti in tre categorie che mostrano una diversa percentuale di risposta ai protocolli di chemioterapia, una diversa sopravvivenza libera da malattia e una diversa sopravvivenza complessiva. Quattro grandi studi hanno riportato che a 5 anni sopravvive il 35-65% dei pazienti a cariotipo favorevole, il 15-40% di quelli con cariotipo intermedio e meno del 20% di quelli a cariotipo sfavorevole. L'assetto cromosomico della popolazione leucemica però non solo permette d'identificare pazienti per i quali dovrebbero essere avviate procedure terapeutiche diversificate, ma consente altresì d'individuare pazienti particolarmente sensibili ad uno specifico tipo di trattamento. Per comprendere questa affermazione basti pensare alla risposta terapeutica che si ottiene nei pazienti con t(15;17)(q22;q21) trattati con acido all-trans retinico o con triossido d'arsenico.

### **Classificazione citogenetica delle LAM**

I pazienti con LAM possono presentare traslocazioni cromosomiche, anomalie numeriche, delezioni di particolari regioni cromosomiche. Indubbiamente le traslocazioni sono le anomalie citogenetiche più frequenti avendo un'incidenza del 40-60% a seconda delle varie casistiche. Anomalie numeriche vengono identificate nel 10% dei pazienti e delezioni cromosomiche nel 5% dei casi.

Le traslocazioni cromosomiche possono coinvolgere i seguenti geni:

1. Core binding factor
2. Recettore alfa dell'acido retinoico
3. Mixed Lineage Leukemia (MLL)
4. Coattivatori della trascrizione
5. Altri geni

#### *Traslocazioni coinvolgenti il Core binding factor (CBF)*

Due sono le più frequenti traslocazioni all'interno di questo gruppo, la t(8,21)(q22;q22) e la t(16;16)(p13;q22)/inv(16)(p13q22).

La t(8;21)(q22;q22) si osserva nel 10% dei pazienti con LAM e nel 30-40% dei casi con citotipo M2. All'indagine immunofenotipica la popolazione neoplastica è caratteristicamente CD19, CD13, CD34 e talvolta CD56 positiva. La traslocazione coinvolge i geni ETO, mappato in 8q22, ed il gene AML1, mappato in 21q22. Quest'ultimo codifica per la subunità alfa dell'eterodimero "Core Binding Factor". È questa subunità che attraverso il "runt homology domain" (RHD) consente al CBF di legarsi direttamente al DNA. In tal modo il gene AML1 si comporta da attivatore dei processi trascrizionali. Infatti esso attraverso l'interazione con p300 e con la "CREB binding protein" induce l'acetilazione degli istoni. Viceversa la traslocazione fonde la regione RHD di AML1 a tutto il gene ETO. Sul cromosoma 21 coinvolto nella traslocazione si crea così il gene di fusione

AML1/ETO che blocca i processi trascrizionali sia tramite la sua azione dominante negativa nei confronti del gene AML1 normale sia tramite il legame che si stabilisce tra le regioni "Zinc fingers" di ETO ed un complesso che reprime la traslocazione.

La t(16;16)(p13;q22)/inv(16)(p13q22) si osserva invece nel 10-12% delle LAM, ma la sua incidenza potrebbe essere sottostimata perchè l'anomalia, coinvolgendo bande cromosomiche poco colorate dalle metodiche di bandeggio routinariamente impiegate, potrebbe passare inosservata all'analisi cromosomica convenzionale. L'anomalia citogenetica si trova caratteristicamente correlata ad un quadro di LAM a citotipo M4-M5 con alterazione degli eosinofili che presentano una commistione di granulati eosinofili e basofili. Il riarrangiamento determina la fusione tra il gene che codifica per la subunità beta del CBF (CBFB) ed il gene SMMHC, che codifica per la catena pesante della miosina. Il gene di fusione CBFB/SMMHC svolge un'azione dominante negativa nei confronti di AML1.

#### *Traslocazioni coinvolgenti il recettore alfa dell'acido retinico (RARA)*

La traslocazione più frequente all'interno di questo gruppo è la t(15;17)(q22;q12), che coinvolge il gene PML, mappato alla banda q22 del cromosoma 15 ed il gene RARA, mappato alla banda q12 del cromosoma 17. La traslocazione è specificamente correlata ad una diagnosi di leucemia acuta promielocitica (LAM M3). Il punto di rottura all'interno del gene PML può avvenire in tre diverse regioni chiamate BCR1, BCR2 e BCR3; viceversa il punto di rottura in RARA cade sempre nel secondo introne del gene. Il gene di fusione PML/RARA, presente sul cromosoma 15 riarrangiato, determina un blocco trascrizionale sia attraverso un'azione dominante negativa nei confronti del gene RARA normale sia attraverso l'attivazione di un complesso che reprime la trascrizione. L'inattivazione di quest'ultimo complesso si ottiene in presenza di dosi farmacologiche di acido all-trans retinico (ATRA). È questo il meccanismo con cui l'ATRA induce la remissione nei pazienti con LAM M3.

Il gene RARA è coinvolto anche nella traslocazione t(11;17). In questo caso il gene che partecipa al riarrangiamento è "Promyelocytic Leukemia Zinc Finger" (PLZF). La traslocazione determina la creazione di due geni di fusione PLZF/RARA, sul cromosoma 11 anomalo, e RARA/PLZF, sul cromosoma 17 anomalo. La cellula esprime entrambi i geni di fusione. Il gene PLZF/RARA blocca i processi trascrizionali e l'espressione di geni cruciali per la differenziazione mieloide tramite il legame che si stabilisce tra PLZF e un sistema repressorio della trascrizione. Il gene RARA/PLZF attiva i processi trascrizionali ed induce la proliferazione della popolazione neoplastica. Caratteristicamente i pazienti con t(11;17)(q23;q12) non sono responsivi all'ATRA che anche a dosi farmacologiche non riesce ad eliminare il legame ad alta affinità creatosi tra PLZF ed il complesso che reprime la trascrizione.

#### *Traslocazioni coinvolgenti MLL*

Il gene MLL, mappato alla banda 11q23, si trova riarrangiato con almeno quaranta partner diversi. Il riarrangiamento della banda 11q23, che sul piano morfo-



logico è strettamente associato ad una LAM a citotipo M4-M5, si osserva nel 50-60% delle LAM del bambino, nel 4% delle LAM de novo dell'adulto e nell'80% delle LAM secondarie. Il punto di rottura all'interno di MLL si localizza in una regione di 8.3 kilobasi che contiene gli esoni 5-11. Nelle forme de novo il punto di rottura si trova verso l'estremità 5' del gene, mentre nelle forme secondarie verso l'estremità 3'. Il gene di fusione MLL/N, che si crea sul cromosoma 11 traslocato contiene le regioni "AT" (che consentono il legame al DNA) e la regione CxxC (che funziona da repressore della trascrizione) di MLL. I geni partner(N) di MLL codificano per proteine di segnale a sede citoplasmatica o per fattori nucleari che partecipano ai processi trascrizionali. Il potere trasformante del gene chimerico MLL/N dipende dalla perdita di un allele di MLL con successiva attivazione dell'altro allele, mentre il fenotipo della popolazione leucemica dipenderebbe dal gene partner di MLL nella traslocazione.

#### *Traslocazione di coattivatori della trascrizione*

Le più frequenti traslocazioni all'interno di questo gruppo sono la t(8;16)(p11;p13) e la t(11;16)(q23;p13). Si tratta di riarrangiamenti cromosomici rari (incidenza 0.5-1%), strettamente correlati a citotipo M5, a prognosi sfavorevole.

La traslocazione 8;16 determina il riarrangiamento del gene MOZ, mappato in 8p11, con il gene CBP, mappato in 16p13. Entrambi i geni codificano per proteine che determinano l'acetilazione degli istoni. Il potere trasformante della proteina chimerica MOZ/CBP dipenderebbe da un "gene dosage effect". La traslocazione si associa sul piano morfologico a quadri di eritrofagocitosi da parte dei blasti leucemici e sul piano clinico a coagulazione intravasale disseminata, frequente interessamento del CNS, scarsa risposta alla chemioterapia.

La traslocazione 11;16 determina il riarrangiamento tra il gene MLL, mappato in 11q23, ed il gene CBP. La proteina chimerica MLL/CBP attiva il processo di leucemogenesi perché il gene CBP perde le regioni necessarie a connettere i vari fattori trascrizionali e preposte al controllo del ciclo cellulare. Si tratta di un'anomalia che seppure rara determina una prognosi sfavorevole.

#### *Altre traslocazioni*

Tra queste bisogna ricordare la traslocazione t(6;9)(p23;q34), che determina il riarrangiamento del gene DEK, mappato in 6p23, con il gene CAN, mappato in 9q34. La traslocazione non si associa ad alcun particolare citotipo di LAM. Il gene di fusione DEK/CAN svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia poiché altera l'espressione di CAN e determina la perdita della sua funzione di "chaperon" tra nucleo e citoplasma a favore di varie proteine. In tal modo il trascritto chimerico determinerebbe un arresto del ciclo cellulare nella fase G0.

### **Alterazioni molecolari**

Come già riportato il 40-60% delle LAM non presenta alcun tipo di alterazione cromosomica all'indagine citogenetica convenzionale. In questi pazienti lo studio del cariotipo non fornisce alcun tipo di informazione. Si tratta di un gruppo ete-

rogeneo di pazienti caratterizzato da una variabile risposta ai protocolli di chemioterapia e da un decorso clinico quanto mai imprevedibile. Queste osservazioni facevano però supporre che le LAM a cariotipo normale potessero in realtà presentare la mutazione di nuovi marcatori molecolari in grado di sostituirsi alla citogenetica convenzionale nel fornire valide informazioni prognostiche. Sino ad oggi i geni la cui mutazione è risultata avere un'importante impatto sul decorso clinico della malattia sono i seguenti:

1. Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)
2. N-RAS
3. c-KIT
4. MLL "Partial tandem duplication"
5. "CCAAT/enhancer binding protein alpha" (C/EBPA)
6. WT1

### *FLT3*

Il gene *FLT3*, mappato alla banda q21 del cromosoma 13, codifica per una proteina recettoriale ad attività tirosina kinasica di classe III. Quando tale proteina lega il proprio ligando, una proteina espressa dalle cellule stromali, si ha la dimezzazione del recettore e l'attivazione della kinasi. Due sono le mutazioni in grado d'indurre l'attivazione costitutiva della kinasi:

- l'"Internal tandem duplication" (ITD), che consiste nella duplicazione di un frammento della regione iuxtamembrana, comprendente gli esoni 1 e 12. Il frammento, lungo 20-200kb, si fonde "in-frame" con la restante porzione del gene. La mutazione consente alla proteina recettoriale di formare dimeri in assenza del ligando e quindi determina l'attivazione costitutiva della kinasi anche in assenza del ligando;
- mutazioni che colpiscono gli amminoacidi specifici situati a livello della regione denominata "activation loop" (AL) che svolge un'attività inibitoria nei confronti della kinasi. Infatti in assenza del ligando tale regione assume una configurazione ad elica che impedisce l'attivazione della kinasi, mentre in presenza del ligando assume una configurazione rilasciata che consente l'attivazione della kinasi stessa. La mutazione fissa l'AL in configurazione rilasciata causando l'attivazione costitutiva della kinasi.

L'ITD ha un'incidenza del 35-40% e si osserva soprattutto nei pazienti a cariotipo normale mentre la mutazione dell'AL si osserva nel 7% circa delle LAM a cariotipo normale.

### *N-RAS*

Mutazioni a carico di questo gene sono state osservate nel 10-30% dei pazienti con LAM. Si tratta di alterazioni geniche che colpiscono gli esoni 12, 13 e 63. RAS codifica per una proteina ad attività GTPasica che lega GDP/GTP e partecipa ai meccanismi di trasduzione del segnale. L'attivazione di RAS avviene ad opera di una molecola adattatoria Grb2 e della proteina SOS, che scambia il nucleotide guanina favorendo il passaggio di RAS-GDP a RAS-GTP. Normalmente il ritorno a RAS-GDP avviene ad opera dell'attività GTPasica di RAS. Le mutazioni, bloccando l'idrolisi di RAS-GTP, stabilizzano RAS nella sua

forma attivata. Le mutazioni determinano quindi un'eccessiva proliferazione cellulare ed un blocco dei processi di morte cellulare.

#### *c-KIT*

Codifica anch'esso per una proteina ad attività recettoriale dotata di attività tirosina chinasi. L'attivazione di quest'ultima si sviluppa quando tale proteina lega il proprio ligando, lo "Steel Factor", formando dimeri. Le mutazioni di c-KIT si sviluppano nel 10% dei pazienti con LAM. Si tratta di delezioni, inserzioni, mutazioni puntiformi. Le mutazioni di c-KIT inducono l'attivazione costitutiva della kinasi in assenza del ligando in quanto inducono la formazione di omodimeri. Inoltre anche per questo gene sono state descritte mutazioni che colpiscono la regione AL.

#### *MLL "Partial tandem duplication" (PTD)*

Si osserva nel 10% delle LAM a cariotipo normale e nell'80% delle LAM che presentano la trisomia 11 alla citogenetica convenzionale. Tale mutazione consiste nella duplicazione di una porzione interna del gene MLL. Il segmento duplicato può comprendere gli esoni 2-6 o gli esoni 2-8. In entrambi i casi si ritiene che la mutazione possa essere dovuta ad un evento ricombinatorio a livello delle sequenze *ALU* omologhe.

#### *C/EBPA*

Tale gene, mappato alla banda q13.1 del cromosoma 19 e ricco in guanina e citosina, codifica per un fattore trascrizionale che svolge un ruolo cruciale nella mielopoiesi. Siccome C/EBPA è espresso durante la differenziazione in senso mielomonocitico e la sua espressione aumenta esponenzialmente durante la differenziazione mieloide, si ritiene che le sue mutazioni possano indurre un blocco maturativo LAM specifico. Le mutazioni di C/EBPA hanno un'incidenza del 7% e si osservano soprattutto nelle LAM a citotipo M2 con t(8;21) o in quelle a cariotipo normale. Le mutazioni possono risultare nella sintesi di una proteina tronca ad attività dominante negativa o nella sintesi di una proteina incapace di legarsi al DNA.

#### *WT1*

Si tratta del gene del Wilm's tumor, mappato in 11p13. Il gene, un "tumor suppressor gene", codifica per un fattore trascrizionale a dito di zinco. Nel midollo osseo normale e nel sangue periferico l'espressione di WT1 è estremamente bassa ed è spesso non dimostrabile anche da parte della RT PCR. Viceversa il 50% circa delle LAM presenta un'aumentata espressione del gene. Vari studi hanno tentato d'individuare le controparti normali della cellule che sovraesprime WT1, ma tali sforzi sono stati sino ad ora infruttuosi. È tuttora sconosciuto il fenomeno per cui le cellule leucemiche esprimono alti livelli di WT1.

### **Significato prognostico dell'anomalia citogenetica**

L'importante impatto prognostico del cariotipo nelle LAM era già stato dimostrato da vari studi condotti negli anni '80 ed era stato confermato

dall'“International Workshop on Chromosomes in Leukemia”. Le casistiche di allora avevano però arruolato un piccolo numero di pazienti, spesso sottoposti a diversi protocolli di chemioterapia. Ciò aveva fatto sì che fossero messi in discussione sia il significato prognostico indipendente dell'assetto citogenetico sia la capacità dell'anomalia cromosomica presente alla diagnosi di guidare le possibili scelte terapeutiche. Già allora comunque la maggior parte degli studi riportava che la presenza di un inv(16) si associava ad un decorso clinico favorevole mentre la presenza di monosomia 7 (-7), di -5/del(5q) e di un cariotipo con più di tre alterazioni cromosomiche si associava ad un decorso clinico sfavorevole. Questi dati facevano supporre che l'alterazione cromosomica potesse riflettere differenze biologiche della leucemia che trascendevano la sensibilità della popolazione leucemica a quel particolare tipo di trattamento. Tuttavia non sempre vi era consenso sul significato prognostico dell'alterazione cromosomica osservata. Ad esempio la t(8;21) e la t(15;17) erano talvolta considerate a prognosi favorevole talaltra a prognosi intermedia. A partire dalla fine degli anni '90 vari studi prospettici hanno confermato il valore prognostico del cariotipo, definendo in modo più corretto la risposta alla chemioterapia, il rischio di recidiva ed la sopravvivenza correlate ad un particolare difetto cromosomico.

Una delle casistiche più ampie (1512 pazienti) che ha sicuramente portato un contributo fondamentale a tale riguardo è stata quella di Grimwade e collaboratori (1998). Paragonando la risposta alla chemioterapia d'induzione, il rischio di recidiva e la sopravvivenza globale dei pazienti a cariotipo normale a quella dei pazienti con le varie alterazioni cromosomiche gli Autori sono riusciti ad individuare tre classi di LAM a diverso decorso clinico. I pazienti a cariotipo favorevole erano quelli che presentavano la t(8;21), l'inv(16) e la t(15;17) da sole o associate ad altre anomalie. Per questo gruppo di LAM la percentuale di remissione era 87-98%, il rischio di recidiva a cinque anni 29-42% ed la sopravvivenza a cinque anni 61-69%. Nessun paziente di questa classe aveva presentato una malattia resistente. Viceversa i pazienti a cariotipo sfavorevole erano quelli che presentavano -7, -5/del(5q), anomalie delle braccia lunghe del cromosoma 3, t(9;22), t(6;9) e cariotipo complesso. Per questo gruppo di LAM la percentuale di remissione era 42-67%, il rischio di recidiva a cinque anni 68-90%, mentre la sopravvivenza a cinque anni 4-21%. Il 15-46% dei pazienti appartenenti a questo gruppo presentava una malattia resistente. I pazienti a cariotipo intermedio erano quelli che presentavano trisomia 8 (+8), normale assetto citogenetico, anomalie della banda 11q23, del(9q), del(7q),+21,+22. Per questo gruppo di LAM la percentuale di remissione era 76-100%, il rischio di recidiva a cinque anni era 44-60%, mentre la sopravvivenza a cinque anni era 23-60%. Il 20-46% di pazienti appartenenti a questo gruppo presentava una malattia resistente.

In uno studio successivo, che era stato condotto su un campione di 1065 pazienti con età mediana di 65 anni e che aveva utilizzato la stessa suddivisione citogenetica, Grimwade e collaboratori (2001) avevano confermato le osservazioni fatte in precedenza. I pazienti a cariotipo favorevole presentavano una percentuale di remissione del 63-87%, un rischio di recidiva a cinque anni del 26-89%, una sopravvivenza a cinque anni del 17-38%. Il 5-13% dei pazienti appartenenti a

questo gruppo presentava una malattia resistente. I pazienti a cariotipo intermedio presentavano una percentuale di remissione del 51-86%, un rischio di recidiva a cinque anni del 78-100%, una sopravvivenza a cinque anni dello 0-15%. Il 17-30% dei pazienti appartenenti a questo gruppo presentava una malattia resistente. I pazienti appartenenti al gruppo a prognosi sfavorevole presentavano una percentuale di remissione del 26-45%, un rischio di recidiva a cinque anni dell'81-91%, una sopravvivenza a cinque anni del 2-7%. Il 41-56% dei pazienti appartenenti a questo gruppo presentava una malattia resistente.

Un altro studio (Slovak et al, 2000) aveva valutato l'impatto della citogenetica sulla percentuale di remissione completa, sul rischio di recidiva e sulla sopravvivenza in 609 pazienti sottoposti a tre tipi di terapia intensiva post-remissione: chemioterapia intensiva, trapianto autologo, trapianto allogenico. I pazienti a cariotipo favorevole erano quelli con t(8;21), t(15;17), inv(16) con o senza anomalie aggiuntive ma senza del(9q) e con traslocazione non facente parte di un cariotipo complesso; i pazienti a cariotipo intermedio erano quelli con assetto citogenetico normale, +8,+6,-Y, del(12p); i pazienti a cariotipo sfavorevole erano quelli con -5/del(5q), -7/del(7q), anomalie delle braccia lunghe del cromosoma 3, del(9q), 11q, 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(9;22), cariotipo complesso. Un quarto gruppo di pazienti comprendeva quelli con tutte le altre anomalie. La percentuale di remissione era statisticamente diversa tra i tre gruppi di pazienti, essendo 84% per quelli a prognosi favorevole, 76% per quelli a prognosi intermedia e 53% per quelli a prognosi sfavorevole. La risposta clinica era strettamente correlata all'assetto citogenetico, al performance status ed alla presenza di febbre alla diagnosi. Anche la sopravvivenza tra i tre diversi gruppi prognostici di pazienti variava in modo significativo. All'interno del gruppo a cariotipo complesso i pazienti che presentavano anomalie dei cromosomi 5 e 7 insieme al cariotipo complesso presentavano una percentuale di remissione completa del 37% ma erano tutti morti entro due anni e mezzo dalla diagnosi, quelli senza coinvolgimento di tali cromosomi mostravano una percentuale di remissione completa del 68% anche se questo non si traduceva in una più lunga sopravvivenza. Considerando la terapia post-remissione, la sopravvivenza a cinque anni era 57% per i pazienti con cariotipo favorevole, 48% per quelli con cariotipo intermedio e 23% per quelli con cariotipo sfavorevole. Quest'ultimo gruppo di pazienti mostrava un rischio di ricaduta doppio rispetto a quello dei pazienti a cariotipo favorevole. La differenza nella sopravvivenza osservata tra le tre braccia del trattamento post-remissione (chemioterapia intensiva, trapianto autologo, trapianto allogenico) era marginalmente significativa se si considerava solo il tipo di trattamento ma diveniva altamente significativa se veniva considerato l'assetto citogenetico. Nel gruppo a cariotipo favorevole i pazienti sottoposti ad autotrapianto mostravano la migliore sopravvivenza, mentre quelli trattati con la chemioterapia intensiva la peggiore; l'opposto si osservava per i pazienti a cariotipo intermedio. In questo gruppo i pazienti sottoposti ad autotrapianto presentavano una sopravvivenza a 5 anni del 35%, mentre quelli sottoposti a trapianto allogenico o a chemioterapia intensiva del 50%. All'interno del gruppo a cariotipo sfavorevole i pazienti sottoposti a trapianto allogenico mostravano la migliore sopravvivenza (44% a cinque anni)

mentre quelli sottoposti ad autotrapianto di midollo osseo o a chemioterapia intensiva la peggiore (15% a cinque anni).

Una casistica successiva (Byrd e Collaboratori 2002), che riguardava 1213 pazienti, dimostrò che i pazienti con  $t(8;21)$ ,  $inv(16)$ ,  $t(15;17)$  mostravano un decorso clinico significativamente migliore rispetto ai cariotipi normali (percentuale di RC 91% versus 68%; rischio di recidiva a cinque anni 47% versus 66%, sopravvivenza a cinque anni 54% versus 24%). In questo studio i pazienti con  $t(8;21)$ ,  $inv(16)$ ,  $t(15;17)$  con o senza anomalie aggiuntive e facenti parte o meno di un cariotipo complesso venivano considerati a prognosi favorevole; i pazienti con  $(9;11)$  a prognosi intermedia e quelli con cariotipo complesso a prognosi sfavorevole. Per individuare il significato prognostico delle altre anomalie cromosomiche quelle associate ad una percentuale di remissione, di recidiva e di sopravvivenza superiori o inferiori a quelle dei pazienti a cariotipo normale venivano incluse nel gruppo a prognosi favorevole o sfavorevole, mentre quelle che presentavano percentuali simili venivano incluse nel gruppo a prognosi intermedia. In questo modo la percentuale di remissione completa nei tre gruppi era 88%, 67% e 32%; l'incidenza di recidiva a cinque anni era 51%, 67% e 92% rispettivamente; la sopravvivenza a cinque anni era del 55%, 24% e 5% rispettivamente. In analisi multivariata il cariotipo sfavorevole si associava ad un rischio di recidiva tre volte superiore rispetto a quello del cariotipo intermedio e quattro volte superiore rispetto a quello del cariotipo favorevole; il cariotipo intermedio ad un rischio di recidiva una volta e mezzo rispetto a quello del cariotipo favorevole. Inoltre il cariotipo sfavorevole si associava ad un rischio di morte due volte superiore rispetto a quello del cariotipo intermedio e quattro volte superiore rispetto a quello del cariotipo favorevole; il cariotipo intermedio ad un rischio di recidiva due volte superiore rispetto a quello del cariotipo favorevole.

### **Significato prognostico di alcune anomalie**

*t(8;21), inv(16) e t(15;17)*

Schoch e collaboratori (1997) hanno riportato che i pazienti con trisomia 8 associata a tali anomalie del cariotipo presentavano una percentuale di remissione del 90% ed una sopravvivenza libera da malattia a tre anni del 55%. Inoltre lo stesso Autore (1996) aveva riportato che i pazienti con  $del(9q)$  e  $t(8;21)$  avevano una mediana di sopravvivenza significativamente più breve rispetto a quella dei pazienti con la sola  $t(8;21)$ , 12.5 mesi verso una mediana non raggiunta. Nello studio di Slovak e collaboratori (2001) i pazienti con  $del(9q)$  sembravano avere un decorso clinico simile a quello dei pazienti a cariotipo intermedio, presentando una sopravvivenza mediana di venti mesi ed una sopravvivenza a cinque anni del 27%. Uno studio del "Medical Research Council" ha riportato che a cinque anni la sopravvivenza dei pazienti con  $del(9q)$ , associato a  $t(8;21)$ , da solo e associato ad altre anomalie era 80%, 36%, 33% rispettivamente.

Un'osservazione analoga era stata fatta anche per le anomalie cromosomiche che accompagnavano la  $t(15;17)$ . Si era ipotizzato che il difetto cromosomico aggiuntivo potesse rendere la cellula leucemica meno sensibile alla terapia con ATRA.

Le casistiche di Grimwade e collaboratori (1998 e 2001) hanno però smentito che un difetto aggiuntivo del cariotipo possa in qualche modo alterare il decorso clinico favorevole dei pazienti con t(8;21),inv(16) e t(15;17). Ciò è stato confermato dalla casistica di Byrd e collaboratori, ma è stato smentito dalla casistica di Scenk e collaboratori (2004) che comprendeva 392 pazienti. In questo studio la perdita del cromosoma Y nei pazienti con t(8;21) si associava ad una più breve sopravvivenza mentre la trisomia 22 in quelli con inv(16) si associava ad una più lunga sopravvivenza.

Nel 1998 Bloomfield e collaboratori hanno riportato che i pazienti con le traslocazioni coinvolgenti il CBF o con cariotipo normale sono particolarmente sensibili all'impiego di citosina-arabioside ad alte dosi come terapia di consolidamento della remissione. In un primo momento questa osservazione era stata fatta nei pazienti con t(8;21). Nello studio di Byrd e collaboratori (1999) i pazienti con tale traslocazione erano sottoposti ad uno o a più di tre cicli di ara-C ad alte dosi. Questo ultimo gruppo di pazienti presentava una sopravvivenza mediana libera da recidiva superiore a 35 mesi e una percentuale di recidiva a cinque anni del 19% mentre i pazienti che avevano ricevuto un solo ciclo di tale terapia avevano mostrato una mediana di sopravvivenza libera da malattia di 10.5 mesi ed una percentuale di recidiva del 62%. Anche la sopravvivenza globale a cinque anni dei due gruppi di pazienti era significativamente diversa essendo 76% per i pazienti che avevano ricevuto più di tre cicli di ara-c ad alte dosi e 44% per quelli che avevano ricevuto un solo ciclo di chemioterapia. Recentemente, l'efficacia delle alte dosi di ara-c ripetute per più di tre cicli è stata confermata anche nei pazienti con inv(16)/t(16;16) (Byrd et al., 2004). In questo gruppo di pazienti quelli trattati con più di tre cicli mostravano una sopravvivenza libera da malattia a cinque anni del 57%, un'incidenza di recidiva del 43%, mentre quelli che avevano ricevuto un solo ciclo presentavano una sopravvivenza libera da malattia del 30% ed un'incidenza di recidiva del 70%. Tuttavia tra i due gruppi non vi era una differenza statisticamente significativa per la sopravvivenza globale.

Quest'ultimo dato rifletteva l'elevata percentuale di successo della terapia di salvataggio che consisteva nel trapianto autologo o allogenico di midollo osseo.

### **Riarrangiamento della banda 11q23**

Nel 1998 Grimwade e collaboratori avevano considerato la delezione delle braccia lunghe del cromosoma 7 ed i riarrangiamenti della banda 11q23 come anomalie a significato prognostico intermedio. I pazienti con del(7q) come unica anomalia presentavano un decorso clinico simile a quello dei cariotipi normali. Pertanto la prognosi sfavorevole da sempre associata a tale alterazione cromosomica poteva dipendere dal fatto che essa era frequentemente riscontrata nei pazienti a cariotipo complesso. Già in precedenza il "Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia" aveva dimostrato un decorso clinico intermedio per i pazienti con tale delezione in assenza di anomalie del cromosoma 5.

I pazienti con t(11;V)(q23;?) costituivano un gruppo estremamente eterogeneo.

All'interno di questo gruppo i pazienti con  $t(9;11)(p22;q23)$  avevano mostrato una tendenza non statisticamente significativa verso un decorso clinico più favorevole rispetto a quello dei pazienti con  $t(11;V)$ , dove V sta ad indicare un partner diverso dal cromosoma 9. In questa casistica quindi il riarrangiamento della banda 11q23 venne considerato a prognosi intermedia. Già nel 1997 Mrozek e collaboratori avevano riportato che i pazienti con  $t(9;11)$  mostravano una prognosi significativamente più favorevole rispetto a quelli con  $t(11;V)$ . Da allora tale osservazione aveva ricevuto varie conferme e smentite. Slovak e collaboratori (2000) e Buchner e collaboratori (1999), considerando l'importante variabilità nella percentuale di remissione riportata per i pazienti con traslocazione della banda 11q23 indipendentemente dal cromosoma partner nella traslocazione, avevano considerato tale riarrangiamento a prognosi sfavorevole.

Nel 2002 Byrd e collaboratori riportarono che il decorso clinico associato alla traslocazione della banda 11q23 dipendeva dal cromosoma partner nella traslocazione. Infatti mentre i pazienti con  $t(9;11)$  presentavano una percentuale di remissione, di recidive ed una sopravvivenza globale simili a quelle dei cariotipi normali, i pazienti con  $t(6;11)$  e con  $t(11;19)$  presentavano una sopravvivenza significativamente peggiore con nessun paziente sopravvissuto a 5 anni ed un rischio di recidiva significativamente più alto sebbene avessero una percentuale di remissione simile a quella dei cariotipi normali. Pertanto i pazienti con  $t(9;11)$  erano stati inclusi nel gruppo a prognosi intermedia, mentre quelli con  $t(11;V)$  nel gruppo a prognosi sfavorevole. Tale differenza non è stata dimostrata da una casistica successiva che includeva 54 pazienti con traslocazioni a carico della banda 11q23 (Schoch e collaboratori 2003). Questo studio ha dimostrato che i pazienti con  $t(11;V)$  mostravano una prognosi più simile a quella dei cariotipi sfavorevoli che non a quella dei cariotipi intermedi. Le LAM de novo con riarrangiamenti di MLL presentavano una sopravvivenza globale migliore rispetto a quella delle forme secondarie con MLL traslocato (10 verso 2.5 mesi). Non vi era inoltre differenza tra la sopravvivenza dei pazienti con  $t(9;11)$  e con  $t(11;V)$  (10 verso 8.9 mesi).

### **Significato prognostico dell'anomalia molecolare**

#### *FLT3*

Una casistica che comprendeva 70 pazienti aveva inizialmente dimostrato che la ITD del gene comporta una prognosi sfavorevole (Rombouts et al 2000). In questo studio la percentuale di remissione per i pazienti senza la mutazione era 79.6% mentre quella dei pazienti con la mutazione era 47.1%. Dopo ventitre mesi di follow-up recidivava il 25.6% dei pazienti senza la mutazione ed il 75% dei pazienti con la mutazione. Queste osservazioni sono state confermate da due studi successivi. Nella casistica di Abu-Dhurier e collaboratori (2000) i pazienti con la mutazione presentavano una sopravvivenza significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti senza la mutazione (medie 12.8 verso 29 mesi). Inoltre il 90% dei pazienti con la mutazione moriva entro diciotto mesi dalla diagnosi. La mutazione manteneva il proprio significato prognostico sia nelle LAM a basso rischio che in quelle ad alto rischio. Nella casistica di Kottaridis e collaboratori (2001),



comprendente 854 pazienti, la mutazione aveva avuto un'incidenza del 27%. Essa si associava ad una percentuale di remissione completa del 78%, ad un'incidenza di morte in induzione dell'11%, ad un rischio di recidiva a 5 anni del 64%, ad una sopravvivenza libera da malattia a cinque anni del 30%, ad una sopravvivenza a cinque anni del 32%. Tali dati erano tutti significativamente diversi rispetto a quelli osservati nei pazienti senza la mutazione che presentavano le seguenti percentuali 84%, 7%, 44%, 46% e 44%. Queste osservazioni hanno ricevuto varie conferme (Fröhling et al., 2002).

Un'altra casistica ha invece dimostrato che la mancanza di alleli "wild-type" di *Flt3* nei pazienti con citogenetica normale o con l'ITD del gene si associa ad un decorso clinico sfavorevole (Whitman et al 2001). In questa casistica i pazienti con l'ITD del gene presentavano una sopravvivenza libera da malattia peggiore rispetto a quella dei pazienti con entrambi gli alleli wild-type (wt/wt) ma una sopravvivenza complessiva sovrapponibile. Lo studio identificava tre categorie prognostiche di pazienti:  $Flt3^{wt/wt}$ ,  $Flt3^{ITD/wt}$  e  $Flt3^{ITD/-}$ . Quest'ultimo presentava una percentuale di remissione completa simile a quella degli altri due gruppi, ma una sopravvivenza libera da malattia a dodici mesi solo del 17% (71% per i pazienti  $Flt3^{wt/wt}$  e 51% per quelli  $Flt3^{ITD/wt}$ ) ed una sopravvivenza complessiva a dodici mesi solo del 13% (46% per i pazienti  $Flt3^{wt/wt}$  e 46% per quelli  $Flt3^{ITD/wt}$ ). Uno studio recente ha riportato che i pazienti con livelli di espressione del gene *Flt3* superiori a 200.000 copie/?g di RNA avevano una bassa percentuale di remissioni (2% circa), mentre quelli con livelli di espressione inferiori avevano una percentuale di remissioni del 69% (Ozeki et al, 2004).

### *N-RAS*

Gli studi riguardanti il significato prognostico delle mutazioni di RAS hanno fornito risultati contraddittori. Mentre alcune casistiche hanno riportato un impatto clinico favorevole con una buona percentuale di remissioni complete e un buon decorso clinico, altre hanno smentito tali risultati. La maggior parte degli studi ha dimostrato che anche nei pazienti con mutazioni di RAS il cariotipo e l'età del paziente sono i due fattori che hanno il maggior significato prognostico.

### *c-KIT*

L'impatto delle mutazioni di *c-kit* sul decorso clinico è tuttora mal definito. Alcuni studi hanno riportato che la mutazione di *c-kit* non influenza in alcun modo la prognosi mentre altri hanno riportato una più bassa percentuale di remissioni e una più alta incidenza di recidive nei pazienti con *c-kit* mutato.

### *MLL PTD*

Nel 1998 Caligiuri e collaboratori hanno riportato che la PTD del gene *MLL* determinava una differenza statisticamente significativa nella durata della remissione completa: i pazienti con tale difetto genico presentavano una remissione della durata di 7.1 mesi contro i 23.2 mesi dei pazienti senza la PTD. Si trattava però di una casistica che aveva reclutato pazienti sottoposti a vari regimi di chemioterapia. Tali osservazioni sono state successivamente confermate da Döhner e collaboratori (2002) che hanno analizzato una casistica più omogenea compren-

dente 221 pazienti. In questa casistica la percentuale di remissione e la mediana di sopravvivenza non erano influenzate dalla PTD di MLL, mentre lo era significativamente la durata media della remissione (7.7 mesi versus 19). Queste osservazioni sono state confermate anche dalla casistica di Schnittger e collaboratori (2000) che comprendeva 387 pazienti con LAM de novo e secondaria. In questo studio la PTD influenzava in modo significativo sia la mediana di sopravvivenza che la durata mediana della remissione completa.

#### *“CCAAT/enhancer binding protein alpha” (C/EBPA)*

Gli studi sino ad oggi pubblicati riportano che la mutazione di C/EBPA si associa a una prognosi favorevole con sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale significativamente migliori rispetto a quelle osservate nei pazienti con LAM a rischio intermedio (Fröhling et al., 2004; Preudhomme et al., 2002).

#### *WT1*

Il gene è un ottimo marcatore di malattia minima residua. Quando si ha una risposta alla chemioterapia d'induzione i livelli di espressione di WT1 si riducono più rapidamente rispetto a quelli di un gene di fusione marcatore della popolazione leucemica, mentre l'espressione di WT1 aumenta più rapidamente rispetto a quella del gene di fusione quando il paziente ancora in remissione è in procinto di sviluppare una recidiva della malattia (Cilloni et al., 2002). Ciò indicherebbe che mentre l'espressione del gene di fusione dipende dal numero di cellule leucemiche, quella di WT1 è più strettamente correlata allo stato funzionale delle cellule leucemiche. Pertanto WT1 è un ottimo marcatore di MRD e la sua aumentata espressione in un paziente ancora in remissione deve far pensare ad un imminente ripresa di malattia.

#### **“Gene-expression profiling”: quale impatto prognostico?**

Il potenziale impatto prognostico del “gene-expression profiling” è stato recentemente dimostrato da vari studi (Bullinger et al., 2004; Valk et al., 2004). Tra questi quello più significativo è stato quello di Bullinger e collaboratori (2004) che ha dimostrato come 133 geni siano in grado di predire il decorso clinico dei pazienti con LAM. Gli Autori hanno riportato che i 133 geni individuavano pazienti a prognosi favorevole e sfavorevole sia all'interno dei gruppi prognostici già individuati dall'anomalia citogenetica sia all'interno del gruppo dei pazienti a cariotipo normale. In questi ultimi Flt3 era il gene che sembrava avere il maggior impatto prognostico, mentre nei pazienti con riarrangiamento del gene MLL, a cariotipo normale o a cariotipo complesso tale ruolo era assunto dagli “homeobox genes”. In futuro sarà interessante stabilire se tali “gene-expression profiling” identifichino i meccanismi biologici cruciali per la risposta ad un determinato protocollo di chemioterapia o se siano invece più strettamente correlati al tipo di progenitore emopoietico che subisce la trasformazione leucemica.

## Bibliografia

1. Bernasconi P.: Onco-ematologia Molecolare. EDIMES, Pavia 2003.
2. Bernasconi P., Boni M., Casigliano P.M., Calatroni S.: Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Ann. New York Academy Sci* 963: 297-305, 2002.
3. Grimwade D., Walker H., Oliver F., et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333, 1998.
4. Grimwade D., Walker H., Harrison G., et al.: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98:1312-1320, 2001.
5. Grimwade D., Moorman A., Hills R., et al.: Impact of karyotype on treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 83 Suppl 1: S45-8, 2004.
6. Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A., et al.: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083, 2000.
7. Byrd J.C., Mrozek K., Dodge R.K., et al.: (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100:4325-4336, 2002.
8. Burnett A.K., Wheatley K., Goldstone A.H., et al.: The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML 10 trial. *Brit J Haematol* 118: 385-400, 2002.
9. Marcucci G., Mrozek K., Ruppert A.S., et al.: Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol.* 22: 2410-2418, 2004.
10. Kim D.H., Sohn S.K., Kim J.G., et al.: (2004) Parameters for predicting allogeneic PBSCT outcome of acute myeloid leukemia: cytogenetics at presentation versus disease status at transplantation. *Ann Hematol.* 2004 Sep 3; [Epub ahead of print].
11. Weltermann A., Fonatsch C., Haas O.A., et al.: Impact of cytogenetics on the prognosis of adults with de novo AML in first relapse. *Leukemia* 18: 293-302, 2004.
12. Byrd J.C., Ruppert A.S., Mrozek K., et al.: Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. *J Clin Oncol* 22: 1087-1094, 2004.
13. Schlenk R.F., Benner A., Krauter J., et al.: Individual patient data-based

- meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 22: 3741-3750, 2004.
14. Schoch C., Schnittger S., Klaus M., et al.: AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 102: 2395-2402, 2003.
  15. Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A., et al.: FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Brit J Haemat* 111: 190-195, 2000.
  16. Kottaridis P.D., Gale R.E., Frew M.E., et al.: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98: 1752-1759, 2001.
  17. Kottaridis P.D., Gale R.E., Langabeer SE, et al.: Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 100: 2393-2398, 2002.
  18. Frohling S., Schlenk R.F., Breitnick J., et al.: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100: 4372-4380, 2002.
  19. Whitman S.P., Archer K.J., Feng L., et al.: Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 61: 7233-7239, 2001.
  20. Ozeki K., Kiyoi H., Hirose Y., et al.: Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 103: 1901-1908, 2004.
  21. Dohner K., Tobis K., Ulrich R., et al.: Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20: 3254-3261, 2002.
  22. Schnittger S., Kinkelin U., Schoch C., et al.: Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 14: 796-804, 2000.
  23. Frohling S., Schlenk R.F., Stolze I., et al.: CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22: 624-633, 2004.
  24. Preudhomme C., Sagot C., Boissel N., et al.: Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia:

- a study from the Acute Leukemia 25. French Association (ALFA). *Blood* 100: 2717-2723, 2002.
25. Cilloni D., Gottardi E., De Micheli D., et al.: Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 16: 2115-2122, 2002.
  26. Bullinger L., Dohner K., Bair E., et al.: (2004) Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 350:1605-1616.
  27. Valk P.J., Verhaak R.G., Beijen M.A., et al.: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 350: 2410-2418, 2004.
  28. Grimwade D., Haferlach T.: Gene-expression profiling in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 350: 1676-1678, 2004.

# Population-based study of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia (AML)

*David Bowen, Robin Sanderson*

Division of Pathology and Neuroscience, University of Dundee, Scotland

The International Workshop on Chromosomes in Leukaemia described the first prospective study of karyotype in human acute myeloid leukaemia (AML), from which the Chicago karyotype classification was derived (1). The long-term survival of patients identified at this workshop has been reported in the third review of these patients in which multivariate analyses showed that karyotype was an independent predictor of survival for all patients (2). The Medical Research Council (MRC) AML 10 trial defined three prognostic groups based on cytogenetic abnormalities detected at presentation; favourable, intermediate and adverse (3). The concept of classifying AML according to the pre-treatment karyotype has become acceptable to most leukaemia investigators and has developed into “risk-adapted” therapeutic strategies (4). However, most demographic studies of AML derive from patients eligible for entry into randomised controlled trials, and are inevitably biased towards younger age. Few studies have used population-based registries, which are clearly unrepresentative of the wider AML population, and these are limited by relatively small numbers (5-8).

## Demographics of AML derived from three UK datasets

### Patients, databases and methodology

We collated patient information from three separate sources, two regional leukaemia registry databases, from Scotland and the North-East of England, and a population based case-control study from selected regions in England. The case-control study has previously been described and comprised cases of acute leukaemia 16-69 years, in the English regional health authorities of South West, Wessex and Yorkshire, and the counties of Lancashire and Cumbria (9). The Northern Region Haematology database is a population based registry containing patient data collected prospectively by the Northern Region Haematology Group for patients with AML since 1983 from a geographical-based population of 3.01 million (6). The Scotland Leukaemia Registry database is a population based reg-

istry containing patient data prospectively collected in Scotland for all patients with AML aged 16 and above since 1998 using similar methodology to the Northern data collection.

Clonal chromosomal abnormalities were defined and described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (10). Cases were assigned a modified Chicago classification, using a hierarchical system. Patients were also subdivided into subgroups representing each combination of chromosome 5 and 7 abnormalities present (5/7 subgroups). The frequency of common additional abnormalities in each 5/7 group was recorded. Complexity was defined as  $\geq 5$  abnormalities.

Two main datasets were compiled, representing the age overlap of the databases, consisting of 1709 patients from the North-East and Scotland registries (Dataset A), aged 16+, and 2006 patients from the two registries and case-control study combined (Dataset B), aged 16-69. A third dataset of 1240 patients was compiled from all patients aged 16-69 from the Scotland registry and case-control study, for whom sufficient information was available for separate analysis of secondary vs. *de novo* AML.

For each cytogenetic group the sex ratio of observed number of cases, was compared against the sex ratio of cases which would be expected to be seen when adjusted for age and sex by decade (according to the Scotland census 2001) with binomial distribution. *p* values  $< 0.01$  were considered significant.

## Results

Of 1709 patients from dataset A, and 2006 patients from dataset B, 70%/74% (Dataset A/B) had a successful cytogenetic analysis performed, with a median age of 62/54. Of these patients, 45%/41% had a normal karyotype, with median ages 64/56. In both datasets, the most common cytogenetic subgroup was abnormalities of chromosomes 5/7, at 17%/12% (median age 68/60). Of the good prognostic cytogenetic groups, the most common recurring abnormality was t(15;17), at 8%/11%, (median age 41/41), followed by t(8;21) with 4%/5% (median age 53/42), then inv(16) with 2%/3% (median age 47/45). The most common trisomy was +8, found in 6%/5%. The age distribution of karyotypic subgroups is delineated in Table 1. Of the favourable karyotypes, only t(8;21) did not occur in a significantly younger population.

**Table 1** - Age distribution of cytogenetic subgroups.

Median age statistically different from group (P<.01)	Cytogenetic abnormalities
Younger	t(15;17), inv(16), t(9;11)
Older	-5, -5q, -5/-7, -5q/-7, complex including 5 or 7, +11
Not different	-7, -7q, +8, +4, normal, complex <i>not</i> including 5 or 7, t(8;21), t(9;22), 11q23

Two cytogenetic subgroups had a large *absolute* male predominance in both datasets, t(8;21) (2.27/2.26:1) and inv(16) (2.50/2.20:1). Only one group showed an *absolute* female predominance in both datasets, t(15;17) (1:1.31/1.14). However, when adjusted for the expected sex ratio by decade, no significant sex differences were seen for most subgroups. Where a sex bias was identified, it was always male predominant (Table 2).

In both datasets the proportion of patients with complex karyotypes and of 5/7 subgroups increased with increasing age. Patients with -5, -5/-7, -5/del(7q), del(5q)/-7 and del(5q)/del(7q) formed a group with a significantly greater proportion of complex karyotypes compared with -7 and del(7q) alone ( $p < 0.01$ ), with del(5q) intermediate between the two ( $p < 0.01$ ).

The frequency of common additional abnormalities in the 5/7 subgroups was described. Amongst subgroups with -5 or del(5q) the most common additional abnormalities were of chromosome 17, (including del(17p), add(17p), dic(17p)) followed by abnormalities of chromosome 3 (del(3q), del(3p), -3), 12 (del(12p), -12), -18 and -21. These additional cytogenetic abnormalities were less frequently observed in the -7 and del(7q) subgroups, although trisomy 8 was overrepresented.

## Discussion

Our study provides a population-based review of the demographic and cytogenetic features of the wider AML population in the UK. Unbalanced abnormalities of chromosome 5 and 7 are the most frequently occurring in AML (17%/12%). No previous study has had sufficient numbers to provide detailed analysis by 5/7 subgroup, but this study demonstrates distinct heterogeneity in the demographic and cytogenetic characteristics of different 5/7 subgroups. Chromosome 5 containing subgroups represent an older population, are more likely to be associated with complex karyotypes and to have additional poor risk abnormalities including those affecting chromosome 17. Concurrent deletions / monosomies of chromosomes 5 and 17 could be important in AML transformation, as functional cooperation between a putative tumour suppressor gene at 5q13.3 and mutation of the *p53* gene at 17p could represent components of a multistep pathway in poor-risk AML (11). Pedersen-Bjergaard<sup>12</sup> describes genetic pathways in the leukaemogenesis of therapy-related MDS/AML. Our study has identified such pathways in *de novo* AML.

**Table 2** - Demographics of cytogenetic subgroups adjusted by decade for sex distribution; subgroups in which a sex predominance was identified.

Cytogenetic Group	Age Group	Number Male: Female Patients
t(8;21)	60-69	12 : 1
t(8;21)	70-79	7 : 0
+8	70-79	19 : 4
Normal	60-69	140 : 111
Normal	80-89	27 : 22
Complex	20-29	6 : 2



These pathways include those in which deletions of 5q or monosomy 5, are associated with any or all of -7, -7q, del(17p), -17, p53 mutations or a complex karyotype. Less common additional abnormalities in this pathway include those of chromosomes 3, 12 and monosomy 18. The primary events are likely to involve chromosome 5 but this has not been definitively demonstrated.

AML with the more common balanced translocations [t(15;17), inv(16) and t(8;21)] constitute a younger and biologically distinct group of disorders with a favourable clinical outcome. It is of interest that t(8;21) is the only one of these favourable abnormalities represented not only in the younger age decades but also in the older patients. Although based on small numbers, t(8;21) in older age is a heavily male predominant disease.

Previous studies have identified an *absolute* male predominance for AML, especially in older patients.<sup>13</sup> In an attempt to verify crude incidence data for cytogenetic groups our data were age/sex adjusted by decade, and now few cytogenetic groups now showed sex predominance. Those that did were male predominant, and were not the common balanced abnormalities in the *younger* AML population as previously suggested. An excess of males was seen in some older age groups including with normal karyotype, and given that the normal karyotype group accounts for around 40% of patients, this suggests that a true male excess exists in older patients.

### Acknowledgements

To Dr Penny Taylor, Dr Nick Bown, Professor Steven Proctor and Haematology colleagues in the North East of England for the use of the Northern Region Haematology Database

To Dr Peter Johnson, Mrs Christine McGuire, Mrs Jo White and Haematology colleagues from Scotland for the use of the Scottish Leukaemia Registry data.

To Dr Anthony Moorman, Dr Eleanor Willett, Professor Eve Roman and Haematology colleagues who contributed data to the case-control study coordinated from Leeds.

To all staff involved with the collection and analysis of cytogenetic data.

### Reference List

1. Rowley J.D.: Chromosome abnormalities in human acute nonlymphocytic leukemia: relationship to age, sex, and exposure to mutagens. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1982; 60: 17-23.
2. Bloomfield C.D., Shuma C., Regal L. et al.: Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer.* 1997; 80: 2191-2198.
3. Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998; 92: 2322-2333.

4. Wheatley K., Burnett A.K., Goldstone A.H. et al.: A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol.* 1999; 107: 69-79.
5. Taylor P.R., Reid M.M., Stark A.N. et al.: De novo acute myeloid leukaemia in patients over 55-years-old: a population-based study of incidence, treatment and outcome. Northern Region Haematology Group. *Leukemia.* 1995; 9: 231-237.
6. Proctor S.J., Taylor P.R.: Age cohort subgroups in adult acute myeloid leukaemia studies--the population perspective. *Leukemia.* 2001; 15: 188-189.
7. Preiss B.S., Kerndrup G.B., Schmidt K.G. et al.: Cytogenetic findings in adult de novo acute myeloid leukaemia. A population-based study of 303/337 patients. *Br J Haematol.* 2003; 123: 219-234.
8. Mauritzson N., Johansson B., Albin M. et al.: A single-center population-based consecutive series of 1500 cytogenetically investigated adult hematological malignancies: karyotypic features in relation to morphology, age and gender. *Eur J Haematol.* 1999; 62: 95-102.
9. Kane E.V., Roman E., Cartwright R., Parker J., Morgan G.: Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer.* 1999; 81: 1228-1233.
10. Mitelman F.: *ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature.* 1995. Basel, Switzerland, Karger. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
11. Castro P.D., Liang J.C., Nagarajan L.: Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood.* 2000; 95: 2138-2143.
12. Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.K., Christiansen D.H., Nerlov C.: Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002; 99: 1909-1912.
13. Moorman A.V., Roman E., Cartwright R.A., Morgan G.J.: Age-specific incidence rates for cytogenetically-defined subtypes of acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer.* 2002; 86: 1061-1063.

## **La leucemia acuta promielocitica: paradigma per una nuova strategia terapeutica**

*Francesco Lo-Coco*

Dipartimento di Biopatologia, Università Tor Vergata, Roma

Nel corso degli ultimi 15 abbiamo assistito ad una straordinaria serie di progressi nella ricerca clinica e biologica sulla leucemia acuta promielocitica (LAP). Da un lato, infatti, sono stati identificati i geni coinvolti nella traslocazione t(15;17) specifica della malattia ed è stato delucidato il meccanismo attraverso il quale la proteina ibrida PML/RAR $\alpha$  derivante da questa produce il blocco differenziativo; dall'altro l'introduzione dell'acido retinoico e la sua inclusione negli schemi terapeutici in combinazione alla chemioterapia, hanno portato a capovolgere le stime di sopravvivenza a lungo termine, essendo attualmente vicina all'80% la percentuale dei pazienti potenzialmente guariti, rispetto al 20% che si registrava alla fine degli anni '80. È importante sottolineare il contributo a questo successo del gruppo cooperativo italiano GIMEMA, che già negli anni 80 aveva identificato i caratteri peculiari di questa leucemia ed adottato dei protocolli chemioterapici "mirati". Agli inizi degli anni '90, mettendo a frutto l'esperienza specifica acquisita, il gruppo GIMEMA ha ideato una strategia terapeutica di combinazione (acido retinoico+antracicline, protocollo AIDA) che ha trovato notevolissima diffusione in Europa e nel mondo. La LAP rappresenta il primo modello di neoplasia umana in cui si sia rivelato efficace un approccio terapeutico di tipo differenziativo. Anche se a tutt'oggi non riusciamo ad ottenere risultati analoghi in altri tumori, diversi sono gli studi in corso in onco-ematologia nei quali si stanno valutando agenti differenzianti in varie combinazioni. Oltre all'acido retinoico, altri nuovi (e vecchi "rispolverati") agenti terapeutici quali gli anticorpi anti-CD33 ed il triossido di arsenico si sono rivelati estremamente efficaci nel trattamento della LAP, essendo al momento attuale preferibilmente impiegati in recidiva. Infine, studi di monitoraggio della risposta alla terapia attraverso metodiche di biologia molecolare (amplificazione con la PCR del gene PML/RAR $\alpha$ ) consentono oggi, insieme ai parametri clinici convenzionali, di modulare l'intensità del trattamento attraverso la identificazione precoce dei pazienti a maggior rischio di recidiva, permettendo inoltre di risparmiare tossicità inutile in quelli potenzialmente guariti.

## Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia

*Giovanni Martinelli,<sup>1</sup> Michele Malagola,<sup>1</sup> Michela Rondoni,<sup>1</sup>  
PierPaolo Piccaluga,<sup>1</sup> Costanza Bosi,<sup>1</sup> Domenico Russo,<sup>2</sup> Michele Baccarani<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Medical Oncology "Seràgnoli", University of Bologna, Bologna;

<sup>2</sup>Chair of Hematology, University of Brescia, Brescia

The expression *acute myeloid leukemia* (AML) collectively refers to a combination of distinct diseases that differ with regard to their pathogenetic evolution, genetic abnormalities, clinical features, response to therapy and prognosis. Cytogenetic and molecular analyses have been instrumental in identifying disease entities among the mixed bag of AML subtypes, which are currently catalogued as suboptimally defined categories with widely different prognoses. These classifications are mainly based upon cytogenetic knowledge. They provide leads in clinical decision-making, e.g. with regard to treatment choice. The disclosure of genetic abnormalities may also offer potential targets for treatment intervention. Today such specific interventions into the molecular intracellular derangements of leukemic cells are only available for exceptional genetically defined entities of AML, such as acute promyelocytic leukemia with the translocation t(15;17). The microarray technology for analyzing differences in gene expression among clinical specimens of leukemia, advances in protein technology, the use of clinically relevant animal models, the development of drug design technology and the use of appropriate cellular in vitro systems, promise to accelerate our understanding of AML, pathogenesis as well our ability to recognize specific AML disease entities in the near future. With this perspective in mind, what are current and emerging strategies in AML therapy?

### Remission induction strategies

Since the introduction of the anthracyclines (daunorubicin and doxorubicin) and cytarabine, these therapeutic agents have been the cornerstones of remission induction therapy for adult AML. With some variations, most centers apply treatment schedules based on these drugs, sometimes supplemented with etoposide. Instead of daunorubicin, some remission induction therapies have incorporated idarubicin, mitoxantrone or amsacrine. These combinations induce complete remissions in an average of 70% to 80% of adults aged less than 60 years and in approximately 50% of patients of older age. The overexpression of a membrane

protein designated P-glycoprotein (P-gp) is a typical phenotypic marker of pleiotropic drug resistance. P-gp belongs to a group of phosphorylated glycoproteins. In patients, primary or acquired resistance to chemotherapy has been associated with specific immunophenotypes and particular molecular and functional markers eg, with the expression of P-gp (P glycoprotein or MDR1). Efforts to overcome chemotherapy resistance by including multidrug resistance modifiers (eg cyclosporin or its analogue PSC 833) in the induction schedule have as yet not met with reproducible success in prospective comparative studies (1-3). These MDR modulators have been associated with enhanced toxicity. Due to the impact of the modulator on chemotherapy pharmacokinetics and the risk of increased toxicity, the dosages of chemotherapeutic drugs in the experimental groups had to be reduced. The dose reductions and the enhanced early toxicity may have jeopardized any potential benefit. Remission induction with growth factor priming is currently receiving renewed interest. AML is a prototype malignancy expressing functional hematopoietic growth factor receptors on their cellular surface (4). Growth factor receptors offer targets for therapeutic intervention. Co-incubation of AML cells with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and the cell cycle dependent chemotherapeutic agent cytarabine increases intracellular levels of the active metabolite cytosine arabinoside-triphosphate, elevates incorporation of cytarabine into cellular DNA and enhances cytarabine cytotoxicity against leukemic blasts and leukemic progenitor cells (5). The therapeutic concept of sensitizing AML to chemotherapy with G-CSF or GM-CSF, a phenomenon frequently referred to as growth factor priming, has been examined until recently in uncontrolled and small size randomized studies mainly. In two larger randomized studies in which GM-CSF was applied after the days of chemotherapy to accelerate hematopoietic recovery, it was also administered concomitantly with the chemotherapy (6, 7). The latter two studies were performed in patients of older age, i.e., mainly patients with AML of unfavorable prognosis. In one of these studies in 240 patients of 55+ yr age, GM-CSF conferred a better disease-free survival (7) but it was not possible to distinguish the effect of AML priming from an effect of enhanced hematopoietic recovery following marrow suppression. A recent large randomized study (enrolling 640 patients) focussed on the G-CSF priming question (5). The study was conducted in young and middle aged adults with previously untreated AML, thus representing a broader prognostic diversity. G-CSF was selectively applied from day -1 of chemotherapy through the last day of chemotherapy of both induction cycles I and II. G-CSF was not continued after chemotherapy during the hypoplastic phase. In this study the anthracyclin was scheduled at the end of the cycle to avoid interference with cytarabine cell cycle dependent cytotoxicity. Among patients in the study attaining CR, the probability of relapse was considerably reduced when they had been assigned to treatment with G-CSF along with induction chemotherapy. This difference translated into a significant DFS benefit at 4 years for G-CSF primed patients. The benefit of G-CSF sensitization was particularly evident among the intermediate-subset of patients (72% of cases) as evidenced by improvements of overall survival, die-

sease-free as well as event-free survival (5). Consistent with laboratory data, the latter benefit may have been achieved through G-CSF mediated activation of subpopulations of leukemic cells initially insensitive to the chemotherapy. Further exploration of the approach of G-CSF sensitization of chemotherapy seems warranted.

### Post-remission strategies

During the last 20 years there has been a shift from low-dose maintenance chemotherapy administered for prolonged times (1-2 years) toward intensified cycles of chemotherapy delivered within a concentrated time (4-6). These dose-escalated and time-condensed cycles are given once a complete remission has been induced and serve the objective of eradicating minimal residual leukemia. Most commonly, these regimens are based on high-dose cytarabine with or without autologous or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Survival rates in large Phase III studies of high-dose chemotherapy for AML patients 60 years of age or younger have been estimated at 40% to 55% at 4 years. These results would indicate a dose-response relationship for chemotherapy in patients with AML. High-dose cytotoxic therapy followed by autologous stem cell transplantation (auto-SCT) has been compared with either no further postremission treatment or *conventional-type* postremission chemotherapy. In certain studies (8, 9) but not others (12), disease-free survival was improved after auto-SCT due to a reduction in the probability of relapse. In none of these studies a significant advantage in overall survival auto-SCT (ranging from 40% to 55% at 4 years) was noted. The lack of survival benefits is explained by the fact that a proportion of patients relapsing after chemotherapy can be rescued by an autograft in second remission. The procedure-related mortality following auto-SCT has also been somewhat greater than after chemotherapy, partially offsetting the advantage of the reduced relapse frequency with autologous transplantation. Further, only a limited fraction of complete responders proceed to transplantation. Premature withdrawal from autografting is the consequence of the harvest of an insufficient number of hematopoietic cells for grafting, intercurrent infections, or early relapse of leukemia. A question that remains to be resolved is whether certain subgroups of patients with AML benefit from auto-SCT selectively. There is evidence suggesting that patients with intermediate-risk AML (according to cytogenetics) derive more benefit from auto-SCT than from intensive chemotherapy alone (9) but this has not been confirmed in other studies (10, 12). Definite conclusions regarding the potential benefit of autologous stem cell transplantation in distinct prognostic subsets of AML, will require additional studies enrolling larger numbers of patients. Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) following myeloablative cytotoxic therapy currently offers the most powerful antileukemic treatment modality for AML in remission. When an HLA-matched allogeneic sibling donor is available, the option of allo-SCT is usually the first choice in patients with AML in complete remission; following allo-SCT the probability of relapse is significantly reduced. The risk of relapse

**Table. 1** - Molecular markers additional to cytogenetics with independent prognostic significance for remission duration or survival in AML of adults.

Marker	Frequency (%)	Predictive for relapse	Survival	Reference
P53 mutation	9/200 (4.5)	-	Unfavorable	Nakano et al.*
High BCL2 and WT1 mRNA expression	35/98 (36)	Unfavorable	Unfavorable	Karakas et al.*
MLL partial tandem duplication	18/221* (8)	Unfavorable	NS	Döhner et al.*
High EVI 1 mRNA expression	32/319 (10)	Unfavorable	Unfavorable	Van Waalwijk et al.*
C/EBP $\alpha$ mutation 12/277 (4.3)	15/135 (11) Favorable	Favorable Favorable	Favorable Van Waalwijk et al.*	Preudhomme et al.*
c-KI T mutation	34/110° (31)	Unfavorable	NS	Care et al.*

\*Normal cytogenetics only °AML with t(8;21) and inv (16) only.

in patients with AML in first complete remission following transplantation of an HLA-matched sibling allograft may vary from 10% to 25%. Accumulating evidence suggests that disease-free survival is better following allo-SCT, although this observation has not always been consistent (10). The advantage of a reduced probability of relapse of AML after allo-SCT is partially sacrificed due to enhanced procedure-related mortality of 10-25% (caused by acute and chronic graft-versus-host disease and post-transplant immunodeficiency complicated by interstitial pneumonia and serious opportunistic infections). As the application of an allograft is practically dependent on the availability of a fully matched family donor and specific age eligibility limitations, comparisons of outcome following allografting and autografting or chemotherapy have not been based upon true randomizations. More recently, investigators have compared outcome between patients with an HLA-matched donor (regardless of whether or not the transplant was done) and those without an available donor in an effort to mimic an intention-to-treat evaluation (13-17). The results indicate reduced relapse rates for patients with AML in first complete remission with a donor but clear evidence of an overall benefit is still lacking. Considering the clinical heterogeneity of AML, an important issue has been whether certain subsets of patients would benefit more from an allograft than do others. For instance, in patients with good-risk AML (based on cytogenetics) with an *a priori* risk of relapse of 25% or less, it makes no sense to apply an allograft in first complete remission considering the associated enhanced procedure related death rate. Also, patients with good-risk AML have a greater chance of being rescued in case of relapse. This argues for reserving allotransplant strategies in good-risk AML for those with relapse only. HLA-matched unrelated donor (MUD) transplants are increasingly employed when a genotypically HLA-matched donor is not available. Although such transplants are mainly applied to restricted categories of high-risk cases (poor-risk AML in CR1, or AML in CR2 or CR3 in early relapse) their value remains to be critically assessed in large series of patients.

### Treatment strategies in older patients

The majority of patients with AML are 60 years of age or older. While results of treatment have improved steadily in younger adults over the last 20 years, there have been limited improvements in outcome among individuals of 60+ years of age. When treated with chemotherapy alone, the older patients have an estimated survival of approximately 20% at 2-years and 10% at 4 to 5 years. The reasons for the unsatisfactory outcome in the elderly likely relate to the increased frequency of unfavorable cytogenetics among older patients with AML, a greater frequency of antecedent myelodysplasia, as well as the limited abilities of the patients to tolerate intensive chemotherapy. High-dose chemotherapy is not beneficial to the elderly with AML (18, 19)

There has been an intense interest in the introduction of new modalities. Examples of these strategies are the use of antibody directed treatment (eg the use of the antiCD33-calicheamycin toxin conjugate, Mylotarg, (20) and the development of molecular targeting (egfarnesyl transferase inhibitors). Also interesting is the development of allotransplantation following conditioning with non-myeloablative preparative regimens. The goal of these approaches is to establish chimerism following immunosuppressive therapy and then exploit the graft-versus-leukemia of the allografts, so that donor chimerism can be used as a platform for subsequent infusions of donor lymphocytes. Early clinical trials afford proof of principle of this approach, but for the time being they are based on small patient numbers and they have limited follow-up (21-23). In older patients with various hematologic disorders (mixed) donor chimerism can be established, but more mature data will be needed for an assessment of the clinical value of this strategy.

### What have genetics to offer?

Cytogenetic classifications employed with some variation by different groups in AML roughly distinguish three risk groups, one with favorable outcome (probability of relapse of 30% or less and 4-years survival of 70% or more), a second intermediate prognostic group with a risk probability of relapse of 50% and an overall survival at 4 years of 40-50%, and thirdly an adverse prognostic category characterized by a high relapse rate (more than 70%) and an overall survival rate at 4 years of 20% or less. These values of outcome refer to averages for adults between 15 and 60 years of age. More recently, various new molecular markers have been identified that allow for dissecting these composite risk categories. For instance, *FLT3* internal tandem repeat mutations have been recognized as the single most common abnormality in AML. *FLT3* internal tandem duplications (*FLT3*-ITD) represent activating mutations of the FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*), a hematopoietic receptor. AML with *FLT3*-ITD are seen in 15-30% of pediatric and adult patients. *FLT3*-ITD are associated with significantly greater risk of relapse and reduced survival (24-29). Other studies with large numbers of patients could not (yet) unquestionably reproduce the prognostic value of *FLT3*-ITD for survival (30-32). It has been suggested that a high mutant/wild type *FLT3* ratio enhances that predictive power of *FLT3* mutations



for survival as well (33). Interestingly *FLT3* mutations are mainly seen in the largest category of intermediate cytogenetic risk of AML. Hence, detection of *FLT3*-ITD's offers an important addition to recognize a new subset of aggressive AML. Another recurrent Asp835 point mutation of the *FLT3* receptor, seen in approximately 5-10% of *de novo* AML, has not (or not yet) been correlated with prognosis. Mutations of the tumor suppressor gene *p53* predict for negative outcome (34). Immunodiagnosis of *bcl2* positivity was shown to have negative predictive value in AML (35-37). By RT-PCR analysis high *BCL2* and *WT1* expression have also been suggested in combination to define AML with poor risk (38). *EVI-1* (ecotropic virus integration site 1) is an oncogene overexpressed in AML with translocations of 3q26 and characterizes AML with poor risk outcome. Recently it was shown that *EVI-1* mRNA overexpression in AML in the absence of 3q26 cytogenetic abnormalities also predicts for notably bad prognosis (39). *C/EBP- $\alpha$*  (CCAAT enhancer-binding protein alpha) is a transcription factor that has a key role in myelopoiesis. *C/EBP- $\alpha$*  mutations have been found in patients with AML in a few percent of cases. The latter mutations define AML with relatively good risk leukemia (40, 41). These cases are hidden among the intermediate cytogenetic risk subset of patients with AML and can now be separated. Similarly, partial duplications of a portion of the *MLL* gene define an unfavorable subset among AML with intermediate risk cytogenetics (42). Also high expression of a gene designated *BAALC* (Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic) which is normally expressed on neuro-ectoderm-derived tissues and hematopoietic progenitors has been suggested in a study of limited size (86 cases) to predict for poor survival among patients with AML with normal cytogenetics (43). Each of these molecularly defined groups is of relatively small proportion, consistent with the considerable genetic heterogeneity of AML. The presence of point mutations of the hematopoietic receptor *c-kit* in patients with *abn(16)* AML and *t(8;21)* AML, generally considered to be of favorable prognosis, defines a subset with an enhanced risk of recurrence (44). With the introduction of high throughput analysis for molecular abnormalities and gene expression profiling, it will in the near future probably be possible to define other classes of AML. The introduction of expression array chips may yield composite mRNA signatures of AML cells with prognostic value as well. These distinctions when validated in clinical studies, are foreseen to provide powerful tools for guiding treatment strategies in AML (45, 46). A precise recognition of the diverse genetic abnormalities will be of value in distinguishing AML subsets with distinct pathogenic origin; most likely some of these diagnostic targets may provide convenient markers for monitoring the effect of therapy and quantifying the disappearance of leukemia cells following therapy. One might anticipate that these analyses will provide insights into molecular pathways and disclose why certain leukemias are unresponsive to traditional chemotherapy. Thus they may provide keys towards new avenues for treating high risk AML, e.g. based on interventions directed at genetic abnormalities. Examples of these approaches currently in trial are interventions aimed at suppressing the oncogene *BCL2* (eg with anti-sense oligonucleotide modalities) (47) and the use of molecules that act as kinase inhi-

bitors. The latter category for instance comprises a series of molecules (eg CEP 701) (48) that inhibit the constitutive active FLT3 receptor mutants in AML. Various of these molecules are currently in therapeutic development.

## References

1. Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L, et al. Mitoxantrone, Etoposide, and Cytarabine with or without Valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial (E2995). *J Clin Oncol* 2004; 22: 1078-86.
2. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001; 98: 3212-2.
3. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002; 100: 1224-32.
4. Lowenberg B, Touw IP. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 281-92.
5. Lowenberg B, Van Putten W, Theobald M, Gmür J, Verdonck L, Sonneveld P, et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349: 743-52.
6. Löwenberg B, Suciú S, Archimbaud E, Ossenkoppele G, Verhoef GE, Vellenga E, et al. Use of recombinant GM-CSF during and after remission induction chemotherapy in patients aged 61 years and older with acute myeloid leukemia: final report of AML-11, a phase III randomized study of the Leukemia Cooperative Group of European Organisation for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group. *Blood* 1997; 90: 2952-61.
7. Witz F, Sadoun A, Perrin MC, Berthou C, Briere J, Cahn JY, et al. A placebo-controlled study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered during and after induction treatment for de novo acute myelogenous leukemia in elderly patients. Groupe Ouest Est Leucémies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 1998; 91: 2722-30.
8. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 1995; 332: 217-23.

9. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet* 1998; 351: 700-8.
10. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1998; 339: 1649-56.
11. Ravindranath Y, Yeager AM, Chang MN, Steuber CP, Krischer J, Graham-Pole J, et al. Autologous bone marrow transplantation versus intensive consolidation chemotherapy for acute myeloid leukemia in childhood. Pediatric Oncology Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1428-34.
12. Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, Witz F, Milpied N, Delain M, et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 1997; 90: 2978-86.
13. Keating S, de Witte T, Suci S, Willemze R, Hayat M, Labar B, et al. The influence of HLA-matched sibling donor availability on treatment outcome for patients with AML: an analysis of the AML 8A study of the EORTC Leukaemia Cooperative Group and GIMEMA. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. *Br J Haematol* 1998; 102: 1344-53.
14. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075-83.
15. Burnett AK, Wheatley K, Goldstone AH, Stevens RF, Hann IM, Rees JH, et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML 10 trial. Medical Research Council Adult and Paediatric Working Parties. *Br J Haematol* 2002; 118: 385-400.
16. Suci S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. EORTC and GIMEMA Leukemia Groups. *Blood* 2003; 102: 1232-40.
17. Burnett AK, Wheatley K, Stevens R. Further data to question the use of alloBMT in AML CR1 in addition to intensive chemotherapy. The MRC experience in 715 patients under 44 years with donors availability. *Blood* 2002; 10: 269a [abstract].
18. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al.

- Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer and Leukemia Group B. N Engl J Med* 1994; 331: 896-903.
19. Archimbaud E, Jehn U, Thomas X, De Cataldo F, Fillet G, Belhabri A, et al. Multicenter randomized phase II trial of idarubicin vs mitoxantrone, combined with VP-16 and cytarabine for induction/consolidation therapy, followed by a feasibility study of autologous peripheral blood stem cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*.1999; 13: 843-9.
  20. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, et al. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia* 2002; 16: 1627-36.
  21. Feinstein LC, Sandmaier BM, Hegenbart U, McSweeney PA, Maloney DG, Gooley TA, et al. Non-myeloablative allografting from human leucocyte antigen-identical sibling donors fortreatment of acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol* 2003; 120: 281-8.
  22. Martino R, Caballero MD, Simon JA, Canals C, Solano C, Urbano-Ispizua A, et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *AML and allo PBSCT Subcommittees of the Spanish Group for Hematopoietic Transplantation. Blood* 2002; 100: 2243-5.
  23. Bertz H, Potthoff K, Finke J. Allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors in older patients with myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1480-4.
  24. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-80.
  25. Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 2000; 14: 675-83.
  26. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 89-94.
  27. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111: 190-5.
  28. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-9.
  29. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16

- to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-80.
30. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-35.
  31. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2001; 100: 59-66.
  32. Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, et al. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2002; 94: 3292-8.
  33. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61: 7233-9.
  34. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kitamura K, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2000; 65: 23-31.
  35. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 3091-6.
  36. Lauria F, Raspadori D, Rondelli D, Ventura MA, Fiacchini M, Visani G, et al. High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. *Leukemia* 1997; 11: 2075-8.
  37. Maung ZT, MacLean FR, Reid MM, Pearson AD, Proctor SJ, Hamilton PJ, et al. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 88: 105-9.
  38. Karakas T, Miething CC, Maurer U, Weidmann E, Ackermann H, Hoelzer D, et al. The coexpression of the apoptosis-related genes bcl-2 and wt1 in predicting survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 846-54.
  39. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acutemyeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101: 837-45.
  40. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, deBotton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA) Group. *Blood* 2002; 100: 2717-23.
  41. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, et al. Biallelic mutations in the

- CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 2003; 4: 31-40.
42. Dohner K, Tobis K, Ulrich R, Frohling S, Benner A, Schlenk RF, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3254-61.
  43. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 2003; 102: 1613-8.
  44. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121: 775-7.
  45. Valk PJM, Verhaak RGW, Beijnen MA, Erpelinck CAJ, Van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1617-28.
  46. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605-16.
  47. Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC, et al. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 2003; 101: 425-32.
  48. Douglas Smith B, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 3669-76.

## Approccio immunologico nella terapia della leucemia acuta mieloide

*Sergio Amadori, Carla Mazzone, Adriano Venditti*

Cattedra di Ematologia, Università Tor Vergata, Roma

La “targeted therapy” rappresenta una nuova frontiera per la terapia di vari tipi di neoplasie ed, in particolare, della leucemia acuta mieloide (LAM), per la quale le strategie terapeutiche convenzionali sembrano ormai aver raggiunto un “plateau” in termini di risultati clinici. Nel contesto di trattamenti che rispondano a criteri di “targeted therapy”, l’identificazione di un approccio immunologico efficace costituisce l’obiettivo di molti ricercatori da ormai venti anni. In generale, l’approccio immunologico prevede l’uso di anticorpi monoclonali (AM), strategia questa ormai ben consolidata nella corrente pratica clinica con risultati più che incoraggianti in varie emopatie maligne.

Affinché un AM possa trovare impiego terapeutico deve avere caratteristiche quali: scarsa o assente immunogenicità, alta specificità per le cellule leucemiche, capacità di veicolare agenti citotossici ed ovviamente un accettabile profilo tossico. L’impiego ottimale di AM richiede, inoltre, l’identificazione di “targets” idonei (“antigeni leucemia-associati”), che devono essere stabilmente ed omogeneamente espressi dalle cellule leucemiche, non espressi od espressi in modo trascurabile da tessuti normali, non essere presenti in forma solubile (per evitare una rapida “clearance”) ed infine essere facilmente accessibili all’AM. Gli AM utilizzati a fini terapeutici possono essere di tipo non-coniugato (anticorpo nudo) o coniugato.

### **AM non-coniugati (AMnC)**

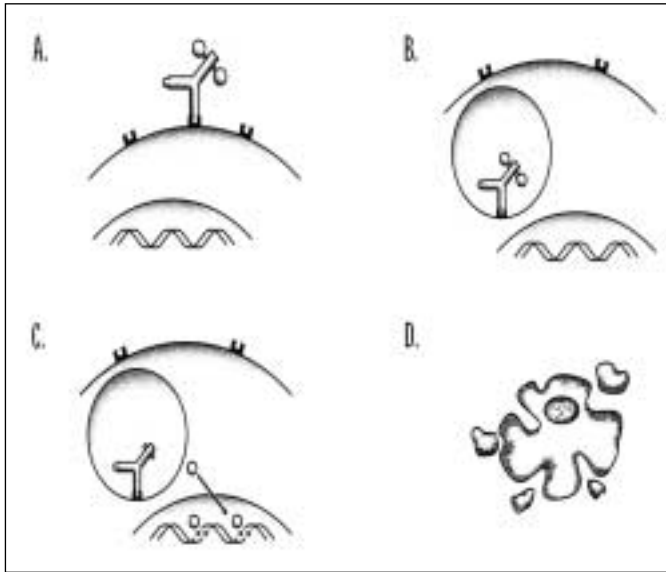
Gli AMnC sono in grado di indurre la morte cellulare tramite il reclutamento e l’attivazione di cellule effettrici in grado di agire tramite “citotossicità” cellulo-mediata, complemento-dipendente, oppure tramite il blocco della interazione ligando-recettore; quest’ultimo meccanismo di azione è in grado di indurre apoptosi tramite la inibizione del segnale di trasduzione. Il primo AMnC utilizzato nella terapia della LAM riconosceva come bersaglio l’antigene (ag) CD33. Tale ag è espresso sulla superficie delle cellule di LAM in più del 90% dei casi con una densità antigenica media di circa 10.000 siti per cellula. Esso è tipicamente espresso sui normali progenitori mieloidi, ma non sulla cellula staminale emo-

poietica pluripotente e sui tessuti non-ematopoietici. Non vi sono prove che il legame con CD33 inneschi fenomeni di apoptosi, di conseguenza si ritiene che l'AM anti-CD33 non-coniugato eserciti la sua azione litica nei confronti della cellula leucemica inducendo un "danno immunologico". Studi preliminari che hanno utilizzato anti-CD33 murino hanno dimostrato la sua scarsa tossicità, la sua rapida fissazione a livello splenico e midollare e la saturazione dei siti antigenici sulle cellule leucemiche alle dosi di 5-10 mg/m<sup>2</sup>. Nonostante una transitoria riduzione della blastosi periferica osservata in alcuni casi, l'AM murino tuttavia è risultato sostanzialmente incapace di indurre una adeguato effetto antileucemico. Proprio nel tentativo di potenziarne l'efficacia antileucemica, il gruppo dello Sloan-Kettering ha sviluppato un AM anti-CD33 chimerico, umanizzato (HuM195). In uno studio di fase II con HuM195, è stata osservata una riduzione della blastosi periferica in tutti i 35 pazienti arruolati, ma soltanto in 1 si è ottenuta una remissione completa (RC). In considerazione della relativa inefficacia di HuM195 in presenza di malattia in fase conclamata, si è pensato di utilizzare tale AM in condizioni di malattia minima residua, come per esempio nei pazienti indotti in RC. In questo senso, è stato condotto un trial clinico in pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica (LAP) in remissione ematologica dopo chemioterapia + ATRA, per i quali era previsto un mantenimento con HuM195 alla dose di 3 mg/m<sup>2</sup> due volte a settimana per 6 somministrazioni. Di 27 pazienti entrati nello studio, 22 presentavano persistente positività molecolare per il riarrangiamento PML/RARa; dopo terapia con HuM195, 11 dei 22 (50%) ottenevano la remissione molecolare.

### **AM coniugati (AMC)**

La iniziale esperienza con HuM195 aveva insegnato che tale AM, pur non esercitando una significativa attività antileucemica, era comunque in grado di raggiungere le sedi di malattia, saturare i siti antigenici sulle cellule leucemiche con successiva internalizzazione dopo legame con il proprio recettore sulla membrana cellulare. Questa osservazione ha rappresentato la premessa alla ipotesi che HuM195 potesse utilmente fungere da "carrier" di farmaci chemioterapici in grado di indurre un danno selettivo nei confronti dei blasti mieloidi risparmiando i tessuti normali. Lo sviluppo di tale ipotesi è alla base della generazione del farmaco gemtuzumab ozogamicin (GO, Mylotarg), prima immunotossina ad ottenere l'approvazione della FDA per l'impiego clinico nella LAM in recidiva. Il GO è un prodotto di coniugazione tra un AM anti-CD33 (hP67.6) ed un potente antibiotico ad azione antitumorale (calicheamicina), appartenente alla famiglia delle antracicline. Il risultato è una molecola ricombinante, in cui tre piccole sequenze ipervariabili per ciascuna catena dei domini variabili dell'anticorpo murino sono state inserite nel dominio variabile di una immunoglobulina umana IgG4. La molecola "ingegnerizzata" è prodotta da una linea mielomatosa di topo, non secernente immunoglobuline murine (linea KD1). Studi in vitro hanno dimostrato che i blasti leucemici CD33<sup>+</sup> internalizzano l'ag CD33 dopo legame con l'AM; l'internalizzazione ed il catabolismo del complesso CD33-antiCD33 avviene





**Fig. 1** - Meccanismo di azione di Gemtuzumab Ozogamicin.

entro 4 ore. Alla internalizzazione di GO fa seguito la rottura immediata del legame chimico (linker) mediante il quale calicheamicina è agganciata all'anticorpo, con conseguente rilascio intracitoplasmatico dell'agente citotossico. La calicheamicina è capace così di legarsi in maniera sequenza-specifica alla catena di DNA inducendo rottura del doppio filamento e quindi innesco di morte cellulare. (Figura 1 A, B, C, D).

Un iniziale studio di fase I ha inteso determinare la massima dose tollerata di GO in pazienti affetti da LAM resistente o in recidiva. Allo studio sono stati arruolati 40 pazienti a cui GO è stato somministrato in dosi scalari ( $0,25 - 9 \text{ mg/m}^2$ ) ogni 14 giorni per un massimo di 3 dosi. L'incremento di dose è stato interrotto a  $9 \text{ mg/m}^2$  poiché a tale dose si osservava la saturazione pressoché completa dei siti antigenici presenti sulle cellule leucemiche. La somministrazione di GO è stata generalmente ben tollerata e gli effetti collaterali più comuni sono consistiti in febbre, brivido e transitorio incremento delle transaminasi. In 8 (20%) pazienti si è ottenuta la RC ed in altri 3 (8%) la normalizzazione dei parametri ematologici. Tre sono gli studi di fase II condotti con GO. Il primo (trial 201), multicentrico, condotto negli USA ed in Canada includeva pazienti con LAM in prima recidiva con durata della RC > 6 mesi, con esclusione dei pazienti con LAM secondaria o in recidiva dopo trapianto allogenico di cellule staminali. Il secondo studio (trial 202), condotto in Europa, era analogo al precedente con la sola eccezione di consentire l'inclusione di pazienti in recidiva dopo trapianto allogenico di cellule staminali. Il terzo studio (trial 203), condotto in Europa ed USA, includeva pazienti di età > 60 anni con LAM in recidiva dopo almeno 3 mesi di RC. L'insieme di questi studi di fase II ha arruolato un totale di 188 pazienti che hanno ricevuto il GO alla dose di  $9 \text{ mg/m}^2$  al giorno 1 e al giorno 15. La "overall response rate (ORR)" (includente la RC e la RC con incompleto recupero piastrinico, RCp) nei

tre studi è stata del 31%: 34% nello studio 201; 32% e 20%, rispettivamente negli studi 202 e 203. La stratificazione per età dei pazienti non modificava sostanzialmente il dato della ORR: 28% per i pazienti di età > 60 anni, 34% per quelli di età inferiore. La durata della “overall survival” (OS) è risultata del 27% ad 1 anno. La tossicità, valutata secondo i criteri NCI, è consistita principalmente in mielosoppressione e complicanze emorragiche sovrapponibili a quelle della terapia convenzionale; al contrario, minima è risultata l’incidenza di mucositi ed infezioni, e di grado moderato la tossicità epatica. L’insieme di questi dati dimostra come GO rappresenti una efficace e tollerabile monoterapia per pazienti affetti da LAM in prima recidiva, inclusi quelli con età > 60 anni. Con l’obiettivo quindi di valutare l’efficacia, la tossicità e la fattibilità della somministrazione di GO come terapia front-line nei pazienti anziani affetti da LAM, il gruppo EORTC-LG in collaborazione con GIMEMA ha attivato nel settembre 2000 uno studio multicentrico di fase II (AML-15), conclusosi nel settembre del 2001 con l’arruolamento di 105 pazienti. Il disegno dello studio prevedeva la somministrazione sequenziale di GO e chemioterapia standard di induzione (protocollo MICE) a pazienti di età 61-75 anni e performance status (PS) 0-1 (AML-15A). I pazienti considerati non eleggibili per un trattamento di tipo intensivo (età > 75 anni, oppure età inferiore ma con PS  $\geq 2$ ) ricevevano terapia di induzione con solo GO. La figura 2 illustra il disegno generale dello studio.

Nel protocollo AML-15A sono stati arruolati 57 pazienti valutabili, dei quali 38 (67%) hanno completato l’intero programma di induzione (GO+MICE). L’ORR dopo l’intera sequenza di induzione è stata del 54% (31/57), con una RC ed una RCp raggiunta nel 35% e 19% dei pazienti, rispettivamente. Una iniziale risposta al GO veniva documentata nel 35% dei pazienti, con una CR e CRp nel 23% e 12%, rispettivamente. In generale, la tossicità è stata accettabile con una mortalità globale “therapy-related” del 14% (5% dopo GO). I principali effetti collaterali dopo entrambe le fasi di induzione sono consistiti in mielosoppressione prolungata ma reversibile e tossicità epatica. In particolare, la malattia epatica veno-

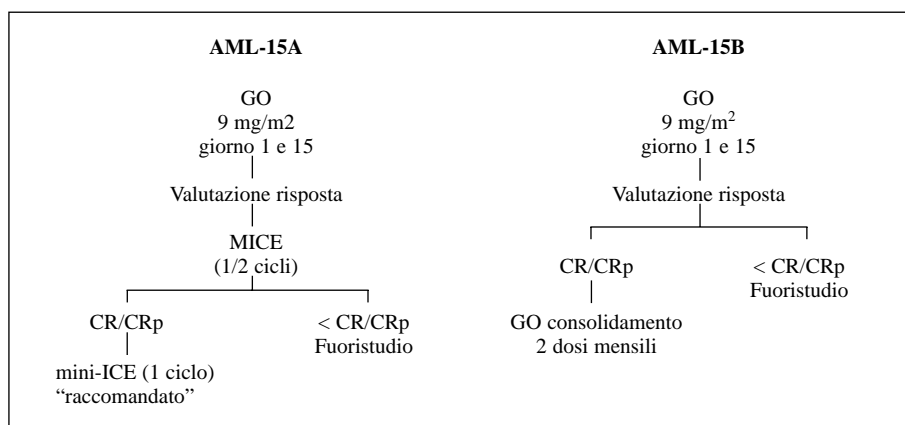


Fig. 2 - Disegno del protocollo EORTC-GIMEMA AML-15

occlusiva è stata osservata in 3 pazienti dopo GO e 2 dopo MICE (8.8%), con una "fatality rate" dell'80% (4/5). La combinazione sequenziale di GO e chemioterapia convenzionale si è dimostrata, quindi, efficace per il trattamento di pazienti anziani con LAM. In considerazione di tali risultati a partire nel settembre 2002 è stato attivato il nuovo studio multicentrico, randomizzato, di fase III (AML-17) che confronta GO seguito da MICE verso MICE da solo in pazienti di età 61-75 anni con LAM all'esordio.

Nel protocollo AML-15B sono stati arruolati 40 pazienti; l'ORR è risultata del 17% (7/40; RC 10%, RCp 7%). Con un follow-up mediano di 12 mesi, la OS osservata è stata del 27%. Anche in questo caso la mielosoppressione è risultata prolungata, con infezioni di grado 3-4 nel 40% dei pazienti e neutropenia febbrile nel 52%. La mortalità "therapy-related" è stata del 17%, con una punta del 31% quando l'analisi veniva ristretta ai soli pazienti con età > 75 anni. Tossicità epatica di grado 3-4 è stata osservata nel 10% dei pazienti, ed in 1 è risultata fatale per la comparsa di malattia epatica veno-occlusiva. In considerazione di tali risultati è in corso di attivazione il nuovo studio randomizzato di fase II-III (AML-19) che confronterà basse dosi di GO come singolo agente verso terapia palliativa in pazienti di età > 75 anni con LAM all'esordio.

Una ulteriore modalità di impiego ai fini terapeutici degli AM è rappresentata dal loro legame con radionuclidi (radioimmunogoniugati). Questi trovano applicazione sia come "stand-alone treatment", veri e propri proiettili radioattivi capaci di colpire preferenzialmente le cellule leucemiche risparmiando al massimo il normale tessuto emopoietico circostante, sia nel contesto di regimi di condizionamento pre-trapianto. I radionuclidi  $\alpha$ -emittenti rappresentano i candidati ideali per limitare il più possibile l'irradiazione alla sola componente leucemica midollare. Il gruppo del Memorial Sloan-Kettering ha utilizzato il  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 in uno studio di "dose-escalation" in pazienti con LAM in recidiva. Diciassette pazienti sono stati trattati con tale immunoconiugato e sebbene in 12 si sia ottenuta una riduzione della blastosi midollare e/o periferica, non sono state documentate RC. La tossicità è consistita in pancitopenia di grado 3-4 osservata in tutti i pazienti.

Antigeni quali CD33 e CD45 sono stati identificati come "targets" potenziali nel tentativo di definire le dosi ottimali di "total bone marrow irradiation" nel contesto di regimi di condizionamento per trapianto allogenico. Il gruppo di Seattle ha impiegato  $^{131}\text{I}$ -anti-CD33 in 9 pazienti affetti da LAM in recidiva. Gli autori, a causa del breve periodo di permanenza del radioimmunoconiugato nelle sedi di captazione, a sua volta dovuto ad una rapida internalizzazione e dealogenazione del composto, hanno documentato una biodistribuzione terapeuticamente favorevole solo in 4 dei 9 pazienti. Il CD45 sembra tuttavia essere un "target" più affidabile del CD33 in quanto: espresso dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche (eccetto eritrociti e piastrine) con un elevato numero di copie (200.000 copie/cellula); espresso nel 90% delle leucemie acute, sia mieloidi che linfoidi; non espresso da cellule non-ematopoietiche; non internalizzato a seguito del legame anticorpale. Studi preclinici hanno evidenziato la capacità di lunga permanenza di  $^{131}\text{I}$ -anti-CD45 in sede splenica e midollare; sulla base di tali dati il gruppo di Seattle ha con-

dotto uno studio di fase I in pazienti con LA in recidiva. La fase propriamente terapeutica era preceduta da una valutazione della biodistribuzione del radiocomposto. I pazienti per i quali veniva documentata una biodistribuzione favorevole, ricevevano dosi scalari di  $^{131}\text{I}$ -anti-CD45 ( $^{131}\text{I}$ -BC8) associate a ciclofosfamide (120 mg/kg) e TBI alla dose standard di 12 Gy, il tutto seguito da trapianto allogenico con cellule staminali midollari. Dei 44 pazienti inizialmente valutati per la biodistribuzione, 37 (84%) presentavano un "pattern" favorevole e venivano quindi arruolati allo studio. Il 30% di questi sono divenuti lungo-sopravvivenenti, a fronte di un profilo di tossicità generale non dissimile da quella riportata nel condizionamento standard, suggerendo un possibile contributo favorevole nel controllo della malattia esercitato dalla aggiunta di una irradiazione selettiva del tessuto midollare in una popolazione di pazienti ad alto rischio di insuccesso terapeutico.

### Bibliografia essenziale

1. Sievers EL, Appelbaum FR, Speilberger RT, et al. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*. 1999; 93: 3678-3684.
2. Sievers EL, Larson RA, Estey E, et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3244-3254.
3. Feldman E, Kalacyo M, Schulman P, et al. Humanized monoclonal anti-CD33 antibody HuM195 in the treatment of relapsed/refractory acute myelogenous leukemia: preliminary report of a phase III study [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1999; 18: 4.
4. Kossman SE, Scheinberg DA, Jurcic JG, Jimenez J, Caron P. A phase I trial of humanized monoclonal antibody HuM195 (anti-CD33) with low-dose interleukin-2 in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2748-2755.
5. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, et al. Antibody-target chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*. 2002; 16: 1627-1636.
6. Amadori S, Suci S, Willemze R, Mandelli F, et al. Sequential administration of gemtuzumab ozogamicin and conventional chemotherapy as first line therapy in elderly patients with acute myeloid leukaemia: a phase II study (AML-15) of the EORTC and GIMEMA leukaemia groups. *Haematologica*. 2004; 89: 950-956.
7. Mone AP, Howard DE, Molnar I, Kreitman RJ, Frankel AE. Resistant acute myeloid leukemia responds to a novel diphtheria toxin/GM-CSF fusion protein: summary of an ongoing phase I trial [abstract]. *Blood*. 2000; 96(part 1): 117a, #504.
8. Pagel JM, Matthews DC, Appelbaum FR, Bernstein ID, Press OW. The use of radioimmunoconjugates in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 807-816.

## **Analogie e differenze nella patogenesi delle LAM e delle SMD**

*Carlo Bernasconi*

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

È innanzitutto necessario dare una definizione dei due disordini ematologici. La leucemia acuta mieloide (LAM) è caratterizzata da un arresto maturativo delle cellule ematopoietiche del midollo osseo; è malattia eterogenea, con parecchi sottotipi morfologici e citogenetici. Le sindromi mielodisplastiche (SMD) sono invece caratterizzate da una maturazione mieloide displastica sul piano morfologico e inefficace sul piano funzionale; anche le mielodisplasie presentano caratteristiche alterazioni citogenetiche, differenti da quelle della LAM, evidenziabili in una percentuale non trascurabile di pazienti.

Le SMD vengono anche definite "preleucemie" perché frequentemente, anche se non obbligatoriamente, possono evolvere in leucemie: da anemie refrattarie, a anemie refrattarie con eccesso di blasti, a LAM. In apparenza le SMD costituiscono quindi situazioni cliniche che appaiono come un modello ideale per lo studio dei meccanismi d'insorgenza delle leucemie, perché il percorso della leucemizzazione sembra svolgersi in tappe successive, che ben si prestano ad essere studiate nella loro sequenza. A questo riguardo è però necessario porsi un quesito fondamentale: siamo sicuri che sono le tappe attraverso le quali più frequentemente si svolge il processo di leucemizzazione o invece si tratta di percorsi diversi, che presentano solo alcune analogie e parecchie differenze?

### **Leucemia acuta mieloide**

I vari sottotipi morfologici, distinti secondo la classificazione FAB in entità che vanno dall'M0 all'M7, sono associati a ben identificate alterazioni cromosomiche riscontrate a carico delle cellule leucemiche. Così ad esempio l'M3, la leucemia promielocitica, è obbligatoriamente associata alla t(15;17), o meno frequentemente ad altre traslocazioni interessanti il cr. 17; all'M2 è associata la t(8;21); all'M4 eos. è associata l'inv(16) o la t(16;16). Le alterazioni cromosomiche coinvolgono determinati geni, mappati in precise posizioni cromosomiche; a causa delle alterazioni cromosomiche tali geni vengono a trovarsi in posizioni anomale ed a funzionare in modo anormale. Essi regolano la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi cellulare; dal loro funzionamento anomalo possono derivare popolazioni cellulari atipiche, leucemiche.

Lo studio delle alterazioni cromosomiche e molecolari delle cellule leucemiche ha portato ad un duplice risultato: sul piano pratico ha fornito la possibilità di distinguere gruppi citogenetici di leucemie a prognosi diversa (favorevole, intermedia, sfavorevole); sul piano biologico ha consentito l'acquisizione di alcuni meccanismi molecolari della trasformazione leucemica. Tali conoscenze sono solo iniziali, però è evidente che la ricerca deve seguire questo percorso per identificare le alterazioni molecolari che costituiscono i meccanismi di malattia, sui quali potere poi intervenire con una terapia efficace. È stato così accertato che le traslocazioni/inversioni cromosomiche coinvolgono, nella grande maggioranza dei pazienti, i seguenti geni: il recettore  $\gamma$  dell'ac. retinoico, il *core binding factor*, il gene MML, i coattivatori della trascrizione.

Tuttavia, si deve sottolineare che non tutti i pazienti con LAM presentano alterazioni cromosomiche alla citogenetica classica. Infatti, il 20-40% dei pazienti, secondo le casistiche, mostra un cariotipo normale. Anche in questi casi però, con tecniche di biologia molecolare quali il *Southern blotting* e la RT-PCR, si riescono ad evidenziare mutazioni geniche. I geni più frequentemente colpiti sono: FLT3, RAS, c-KIT.

Ancora solo a scopo esemplificativo viene esaminato il gene FLT3, mappato sul cr. 13 a livello della banda q21, che codifica per una proteina recettoriale ad attività tirosinocinasi; il corrispondente ligando è una proteina espressa sulle cellule stromali. Il 35-40% dei pazienti con LAM presenta mutazioni dell'FLT3. Una delle mutazioni più interessanti è l'ITD (*internal tandem duplication*), che consiste nella duplicazione di un frammento variabile della porzione iuxta-membrana; il frammento duplicato si fonde, con orientamento testa-coda, con la porzione restante del gene, forma dimeri in assenza del ligando, con conseguente autofosforilazione del recettore. L'attivazione di FLT3 si accompagna ad un blocco dei sistemi di controllo dell'apoptosi, che da sola non è però sufficiente a causare una LAM; perché questa si sviluppi è necessario che si associ un'altra alterazione genica, che determini un blocco differenziativo.

### **Sindromi mielodisplastiche**

È un capitolo dell'ematologia che si è sviluppato negli ultimi decenni. La classificazione FAB ha portato il grande vantaggio di uniformare le casistiche e consentirne il raffronto.

Anche nelle SMD vengono riscontrate frequenti anomalie cromosomiche, soprattutto a carico dei cr. 5 e 7; abbastanza frequenti sono anche le anomalie a carico delle braccia lunghe del cr. 20 e i cariotipi complessi (presenza di 3 o più anomalie). Si tratta di alterazioni cromosomiche diverse da quelle ricordate per le LAM "de novo" nell'adulto, ma simili a quelle delle LAM dell'anziano.

Sul piano della pratica clinica è stato dimostrato che anche per le SMD, come per le LAM, le alterazioni citogenetiche possono venir utilizzate come attendibili indicatori prognostici, ed essere distinte nell'*International Prognostic Scoring System* come parametri di buona, intermedia, cattiva prognosi.

Sul piano dei meccanismi patogenetici molto si è imparato dalle SMD/LAM

secondarie a precedenti terapie. In questo gruppo di malattie sono state individuate diverse entità con caratteristiche peculiari:

1. le leucemie successive all'impiego di agenti alchilanti, nelle quali le anomalie interessano i cr. 5 e 7, l'esordio della leucemia è preceduto da una fase di mielodisplasia, il periodo di latenza è di 2-5 anni; si tratta in genere di pazienti anziani e la risposta alla terapia è scarsa;
2. le leucemie successive all'impiego di inibitori delle topoisomerasi II, nelle quali l'anomalia cromosomica più frequente è la t(11q23), non esiste una fase preleucemica, il periodo di latenza è di 1-2 anni; si tratta di pazienti più giovani, la risposta alla terapia d'induzione è buona, ma la sopravvivenza a lungo termine è scarsa;
3. infine un gruppo di leucemie successive all'impiego di agenti citotossici vari, che sono caratterizzate da anomalie cromosomiche uguali a quelle riscontrate nelle LAM a buona prognosi (le traslocazioni 15;17 e 8;21 e l'inversione del 16); in questi casi, come nelle LAM "de novo", la risposta alla terapia è buona, anche a lungo termine.

Lo studio delle SMD/LAM secondarie a terapie citotossiche ha consentito a Jens Pedersen-Bjergaard (2002) di formulare per questi disordini ematologici differenti percorsi patogenetici, caratterizzati da alterazioni cromosomiche primarie e secondarie, che conducono a mutazioni geniche di RAS, di TLT3, della p53 e altre, proprie dei processi di leucemizzazione. In precedenza Eva Hellström-Lindberg all'ASH Meeting del 2000 aveva presentato un analogo schema patogenetico di insorgenza delle mielodisplasie e loro successiva evoluzione leucemica, comprendente anche l'importanza preparatoria di mutazioni geniche ereditarie o acquisite e di una possibile predisposizione costituzionale riguardante i meccanismi di riparazione del DNA, il catabolismo degli agenti tumorali, l'instabilità genomica.

Che esistano situazioni preparatorie della mielodisplasia/leucemia è un'ipotesi molto interessante, che trova conferma anche in dati segnalati recentemente. Infatti, Offman et al. in un articolo pubblicato su Blood nell'agosto 2004 riferiscono di aver osservato in casi di SMD/LAM insorti dopo trapianto di organo (cuore, rene, polmone) un'evidente correlazione con un difetto di riparazione del DNA: lo studio del profilo genico ha evidenziato una instabilità dei microsatelliti in tutti (7 su 7) i pazienti con SMD/LAM secondaria a trapianto, instabilità dei microsatelliti che invece si osserva infrequentemente nelle LAM "de novo". Al riguardo è ancora da sottolineare il fatto che il progressivo aumento di incidenza delle SMD/LAM con l'avanzare dell'età ben si correla con i risultati dell'analisi dei *microarray*, che hanno posto in evidenza come con l'età si osservi una progressiva acquisizione di difetti genici.

Trattando i difetti intrinseci alla cellula staminale nelle SMD è necessario ricordare il controllo "epigenetico" dell'espressione genica, termine con cui si indica una modificazione dell'espressione genica mediato da meccanismi differenti da quelli controllati dalla sequenza nucleotidica primaria di un gene. Al riguardo sono importanti i processi di metilazione del DNA nelle regioni *promoter* dei

geni, i siti dove inizia la trascrizione del DNA in RNA. La metilazione del DNA inattiva i geni onco-soppressori, e questo potrebbe essere un importante meccanismo epigenetico della leucemogenesi. Schematicamente il processo si svolge nel modo seguente: nella regione *promoter* del gene sono accumulati siti CpG (Citosina precedente Guanina); nelle cellule normali tali siti sono non-metilati e permettono un'attiva trascrizione genica; nelle cellule displastiche/neoplastiche tali siti sono invece mutilati e impediscono la trascrizione genica. È questo il bersaglio molecolare sul quale vuole incidere l'impiego terapeutico di agenti ipometilanti (quali la Decitabina) nel trattamento delle SMD.

### Il ruolo del microambiente

È noto che nella patogenesi delle SMD un ruolo importante viene svolto, accanto al difetto genetico intrinseco (cioè il danno del DNA), anche dall'azione di fattori estrinseci (aumentata produzione di citochine inibitrici della differenziazione cellulare, mancanza di appropriata adesione/interazione fra cellule e stroma, eccessiva neoangiogenesi, intervento di meccanismi immuni), con profonde modificazioni del microambiente midollare.

Certamente i rapporti fra progenitori emopoietici normali e displastici/neoplastici da una parte, e cellule dello stroma midollare e matrice extracellulare dall'altra, sono molteplici e complessi. Sono mediati da citochine e chemochine, molecole di adesione, recettori e ligandi a diversa localizzazione. La complessità è aumentata dall'intrecciarsi di meccanismi patologici con processi apparentemente fisiologici. Per illustrare tale concetto è sufficiente richiamare l'attenzione sul fattore SDF-1, chemochina prodotta dalle cellule dello stroma, che svolge un ruolo fondamentale nell'*homing* delle cellule staminali ematopoietiche; il corrispondente recettore CXCR4 è presente sulle cellule CD34+. Lo stesso fattore SDF-1 si ritrova in organi danneggiati (fegato, cuore, cervello, ecc) e il suo livello di espressione può funzionare come gradiente di richiamo di cellule staminali CXCR4+ nelle sedi di un danno tessutale (Körbling e Estrov, 2003; Ratajczak et al., 2004).

L'asse SDF-1 / CXCR4 può quindi essere considerato come un meccanismo fisiologico di riparazione cellulare. Ma lo ritroviamo anche fra gli eventi che condizionano una prognosi sfavorevole nelle LAM. Infatti la mutazione FLT3/ITD (già riportata) mostra un'aumentata espressione di CXCR4, e questa si associa ad una significativa riduzione della sopravvivenza per alta probabilità di ricaduta dei pazienti con LAM che presentano tale alterazione molecolare (Rombouts et al., 2004).

**In conclusione**, il rapido accumularsi di nuove acquisizioni, talora completamente inaspettate (come l'associazione della mutazione FLT3/ITD con l'espressione del CXCR4), lascia intravedere il coinvolgimento di fattori patologici (come le mutazioni geniche) e fattori fisiologici (come l'interazione chemochina-recettore) nel causare meccanismi di malattia.

Non possiamo far altro che pensare che siamo solo all'inizio di questa ematolo-



gia molecolare. Le nuove conoscenze, che si stanno accumulando a valanga, ci costringono a ritenere insoddisfacenti le attuali classificazioni cliniche delle LAM e delle SMD, e considerarle solo come formulazioni di lavoro che debbono di volta in volta essere aggiornate.

### **Bibliografia essenziale**

1. Bernasconi P. Onco-ematologia molecolare. EDIMES - Edizioni Medico Scientifiche, Pavia, 2003.
2. Giles F.J., Keating A., Goldstone A.H. et al. Acute myeloid leukemia. A.S.H., 73, 2002.
3. Hellström-Lindberg E., Willman C., Barret A.J., Sauntharajah Y. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic Syndromes. A.S.H., 110, 2000.
4. Herman J.G., Baylin S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N. Engl. J. Med., 349: 2042, 2003.
5. Körbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? N. Engl. J. Med. , 349: 570, 2003.
6. Offman J., Opelz G., Doehler B. et al. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. Blood, 104: 822, 2004.
7. Pedersen-Bjergard J., Andersen M.K., Christiansen D.H., Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Blood 99: 1909, 2002.
8. Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells "hide out" in the bone marrow. Leukemia, 18: 29, 2004.
9. Rombouts E.J.C., Pavic B., Löwenberg B., Ploemacher R.E. Relation between CXCR-4 expression, Ftl3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. Blood, 104: 550, 2004.

## **Dalla morfologia ai microarray: come e perché si sta modificando l'approccio diagnostico alle malattie emato-oncologiche**

*Andrea Biondi*

Centro M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università Milano-Bicocca

Non c'è campo della medicina che non risenta delle straordinarie potenzialità tecnologiche offerte dalla moderna genetica molecolare. L'avvenuta sequenza del genoma, la possibilità di miniturizzare l'analisi dell'espressione di tutti i geni così come l'analisi delle alterazioni piccole (mutazioni) e grandi (delezioni e amplificazioni) del genoma, l'avvento di metodi sempre più sofisticati ed accurati per inibire in modo selettivo e duraturo l'espressione di un gene, accanto alle potenzialità della bioinformatica, sono solo alcuni degli esempi di questa "rivoluzione". L'approccio diagnostico approfondito, mediante l'integrazione del risultato morfologico, immunofenotipico e genetico, permette un inquadramento diagnostico più accurato nella maggior parte delle malattie emato-oncologiche (leucemie e linfomi). La disponibilità di marcatori genetici specifici, può essere utilizzata per dimostrare livelli di malattia che non sono rilevabili con le comuni tecniche diagnostiche. Il rilievo di un livello molecolare di malattia (definita malattia residua minima), viene utilizzata per identificare pazienti con una diversa prognosi e per identificare più precocemente la ripresa clinica della malattia. L'avvento delle nuove nano tecnologie che valutano contemporaneamente l'espressione di migliaia di geni mediante la tecnica dei micro arrays ha aperto nuove prospettive sia da un punto di vista diagnostico che per la comprensione dei meccanismi alla base della trasformazione leucemica. Oltre al probabile impatto nella classificazione ed assegnazione a diverse classi di rischio, lo studio dei profili di espressione permette la definizione di pathways metabolici e alla identificazione di nuovi bersagli per interventi terapeutici sempre più mirati. La disponibilità di interferire con il prodotto genico alterato sia a livello della sua espressione (mediante l'approccio di RNA-interference) che proteico, sfruttando la proprietà di piccole molecole di neutralizzare l'attività patologica della proteina anomala delle cellule leucemiche, ha aperto un nuovo capitolo della medicina molecolare.

## Management and new treatment options in adult ALL

*Dieter Hoelzer*

J.W.Goethe University, Medical Clinic III, Frankfurt, Germany

Management and new treatment options in adult acute lymphoblastic leukemia mainly include (1) shortened and intensified induction and consolidation chemotherapy, (2) new approaches for stem cell transplantation (SCT) (3) antibody therapy, (4) molecular targeting of signal transduction cascade e.g. with tyrosine kinase inhibitors, (5) evaluation of minimal residual disease (MRD) for monitoring and treatment decisions and (6) new microarray techniques for identification of markers with potential diagnostic and prognostic relevance.

New approaches for *chemotherapy* include shortened induction therapy with intensified anthracyclines, dexamethasone, pre-treatment with cyclophosphamide and *PEG-L-asparaginase*. PEG-L-Asparaginase, which has the advantage of being applied only once instead of repeated injections of native E.coli Asparaginase for 2 weeks is currently explored in childhood and adult ALL studies. Also Dexamethasone instead of prednisone is explored in children as well as in adults. Dose and duration seems to be important. New consolidation cycles e.g. include HDAC, HDMTX and new drugs such as purine analogues e.g. Nelarabine or intrathecal Depocyte. Higher antileukemic activity leads to higher CR rates (>90%). However infections remain a major problem in adult ALL. Therefore intensified supportive measures including the use of G-CSF during induction and consolidation are required.

In *SCT* new approaches are directed to (1) the extension of SCT indications e.g. by the inclusion of mini-transplants in elderly or comorbid patients, (2) the improvement of antileukemic effectivity by new conditioning regimens e.g. with radioimmunoconjugates or by the improvement of graft-versus-leukemia effects e.g. with donor lymphocyte infusions or mini-transplants after tumor-reduction by autologous SCT.

Regarding *antibody therapy* the use of Rituximab has substantially improved the outcome of patients with mature B-ALL, Burkitt and Burkitt-like NHL. Rituximab is now also explored in B-lineage CD20+ ALL in elderly, in standard risk patients and as an in vivo purging for adult high risk B lineage CD20+ ALL. For adult T-ALL and T-lymphoblastic lymphoma antiCD52 (Campath) is evalu-

ated in relapsed/refractory or MRD+ patients and may in the future become a part of front-line regimens.

New *molecular therapeutic strategies* are evaluated particularly in Ph/bcr-abl-positive ALL such as the specific Abl-tyrosine kinase inhibitor Imatinib (former STI571). With Imatinib remissions can be achieved in relapsed/refractory ALL patients even in patients with relapse after allogeneic SCT. At present Imatinib is explored concomitant to induction therapy in younger Ph/bcr-abl-positive ALL patients and in 3 trials the CR rate was > 90%. In elderly Ph/bcr-abl-positive patients an ongoing randomized trial showed a CR rate of more than 90% in patients receiving Imatinib as a single drug induction therapy over a period of 4 weeks. In patients who remain MRD positive after Imatinib other targeted therapies such as monoclonal antibodies, donor lymphocyte infusions after SCT,  $\alpha$ -interferon or new signal transduction inhibitors e.g. farnesyl transferase inhibitors (FTI) are explored.

Measurement of *MRD* allows the definition of three MRD-based risk groups: MRD low-risk, MRD-high-risk and MRD intermediate risk patients. All of them are in the need of a specifically defined therapy.

*Microarray technology* in ALL has first confirmed the immunologically defined ALL subtypes, led to the identification of new subgroups but may also be able to distinguish patients with high risk of relapse within standard risk ALL patients which cannot be subdivided by conventional risk criteria.

In conclusion modern approaches for the treatment of adult ALL are very complex in terms of diagnosis, treatment options and treatment strategies: However, it seems that only these very complex approaches will improve the outcome of adult ALL substantially.



# **LEUCEMIE CRONICHE**



## **Molecular targets in chronic myeloid leukemia**

*Giovanni Martinelli,<sup>1</sup> Simona Soverini,<sup>1</sup> Gianantonio Rosti,<sup>1</sup> Daniela Cilloni,<sup>2</sup> Michele Baccarani<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Medical Oncology "Seràgnoli", University of Bologna, Bologna

<sup>2</sup>Division of Hematology, San Luigi Gonzaga Hospital, Torino

This study was supported by Cofin 2003 (M. Baccarani), AIL, AIRC, Fondazione Del Monte di Bologna e Ravenna, FIRB 2001 and Ateneo 60% grants.

### **Abstract**

Specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are rapidly developing clinical tools applied for the inhibition of malignant cell growth and metastasis formation. As a general tumor model, the chimerical Bcr-Abl protein expressed by chronic myeloid leukemia (CML) cells has constitutive tyrosine kinase activity. Imatinib, an ATP-competitive selective inhibitor of Bcr-Abl, has unprecedented efficacy for the treatment of CML. The most common imatinib resistance mechanism involves Bcr-Abl kinase domain mutations that impart varying degrees of drug insensitivity. To overcome resistance, several approaches have been studied *in vitro* and *in vivo*. They include dose escalation of imatinib, combination of imatinib with chemotherapeutic drugs, alternative Bcr-Abl inhibitors (TKIs), inhibitors of kinases downstream of Bcr-Abl such as Src kinases, farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors, histone deacetylase, proteasome and cyclin-dependent kinase inhibitors, arsenic trioxide strategies. Further investigations into the molecular mechanisms of disease and how to specifically target the abnormal processes will guide the design of new treatment modalities in future clinical trials. This review highlights the development of new TKIs as a specific molecularly targeted therapy and as the principal mechanisms to overcome imatinib resistance.

### **Background**

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic disorder characterized by the malignant expansion of bone marrow stem cells. CML is almost unique among human cancers since a single genetic defect is responsible for the trans-



formed phenotype. The cytogenetic hallmark of more than 90% of CML cases is indeed a reciprocal t(9;22)(q34;q11) chromosomal translocation, (1) that creates a derivative 9q+ and a small 22q-, most commonly referred to as the Philadelphia (Ph) chromosome (2). As a result of this translocation, the latter harbors a *BCR-ABL* fusion gene encoding a chimeric Bcr-Abl protein with deregulated tyrosine kinase activity, the expression of which has been shown to be necessary and sufficient for the transformed phenotype of CML cells (3, 4). Through the contribution of various researchers, the past twenty years have brought us considerable knowledge on the molecular and cell biology of CML, creating the essential platform for molecular targeted therapies to be engineered. It soon became clear that the Bcr-Abl oncoprotein itself is the ideal target, since a) it has a central role in CML pathogenesis, and b) it is not expressed by normal cells. Furthermore, the dissection of the signal transduction pathways affected by the deregulated kinase activity of Bcr-Abl has provided information on additional or alternative signalling steps that could be interrupted in an attempt to block the leukemogenic process. Bcr-Abl exerts its oncogenic effects in CML cells essentially by stimulating cell proliferation, inhibiting apoptosis and altering cell adhesion to bone marrow stroma. Signal transduction cascades involved in these cellular processes and activated by Bcr-Abl include, among others:

- Ras (5);
- mitogen-activated protein kinase (MAPK) (6) and its downstream effectors MEK and Erk;
- phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (7, 8) and its downstream effector Akt.

With the only exception of Ras, all these proteins share with Bcr-Abl an intriguing feature, i.e. they all are tyrosine kinases (TKs).

Specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are rapidly developing clinical tools applied for the inhibition of malignant cell growth and metastasis formation. Imatinib mesylate (formerly STI571; Gleevec™ or Glivec®, Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) is the first, successful example of molecularly targeted therapy for CML. It is a small-molecule inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase, as well as of a limited number of other kinases (c-Kit, PDGF-R, ARG) (9, 10) Preclinical and clinical studies (11-18) have confirmed the remarkable efficacy and high tolerability of this drug. The Bcr-Abl inhibitor imatinib mesylate is now the first-choice treatment of all newly diagnosed CML patients, but the initial striking efficacy of this drug has been cast into shadow by the evolution of clinical resistance. The emergence of resistance to imatinib has prompted research to focus on strategies aiming at preventing or overcoming this phenomenon. Since resistance often coincides with the reactivation of the kinase activity within the leukemic clone, either Bcr-Abl itself or Bcr-Abl-triggered downstream signalling pathways remain good targets for molecular therapy. Several approaches have been studied both *in vitro* and *in vivo*. They include dose escalation of imatinib, combination of imatinib with chemotherapeutic drugs, alternative Bcr-Abl inhibitors (TKIs) including Src kinase inhibitors, inhibitors of kinases downstream of Bcr-Abl. Further investigations into the molecular mech-

anisms of disease and how to specifically target the abnormal processes will guide the design of new treatment modalities in future clinical trials.

**Amplification of *BCR-ABL* gene or mutations in the *BCR-ABL* gene are the primary mechanisms of imatinib resistance.**

Despite high rates of hematologic and cytogenetic responses, primary refractoriness and acquired resistance to imatinib are observed in a growing number of patients, especially those in more advanced stages of the disease. Resistance has been traced to two main mechanisms:

- the overexpression of Bcr-Abl, mainly due to gene amplification, (19,20) and, more frequently;
- the acquisition or the selection of specific point mutations within several critical regions of the Abl kinase domain (Figure 1) (19-27).

Clonal cytogenetic evolution, i.e. occurrence of cytogenetic abnormalities in addition to the Philadelphia chromosome, has also been reported to contribute to relapse in patients undergoing imatinib treatment (20).

Crystallographic studies have shown that the high selectivity and efficacy of imatinib relies on its ability to bind and lock Bcr-Abl in its inactive, auto-inhibited conformation (28, 29). Mutations seem to act by disrupting critical contact points between imatinib and Bcr-Abl or, more often, by inducing a transition from the inactive to the active state, a conformation to which Imatinib is unable to bind. From analyses of clinical samples, the *repertoire* of mutations found in association with the resistant phenotype has been accruing slowly but inexorably over time (Table 1). Nevertheless, data about the relative as well as overall frequency of such mutations are still conflicting. It is also currently unclear whether Abl mutations, or a specific subset of them, may harbor prognostic significance in terms of time to progression and/or survival (20, 24, 26).

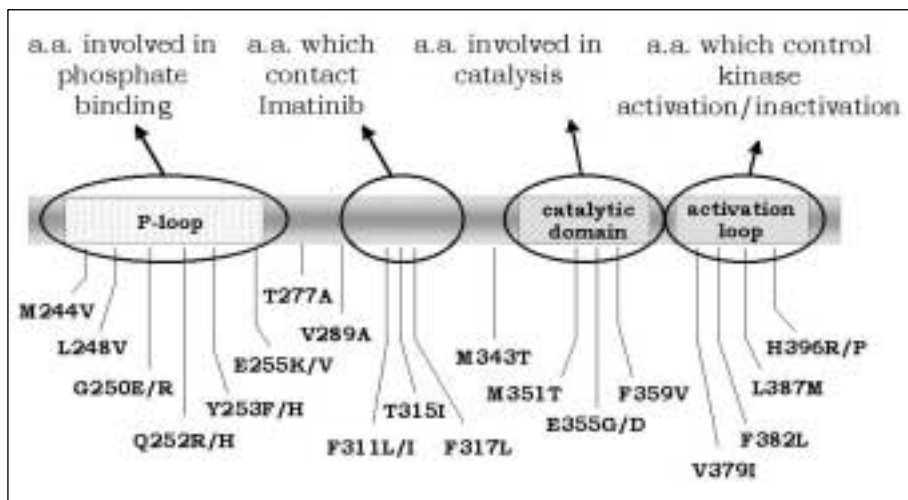


Fig. 1 - Distribution of reported point mutations within the ABL kinase domain.

**Table 1** - BCR-ABL point mutations associated with imatinib resistance detected in CML or ALL patients.

Nucleotide change <sup>a</sup>	Amino acid change <sup>b</sup>	No. of cases (detected/tested)	References
A1094G	M244V	6/165	20,26,24,54
C1106G	L248V	2/29	26, b
G1113A	G250E	7/127	26,24,21, 54
G1112A	G250R	1/117	a
G1120C	Q252R	1/32	24
G1120T	Q252H	12/125	20,26,24
T1121C	Y253H	11/194	20,24,21,25,54
A1122T	Y253F	8/165	20,26,24, 54
G1127A	E255K	30/222	20,26,24,21,25,50,54
A1128T	E255V	4/141	20,26,21,51, 54
A1191G	D276G	1/33	53 b
A1194G	T277A	1/117	a
T1230C	V289A		52
T1494C	F311L	2/64	22,54
C1308T	T315I	27/194	20,26,21,25,53
C1308A	T315N	1/33	53
C1315G	F317L	5/100	24,21,54
T1392C	M343T	1/32	24
T1416C	M351T	25/244	20,26,24, 21,22,54
T1428G	E355G	5/65	20,26,24,54
T1439G	F359V	5/99	26,24
T1440G	F359A	2/150	53,a
G1499A	V379I	1/32	24
T1508C	F382L	1/32	24
T1523A	L387M	2/149	24
G1523C	L387F	3/117	a
A1551C	H396P		52,25
A1551G	H396R	7/52	20,26,24,54
A1558C	A397P	1/117	a
C1614A	S417Y	1/27	26
G1739A	E459K	1/27	26
<b>T1821C</b>	F486S	1/27	26

<sup>a</sup>Nucleotide positions according to GenBank accession number M14752.

<sup>b</sup>Amino-acid positions, denoted with the single letter code, are those for GenBank sequence (accession number AAB60394) and correspond to ABL type 1a.

Additional mutations from ASH2003 abstracts: Kreil et al. Blood 2003;102(Suppl.1):71a (ref. a in tab 1); Chu et al. Blood 2003; 102 (Suppl 1): 70a (ref. b in tab 1), and a review article by Nardi et al. (52)

### Alternative ABL inhibitors or high dosage of imatinib?

Different ABL mutants seem to have different degrees of resistance to Imatinib (Table 2). *In vitro* data indicate that while some mutations seem to confer a highly resistant phenotype, thereby suggesting withdrawal of Imatinib in favour of alternative therapeutic strategies, other might be simply overcome by dose-escalation (30, 31). Routine testing for emerging mutations should enter the clinical practice in order to assure a rational therapeutic management of CML patients. For those patients who do not benefit from dose-escalation, novel inhibitors would be a welcome addition to the drug armamentarium (Table 3). It is con-

**Table. 2** - IC50 values for wild-type (WT) ABL and BCR-ABL and for the main BCR-ABL mutants.

BCR-ABL type	IC50 (mM Imatinib)					Benefit from dose-escalation?
	Corbin (29) (2002)	Azam (49) (2003)	Hochhaus (20) (2002)	Shah (24) (2002)	von Bubnoff (25) (2003)	
WT ABL		0.025				-
WT BCR-ABL	0.5	0.6		0.6	>0.1 >0.5	-
M244V	1.6	3.1				Y
M244I		1.4				Y
G250E	4.5	>20			>10	N
Q252H	2.6	2.9				Y
Y253H	>17.7	17.7	3.7		>10	N
Y253F	5.0		1.8			N
E255V	>17.7		>5		>10	N
E255K	7.5	12.1	>5	>10	>10	N
F311L	0.7	1.3				N
T315I	>17.7	>20		>10	>10	N
T315S		3.8				N
F317L	1.3	2.3		7.5		N
M351T	1.5	4.9		4.4		Y
M351I		1.6				Y
E355G	2.0			2.4		Y
F359V	1.4					Y
V379I	1.0					Y
L387M	1.1					Y
H396P	4.3				>0.1 >0.5	N
H396R	5.4					N

**Table. 3** - New tyrosine kinase inhibitors entered in clinical trials.

Agent	Company	Target	Class	Phase	Principal indications
SKI606	Wyeth-Ayerst	Abl, Src	TKI	I	Glivec-refractory CML
BMS354825	BMS	Abl, Src	TKI	II	Glivec-refractory CML
AZD0530	Astra Zeneca	Abl, Src	TKI	I	Glivec-refractory CML
AP23464	Ariad	Abl, Src	TKI	I	Glivec-refractory CML
CGP76030	Pfizer	Src	TKI	/	Glivec-refractory CML

ceivable that several targeted inhibitors could be necessary - this would allow clinicians to combine different compounds or to switch from one to another, individualizing therapy on the basis of molecular surveillance of the BCR-ABL sequences present in the tumor load.

### “Dual” SRC and ABL inhibitors

Bcr-Abl activates multiple signaling pathways, including members of Src family kinases such as Lyn and Hck. Previous studies have demonstrated that multiple

domains of Bcr-Abl interact with and activate Src kinases independently of Bcr-Abl kinase activity, and studies with dominant-negative mutants and Src inhibitors suggest that Src kinases may contribute to the proliferation and survival of myeloid cell lines expressing Bcr-Abl *in vitro* (32).

Hck and Lyn are expressed and activated in CML blast-crisis patients and their increased expression correlates with disease progression or STI571 resistance in some CML patients. This insight raises the possibility that small-molecule with "dual" kinase inhibitory activity either against ABL or SRC, might have activity in CML and ALL Ph<sup>+</sup> patients. Several compounds originally described as Src kinase inhibitors were subsequently shown to inhibit Abl at nanomolar concentrations. Indeed, promising *in vitro* activity against a limited number of imatinib-resistant BCR-ABL isoforms has been seen for two compounds from the pyrido[2,3-*d*]pyrimidine class of dual SRC-ABL inhibitors (PD166326 and PD180970) (33-35).

**PD180970 and PD173955 as ABL and SRC inhibitors.** Eminent alternative Abl inhibitor are PD180970 and PD173955, pyrido-[2,3-*d*]pyrimidine compounds. The crystal structure of PD173955, in complex with imatinib has been recently solved. These studies indicate that the most important difference between the binding of imatinib and PD173955 is the fact that the latter binds both the active and inactive conformations of Abl. Although PD173955 contacts far fewer amino acid residues than does imatinib, it inhibits the tyrosine kinase at approximately 100-fold lower concentrations. A recent study showed that PD180970 is active against ABL mutations affecting the P-loop and A-loop of ABL (36). In contrast, there is no activity toward the T315I mutant. Although the pharmacological properties of this compound make it unsuitable for clinical use, these data suggest that it will be possible to target imatinib-resistant ABL mutants.

**SKI606 and 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile Src kinase inhibitors.** Recently, a new class of compounds, 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile Src kinase inhibitors, has been synthesized. One member of this class, SKI-606, is a dual-specificity inhibitor of both Src family and Abl kinases. The *in vitro* effects of SKI-606 have been analyzed on human cell lines from CML patients in blast crisis (K562, MK2, LAMA) using a wide range of concentrations (0.01mM, 0.1mM, 1mM, 10mM) of this novel agent (37). Cell cycle analysis for the cell lines, showed that a major effect of SKI-606 is to alter cell cycle progression, producing G1/S arrest. SKI-606 induced dose-dependent inhibition of proliferation with IC<sub>50</sub> of 1mM at 24hr. Flow cytometric analysis with Annexin-V showed that SKI-606 induced apoptosis of 50% of cells at 48hr. Western blotting and immuno-blotting analyses showed reduced phosphorylation of Bcr-Abl and also of Lyn and Hck. Activation of Caspase-9, an effector cysteine-protease, after exposure to SKI-606 was also reported. This study thus showed a potential therapeutic usefulness of the drug in treatment of CML, particularly in blast crisis phase.

**A new dual SRC and ABL inhibitor entered in clinical trials: BMS-354825.**

Crystallographic studies predict that most imatinib-resistant mutants should remain sensitive to inhibitors that bind ABL with less stringent conformational requirements. BMS-354825 is an orally bioavailable ABL kinase inhibitor with two-log increased potency relative to imatinib that retains activity against 14 of 15 imatinib-resistant BCR-ABL mutants. BMS-354825 prolongs survival of mice with BCR-ABL-driven disease and inhibits proliferation of BCR-ABL-positive bone marrow progenitor cells from patients with imatinib-sensitive and imatinib-resistant CML (38). These data illustrate how molecular insight into kinase inhibitor resistance can guide the design of second-generation targeted therapies. In addition, the normally smooth contour of the phosphate-binding loop of ABL is distorted by imatinib binding, adding further to the unique conformational requirements for optimal kinase inhibition. These conformation-specific binding requirements contribute to imatinib selectivity, particularly with regard to the closely related kinase SRC, which imatinib does not inhibit. Structural studies of the pyrido[2,3-d]pyrimidine class of dual SRC-ABL inhibitors show that these compounds also bind to the ATP-binding site in ABL, but without regard for the position of the activation loop, which can be in the active or inactive conformation. The only imatinib-resistant BCR-ABL isoform that was clearly resistant to BMS-354825 was the T315I mutant, which retained kinase activity even in the presence of  $\mu\text{M}$  concentrations of the compound.

**Other dual Src and ABL kinase inhibitors: AZ0530 and AP23464.** Other Src kinase inhibitors seem to be effective in pre-clinical model of solid tumors.

This is the case of AZ0530. However, few information have been reported about this drug (<http://www.astrazeneca.com/Article/500081.aspx>) and clinical application or pre-clinical studies are not yet available.

Another dual SRC inhibitor is AP23464. Very recently, it has been reported by O'Hare et al. (39) that AP23464 is a potent ATP-based inhibitor of Src and Abl kinases. It has been shown that the drug displays antiproliferative activity against a human CML cell line and Bcr-Abl transduced Ba/F3 cells (IC(50) = 14 nM; imatinib IC(50) = 350 nM) (39). AP23464 ablates Bcr-Abl tyrosine phosphorylation, blocks cell cycle progression, and promotes apoptosis of Bcr-Abl expressing cells. Biochemical assays with purified GST-Abl kinase domain confirmed that AP23464 directly inhibits Abl activity. Importantly, the low nanomolar cellular and biochemical inhibitory properties of AP23464 extend to frequently observed imatinib-resistant Bcr-Abl mutants, including nucleotide binding P-loop mutants Q252H, Y253F, E255K, C-terminal loop mutant M351T, and activation loop mutant H396P. Like similar compounds, AP23464 was ineffective against the T315I mutant.

**CGP76030, a SRC inhibitor plus an ABL inhibitor shows better results on Ph+ Acute Lymphoblastic Leukemia.** A recent study showed that certain Src kinases are necessary for the induction of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) but not CML (32). This evidence provided a rationale for the use of Src kinase inhibitors to treat Ph<sup>+</sup> B-ALL. The kinase inhibitor CGP76030 impaired

the proliferation of B-lymphoid cells expressing Bcr-Abl *in vitro* and prolonged survival of mice with B-ALL but not CML. The combination of CGP76030 and imatinib was superior to imatinib alone in this regard. The biochemical target of CGP76030 in leukemia cells was Src kinases, not Bcr-Abl. These results implicate Src family kinases as therapeutic targets in Ph<sup>+</sup> B-ALL. Simultaneous inhibition of Src and Bcr-Abl kinases with a “dual” inhibitor or with a “combinatory” TKI approach, may benefit individuals with Ph<sup>+</sup> acute leukemia.

### ***Agents That Target Pathways Downstream of Bcr-Abl***

TKIs or other compounds may be used to inhibit Bcr-Abl downstream signal transduction pathways. A multitude of signaling pathways are activated by Bcr-Abl. These pathways are potential targets for intervention where inhibition of Bcr-Abl itself is not complete. It is also conceivable that oncogenic stimuli other than Bcr-Abl activate such pathways.

**Farnesyl Transferase Inhibitors.** Despite a TK is not directly involved, farnesylation, i.e., the transfer of an isoprenoid (farnesyl) moiety to the C terminus of the protein, is required for Ras to localize to the cell membrane. This sub-cellular localization is necessary for Ras to activate Raf1 and the MAP kinase pathway (40). Numerous cellular proteins are farnesylated and the precise mechanism of growth inhibition by FTIs is unknown. Since Ras is a major pathway activated by Bcr-Abl, this pathway is presumed to be the target of FTIs in these cells. FTIs inhibit the proliferation of Bcr-Abl-positive cells, including those that are resistant to imatinib (41) but do not induce apoptosis. Simultaneous treatment of Bcr-Abl expressing cells with imatinib and FTIs results in apoptosis only if some inhibition of Bcr-Abl is achieved, as in cell lines with increased expression of Bcr-Abl. In contrast, apoptosis is not induced in cell lines that express Bcr-Abl with the T315I mutation, which has an extremely high IC<sub>50</sub>. This suggests that for the induction of apoptosis, Bcr-Abl tyrosine kinase activity must be reduced below a certain threshold.

**Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors.** Activation of *Ras* by Bcr-Abl is thought to activate the MAP kinase pathway. Synergism of MAP kinase inhibitors with imatinib was demonstrated in BCR-ABL-positive cell lines, whereas this drug combination did not affect the proliferation of normal mononuclear cells (42).

**Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors.** Phosphatidylinositol-3 kinase activity is another major downstream target of Bcr-Abl that has been shown to be required for Bcr-Abl to induce leukemia in mice. In cell lines, phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors are synergistic with imatinib. The situation is less clear in primary cells, where there is great variability between individual patients (43). One general caveat with all agents that target pathways downstream of Bcr-Abl may be the fact that inhibition of individual pathways may not be sufficient to shut down the entire system.

### **Novel anti-Bcr-Abl agents**

These observations emphasize the need to develop and test novel anti-Bcr-Abl agents, having mechanisms of antileukemic activity distinct from those described for imatinib. Particularly attractive would be those agents that not only enhance the antileukemic effects of imatinib but also exert cytotoxic effects against imatinib-refractory CML-BC such as a cinnamic acid hydroxamate and LAQ824, which has been shown to act as a potent Histone deacetylase inhibitor (HDI) (44-46).

Geldanamycin and derivatives inhibit heat shock protein 90 (HSP90), a molecular chaperone that stabilizes the Bcr-Abl protein among others. Treatment of Bcr-Abl expressing cell lines with these agents suppresses growth and induces apoptosis.<sup>47</sup> In their presence, Bcr-Abl is degraded via the proteasome pathway. Interestingly, Bcr-Abl proteins with mutations of the kinase domain may be even more sensitive to geldanamycin than the wild-type protein (47). This observation makes these agents particularly attractive for therapy of patients carrying a mutated Bcr-Abl protein.

Finally, arsenic trioxide also leads to the degradation of Bcr-Abl protein, although the mechanism is not understood (48).

### **Acknowledgments**

We thank Marilina Amabile, Angela Poerio, Sabrina Colarossi, Tiziana Grafone, Simona Bassi, Fabrizio Pane e Giuseppe Saglio for helpful discussion about this review data.

### **References**

1. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
2. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306: 277-80.
3. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990; 247: 1079-82.
4. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-30.
5. Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 1995; 181: 307-13.
6. Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 1997; 15: 2333-42.
7. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC,



- Zon G, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995; 86: 726-36.
8. Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1107-13.
  9. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 139-45.
  10. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffen JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001; 97: 2440-8.
  11. le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, et al. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 163-8.
  12. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2: 561-6.
  13. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*. 1997; 90: 3691-8.
  14. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344: 1038-42.
  15. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-7.
  16. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, et al. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997; 90: 4947-52.
  17. Rosti G, Martinelli G, Bassi S, Amabile M, Trabacchi E, Giannini B, et al. Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 2284-90.
  18. Baccarani M, Martinelli G, Rosti G, Trabacchi E, Testoni N, Bassi S, et al. Imatinib and pegylated human recombinant interferon- $\alpha$ 2b in early chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; Aug 19 (Epub ahead of print).
  19. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-80.
  20. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190-6.

21. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002; 99: 3472-5.
22. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Gardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100: 1014-8.
23. Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10700-5.
24. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117-25.
25. von Bubnoff N, Schnell F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 2002; 359: 487-91.
26. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276-83.
27. Soverini S, Martinelli G, Amabile M, Poerio A, Bianchini M, Rosti G, et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. *Clin Chem* 2004; 50: 1205-13.
28. Schindler T, Bornmann WG, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289: 1938-42.
29. Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J Biol Chem* 2002; 277: 32214-19.
30. Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003; 101: 4611-4.
31. Gambacorti-Passerini C, Gunby RH, Piazza R, Galiotta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to Imatinib Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Lancet Oncol* 2003; 4: 75-85.
32. Hu Y, Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, et al. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2004; 36: 453-61.
33. La Rosee P, Corbin AS, Stoffregen EP, Deininger MW, Druker BJ. Activity of

- the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res* 2002; 62: 7149-53.
34. Huron DR, Gorre ME, Kraker AJ, Sawyers CL, Rosen N, Moasser MM. A novel pyridopyrimidine inhibitor of abl kinase is a picomolar inhibitor of Bcr-abl-driven K562 cells and is effective against STI571-resistant Bcr-abl mutants *Clin. Cancer Res* 2003; 9: 1267-73.
  35. Dorsey JF, Jove R, Kraker AJ, and Wu J. The pyrido[2,3-d]pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3127-31.
  36. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib(STI-571). *Cancer Res* 2002; 62: 4236-43.
  37. Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, et al. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res* 2003; 63: 375-81.
  38. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding Imatinib resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science* 2004; 305: 399-401.
  39. O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, et al. Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: Implications for CML. *Blood*. 2004; Jul 15 [Epub ahead of print].
  40. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 1995; 14: 3136-45.
  41. Hoover RR, Mahon FX, Melo JV, Daley GQ. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 2002; 100: 1068-71.
  42. Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, et al. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res* 2002; 62: 188-99.
  43. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, and Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene* 2002; 21: 5868-76.
  44. Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, Hideshima T, et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 2615-22.
  45. Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, et al. Histone Deacetylase Inhibitor LAQ824 Both Lowers Expression and Promotes Proteasomal Degradation of Bcr-Abl and Induces Apoptosis of

- ImatinibMesylate-sensitive or -refractory Chronic Myelogenous Leukemia-Blast Crisis Cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5126-35.
46. Shiotsu Y, Neckers LM, Wortman I, An WG, Schulte TW, Soga S, et al. Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G(1) phase accumulation against chronic myelogenous leukemia cells through destabilization of Bcr-Abl with Hsp90 complex. *Blood* 2000; 96: 2284-91.
  47. Gorre ME, Ellwood-Yen K, Chiosis G, Rosen N, and Sawyers CL. BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* 2002;100:3041-44.
  48. Perkins C, Kim CN, Fang G, and Bhalla KN. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 2000; 95: 1014-22.
  49. Azam M, Latek RR, Daley QG. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112: 831-43.
  50. Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 2001; 293(5538):2163a.
  51. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 2001; 293(5538): 2163a.
  52. Nardi V, Azam M, Daley GQ. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(1): 35-43.
  53. Al-Ali HK, Heinrich MC, Lange T, Krahl R, Mueller M, Muller C, et al. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 2004; 5(1): 55-60.
  54. Soverini S, unpublished results.

## **Patogenesi della leucemia linfatica cronica (B-LLC): interazioni tra cellule maligne e microambiente**

*Federico Calligaris, Cappio, Paolo Ghia*

Università Vita-Salute e Dipartimento di Oncologia, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

La leucemia linfatica cronica (LLC) è caratterizzata dal progressivo ed inarrestabile accumulo di linfociti B monoclonali negli organi linfoidi e nel sangue periferico. Essi esprimono caratteristicamente la molecola CD5 sulla superficie cellulare. Numerose evidenze sperimentali hanno suggerito che la cellula leucemica, nonostante sia portatrice di alterazioni genetiche responsabili della trasformazione neoplastica, necessita dell'interazione costante e ripetuta con numerosi elementi cellulari circostanti che formano il cosiddetto microambiente cellulare. Queste interazioni sono responsabili della sopravvivenza e dell'accumulo delle cellule leucemiche che, in assenza dell'ambiente appropriato, sono destinate a morire rapidamente per apoptosi. La capacità di rispondere a stimoli mediati dai linfociti T attivati, insieme allo studio dell'uso selettivo di alcuni geni delle immunoglobuline (Ig) e alla presenza di mutazioni somatiche nelle sequenze delle Ig, hanno suggerito che la stimolazione antigenica possa avere un ruolo fondamentale nella storia naturale della malattia.

La nostra attività di ricerca è stata indirizzata ad approfondire ulteriormente tali aspetti cercando di definire:

gli elementi cellulari pre-neoplastici o neoplastici iniziali sui quali per primi si possa esercitare l'azione del microambiente;

il ruolo specifico e differenziale svolto dai linfociti T e dalle cellule stromali nel favorire la sopravvivenza delle cellule di LLC;

il potenziale ruolo della stimolazione antigenica specifica nella storia naturale della malattia.

### **Identificazione e caratterizzazione di linfociti B monoclonali circolanti nel sangue periferico di individui altrimenti sani**

Abbiamo studiato il sangue periferico di 500 individui di età superiore ai 65 anni e senza patologie ematologiche o oncologiche note. Abbiamo valutato mediante analisi citofluorimetrica la possibile presenza di squilibri nel rapporto tra le cate-

ne kappa e lambda sulla superficie dei linfociti B circolanti (sia CD5<sup>+</sup> sia CD5<sup>-</sup>) indicatori della presenza di popolazioni monoclonali. Mediante questa semplice metodica sono stati rilevati alterati rapporti κ/λ (>3:1 o < 1:3) in 19 individui (3,8%). La frequenza di tali popolazioni è risultata ancora più alta tra gli individui con più di 75 anni di età (5,7%). La presenza di popolazioni B linfocitarie monoclonali è stata confermata anche mediante analisi in RT-PCR per i geni delle Ig che ha evidenziato una banda monoclonale in 14 casi sui 15 testati. Queste popolazioni cellulari sono state inoltre caratterizzate dal punto di vista citofluorimetrico evidenziando una notevole eterogeneità. Nove casi presentavano popolazioni con aspetto fenotipico simile alla LLC (*LLC classiche*: CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD20<sup>basso</sup>, Ig<sup>basse</sup>). Tre altri casi pur essendo CD5<sup>+</sup> sulla superficie presentavano livelli elevati di CD20 e Ig (*LLC atipiche*). Infine, circa metà dei casi (7) risultavano CD5<sup>-</sup> (*Non-LLC*), ad indicare una predisposizione di entrambe le sottopopolazioni B linfocitarie ad espandersi in maniera monoclonale con l'avanzare dell'età anagrafica. Data l'elevata frequenza di queste espansioni monoclonali negli individui normali, decisamente superiore a quella delle leucemie nell'adulto, è ragionevole pensare che possano essere principalmente una conseguenza dell'invecchiamento del sistema immunitario. Ciò nonostante, è comunque verosimile che progressivamente alcuni di questi cloni possano evolvere in una patologia ematologica manifesta clinicamente ed in particolare in LLC. Pertanto l'analisi di queste popolazioni cellulari potrà essere un utile strumento per la comprensione delle fasi iniziali della trasformazione neoplastica ed in particolare per lo studio delle interazioni tra il clone neoplastico e il microambiente circostante che ne permette la progressiva espansione ed accumulo.

### **Ruolo delle cellule accessorie nella sopravvivenza del clone leucemico**

Abbiamo indagato in dettaglio il ruolo specifico di alcune componenti cellulari non-neoplastiche nel sostenere la sopravvivenza delle cellule leucemiche. Abbiamo coltivato cellule di LLC purificate in presenza di cellule stromali o di linfociti T. Abbiamo provato a riprodurre l'azione di quest'ultimi mediante la sola aggiunta di CD40Ligando solubile (sCD40L) e/o di interleuchina (IL-) 4. Abbiamo poi valutato la risposta in termini di vitalità cellulare e capacità di chemotrazione. I risultati ottenuti indicano che sia i linfociti T sia le cellule stromali sono in grado di mantenere le cellule leucemiche vitali, ma svolgono tale funzione con modalità temporali differenti. In particolare, le cellule T inducono uno stimolo di sopravvivenza a breve termine (misurabile in giorni), mentre le cellule stromali sono in grado di prolungare la vitalità delle cellule di LLC più a lungo termine (settimane). Inoltre abbiamo dimostrato che, mentre la stimolazione con la forma solubile del CD40L è in grado di indurre la produzione del RNA messaggero di entrambe le chemochine MDC e TARC, solo la prima è effettivamente secreta dopo tale stimolo. L'aggiunta di IL-4, elemento fondamentale nel processo di attivazione linfocitaria B, è invece in grado di indurre anche la secrezione di TARC in tutti i casi di LLC testati. Questo suggerisce che la stimolazione fisiologica da parte dei linfociti T durante il processo di riconoscimento del-

l'antigene, che include le interazioni CD40:CD40L e IL-4:IL-4R, è in grado di agire anche sulle cellule leucemiche. È dunque di interesse il fatto che le cellule di LLC siano in grado di produrre le chemochine MDC e TARC, chemochine capaci di reclutare in maniera efficiente altri linfociti T attivati i quali a loro volta sono in grado di prolungare la vitalità dei linfociti neoplastici.

### **Ruolo della stimolazione antigenica nella storia naturale della malattia leucemica**

Abbiamo studiato, grazie alla collaborazione internazionale con i centri di ricerca di Barcellona, Parigi, Atene e Salonicco, l'uso dei geni delle Ig in oltre 500 casi di LLC. Abbiamo confermato l'incremento nell'utilizzo del gene IGHV1-69, mentre gli altri geni delle Ig vengono utilizzati con frequenze decisamente simili al normale repertorio. Ciò nonostante, quando abbiamo analizzato in maniera approfondita le sequenze nucleotidiche del gene IGHV3-21, anch'esso utilizzato nella LLC con una frequenza simile a quella dei linfociti B normali (2,9%), abbiamo notato che quasi la metà dei casi (7/16) presentavano una porzione ad alta affinità per l'antigene (HCDR3) molto simile se non addirittura identica tra loro. Il resto dei pazienti (9/16) presentava invece una sequenza decisamente eterogenea come è atteso in seguito ai riarrangiamenti casuali dei geni delle immunoglobuline. I casi che presentavano un HCDR3 simile esprimevano anche la medesima catena leggera lambda in quasi tutti i casi (6/7), il che implicava la formazione di un sito di riconoscimento antigenico praticamente identico in pazienti provenienti da regioni geografiche differenti. Dal punto di vista clinico i pazienti con HCDR3 simile avevano un tempo medio alla progressione di malattia più breve (3 mesi) rispetto al resto dei pazienti (60 mesi). L'insieme di questi dati indica la possibile esistenza di elementi antigenici, presenti in luoghi geografici diversi tra loro, verosimilmente in grado di selezionare particolari cloni neoplastici, e quindi responsabili della insorgenza/mantenimento della malattia. La stimolazione da parte di tale potenziale antigene sembra svolgere un ruolo deleterio nella progressione della malattia, accelerandone il decorso.

### **Bibliografia essenziale**

1. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 123(3): 380-8, 2003.
2. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell: a tentative model. *Hematol Oncol Clin North Am.* 18(4): 849-62, 2004.
3. 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.* 32(5): 1403-13, 2002.
4. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, Caligaris-Cappio F. Differential effects on CLL cell survival exerted by dif-

- ferent microenvironmental elements. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 2004 in corso di stampa.
5. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, Michel A, Crespo M, Laoutaris N, Montserrat E, Anagnostopoulos A, Dighiero G, Fassas A, Caligaris-Cappio F, Davi F. Geographical patterns and pathogenic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2004 Oct 5; [Epub ahead of print] PMID: 15466924
  6. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103(12): 4389-95, 2004.



## **Citogenetica molecolare della leucemia linfatica cronica**

*Antonio Cuneo, Francesco Cavazzini, Gian Luigi Castoldi*

Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate, Sezione di Ematologia, Università di Ferrara

La biologia e la clinica della LLC presentano aspetti ampiamente eterogenei che riflettono una patogenesi complessa, che riconosce diversità in alcune caratteristiche fondamentali della cellula d'origine e che si sviluppa attraverso una serie di lesioni citogenetiche e molecolari.

Moderne acquisizioni tecnologiche hanno infatti consentito di mettere in luce come il linfocito della LLC utilizzi in maniera preferenziale alcuni sottotipi dei segmenti VDJ del gene immunoglobulinico, come in molti casi vi siano i segni dell'incontro con l'antigene e come, nella maggior parte dei casi, aberrazioni citogenetiche specifiche e difetti molecolari possano determinare alcune caratteristiche della malattia (1).

Le più significative acquisizioni sul profilo di lesioni citogenetiche della LLC e sui principali aspetti molecolari verranno prese in esame con particolare riferimento al loro significato biologico e clinico.

### **PRINCIPI METODOLOGICI**

#### **Analisi citogenetica convenzionale**

Lo studio del cariotipo rappresenta l'unica metodica che potenzialmente permette la visualizzazione di qualunque anomalia cromosomica in un singolo esperimento. Le cellule devono essere coltivate a fresco e sottoposte a stimolazione in vitro con mitogeni B-linfocitari (esteri del forbolo, lipopolisaccaride di E. Coli). Questa metodica è molto specifica (virtuale assenza, in mani esperte, di falsi positivi), e presenta il limite di una bassa sensibilità, derivante da due fattori:

- 1) scarsa attitudine del clone patologico di dividersi in vitro nonostante l'impiego di mitogeni,
- 2) impossibilità di visualizzare delezioni o trisomie di grandezza inferiori alle 5-20 megabasi (corrispondenti alla grandezza di una banda cromosomica in rapporto alla variabile elongazione ottenibile nei diversi pazienti).

#### **Ibridazione in situ fluorescente (FISH) e "multicolor" FISH**

Questa metodica, fornisce risultati riproducibili e ha il grande pregio della sensibilità, della relativa rapidità e semplicità (2). Si esegue su campioni preparati e

fissati per l'analisi citogenetica convenzionale; con opportuni accorgimenti può essere eseguita su cellule morfologicamente intatte o marcate con metodica immunologica. È nota come FISH, abbreviazione dall'inglese Fluorescence In Situ Hybridization. Mediante l'impiego di sonde fluorescenti specifiche, permette la visualizzazione di sequenze di DNA bersaglio e rileva quindi la presenza di delezioni, trisomie o traslocazioni di specifiche regioni cromosomiche. Il vantaggio rispetto all'analisi citogenetica convenzionale è duplice in quanto,

- a) visualizza le lesioni anche nei nuclei in interfase, risolvendo il problema dell'induzione della mitosi in vitro nelle cellule della LLC;
- b) rileva delezioni molto sottili, dell'ordine di grandezza delle centinaia di kilobasi. Il suo limite è che, normalmente, permette la visualizzazione di una o due anomalie per esperimento e non può fornire un quadro completo delle lesioni presenti nel paziente.

Vi sono tecniche che utilizzano miscele di fluorocromi in grado di attribuire un colore a ciascun cromosoma (multicolor FISH o spectral karyotyping): queste consentono di identificare su cellule in metafase (non nei nuclei in interfase) riarrangiamenti cromosomici complessi.

### Comparative genomic hybridization (CGH) e CGH microarrays

Questa metodica si fonda sul principio della ibridazione su cromosomi normali di eguali quantità di DNA tumorale e DNA normale, marcati con fluorocromi diversi. La prevalenza di uno dei due fluorocromi in caso di delezioni o trisomie nel campione patologico consente di individuare qualunque guadagno o perdita di materiale cromosomico in un singolo esperimento. Il vantaggio deriva dal fatto che questa metodica non dipende dall'entrata in mitosi delle cellule patologiche; il limite è rappresentato dall'impossibilità di visualizzare le anomalie "bilanciate" (traslocazioni, inversioni, inserzioni) e dalla sensibilità che non si spinge oltre le 10 megabasi per delezioni o trisomie parziali di un segmento cromosomico (3).

**Tabella 1** - Frequenza della principali anomalia cromosomiche nella LLC.

	Citogenetica convenzionale	FISH
% pazienti con cariotipo normale	40-60%	20%
% pazienti con cariotipo non valutabile	10%	0%
% pazienti con cariotipo alterato	40-50%	80%
% con anomalie specifiche		
+12	20-40% (*)	15-25% (**)
13q-	10-20%	50%
11q-	5-15%	15-30%
6q-	5-10%	2-5%
t(14q32)(#)	3-5%	2-3%
17p-	1-3%	1-5%

(\*) % riferite al totale dei casi anomali - (\*\*) % riferite al totale dei casi analizzati

(#)= esclusa la t(11;14); nel 50% dei casi si tratta di una t(14;18)(q32;q21)

La sensibilità di questa metodica viene portata al livello di centinaia di kilobasi qualora invece di ibridare il DNA tumorale e controllo sui cromosomi normali, si utilizzino “array” precostituiti contenenti sequenze di DNA normale clonate in vettori (BAC, PAC) rappresentative di regioni o geni di interesse nella patologia in esame (4)

### **Studio della sequenza dei geni Ig**

Il linfocito B normale riarrangia il gene immunoglobulinico (Ig) durante la maturazione a livello midollare (linfocito pro-B). A tal fine il linfocito, mediante l'attività delle ricombinasi, congiunge una delle sequenze V con una delle sequenze D e J, assemblando così la sequenza della porzione variabile del gene Ig. Al momento dell'incontro con l'antigene all'interno del centro germinativo avviene la maturazione per affinità, durante la quale il linfocito introduce mutazioni nella sequenza della porzione variabile del gene Ig. Dunque, la presenza di un numero significativo (>2%) di mutazioni nel gene Ig rispetto alla “germline” indica che la cellula che ha dato origine al clone neoplastico ha incontrato l'antigene nell'ambito di una risposta immunitaria T-dipendente. Viceversa, l'assenza di mutazioni somatiche del gene Ig indica che la cellula non è transitata attraverso il centro germinativo e quindi rappresenta un linfocito B “vergine”, oppure un linfocito che ha incontrato antigeni che non contemplano la selezione clonale “per affinità” all'interno del centro germinativo (stimolazione non convenzionale o da superantigeni). I passaggi tecnici necessari per lo studio della sequenza del gene Ig nella LLC partono dalla disponibilità di DNA genomico da linfociti del sangue periferico e sfruttano le metodiche di PCR per l'amplificazione del segmento VDJ riarrangiato (o VJ qualora si analizzi la catena leggera), cui segue l'analisi della sequenza del gene  $V_H$  coinvolto rispetto alla corrispondente sequenza  $V_H$  nella “germline” (5).

Grazie a queste metodiche si ottengono informazioni sul tipo di segmenti V, D e J utilizzati dai linfociti patologici e sulla percentuale di mutazioni presenti nella porzione variabile del gene Ig.

### **Analisi del profilo di espressione genica.**

Questa metodica consente di ottenere, in un singolo esperimento di ibridazione, informazioni sull'espressione di migliaia di geni da parte del clone neoplastico, e di paragonare il profilo di espressione così ottenuto con quello di adeguato campione “controllo” scelto dallo sperimentatore (6, 7).

I passaggi metodologici su cui si fonda questa metodica sono i seguenti:

- 1) si ottiene l'mRna del campione patologico in esame e del campione scelto come controllo,
- 2) si trasforma l' mRNA in cDNA mediante RT-PCR,
- 3) si trasforma il cDNA in cRNA con reazione polimerasica, amplificando la quantità di materiale e marcandolo con biotina, consentendo quindi un'efficiente ibridazione e rilevazione del segnale,

4) si ibrida il cRna del campione e del controllo su “chip” che contengono migliaia di sequenze rappresentative di altrettanti geni.

Così facendo si ottiene, valutando l'intensità di fluorescenza ottenuta in corrispondenza di ciascun gene, l'informazione sui livelli di trascritto del gene stesso. Il paragone tra i livelli di espressione del campione in esame e del controllo consentirà di valutare quali singoli geni sono sovraespressi o down-regolati.

## LESIONI CITOGENETICHE E MOLECOLARI

### Profilo citogenetico

A seconda che si impieghi la citogenetica convenzionale o la tecnica FISH i risultati ottenuti possono essere diversi, in quanto la prima tecnica rileva anomalie nel 40-50% dei casi (8), mentre la seconda tecnica rileva alterazioni citogenetiche nell'80% dei casi (9). Oggi si preferisce l'utilizzo della FISH in campo clinico, per la sua sensibilità e relativa semplicità; in realtà entrambe le tecniche hanno un rilevante impatto prognostico (vide infra).

Il profilo di anomalie cromosomiche della LLC è molto ricco e le aberrazioni del cariotipo riportate in letteratura come anomalia singola in almeno due casi sono le seguenti: +12; 13q-, 11q-, 6q-, t(14;18), t(14;19), +3, +18, 17p-, +21, +X, 8q+ (10). In molti casi queste anomalie possono essere presenti contemporaneamente nello stesso paziente: infatti è noto che circa il 40-50% dei pazienti con cariotipo anormale presenta una singola anomalia, mentre un 20-30% dei pazienti pre-

**Tabella 2** - Correlazione tra le principali lesioni citogenetico-molecolari e caratteristiche clinicobiologiche.

Anomalia	Geni o regioni coinvolte	Citologia	Immunofenotipo Geni Ig	Caratteristiche clinicobiologiche
17p-	p53	LLC/PL	CD38+++/- ZAP-70+++/- Ig non mutate +++/-	Prognosi altamente sfavorevole (mediana sopravvivenza <5 anni). Resistenza agli analoghi delle purine. Sensibilità all'anti CD52
11q-	ATM	LLC tipica	CD38+++/- ZAP-70+/- Ig non mutate +++/-	Prognosi sfavorevole (mediana sopravvivenza 5-10 anni). Adenopatie profonde e massive. Discreta sensibilità all'antiCD20 (?)
+12	12q13-15	LLC atipica	CD38+/- ZAP-70+++/- Ig non mutate +/-	Prognosi intermedia (mediana sopravvivenza 10-15 anni) Cattiva sensibilità all'antiCD20 (?)
6q-	6q21	LLC atipica	CD38+++/- Ig non mutate +/-	Prognosi intermedia (mediana sopravvivenza 10-15 anni) Iperleucocitosi; terapia precoce
13q-	13q14	LLC tipica	CD38- ZAP-70+/- Ig non mutate +/-	Prognosi favorevole (mediana sopravvivenza > 15 anni) Buona sensibilità all'anti CD20 (?)

**Tabella 3** - Altre anomalie ricorrenti nella LLC.

<b>Lesione</b>	<b>Commenti</b>
Trisomia 8q	Coinvolge la banda 8q24, rinvenuta in prevalenza mediante CGH o FISH nel 5% dei casi, spesso in associazione ad altre anomalie.
Trisomia 3q	Coinvolge le bande 3q26-28, rinvenuta mediante CGH o FISH nel 3% dei casi
Trisomia 19	Rinvenuta spesso in associazione a trisomia 12 e geni IgV mutati
Trisomia 2p24	Presente nel 5% dei casi, coinvolgimento del gene <i>MYCN</i> che viene sovraespresso
Delezioni 14q	Coinvolgono la banda distale a 14q32 – prognosi sfavorevole (?)
4q35	Cellule linfoplasmocitoidi (LLC atipica); immunofenotipo classico; Componente paraproteinemica; malattia evolutiva; risposta di breve durata alla terapia
4p16	LLC atipica; stadio iniziale, malattia evolutiva
6p24-25	LLC atipica; stadio iniziale, malattia evolutiva
4q21	LLC/PL; fabbisogno precoce di terapia
1p34	LLC tipica; stadio iniziale, malattia indolente
12p	LLC tipica; stadio iniziale, malattia indolente

senta 2 anomalie e 20-30% presenta 3 o più anomalie (cariotipo complesso). In diversi casi, sono stati riportati nello stesso caso cloni con anomalie diverse e non correlate tra loro: ad esempio si possono rinvenire nello stesso paziente cellule con delezione 13, altre cellule con trisomia 12 e cellule con entrambe le anomalie. Questi dati riflettono il fatto che queste anomalie non sempre si manifestano nelle fasi precoci della leucemogenesi, mentre giocano un ruolo importante nelle fasi di espansione clonale. Oggi si utilizza in campo clinico una classificazione “gerarchica” che si fonda sull’idea, supportata dai dati sperimentali, che alcune anomalie hanno un ruolo biologico determinante e sono in grado di conferire alla cellula leucemica caratteristiche peculiari che si riflettono a loro volta nel comportamento clinico (9). Così ciascun paziente viene collocato in una classe citogenetica sulla base delle seguenti priorità: delezione 17p > delezione 11q > trisomia 12 > delezione 6q > delezione 13q > normale. Ad esempio, un paziente che presenta 6q- e 11q- ricade nella categoria 11q-, uno che presenta 13q- e 17p- si colloca nella categoria 17p- e così via. Così facendo si riesce a collocare in una singola categoria citogenetica circa il 70% dei pazienti, mentre i restanti presentano altre anomalie o assenza di aberrazioni rilevabili. Come riportato in tabella 1, l’anomalia predominante in ordine di frequenza, rinvenuta nel 40% circa dei casi di LLC è rappresentata dalla delezione 13q, seguita dalla trisomia 12 e dalla delezione 11q, quindi dalla delezione 17p, dal cromosoma 6q-, dalle traslocazioni 14q. Come di seguito descritto e riassunto in tabella 2 ciascuna di queste anomalie si associa ad alcune importanti caratteristiche cliniche e biologiche.

Esiste poi una serie di più rare anomalie, in prevalenza non bilanciate (i.e. che determinano perdita o guadagno di materiale cromosomico), più raramente bilanciate (traslocazioni), globalmente rinvenibili in un 10-20% circa dei pazienti che non ricadono in alcuna delle classi citogenetiche sopradescritte. Queste anomalie, rinvenute ora con metodica citogenetica classica (11), oppure con metodiche di CGH e CGH microarrays (4, 12), sono descritte in tabella 3.

### **Anomalie specifiche**

#### *Delezione 17p e mutazioni p53*

Questa anomalia è rinvenibile nel 2-5% dei casi di LLC, sia mediante tecnica citogenetica convenzionale (8) che mediante tecnica FISH (9). Gli studi di biologia molecolare hanno posto in evidenza come in molti casi di LLC con delezione 17p possa esservi perdita di un allele codificante per il gene oncosoppressore p53 (che mappa a livello della banda 17p13) e mutazione inattivante del restante allele con perdita di funzione della proteina (13). In questi casi la proteina non funzionale rimane “stabilizzata” e diviene quindi rilevabile nella cellula patologica mediante colorazione immunologia (14). I pazienti con LLC e 17p- presentano una LLC con evidente componente prolinfocitaria, corrispondente alla variante LLC/PL della classificazione FAB (15). È interessante notare come le delezioni 17p siano molto frequenti nella leucemia prolinfocitica (16). La gran parte dei pazienti con 17p- mostra un profilo “non mutato” delle porzioni variabili dei geni Ig, presenta il marcatore CD38 e lo ZAP-70. È stata descritta in questi pazienti una relativa resistenza al trattamento con analoghi delle purine (17) o con anticorpo monoclonale anti CD20 (18), che può essere superata dall’introduzione dell’anticorpo monoclonale anti CD52 (19).

#### *Delezione 11q e mutazioni ATM*

Impiegando la sensibile tecnica FISH, l’incidenza di questa delezione varia tra l’11% ed il 25% dei casi (20, 21). Il segmento comunemente deletato consta di 2.3 megabasi e contiene, tra l’altro il gene responsabile dell’ataxia-teleangiectasia, detto *ATM* (da ataxia-teleangiectasia mutated). L’ataxia-teleangiectasia è una condizione ereditaria caratterizzata dalla predisposizione allo sviluppo di neoplasie linfoidi T-cellulari. In una frazione delle LLC con 11q- si assiste alla perdita di un allele ed alla presenza di mutazioni del restante allele, per cui il gene *ATM* è sicuramente coinvolto nella patogenesi di alcuni casi di LLC (22). La perdita di funzione di *ATM* conduce all’instabilità genica e questo rende ragione dell’elevata frequenza di aberrazioni citogenetiche aggiuntive osservate nei pazienti con 11q- (20)

I pazienti con 11q- presentano una morfologia tipica, con prevalenza di piccoli linfociti che mostrano frequente ma non invariabile positività per CD38 e per ZAP-70 e geni Ig “non mutati”. Le cellule patologiche hanno una minore espressione di molecole di adesione e di recettori per i segnali cellulari, mostrano un profilo di espressione genica peculiare e la malattia mostra la tendenza allo sviluppo di adenopatie massive con resistenza al trattamento intensivo con supporto

di cellule staminali autologhe (21). È stata descritta una descritta in uno studio una discreta sensibilità all'anticorpo monoclonale anti CD20 (18).

### *Trisomia 12*

Questa anomalia cromosomica è rinvenuta nel 10-15% dei casi di LLC. L'anomalia può sfuggire all'analisi citogenetica se è presente in un sub-clone minoritario oppure se le cellule patologiche hanno un indice mitotico basso (23). Le cellule con trisomia 12 possono localizzarsi in maniera preferenziale nel tessuto linfonodale (24). In alcuni pazienti è stata rilevata la trisomia parziale del braccio lungo del cromosoma 12 ed il segmento triplicato era compreso in tutti i casi tra le bande 12q13-15. Non è noto quale gene di questa regione sia coinvolto nella leucemogenesi.

I pazienti con trisomia 12 mostrano, nel 50% circa dei casi, grandi linfociti in percentuale compresa tra il 10 ed il 55% nello striscio periferico. Questo quadro corrisponde alla LLC a cellule miste della classificazione FAB. Si registra una variabile espressione del CD38, con una frequenza intermedia di casi con mutazioni somatiche dei geni Ig.

Il significato prognostico della trisomia 12 non è definito con esattezza, ma si ritiene possa identificare un gruppo di pazienti a prognosi intermedia (8,9). Recenti studi prospettici hanno dimostrato l'associazione della trisomia 12 con fattori di rischio sfavorevoli, quali un pattern diffuso di infiltrazione midollare, con un tempo di raddoppio della conta inferiore ai 12 mesi, elevati livelli di timidina chinasi (21) e frequente positività per il marcatore ZAP-70 (25). È interessante notare che il clone con trisomia 12 può mostrare chemioresistenza alla terapia con alchilanti (26)

### *Delezione 6q*

Questa anomalia è presente nel 2-5% dei casi. Talora rappresenta la sola anomalia rilevabile, mentre in 2/3 dei casi rappresenta un'anomalia aggiuntiva. La regione di minima comune delezione si ritiene si collochi attorno alla banda 6q21 (27). Le caratteristiche dei pazienti con 6q- come anomalia isolata sono rappresentate da una elevata frequenza di LLC a cellule miste, dalla frequente positività per il CD38, dalla elevata conta leucocitaria alla diagnosi e dalla necessità di somministrazione precoce di terapia. In uno studio, la delezione 6q21 si dimostrava un fattore prognostico sfavorevole all'analisi multivariata rispetto ai pazienti con cariotipo normale o con delezione 13q isolata (28).

### *Delezione 13q e geni microRna*

Si tratta dell'anomalia singola più frequente nella LLC, presente in circa il 40% dei casi (9). I pazienti con delezione 13q isolata presentano morfologia tipica, sono in genere CD38- e ZAP-70-.

La regione di minima comune delezione, localizzata alla banda 13q14 è distale rispetto al gene Rb. Un'analoga delezione si rinviene nel 70% dei linfomi mantellari. In questa regione sono presenti numerosi geni, ma ad oggi non è stata rilevata alcuna mutazione inattivante il restante allele. Recentemente sono stati loca-

lizzati almeno due geni codificanti per microRNA nella regione 13q14 deleta (i.e miR-15a e miR-16) (29). Questi geni, che svolgono importanti funzioni di controllo sull'attività del genoma, mostrano ridotta espressione in seguito a delezione (29). Recentemente sono stati identificati quasi 200 geni microRna nel genoma umano: la loro localizzazione è spesso in vicinanza di siti cromosomici "fragili" o in corrispondenza di regioni delete o amplificate in vari tipi di neoplasia (30).

### *Traslocazioni 14q32*

Il cromosoma 14q+ con rottura alla banda q32 coinvolgente il gene per le immunoglobuline è presente nel 2-3% dei casi, escludendo la t(11;14)(q13;q32) che viene considerata come il marcatore delle neoplasie linfoidi mantellari. La traslocazione più frequente è rappresentata dalla t(14;18)(q32;q21) che può coinvolgere il gene BCL2. Altre traslocazioni più rare sono la t(14;19)(q32;q13) coinvolgente il gene BCL3 e la t(2;14)(p13;q32) coinvolgente il gene BCL11. Globalmente, le traslocazioni 14q32 si associano ad una prognosi intermedia o favorevole (9). Va tuttavia ricordato che la rara t(14;19)(q32;q13) si associa ad una morfologia linfocitaria atipica, ad un'età di insorgenza giovane e ad una prognosi francamente severa rispetto a quanto atteso nella LLC (31). I pochi casi con t(14,18) studiati mostrano morfologia ed immunofenotipo atipico ed una malattia che richiede trattamento precoce (32).

La t(11;14) si osserva solo in alcuni casi di LLC in trasformazione prolinfocitaria, la cui diagnosi differenziale rispetto ai linfomi del mantello non è agevole (33-37).

## **EVOLUZIONE DEL CARIOTIPO**

Il cariotipo nella LLC è considerato fondamentalmente stabile, con <20% dei pazienti mostranti aberrazioni aggiuntive durante il decorso della malattia (38). È stato dimostrato che i pazienti con instabilità del cariotipo hanno spesso delezione 11q alla diagnosi (20). Tra le anomalie che compaiono nelle fasi evolutive sono state segnalate la delezione 6q e, l'11q- e il 17p- (39). La comparsa tardiva della delezione 11q si associa alle forme di LLC/PL e ad un'attivazione della malattia (40).

## **SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELLE LESIONI CITOGENETICO-MOLECOLARI**

### **Analisi citogenetica convenzionale**

Le informazioni rilevanti e dotate di potere predittivo indipendente, ricavabili dall'indagine citogenetica convenzionale (8) possono essere così riassunte:

- esiste una correlazione significativa tra percentuale di metafasi anomale e sopravvivenza: i pazienti con cariotipo normale alla diagnosi e durante il decorso della malattia (NN) hanno una mediana di sopravvivenza non rag-



giunta ad 11 anni; i pazienti con una commistione di metafasi normali ed anormale (AN) sopravvivono in media 8 anni circa; quelli con solo metafasi anormale (AA) non raggiungono i 5 anni. Questa osservazione riflette con tutta probabilità la correlazione tra capacità di crescita “in vitro” del clone neoplastico e capacità di crescita “in vivo” e dimostra che i pazienti con un clone anormale che ha soppiantato le residue cellule normali hanno una malattia più aggressiva.

- Esiste un “gradiente” in decremento della curva di sopravvivenza a partire dai pazienti a cariotipo normale, attraverso quelli con 1 singola anomalia clonale e con 2 anomalie, per terminare con quelli aventi 3 o più anomalie (cariotipo complesso), che mostrano la sopravvivenza peggiore. La correlazione tra instabilità genetica-citogenetica e prognosi è altamente riproducibile in molte neoplasie ematologiche.
- Anomalie cromosomiche specifiche hanno significato prognostico indipendente: la delezione 13q è un fattore “favorevole” se presente come anomalia singola, la trisomia 12 e la delezione 11q hanno un significato “sfavorevole”, al pari delle alterazioni 14q. È noto che molti dei pazienti con traslocazioni 14q32, hanno la t(11;14)(q13;q32). Questa anomalia identifica casi che oggi non vengono più classificati come LLC, bensì come linfomi del mantello in fase leucemica o, più raramente, come LLC/PL o LLC atipica (33).

## FISH

Il numero di pazienti con una specifica anomalia cromosomica sale dal 50% all’70-75% impiegando un pannello di 4 sonde che rilevano le anomalie 13q-, 17p-, 11q- e trisomia 12 ed all’82% aggiungendo sonde che rilevano il 6q-, le traslocazioni 14q32, le trisomie parziali 3q ed 8q. Le principali correlazioni tra specifiche anomalie e prognosi emerse in un ampio studio di riferimento (9) sono qui riassunte.

- a) costruendo una classificazione gerarchica che riconosce importanza, in ordine crescente, alla delezione 13q, alla trisomia 12, all’11q- ed al 17p- si rileva che la rispettiva frequenza di queste anomalie è la seguente: 36%; 14%; 17%; 7%. Il 18% dei casi ha un cariotipo normale; l’8% ha anomalie varie.
- b) La mediana di sopravvivenza in questi gruppi è significativamente diversa (9), attestandosi a 133 mesi per il 13q-, a 111 mesi per l’assenza di anomalie rilevabili, a 114 mesi per la trisomia 12, a 79 mesi per l’11q- e a 32 mesi per il 17p-. I pazienti con 17p- mostrano il più breve intervallo tra diagnosi ed inizio del trattamento; quelli con 13q- il più lungo
- c) Il 17p- e l’11q- sono fattori prognostici sfavorevoli indipendenti.

L’approccio diagnostico impiegante la FISH riconosce dunque la presenza di almeno due anomalie cromosomiche (17p- ed 11q-), che hanno importanza nella valutazione del rischio. Ha il pregio di essere relativamente semplice ed effettuabile su larga scala, presenta tuttavia il limite di non riconoscere altri indici citogenetici importanti quali il cariotipo complesso, la percentuale di cellule in mito-

si anomale. Non consente inoltre di riconoscere il significato della trisomia 12 che risulta omologata ad un ampio gruppo non pienamente informativo includente il cariotipo normale e la delezione 13q.

## MUTAZIONI DEI GENI Ig E ORIGINE DELLA LLC

La cellula B-CD5+ che determina l'insorgenza della LLC utilizza in maniera preferenziale alcuni sottotipi delle porzioni VH e JH e DH nel riarrangiamento dei geni Ig. Ciò avviene probabilmente perché alcuni antigeni possono giocare un ruolo nella promozione neoplastica oppure perché i precursori della LLC rappresentano un sottotipo distinto di cellule B-linfocitarie che utilizza fisiologicamente un set ristretto di segmenti VDJ (41). In parte dei casi di LLC esiste traccia dell'incontro con l'antigene da parte della cellula leucemica, evidente quando si analizza la sequenza delle porzioni variabili del gene Ig (LLC "mutate") e si rinven-gono >2% di mutazioni rispetto alla sequenza germline (42). Circa la metà dei casi di LLC, invece, non mostra mutazioni somatiche delle porzioni variabili dei geni Ig (LLC "non mutate") indicando come la cellula trasformata non sia transitata attraverso il centro germinativo. Si ritiene che la cellula d'origine in questi casi sia un linfocito che ha incontrato antigeni che non contemplano la selezione clonale "per affinità" in una risposta non mediata dai linfociti CD4 all'interno del centro germinativo. Lo stato mutazionale dei geni Ig è un indicatore prognostico indipendente: infatti i pazienti "non-mutati" hanno una sopravvivenza significativamente ridotta rispetto ai pazienti "mutati" (43).

Vi è evidenza che la frequenza di mutazioni somatiche dei geni Ig è diversa a seconda del segmento  $V_H$  riarrangiato: così ad esempio la famiglia  $V_H3$  e  $V_H4$  mostrano una frequenza di mutazioni più elevata rispetto alla famiglia  $V_H1$  (21). Le ragioni alla base di questo fenomeno possibilmente riflettono la diversità della stimolazione antigenica subita dai linfociti prima della loro trasformazione.

È stata rinvenuta una correlazione tra stato non-mutato dei geni Ig e l'espressione del marcatore di superficie CD38 (44), ma in altri studi questa associazione non è stata confermata in 1/3 circa dei casi (21). Più recentemente, l'espressione della molecola ZAP-70 si è rilevato in alcuni centri un ottimo marcatore surrogato dello stato mutazionale dei geni Ig (43), ma la riproducibilità della metodica per la sua rilevazione è al momento insoddisfacente.

Infine, la presenza di mutazioni dei geni Ig si associa preferenzialmente a caratteristiche citogenetiche favorevoli (i.e. 13q-)

## LLC E PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA

Gli studi impieganti la recente metodica dei microarrays hanno fornito alcune informazioni interessanti sulla biologia della LLC che possono essere schematicamente riassunte come segue.

- a) il profilo di espressione genica della LLC ne conferma la identità di malattia distinta rispetto ad altre sindromi linfoproliferative e linfomi (6): circa 30 geni iperespressi nella LLC sono riferibili alle vie di trasduzione del segnale,

- mentre circa 50 geni ipoespressi appaiono coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nella replicazione del DNA
- b) l'espressione genica nella LLC appare largamente indipendente dallo stato mutazionale del gene Ig (7) ed appare riferibile a quello di un linfocito B-memoria. Esistono tuttavia alcuni geni differenzialmente espressi nelle due categorie di LLC che ne consentono la distinzione: uno di questi è la tirosin chinasi ZAP-70 che sembra avere un ruolo nella risposta allo stimolo mediato dal BCR (45)
  - c) rispetto al linfocito B-memoria normale il linfocito leucemico mostra un fenotipo quiescente ed anti-apoptotico, con diversità nella capacità di risposta alle citochine e chemochine ed alterate proprietà di adesione cellulare (42)
  - d) è possibile dimostrare un profilo di espressione genica diverso in singoli sottogruppi citogenetici della LLC (21) e in gruppi stratificati per rischio di evoluzione (46).

## CONCLUSIONE

Diversamente da quanto ritenuto in passato la LLC è una malattia che trae origine da linfociti B che hanno incontrato l'antigene e che presentano un profilo chiaramente selezionato di geni VDJ. I linfociti patologici esprimono alcune caratteristiche fenotipiche delle cellule B attivate e mantengono la capacità di rispondere allo stimolo antigenico, anche attraverso un processo attivo di mutazione somatica (47). Gli studi di citogenetica e biologia molecolare non hanno ancora identificato, se non in una minoranza dei casi, il gene o i geni responsabili dell'insorgenza della malattia. Tuttavia l'identificazione di una serie di lesioni cromosomiche, i dati relativi ai geni a microRna, le conoscenze sulle caratteristiche dei geni Ig e dei profili di espressione genica hanno fornito preziose informazioni sulla biologia del linfocito trasformato, consentono oggi di formulare un giudizio prognostico più accurato (48) e di indirizzare al meglio le risorse terapeutiche.

## Bibliografia

1. Cuneo A, Bigoni R, Castoldi G. Towards a clinically relevant cytogenetic classification of chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Haematologica*. 1998; 83: 577-579.
2. Mecucci C. FISH (fluorescent in situ hybridization): the second youth of cytogenetics. *Haematologica*. 1995; 80: 95-97.
3. Bentz M, Huck K, du Manoir S et al. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood*. 1995;85:3610-3618.
4. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 1039-1044.
5. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expres-

- sion as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1840-7.
6. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001; 194: 1625-1638.
  7. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001; 194: 1639-1647.
  8. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990; 323: 720-4.
  9. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910-6.
  10. Juliusson G, Gahrton G. Cytogenetics in CLL and related disorders. *Baillieres Clin Haematol*. 1993; 6: 821-848.
  11. Cavazzini F, Cuneo A, De Angeli C, Bardi A, Agostini P, Tammiso E, Rigolin GM, Castoldi G. Anomalities of chromosome 1p36, 4p16; 4q35, 9q11-32 and +7 represent novel recurrent cytogenetic rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymph*, in the press 2004.
  12. Drandi D, Lee C, Dal Cin P, Gribben JG. Array based comparative genomic hybridization identifies deletions at 14q32 as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2003; 102; supplemento 1; abstract 186a, 45th ASH congress San Diego DEc 6-9, 2003
  13. Gandini D, Aguiari GL, Cuneo A, Piva R, Castoldi GL, del Senno L. Novel small deletions of the p53 gene in late-stage B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1994; 88: 881-885.
  14. Cordone I, Masi S, Mauro FR et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*. 1998; 91: 4342-9.
  15. Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM et al. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol*. 1997; 99: 848-57.
  16. Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1997; 89: 2015-2023.
  17. Dohner H, Fischer K, Bentz M et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995; 85:1580-9.
  18. Byrd JC, Smith L, Hackbarth ML et al. Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab. *Cancer Res*. 2003;63:36-38.
  19. 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.
  20. Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of

- 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*. 1995; 9: 2003-2008.
21. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H; German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002; 16:993-1007.
  22. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 748-753.
  23. Cuneo A, Wlodarska I, Sayed Aly M et al. Non-radioactive in situ hybridization for the detection and monitoring of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1992; 81: 192-196.
  24. Liso V, Capalbo S, Lapietra A, Pavone V, Guarini A, Specchia G. Evaluation of trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 1999; 84: 212-7.
  25. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101: 4944-4951.
  26. Cuneo A, Bigoni R, Balboni M et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leuk Lymphoma*. 1994; 15: 167-172.
  27. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1999; 13: 1331-1334.
  28. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004; 18: 476-483.
  29. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:2999-3004.
  30. Calin GA, Liu CG, Sevignani C et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 11755-11760.
  31. Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I, Bours V, Van den Berghe H, Hagemeijer A. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997; 94: 36-43.
  32. Sen F, Lai R, Albitar M. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18) and trisomy 12. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126: 1543-1546.
  33. Cuneo A, Bigoni R, Negrini M, et al. Cytogenetic and interphase cytogenetic characterization of atypical chronic lymphocytic leukemia carrying BCL1 translocation. *Cancer Res*. 1997; 57: 1144-50.
  34. Cuneo A, de Angeli C, Roberti MG, et al. Richter's syndrome in a case of atypical chronic lymphocytic leukaemia with the t(11;14)(q13;q32): role for a p53 exon 7 gene mutation. *Br J Haematol*. 1996; 92: 375-81.

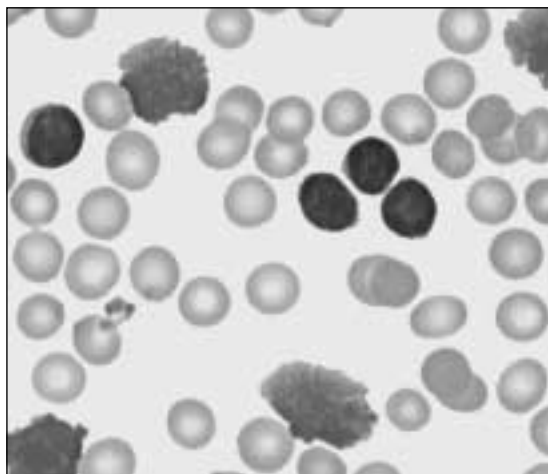
35. Neilson JR, Fegan CD, Milligan DW. Mantle cell leukaemia? *Br J Haematol.* 1996; 93: 494-495.
36. Dascalescu C, Gressin R, Callanan M, Sotto JJ, Leroux D t(11;14)(q13;q32): chronic lymphocytic leukaemia or mantle cell leukaemia? *Br J Haematol.* 1996; 95: 572-573.
37. Orchard J, Garand R, Davis Z et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood.* 2003; 101: 4975-81.
38. Juliusson G, Friberg K, Gahrton G. Consistency of chromosomal aberrations in chronic B-lymphocytic leukemia. A longitudinal cytogenetic study of 41 patients. *Cancer.* 1988; 62: 500-506.
39. Rai KR, Dohner H, Keating MJ, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: case-based session. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2001; 140-56.
40. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica.* 2002; 87: 44-51.
41. Ghiotto F, Fais F, Valetto A et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1008-1016.
42. Guipaud O, Deriano L, Salin H et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol.* 2003; 4: 505-14.
43. Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1764-75.
44. Zupo S, Isnardi L, Megna M et al. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood.* 1996; 88: 1365-1374.
45. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003; 153-175.
46. Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA et al. Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res.* 2003; 1: 346-361.
47. Gurrieri C, McGuire P, Zan H et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells can undergo somatic hypermutation and intraclonal immunoglobulin V(H)DJ(H) gene diversification. *J Exp Med.* 2002; 196: 629-639.
48. Molica S, Vacca A, Ribatti D et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100: 3344-3351.

## Eterogeneità della leucemia linfatica cronica: aspetti biologici ed implicazioni terapeutiche

*Massimo Gentile, Francesca R. Mauro, Maria Stefania de Propriis  
Anna Guarini, Robin Foà*

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia,  
Università "La Sapienza", Roma

La leucemia linfatica cronica (LLC) è in assoluto la forma di leucemia di più frequente riscontro nell'emisfero occidentale, rappresentando da sola il 30% delle leucemie dell'adulto (1). Per decenni l'atteggiamento del clinico nei confronti dei pazienti affetti da tale patologia è stato di tipo conservativo, ma tale approccio ha subito radicali cambiamenti in questi ultimi anni. Le motivazioni di questi cambiamenti sono diverse ed alcune di queste verranno discusse di seguito. Innanzitutto bisogna considerare che, sebbene la sopravvivenza mediana sia di circa 10 anni, i pazienti con LLC presentano un decorso clinico ed una prognosi estremamente variabile. Infatti, mentre per alcuni pazienti è osservabile un decorso clinico indolente ed una aspettativa di vita sovrapponibile a quella di individui sani di pari età, per altri invece il decorso clinico è aggressivo e l'aspettativa di vita molto breve. Inoltre, in passato la LLC era considerata una patologia dell'anziano, data l'età mediana alla diagnosi pari a 65 anni. Attualmente invece, considerando che si è assistito ad un allungamento dell'aspettativa di vita (persone di 65 anni hanno un'aspettativa di vita di almeno 15 anni) e che comunque il 20% dei pazienti al momento della diagnosi presenta un'età <55 anni, questa visione è radicalmente cambiata (2). Infine, grazie agli sviluppi nel campo della ricerca sono oggi disponibili per pazienti affetti da LLC approcci terapeutici incentrati su farmaci ad elevata efficacia (analoghi delle purine ed anticorpi monoclonali) e su procedure trapiantologiche, potenzialmente in grado di eradicare il clone leucemico. Tali strategie terapeutiche trovano altresì nella LLC un maggiore impiego clinico perché l'età biologica è molto migliorata e trattamenti aggressivi sono oggi utilizzabili anche per pazienti in età relativamente avanzata. Alla luce di questi cambiamenti, è facilmente intuibile come negli ultimi anni l'approccio al paziente con LLC sia cambiato, soprattutto grazie al fatto che attraverso la valutazione di alcuni aspetti clinici e parametri di laboratorio e, più recentemente, di alcune caratteristiche biologiche delle cellule neoplastiche, è possibile oggi identificare pazienti a cattiva prognosi che potrebbero avvantaggiarsi di trattamenti chemioterapici "aggressivi" o di procedure trapiantologiche anche in fase precoce di malattia.



**Figura 1** - Quadro morfologico del sangue venoso periferico di un paziente affetto da leucemia linfatica cronica

## Diagnosi

La diagnosi rappresenta un punto di fondamentale importanza per una corretta stratificazione dei pazienti affetti da LLC. Infatti, una diagnosi precisa, che si basa sulla valutazione citomorfologica ed immunofenotipica dei linfociti circolanti nel sangue periferico secondo i criteri del National Cancer Institute Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia (NCI-WG-CLL) (3), permette di escludere la presenza di altri disordini linfoproliferativi cronici leucemici. Attraverso l'esame morfologico è possibile individuare sia i piccoli linfociti di volume omogeneo, caratterizzati da scarso citoplasma e nucleo tondeggiante con cromatina addensata, che le cosiddette ombre di Gumprecht (artefatti dovuti ad elementi linfoidi che nello striscio hanno perso la loro integrità), che caratterizzano i pazienti affetti da LLC (Fig. 1). Inoltre, è possibile quantificare il numero di elementi atipici (prolinfociti, elementi linfoplasmocitoidi, grandi linfociti a citoplasma basofilo ed elementi a nucleo inciso) presenti nello striscio di sangue periferico andando a differenziare i pazienti nelle due varianti morfologiche: la forma tipica e la forma atipica. Attraverso l'analisi immunofenotipica è possibile invece valutare l'espressione di alcuni antigeni di membrana che contraddistinguono i linfociti di LLC, ovvero antigeni della linea B quali il CD19, il CD23 ed il CD20 (debolmente espresso), e della linea T come il CD5, e infine la bassa densità di espressione delle Ig di superficie e la infrequente espressione dell'FMC-7 e del CD79b, antigeni tipici di altri disordini linfoproliferativi cronici in fase leucemica (4) (Tab. 1).

## Stratificazione prognostica: dalla clinica alla biologia

Dopo un corretto inquadramento diagnostico è oggi possibile eseguire una stratificazione prognostica al fine di identificare precocemente i pazienti con LLC a cattiva prognosi e, ugualmente, quelli a prognosi favorevole. Questo obiettivo



**Tabella 1** - Immunofenotipo nelle malattie linfoproliferative croniche a cellule B (TdT-/CD19/20+).

	LLC	LPC	HCL	LSLV	LM	LF
sIg	±	+++	++	++	++	++
CD5	+	-	-	-	+	-
CD23	+	-	-/+	-	-	-/+
FMC-7	-	+	+	+	+	+
CD22	-/+	+	+	+	+	+
CD10	-	-	-	-	- (+)	+
CD79b	-	+	-/+	+	+	+

LLC: leucemia linfatica cronica

LPC: leucemia prolinfocitica cronica

HCL: leucemia a hairy cell

LSLV: linfoma splenico a linfociti villosi

LM: linfoma mantellare

LF: linfoma follicolare

ha rappresentato per molto tempo e rappresenta tuttora, per i clinici ed i biologi che si sono occupati di questa patologia, una sfida importante. Numerosi studi hanno valutato nel corso degli anni il valore prognostico di parametri clinici e di laboratorio, e, più recentemente, di diversi parametri biologici. Le stadiazioni cliniche secondo le classificazioni di Rai e Binet (5-6) rappresentano i primi esempi di stratificazione prognostica utilizzati in pazienti affetti da LLC. Queste, realizzate attraverso la correlazione tra massa tumorale all'esordio e sopravvivenza, differenziano molto bene i pazienti affetti da LLC e rimangono a tutt'oggi i parametri prognostici di maggiore utilizzo nella pratica clinica. Sebbene ci si sia ben presto resi conto che tali classificazioni presentano dei limiti, ovvero nell'ambito dei pazienti con stadio iniziale di malattia non si riesce ad identificare quel sottogruppo caratterizzato da una rapida evoluzione e da una prognosi meno favorevole. Per tale ragione, è stato successivamente valutato il valore prognostico di numerosi parametri clinici e di laboratorio (il sesso, l'età alla diagnosi, il pattern istologico dell'infiltrazione midollare, il tempo di raddoppiamento linfocitario ed il dosaggio della beta-2 microglobulina e della timidin-chinasi, ecc.) intesi ad integrare i sistemi di stadiazione clinica, incrementando il loro potere predittivo sulla prognosi. Allo stesso modo è stata valutata la correlazione di una serie di parametri biologici che caratterizzano i linfociti leucemici con la prognosi dei pazienti con LLC. Inizialmente, sono state prese in considerazione le caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche delle cellule neoplastiche. Grazie a tali caratteristiche è stato possibile dimostrare come i pazienti con morfologia atipica (presenza di una percentuale >11% di cellule atipiche) o con un profilo dell'immunofenotipo atipico (linfociti neoplastici CD5+ che presentano Ig di superficie fortemente espresse o esprimono antigeni quali il CD79b o l'FMC-7) sono caratterizzati da una malattia progressiva e da una prognosi meno favorevole. Quindi, grazie alla messa punto di metodiche citogenetiche, soprattutto attraverso l'analisi FISH con cui è possibile identificare in ~80% dei pazienti con LLC la presenza di una

alterazione citogenetica, è stato possibile valutare il valore prognostico delle diverse anomalie (7). Questo ha permesso di dimostrare come esista una precisa correlazione tra alterazioni citogenetiche e sopravvivenza; ovvero i pazienti che presentano la del(13q) o un cariotipo normale hanno una prognosi favorevole, mentre al contrario i pazienti con del(17p) o del(11q) hanno una aspettativa di vita molto breve. Inoltre, grazie ad una migliore conoscenza della biologia di questa malattia, sono stati identificati altri parametri biologici con valore predittivo sulla prognosi di questi pazienti. Nel 1999, due studi pubblicati simultaneamente hanno dimostrato come la configurazione dei geni che codificano per la regione variabile della catena pesante delle Ig (IgVH) dei linfociti leucemici sia correlata con la prognosi di tali pazienti (8-9).

Infatti, pazienti con configurazione mutata dei geni IgVH (>2% di differenze nella sequenza nucleotidica rispetto alle cellule germline) presentano una sopravvivenza significativamente superiore a quella di pazienti con configurazione germline (<2% di differenze nella sequenza nucleotidica rispetto alle cellule germline). Inoltre, da uno di questi lavori (8) è emerso come esista una stretta correlazione tra espressione del CD38 dei linfociti neoplastici e stato mutazionale, ovvero pazienti con profilo genico IgVH mutato presentano bassi livelli di espressione del CD38, al contrario dei pazienti con profilo germline in cui i livelli di espressione sono elevati. Sebbene, lavori pubblicati recentemente non abbiano confermato questa correlazione ed abbiano messo in discussione il ruolo del CD38 come surrogato dello stato mutazionale, il valore prognostico indipendente di questo parametro è stato documentato (10).

Infine, studi di espressione del profilo genico (11) hanno evidenziato come le cellule di LLC dei pazienti con profilo IgVH germline esprimano elevati livelli di ZAP-70 (una tirosin-chinasi espressa normalmente dai linfociti T e cellule NK, e coinvolta nella trasduzione del segnale del T-cell receptor). Attraverso la valutazione citofluorimetrica o immunocitochimica è stato possibile dimostrare il valore prognostico di questo parametro e la sua correlazione con la configurazione dei geni IgVH (12). Inoltre, recentemente, sono stati pubblicati alcuni studi in cui è stata valutata la possibilità di eseguire una valutazione integrata di questi parametri biologici. Tra questi, un lavoro del nostro Istituto, che riporta la caratterizzazione biologica delle cellule neoplastiche di un gruppo selezionato di 20 pazienti con LLC a decorso clinico indolente e senza necessità di terapia per un periodo di follow-up di almeno 10 anni, ha dimostrato come a tali caratteristiche cliniche si associa un profilo biologico ben definito; infatti, in questo sottogruppo di pazienti a prognosi altamente favorevole sono stati osservati una morfologia ed un immunofenotipo tipico, una bassa espressione del CD38, un profilo delle regioni variabili IgVH mutato, l'assenza di alterazioni citogenetiche sfavorevoli del(17p) e del(11q) e la presenza della del(13q), l'assenza di mutazioni per la p53 (13). Da quanto detto, è intuibile come a breve sarà possibile la realizzazione di modelli statistici integrati, che, tenendo in considerazione i sistemi di classificazione clinica, i parametri di laboratorio ed i parametri biologici, permetteranno di eseguire una corretta stratificazione dei pazienti con LLC.

## **Implicazioni terapeutiche**

Le rilevanti informazioni prognostiche che si possono ottenere attraverso una valutazione clinico-biologica e la possibilità di utilizzare farmaci più nuovi e potenzialmente più efficaci, associati anche a procedure trapiantologiche, hanno rivoluzionato l'approccio terapeutico, tendenzialmente conservativo, che per decenni è stato utilizzato dai clinici nei confronti dei pazienti con LLC, aprendo la discussione su varie tematiche. Sebbene stia diventando chiaro il concetto che per tentare di impattare sulla sopravvivenza di pazienti a cattiva prognosi sia necessario utilizzare protocolli chemioterapici più aggressivi e procedure trapiantologiche in grado di eradicare il clone leucemico, non è altrettanto chiaro se sia ancora opportuno trattare questi pazienti al momento della progressione oppure iniziare una terapia in fase precoce di malattia. E ancora, considerando che i pazienti con caratteristiche favorevoli sembrano presentare delle curve di sopravvivenza sovrapponibili a quelle di persone sane di pari età, è da chiarire se al momento della progressione l'approccio terapeutico per tali pazienti debba essere aggressivo ed altamente immunosoppressivo o di tipo conservativo. Poche sono le informazioni presenti in letteratura che ci possano permettere di rispondere in modo esaustivo a queste domande. Infatti, gli unici dati a nostra disposizione sono quelli relativi a pochi lavori che hanno correlato alcune caratteristiche biologiche e la risposta alla terapia; ovvero la scarsa risposta alla terapia osservata nei pazienti con cellule p53+ (14) e la buona risposta al rituximab che presentano i pazienti con anomalie citogenetiche favorevoli (15). Proprio per questo motivo è auspicabile che un numero sempre maggiore di pazienti con LLC venga sottoposto ad una estesa valutazione biologica al momento della diagnosi; questo approccio ci permetterà di acquisire un maggiore numero di informazioni relative alla prognosi di tali pazienti, ma soprattutto riguardo alla correlazione tra caratteristiche biologiche della cellula neoplastica e sensibilità alle diverse strategie terapeutiche. Questo è il presupposto indispensabile per poter disegnare algoritmi terapeutici "risk-adapted", i quali prendano in considerazione non solo i parametri clinici e l'età dei pazienti, ma anche le caratteristiche biologiche e la chemiosensibilità delle cellule neoplastiche.

## **Ringraziamenti**

Molti studi sulla leucemia linfatica cronica sono stati effettuati con contributi dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), Milano, Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca Scientifica (MIUR), Roma e dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma.

## **Bibliografia**

1. Catovsky D, Foa R. The Lymphoid Leukaemias. London, Butterworths, 1990.
2. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E,

- Sala R, Cerretti R, Mandelli F. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: A single institution study of 204 cases. *Blood* 1999; 94:448-454.
3. 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.
  4. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 378-382.
  5. Rai KR, Savitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
  6. Binet J-L, Lepage M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, Beral HM, Natali JC, Raphael M, Nizet B, Follezo JY. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1977; 40: 855-864.
  7. 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.
  8. 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. IgV gene status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
  9. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
  10. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99:1023-1029.
  11. 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: 4944-51.
  12. M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé 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.
  13. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propriis MS, Mancini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent dis-

- ease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003;102:1035-1041.
14. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91: 4342-4349.
  15. Byrd JC, Smith L, Hackbartg ML, Flinn IW, Young D, Proffitt JH, Heerema NA. Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to Rituximab. *Cancer Res* 2003; 63:36-38.

## Anticorpi monoclonali nella terapia della LLC-B: MabThera e MabCampath

*Marco Gobbi*

Clinica Ematologica Di.M.I., Università di Genova

L'armamentario terapeutico della leucemia linfatica cronica si è arricchito negli ultimi anni di nuovi presidi non convenzionali che vanno ad aggiungersi ai protocolli terapeutici basati sulla Fludarabina. Si tratta di due anticorpi monoclonali umanizzati Rituximab e Alemtuzumab.

Il primo Rituximab o Mabthera riconosce l'antigene CD20 espresso largamente sugli elementi di derivazione B linfocitaria in vari momenti della linea maturativi, dai blasti immaturi fino ad elementi preplasmacitici. Il meccanismo d'azione è complesso e comprende la lisi complemento mediata, la citotossicità anticorpo mediata, l'induzione dell'apoptosi. Non solo, studi più recenti hanno evidenziato effetti su molteplici strutture cellulari quali i canali del calcio e sistemi di trasduzione del segnale. Ciò conferisce capacità sinergiche con farmaci citotossici quali Doxorubicina, Cisplatino e Fludarabina; quest'ultima in particolare down-modula l'espressione dell'inibitore del complemento CD55 incrementando la suscettibilità delle cellule B alla attività del Rituximab. Infine riduce l'espressione di bcl - 2. Il Rituximab è stato utilizzato in vario modo nella terapia della LLC. Come agente singolo si è dimostrato meno attivo che nei linfomi B indolenti sia per una minore espressione della molecola CD20 sulla membrana cellulare degli elementi della LLC, sia per una aumentata espressione degli inibitori del complemento CD 59 e CD55, sia per una più rapida clearance plasmatica dovuta all'elevato numero di cellule circolanti. A questo inconveniente si è cercato di ovviare aumentando il dosaggio e la frequenza delle somministrazioni, ma il regime ottimale non è stato ancora definito. Più interessante appare la combinazione con i moderni regimi chemioterapici basati su Fludarabina. In particolare l'aggiunta di Rituximab a Fludarabina e Ciclofosfamide in pazienti non trattati ha prodotto il 95% di risposta con il 67% di risposta completa, cioè i migliori risultati mai ottenuti fin qui nella terapia della LLC: Anche nei pazienti già trattati le risposte sono state molto buone pari al 72% con il 21% di remissione completa.

Il secondo Alemtuzumab (Mabcampath) diretto contro l'antigene CD52, deriva dal vecchio Campath 1 umanizzato, e riconosce i linfociti B e T normali e le relative controparti neoplastiche. Il meccanismo d'azione si basa sulla tossicità com-

plemento mediata (CDC) e sulla citotossicità mediata da anticorpi (ADCC). Nei pazienti con LLC refrattari a Fludarabina ha mostrato una buona efficacia soprattutto a livello del sangue periferico e del midollo producendo più del 30% di risposta globale. In pazienti non pretrattati, in monoterapia il response rate sfiora il 90%.

Il gruppo milanese dell'Ospedale Niguarda ha utilizzato Alemtuzumab come terapia post remissionale contro la malattia minima residua per la preparazione all'autotrapianto. Altri gruppi hanno utilizzato l'anticorpo in associazione con Fludarabina ottenendo elevati tassi di remissione completa. Tuttavia bisogna sottolineare come l'Alemtuzumab determina una marcata T deplezione con conseguente grave immunodepressione e aumento del rischio infettivo, in particolare riattivazione del CMV. Proprio per questo motivo si è ancora alla ricerca di una collocazione razionale e dei dosaggi adatti di questo monoclonale nella strategia terapeutica della LLC per sfruttare al meglio le sue grandi potenzialità riducendo al massimo i rischi.

# **LINFOMI MALIGNI**





## Espressioni antigeniche della differenziazione linfocitaria e classificazioni dei linfomi maligni

*Umberto Magrini, Marco Lucioni, Marco Paulli*

Dipartimento di Patologia Umana ed Ereditaria, Università di Pavia, Policlinico San Matteo

L'attuale classificazione dei linfomi non-Hodgkin (LNH), frutto di un consenso internazionale (WHO, 2001), raccoglie tutte le entità identificabili con le metodiche a disposizione: morfologia, immunoistochimica, biologia molecolare, clinica. Gli eventi genetici che si realizzano in corso di differenziazione linfocitaria B (riarrangiamenti e mutazioni) costituiscono il substrato per la maggior parte delle alterazioni implicate nella linfomagenesi. Per i linfomi T e NK le conoscenze patogenetiche sono molto più limitate, sia per la bassa incidenza di queste neoplasie, sia per la incompleta conoscenza dei meccanismi di differenziazione.

Per numerosi LNH la “cellula di origine” rappresenta lo stadio di differenziazione al quale è pervenuta la cellula costituente la neoplasia, piuttosto che la cellula nella quale si è attuato l'evento trasformante iniziale che, nella maggior parte dei casi, rimane ignota. Gli antigeni di linea (pan B, pan T), gli antigeni associati ai precursori (TdT), alle cellule B “vergini” (CD5), ai centri germinativi (CD10, bcl6), alle cellule post-centro germinativo (CD38, CD138) sono alcuni degli antigeni espressi ai vari stadi di differenziazione e di attivazione, essenziali per la diagnosi e classificazione dei LNH.

Le tre categorie di LNH (B, T, NK) comprendono linfomi e leucemie/linfomi in quanto, per alcune forme, sono presenti sia la fase circolante che la fase solida, senza sostanziali differenze del profilo antigenico.

Vengono distinte, entro i LNH B e T/NK, i linfomi dei precursori, corrispondenti ai più precoci stadi di differenziazione ed i linfomi periferici, o maturi, corrispondenti a stadi di differenziazione più avanzati. Ogni entità è contraddistinta da dati epidemiologici, patogenetici, clinici e di risposta alla terapia. Un “grading” istologico non è applicabile trasversalmente alla totalità dei LNH, ma ha un significato soltanto all'interno delle singole entità.

Il “pool” di cellule normali dal quale la neoplasia deriva condiziona le caratteristiche di presentazione clinica. A titolo esemplificativo: nell'infanzia, che presenta fisiologicamente ampi “pool” di linfoblasti, prevalgono i linfomi linfoblastici, con elevato ritmo proliferativo e decorso “aggressivo”, mentre nell'anziano, in cui prevale un “pool” di elementi B post-centro germinativo, destinati a dive-

nire plasmacellule di fronte allo stimolo antigenico, è comune il mieloma, con decorso “indolente”. Anche la sede di interessamento (nodale, extranodale) sarà condizionata dalla cellule di origine. Così le neoplasie dei precursori tenderanno a diffondersi per via ematica con quadri leucemici mentre i LNH-follicolari interesseranno tutte le stazioni nodali e quelli marginali occuperanno le sedi proprie degli elementi marginali fisiologici, “in primis” la milza ed il tessuto linfoide mucosa-associato (MALT).

La classificazione WHO dei LNH ha prodotto un elevato livello di cooperazione in tutto il mondo, che porterà a periodici aggiornamenti ed a un più soddisfacente trattamento delle malattie linfoproliferative.

### **Neoplasie dei precursori B e T**

I marcatori degli stadi precoci di differenziazione (CD34, TdT), unitamente agli antigeni di linea (B, T) consentono di diagnosticare e di definire l’origine cellulare di queste neoplasie. Inoltre, citogenetica, genotipo e immunofenotipo stratificano in gruppi a basso ed alto rischio.

### **Neoplasie delle cellule B mature**

Rappresentano l’85% dei LNH. I più frequenti sono i LNH a grandi cellule B ed il LNH follicolare. Come risultante dei processi di differenziazione e dei fenomeni di ipermutazione somatica che si realizzano entro i centri germinativi, permangono identificabili tre principali forme di cellule B: cellule B “vergini” (ricircolanti e sessili), cellule B dei centri germinativi (centroblasti e centroцити), cellule B post-centro germinativo (cellule B memoria e plasmacellule a lunga vita). I LNH-B che traggono origine da questi tipi cellulari sono caratterizzati, nella loro storia naturale, non solo dall’evento trasformante ma anche dalle caratteristiche attinenti la cellula di origine.

Vengono qui di seguito riportati alcuni dati essenziali attinenti i principali istotipi.

**Linfoma a piccoli linfociti/LLC.** Le conoscenze biomolecolari in tema di LLC si sono accresciute significativamente consentendo anche nuove possibilità di trattamento. In sintesi: le forme indolenti, che non richiedono terapia, sono quelle che sono andate incontro a ipermutazioni somatiche e svolgono funzioni di B linfociti “memoria”, mentre quelle a decorso progressivo non sono andate incontro a mutazioni somatiche e sono assimilabili a cellule B “vergini”.

Le proteine ZAP-70 (citoplasmatica) e CD38 (di superficie) hanno importanti implicazioni cliniche in quanto correlano in maniera inversa con il decorso della malattia.

**Linfomi a cellule del mantello.** Sono caratterizzati da t(11;14) con espressione di ciclina D1. Ripetono le caratteristiche cellulari delle cellule del mantello follicolare: hanno infatti un “homing” mantellare in presenza di una rete lassa di cellule dendritiche, mancano di CD23 ed i geni IgV non sono mutati o minimamente mutati. L’elemento cellulare costitutivo viene equiparato al “subset” delle cellule B “vergini” sessili.

**Linfomi follicolari.** Presentano t(14;18) con espressione di bcl2 e ripetono gli aspetti genetici (mutazioni dei geni IgV, mutazioni “ongoing”), fenotipici (espressione di CD10 e bcl6) e architetturali (densa rete di cellule dendritiche) delle cellule dei centri germinativi.

**Linfoma linfo-plasmocitico.** Associato nel 50% dei casi con t(9;14) che comporta posizionamento del gene PAX-5 in contiguità ai geni delle catene pesanti. PAX-5 codifica per un fattore di trascrizione che controlla la proliferazione e differenziazione B-cellulare. Da sottolineare che ha una importanza determinante, nella diagnostica, la sede in cui si localizza la popolazione linfoide con differenziazione plasmacellulare: se nel midollo emopoietico, con ogni verisimiglianza si è di fronte a un LNH linfo-plasmocitico, spesso accompagnato da macroglobulinemia di Waldenström; se la localizzazione è gastro-intestinale, si tratta con ogni probabilità di proliferazione di LNH del MALT.

**Linfomi della zona marginale.** Associati nel 50% dei casi con t(11;18) che comporta la fusione del gene API2, che codifica per un inibitore dell'apoptosi, con il gene MLT, generando una nuova proteina di fusione con probabile effetto antiapoptotico. Sono composti da elementi assimilabili alle cellule della zona marginale sia per morfologia, sia in quanto si espandono in tale area. Esprimono IgM, in assenza di IgD, presentano mutazioni dei geni delle regioni IgV, senza mutazioni “ongoing”. Hanno, in altri termini, le caratteristiche di cellule post-centro germinativo o “memoria”. Da ricordare che, fisiologicamente, le aree marginali del follicolo sono presenti nei tessuti linfoidi mucosa associati (MALT) e nella milza e, non sono rilevabili nei linfonodi se non in particolari linfadeniti (ad esempio toxoplasmosi).

Allorchè interessano il MALT, infiltrano le strutture epiteliali della mucosa (lesioni linfo-epiteliali). La localizzazione gastrica è associata a infezione da *Helicobacter pylori*, mentre le localizzazioni salivare e tiroidea si associano a patologie autoimmuni.

Nell'ambito di questa categoria di linfomi vengono tenuti distinti i LNH-marginali del MALT da quelli splenici e da quelli nodali (rari).

I tipi splenico e nodale differiscono da quelli del MALT soprattutto per le caratteristiche cliniche di presentazione e, non ultimo, per una frequente associazione con infezione da HCV.

**Mieloma/plasmocitoma.** L'immunofenotipo è simile a quello delle plasmacellule non neoplastiche. Oltre alla espressione di CD38, CD138, Ig citoplasmatiche monoclonali, viene acquisita l'espressione di CD56 (molecola di adesione).

**Linfomi diffusi a grandi cellule B.** Presentano una elevata eterogeneità fenotipica, per cui appare difficile una precisa collocazione a un definito stadio della differenziazione B cellulare.

Le lesioni geniche sono altrettanto eterogenee. Sono frequenti varie traslocazioni alla banda 3q27, interessanti il protooncogene bcl-6, un repressore di trascrizione che svolge un ruolo chiave nella formazione dei centri germinativi. Le altera-

zioni geniche sono costituite da sostituzione del promoter di *bcl-6*, che portano a deregolazione del gene stesso, unitamente a ipermutazioni somatiche aberranti che interessano geni multipli. È curioso notare che la semplice morfologia ha individuato 30 anni fa (1974) due categorie prognosticamente distinte di linfomi diffusi a grandi cellule B (centroblasti e immunoblasti) e che l'analisi dei microarray ha "riscoperto" questi gruppi prognostici nel 2000!

**Linfoma di Burkitt.** Le forme sporadiche, endemiche, HIV associate denotano costantemente traslocazioni tra il gene *c-Myc* e uno dei loci delle Ig. L'espressione di CD10, la negatività di *bcl2* e l'alto indice di proliferazione ( $Ki67 > 99\%$ ) sono i criteri immunofenotipici diagnostici.

Le acquisizioni in tema di *linfomi T* sono ancora limitate. Vale la pena comunque di ricordare tra i LNH-T almeno *i linfomi a grandi cellule anaplastiche*. Sono neoplasie caratterizzate dalla espressione, da parte di grandi cellule anaplastiche, simili alle cellule di Reed-Sternberg, dell'antigene CD30.

Alcune forme presentano la  $t(2;5)$  che condiziona la fusione del gene della nucleofosmina (NPM) con il gene *ALK*, con formazione di un trascritto chimerico che codifica per una proteina ibrida (p80). La proteina p80, istochimicamente dimostrabile, non espressa nei T-linfociti normali, è espressa negli elementi neoplastici ed esplica una attività tirosino-chinasica che gioca un ruolo nella progressione linfomatosa. L'identificazione della traslocazione e l'espressione di p80 costituiscono un fattore prognostico favorevole.

### **Bibliografia essenziale**

1. WHO Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Jaffe E.S. et al. Ed., IARC Press, Lyon, 2001.
2. Harris N.L. et al. New approaches to lymphomas diagnosis. *Hematology* 2001, 194-220.
3. Cavalli F. et al. MALT lymphomas. *Hematology* 2001, 241-258.
4. Keating M.J. et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 2003, 153-175.

## Patogenesi molecolare dei linfomi maligni

*Gianluca Gaidano, Davide Rossi, Silvia Franceschetti, Annarita Conconi*

U.D.A. Ematologia, Dipartimento di Scienze Mediche & IRCAD,  
Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Novara

La patogenesi molecolare dei linfomi è un processo multifasico che coinvolge *i*) lesioni molecolari di proto-oncogeni e geni onco-soppressori; *ii*) infezione virale del clone neoplastico; *iii*) stimolazione cronica da parte dell'antigene. Nell'ambito delle lesioni molecolari di proto-oncogeni, il meccanismo di attivazione per traslocazione cromosomica è particolarmente frequente nei linfomi non-Hodgkin. La caratteristica costante delle traslocazioni cromosomiche studiate finora è rappresentata dall'alterazione nella struttura o nella regolazione di un proto-oncogene. Due sono i meccanismi di base attraverso cui una traslocazione può agire nel contesto dei linfomi. Da un lato, la traslocazione cromosomica può allontanare il proto-oncogene dalle sue proprie normali strutture regolatorie, e posizionarlo sotto nuovi elementi di controllo. Come conseguenza, il proto-oncogene può essere espresso in tessuti nei quali normalmente è assente (deregolazione eterotopica), o, nel caso sia espresso già nel tessuto normale da cui il linfoma deriva, può essere sottratto ai fini meccanismi di controllo che lo regolano in condizioni fisiologiche (deregolazione omotopica). Un secondo meccanismo attraverso cui una traslocazione può agire è rappresentato dalla formazione di un trascritto di fusione, derivante dalla fusione di due geni localizzati nei due punti di rottura dei cromosomi coinvolti nella traslocazione. I proto-oncogeni attivati attraverso la formazione di trascritti di fusione, come esemplificato dalla traslocazione t(11;18) dei linfomi MALT, generano proteine chimeriche che mostrano nuove proprietà biochimiche, distinte da quelle delle proteine normali prodotte dal proto-oncogene. Le traslocazioni dei linfomi non-Hodgkin a cellule B hanno costituito il modello per l'approccio molecolare al clonaggio delle traslocazioni dei tumori umani. Storicamente, infatti, il clonaggio delle traslocazioni coinvolgenti il proto-oncogene *c-MYC* e i geni delle immunoglobuline ha fornito una strategia molecolare largamente applicata negli ultimi due decenni al clonaggio di altre traslocazioni. Il motivo dominante comune delle traslocazioni dei linfomi non-Hodgkin a cellule B è costituito dalla deregolazione trascrizionale del proto-oncogene coinvolto. Tale deregolazione è conseguente alla giustapposizione del proto-oncogene a sequenze regolatorie derivate dai geni delle immunoglobuline o da altri loci espressi costituzionalmente nei linfociti B maturi normali.

L'inattivazione bi-allelica di geni onco-soppressori nei linfomi avviene più comunemente per mutazione inattivante di un allele e delezione dell'altro allele. In casi più rari, l'inattivazione bi-allelica è raggiunta per doppia mutazione su entrambe gli alleli o per delezione omozigote del gene. Un ulteriore meccanismo di inattivazione dei geni onco-soppressori è rappresentato dalla metilazione delle regioni regolatorie del gene, con conseguente ridotta espressione dello stesso. A differenza di mutazione e delezione, che rappresentano meccanismi genetici di inattivazione, l'inattivazione per metilazione è un evento di tipo epigenetico.

Una caratteristica comune ai virus oncogeni attualmente conosciuti nei linfomi è la infezione persistente e di lunga durata dell'ospite, che costituisce la condizione necessaria alla trasformazione neoplastica. I virus oncogeni, infatti, applicano multiple strategie per sfuggire al sistema immunitario dell'ospite. Ad esempio, EBV genera una infezione latente in cui, grazie alla espressione di pochi geni virali, riesce a rendersi "invisibile" al sistema immunitario dell'ospite e inoltre è in grado di "downregolare" le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I delle cellule infettate. Nonostante queste strategie, un ospite immunocompetente è in grado di montare una risposta immunitaria precoce contro le cellule trasformate dai virus oncogeni e riesce quindi a prevenire lo sviluppo del tumore. Nell'ospite immunocompromesso, al contrario, le cellule trasformate dal virus riescono ad evadere l'immunosorveglianza. Infatti, gli individui infettati dal virus della immunodeficienza umana (HIV), o sottoposti a immunosoppressione iatrogenica in seguito a trapianto, sono a rischio per lo sviluppo di linfomi correlati ad EBV. Nell'ambito dei linfomi associati a infezione virale, con alcune eccezioni, l'infezione virale è condizione necessaria, ma non sufficiente allo sviluppo del linfoma. I virus, infatti, non si comportano come un cancerogeno completo, ma hanno una azione iniziante o promuovente la linfomagenesi. È quindi necessaria la deregolazione di altre vie, tramite lesioni genetiche addizionali all'azione del virus, affinché una cellula diventi completamente trasformata. In pratica, solo una frazione di individui infettati da virus oncogeni sviluppa un tumore ed il periodo di latenza fra infezione e trasformazione neoplastica nei soggetti immunocompetenti è spesso lungo. I virus oncogeni associati a linfoma contribuiscono alla trasformazione neoplastica tramite meccanismi diretti ed indiretti. I virus che portano uno o più oncogeni con capacità trasformanti agiscono con meccanismo diretto e includono, ad esempio, EBV e HHV-8. Altri virus (HIV, HCV), invece, promuovono la trasformazione neoplastica indirettamente grazie alla stimolazione cronica del sistema immunitario o tramite modificazioni del microambiente cellulare.

### ***Linfomi follicolari***

I linfomi follicolari sono caratterizzati da attivazione di *BCL-2* nel 90 % dei casi. A differenza della maggior parte dei proto-oncogeni, *BCL-2* non regola direttamente la proliferazione cellulare, bensì è preposto al controllo della morte cellulare programmata (apoptosi). Evidenze sperimentali hanno dimostrato che *BCL-2* è in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule di molti tessuti in assenza di divisione mitotica. Per esempio, nel tessuto linfoide, *BCL-2* mantiene le cel-

lule B memoria e le plasmacellule secernenti. L'attivazione del gene *BCL-2* nei linfomi follicolari avviene tramite la traslocazione t(14;18)(q32;q21). La traslocazione fonde il gene *BCL-2* nella sua regione non tradotta 3' terminale con sequenze del locus delle immunoglobuline. Ne consegue la deregolazione trascrizionale di *BCL-2*, che è così espresso ad alti livelli. L'iperespressione di *BCL-2* così ottenuta protegge la cellula neoplastica dall'apoptosi. Studi sperimentali nell'animale transgenico hanno dimostrato che l'attivazione di *BCL-2* provoca una iperplasia diffusa delle cellule B, con caratteristiche istologiche simili a quelle osservate in corso di linfoma follicolare. Similmente alla malattia umana, alcuni animali sviluppano nel tempo un disordine linfoproliferativo a cellule B più aggressivo in seguito all'accumulo di lesioni genetiche addizionali in una cellula che contiene una copia di *BCL-2* attivato. Una frazione di linfomi follicolari progredisce a linfoma diffuso a grandi cellule: questa trasformazione clinico-istologica si accompagna a mutazione di *p53* nel 90 % dei casi, oltre a inattivazione dei geni onco-soppressori *p15* e *p16*, ipermutazione somatica aberrante di molteplici proto-oncogeni, e, più raramente, attivazione di *c-MYC*.

### ***Linfoma diffuso a grandi cellule B***

Traslocazioni cromosomiche coinvolgenti la banda 3q27 e svariati siti cromosomici, inclusi i siti delle immunoglobuline, rappresentano una alterazione frequente nei linfomi diffusi a grandi cellule B. Il proto-oncogene coinvolto, definito *BCL-6*, appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali contenenti i domini "zinc finger" ed è espresso selettivamente dalle cellule B del centro germinativo. Modelli animali hanno dimostrato che *BCL-6* è indispensabile per la normale formazione e funzione del centro germinativo. Il meccanismo di attivazione in corso di traslocazione è rappresentato dalla rottura del gene nella sua porzione 5', cui consegue la sostituzione del promotore endogeno di *BCL-6* con un promotore eterologo derivato dal cromosoma partner. L'effetto funzionale della traslocazione è costituito dalla espressione costitutiva di una proteina *BCL-6* intatta. Dato che la differenziazione da cellule del centro germinativo a plasmacellule si accompagna normalmente a "down-regolazione" di *BCL-6*, è verosimile che l'espressione costitutiva del proto-oncogene a seguito di traslocazione cromosomica "congeli" le B cellule allo stadio di centrociti/centroblasti e non ne permetta la ulteriore maturazione. L'analisi molecolare di *BCL-6* ha definito che questo gene è coinvolto in circa il 40 % dei linfomi diffusi a grandi cellule B, e rappresenta un marcatore specifico di questa patologia. Oltre al riarrangiamento cromosomico, le alterazioni molecolari di *BCL-6* includono anche le mutazioni in prossimità delle regioni regolatorie del gene, in corrispondenza della regione che va incontro a riarrangiamento. A differenza dei riarrangiamenti di *BCL-6*, che sono selettivamente associati ai linfomi diffusi a grandi cellule, le mutazioni di *BCL-6* si riscontrano in tutti i tipi di linfomi derivanti da cellule del centro germinativo, tra cui anche il linfoma follicolare ed il linfoma di Burkitt. Infatti, nella fisiologica maturazione delle cellule B, le mutazioni di *BCL-6* rappresentano un marcatore molecolare di transito delle cellule B attraverso il centro germinativo.



### ***Linfoma mantellare***

La traslocazione t(11;14) associata al linfoma mantellare attiva il proto-oncogene ciclina D1 (anche noto come *BCL-1*), un fattore di controllo del ciclo cellulare. Poichè la traslocazione si associa selettivamente al linfoma mantellare nello spettro dei linfomi non-Hodgkin, essa rappresenta un utile marcatore diagnostico per la diagnosi differenziale di questo linfoma. È oggi comunemente riconosciuto che il reperto di attivazione di ciclina D1 in una biopsia di linfoma a cellule B è il criterio più accurato per la diagnosi di linfoma mantellare, il cui riconoscimento su semplice base istologica è spesso difficile.

### ***Linfoma di Burkitt***

Traslocazioni di *c-MYC* sono presenti nel 100 % dei linfomi di Burkitt. L'oncogene *c-MYC*, sul cromosoma 8q24, può essere coinvolto in traslocazioni che lo giustappongono ad un locus delle immunoglobuline sul cromosoma 2 (catena leggera **k**), 14 (catene pesanti), o 22 (catena leggera **I**). Nella traslocazione più frequente, t(8;14)(q24;q32), i punti di rottura sono localizzati 5' e centromerici rispetto a *c-MYC*, mentre sul cromosoma 14 la rottura avviene a livello del locus IgH. Nelle t(2;8) e t(8;22), complessivamente più rare, un locus delle catene leggere delle immunoglobuline è traslocato 3' e telomericamente rispetto a *c-MYC*, che rimane sul cromosoma 8. I siti di rottura sul cromosoma 8 sono eterogenei rispetto a *c-MYC* e possono avvenire nel primo esone o introne, immediatamente 5' al promotore di *c-MYC*, oppure ad una distanza indefinita (> 300 Kb) 5' rispetto a *c-MYC*. Inoltre, sul cromosoma 14, possono essere coinvolte sia la regione joining sia la regione switch dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline. Oltre al riarrangiamento per traslocazione, tutti gli alleli *c-MYC* traslocati sono anche affetti da mutazioni puntiformi nella regione regolatoria del gene e, frequentemente, anche da mutazioni in corrispondenza del punto di legame fra *c-MYC* e *p107*, una proteina che normalmente inibisce l'attività trascrizionale di *c-MYC*. Nel complesso, l'attivazione di *c-MYC* in corso di traslocazione sembra essere dovuta a:

- a) prossimità di nuovi elementi regolatori di tipo enhancer derivati dal gene immunoglobulinico adiacente;
- b) alterazione strutturale delle regioni regolatorie del gene;
- c) perdita della sensibilità alla regolazione negativa esercitata da *p107*.

L'attività trasformante di *c-MYC* è stata convalidata dalle capacità dell'oncogene attivato di trasformare cellule B normali in coltura e di causare l'insorgenza di linfomi nell'animale transgenico. Il proto-oncogene *c-MYC* condivide con gli altri fattori trascrizionali le seguenti proprietà fondamentali di questo gruppo di geni:

1. si localizzano a livello nucleare (da qui la dizione comune di proto-oncogeni nucleari);
2. sono in grado di legare specifiche sequenze di DNA;
3. regolano l'attività e l'espressione di altri geni.

L'espressione dei fattori trascrizionali è sottoposta ad uno stretto meccanismo di regolazione e subisce precise modificazioni a seconda delle fasi del ciclo cellulare. Il legame al DNA avviene attraverso specifici domini funzionali. La funzione generale dei fattori trascrizionali è di ricevere segnali che giungono dal citoplasma al nucleo e di convogliare tali segnali direttamente al DNA, promuovendo e/o sopprimendo l'espressione di altri geni cellulari. Il linfoma di Burkitt, oltre alla attivazione di *c-MYC* per traslocazione cromosomica, presenta nel 30 % dei casi, mutazioni di *p53*. Inoltre, i casi di linfoma di Burkitt endemici (insorti in Africa Equatoriale, Papua, Nuova Guinea) presentano consistentemente l'infezione del tumore da parte del virus di Epstein-Barr; questa, invece, è presente solo nel 30 % dei linfomi di Burkitt sporadici insorti in Europa o negli Stati Uniti.

### ***Linfomi T***

Nell'ambito dei linfomi T, la *t(2;5)* si associa elettivamente ai linfomi non-Hodgkin T a grandi cellule anaplastiche. *t(2;5)* provoca la formazione di un trascritto di fusione fra i geni *NPM* e *ALK*. Il gene *NPM* codifica per una proteina nucleolare, mentre *ALK* codifica per una tirosina chinasi normalmente non espressa nelle cellule T. La leucemia prolinfocitica T si associa a inattivazione somatica del gene *ATM*. Questo reperto implica il coinvolgimento di *ATM* non solo in sindromi neoplastiche ereditarie, ma anche nei tumori sporadici.

### ***Impatto clinico delle conoscenze patogenetiche dei linfomi***

In campo diagnostico, i marcatori molecolari possono complementare e raffinare i criteri classificativi dell'istologia tradizionale, portando all'identificazione di specifici tipi nosologici in base alla assenza/presenza di una determinata lesione genetica. Un esempio molto significativo è rappresentato dal caso dell'attivazione della ciclina D1 nelle sindromi linfoproliferative. Storicamente, i primi studi avevano rilevato la presenza di attivazione di ciclina D1 in una bassa percentuale di numerose sindromi linfoproliferative, tra cui la leucemia linfatica cronica e i linfomi a cellule B. Successivamente, si riconobbe che tutti i casi di sindrome linfoproliferativa con attivazione di ciclina D1 presentavano delle caratteristiche fenotipiche e cliniche comuni e consistenti con la derivazione istologica dalle cellule del mantello del centro germinativo. Inoltre, i marcatori molecolari rappresentano lo strumento di elezione per l'analisi della malattia residua minima, grazie alla loro altissima sensibilità. La sensibilità delle lesioni molecolari si basa sul fatto che molte di esse sono rilevabili a mezzo della PCR. Questa tecnica permette di rilevare una lesione genetica presente in una cellula su un milione. È oggi anche possibile una analisi quantitativa in PCR, che permette di definire con una certa approssimazione la proporzione di cellule neoplastiche residue in una determinata biopsia. Infine, i marcatori molecolari derivati dalle conoscenze patogenetiche dei linfomi possono essere utilizzati come marcatori di prognosi di queste neoplasie.

## Impatto clinico della diagnosi molecolare dei linfomi non-Hodgkin

*Emanuela Carlotti, Alessandro Rambaldi*

Divisione di Ematologia, Ospedali Riuniti, Bergamo

L'alterazione citogenetica più frequentemente riscontrata nei linfomi follicolari è la traslocazione t(14;18) (q32;q21), identificabile nel 75-80% dei casi. In seguito a questo riarrangiamento l'oncogene *bcl-2*, localizzato nella regione 18q21, viene traslocato sul cromosoma 14 e posto sotto il controllo della sequenza regolatrice del gene della catena pesante delle Immunoglobuline (IgH) che porta ad un aumento dell'espressione della proteina antiapoptotica BCL2. La t(14;18) può essere identificata mediante la tecnica di Polymerase Chain Reaction (PCR), una metodica rapida e sensibile che permette di monitorare la malattia residua minima nei pazienti con linfoma follicolare.

Gribben et al. (1) sono stati i primi a descrivere che i pazienti con linfoma follicolare che dopo trapianto autologo non presentano evidenza molecolare di cellule neoplastiche *Bcl-2*/IgH+ hanno una prognosi migliore rispetto ai pazienti positivi. Altri studi effettuati anche nell'ambito di terapie convenzionali hanno confermato che la scomparsa, dopo terapia, delle cellule *Bcl-2*/IgH+ si associano ad una prognosi migliore (2, 3).

Nell'ambito di uno studio multicentrico nazionale, abbiamo studiato l'efficacia della chemioterapia CHOP e dell'anticorpo monoclonale (mAb) Rituximab nell'indurre remissione molecolare in 128 pazienti con diagnosi di linfoma follicolare<sup>4</sup>. Tutti questi pazienti sono stati sottoposti a 6 cicli di chemioterapia CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone) e quelli che al termine del trattamento chemioterapico avevano raggiunto una remissione clinica ma erano rimasti molecolarmente positivi per il riarrangiamento *bcl-2*/IgH sono stati ulteriormente trattati con Rituximab (4 infusioni una volta alla settimana). Un totale di 77 pazienti ha ricevuto la somministrazione dell'anticorpo monoclonale e sono stati poi monitorati molecolarmente tramite PCR. Al primo controllo eseguito a 12 settimane dal termine della somministrazione del Rituximab il 59% dei pazienti aveva raggiunto una negativizzazione molecolare. A 28 settimane il 74% era negativo mentre a 44 settimane il 63%. Tutti quei pazienti che hanno mantenuto uno stato di negatività molecolare nel tempo avevano un migliore intervallo libero da ricorrenza di malattia rispetto a quelli che erano rimasti positivi o che

erano ricaduti molecolarmente durante il follow-up (57% vs 20% a 3 anni,  $p < 0.001$ ).

L'evidenza che i pazienti che hanno raggiunto una remissione molecolare raggiungano un risultato clinico che nel tempo si dimostra più favorevole suggerisce che il raggiungimento di una remissione molecolare è un obiettivo che dovrebbe essere perseguito con la terapia. Tuttavia la definizione di remissione molecolare dipende molto dal tipo e dalla sensibilità della tecnica utilizzata per l'indagine molecolare. La nested PCR può arrivare a rilevare una cellula positiva in  $10^6$  cellule normali, ma i risultati di questa metodica variano molto tra i diversi laboratori a seconda del tipo di campione biologico analizzato (midollo, sangue periferico o linfonodo) e dalla qualità dei reagenti utilizzati. Più di recente l'introduzione della PCR quantitativa (RQ-PCR), un sistema che mediante l'impiego di primers e di una sonda oligonucleotidica specifici permette di quantificare il numero di cellule con la t(14;18) presenti in un campione, ha permesso di determinare il numero di cellule positive presenti all'interno di una campione con una sensibilità riproducibile massima pari a  $10^5$ . L'analisi effettuata mediante RQ-PCR di 86 dei 128 pazienti arruolati nello studio precedente ci ha permesso di verificare come alla diagnosi, esista una grande eterogeneità per quanto riguarda la quantità di malattia presente (numero di cellule positive per il riarrangiamento *Bcl-2/IgH* presenti nei campioni sia di midollo che di sangue periferico) (5). Lo studio ha infatti dimostrato che vi sono pazienti con una infiltrazione midollare di malattia molto elevata (una cellula linfomatosa ogni 10 cellule normali) e pazienti che al contrario presentano un minimo interessamento midollare o ematico (una cellula positiva ogni 100.000 cellule normali). Questa eterogeneità sembra essere responsabile anche del diverso tipo di risposta osservato dopo trattamento. Infatti, dopo chemioterapia convenzionale CHOP nei pazienti che avevano livelli di infiltrazione midollare elevata (più di una cellula neoplastica ogni 100 cellule normali) si osserva in genere una riduzione mediana di 2 logaritmi, ma non una scomparsa della malattia misurabile molecolarmente. La successiva somministrazione di Rituximab aggiunge una riduzione ulteriore di 2 logaritmi del numero di cellule positive per *Bcl-2* fino ad ottenere la sua scomparsa nel 70% dei pazienti trattati. L'analisi multivariata ha evidenziato come un basso livello di cellule *Bcl-2/IgH+* (inferiori a 1 cellula su 1000 cellule normali) risulta essere il miglior predittore di risposta clinica e molecolare sia dopo trattamento con CHOP che dopo la successiva somministrazione di Rituximab. A 5 anni dalla fine della terapia l'event free survival dei pazienti con un livello di cellule *Bcl-2/IgH+* inferiore a 1 cellula su 100 è risultato essere del 59% rispetto al 32% di quelli che avevano un livello elevato ( $p \leq 0.02$ ). Inoltre la probabilità di ricaduta dei pazienti che avevano raggiunto una risposta molecolare, indipendentemente se dopo solo chemioterapia CHOP o dopo trattamento sequenziale con CHOP e Rituximab è risultata essere del 64% rispetto al 32% registrato nei pazienti che non si sono mai negativizzati molecolarmente ( $p < 0.006$ ).

In conclusione, questo nuovo studio conferma il ruolo e l'importanza del monitoraggio molecolare che fin dalla diagnosi fornisce informazioni rilevanti a riguardo della scelta dei trattamenti e successivamente sulla loro efficacia.

Restano tuttavia ancora aperti alcuni punti di discussione a proposito del significato della ricomparsa di un clone *Bcl-2/IgH+* (devono essere trattati quei pazienti che raggiungono una remissione clinica ma rimangono positivi molecolarmente? Bisogna ulteriormente trattare quelli che hanno una ricaduta molecolare ma rimangono in remissione clinica?) che solo nuovi studi prospettici randomizzati potranno risolvere.

### **Bibliografia essenziale**

1. Gribben J, et al. *Blood* 1993; 12: 3449-7.
2. Johnson PW, et al. *J Clin Oncol* 1994; 12: 798-805.
3. Colombat P, et al. *Blood* 2001; 97: 101-6.
4. Rambaldi A, et al. *Blood* 2002; 99: 856-2.
5. Rambaldi A, et al. Submitted to *Blood*.

## **Anticorpi monoclonali nella terapia dei linfomi non-Hodgkin**

*Francesco Lauria, Francesco Forconi*

Università degli Studi di Siena, Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sezione di Ematologia e Trapianti

Nella maggior parte dei Linfomi non-Hodgkin (LNH), la chemioterapia e la radioterapia convenzionali non sono in grado di determinarne la guarigione e, anche nei casi in cui si ottiene una risposta terapeutica, la malattia spesso ricade. L'aggiunta di trattamenti immunologici all'armamentario terapeutico sta offrendo sempre più importanti benefici su questo tipo di neoplasie. Tra i trattamenti immunologici che stanno ritrovando sempre più ampia applicazione clinica è l'immunoterapia passiva con anticorpi monoclonali (AcMo) diretti contro antigeni tumorali.

Come per qualsiasi strategia immunologica, il problema della terapia con AcMo è quello di identificare un antigene tumorale appropriato. L'antigene bersaglio ideale deve:

1. essere espresso sulla superficie solo delle cellule tumorali (tumore-specifico),
2. deve trasmettere segnali importanti per la funzione della cellula tumorale,
3. non deve essere liberato o secreto dalla cellula tumorale o modulato o internalizzato.

L'idiotipo dell'immunoglobulina tumorale è sempre stato considerato il candidato teoricamente più vicino a questi requisiti e i primi studi più di 30 anni fa a Stanford con anticorpi anti-idiotipo nei linfomi follicolari risultarono capaci di determinare riduzione o regressione delle masse tumorali. Tuttavia l'applicazione clinica di questo approccio si dimostrò difficile perchè

- a) l'antigene idiotipico è paziente specifico, rendendo la produzione degli anticorpi anti-idiotipo dispendiosa sia in termini economici che di tempo,
- b) perchè l'idiotipo tumorale dei linfomi va spesso incontro a variabilità intracellulare, determinando variazione degli epitopi bersaglio e perdita di riconoscimento anticorpale.

Nell'ultimo decennio sono stati identificati altri antigeni tumorali nei LNH, primo fra tutti il CD20, ma anche il CD52, il CD22, l'HLA-DR, il CD80, o il VEGF. Gli AcMo anti-CD20 e anti-CD52 sono quelli che hanno ritrovato mag-

gior riscontro clinico. Questi AcMo sono limitati dal fatto che non sono tumore-specifici, aumentando i rischi di effetti collaterali sulle popolazioni cellulari normali, ma hanno il vantaggio di essere uguali tra ciascun linfoma e quindi poter essere pronti per il loro utilizzo già al momento della diagnosi di LNH.

## **Rituximab**

Il CD20 è espresso nel 95% dei LNH a cellule B. Tra gli AcMo anti-CD20, sono in commercio forme non coniugate come il Rituximab (AcMo chimerico con Fc umano IgG1 e regione variabile murina anti-CD20 umano), e forme radioconiugate con Iodio-131 (Tositumomab) o con Itrio-90 (Ibritumomab).

Il meccanismo di azione del Rituximab è stato largamente studiato *in vitro* ed è stato osservato come sia in grado di indurre lisi cellulare complemento-mediata (CDCC), citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) e apoptosi cellulare. Recentemente è stato proposto che questo AcMo abbia anche una potenziale attività "vaccinale".<sup>1</sup> Secondo questo meccanismo, peptidi derivati dalla lisi delle cellule linfomatose, indotta dal farmaco, sono catturati da cellule dendritiche che maturano a cellule presentanti l'antigene e generano linfociti T citotossici specifici mediante cross-presentazione. Tuttavia il reale meccanismo *in vivo* del rituximab rimane da dimostrare.

Il Rituximab è ormai ampiamente utilizzato per la sua alta attività e per il profilo di tossicità favorevole. Viene impiegato indifferentemente sia nei LNH a basso grado che ad alto grado di malignità sia in fase di induzione che di mantenimento e infine un ruolo favorevole del Rituximab è stato evidenziato anche in corso di (auto)trapianto di cellule staminali emopoietiche. La maggior parte degli effetti collaterali si verificano durante la prima infusione e consistono principalmente in febbre e brivido e, occasionalmente, ipotensione.

### ***Rituximab nell'induzione dei linfomi indolenti.***

L'efficacia del Rituximab fu inizialmente dimostrata proprio nei linfomi follicolari ricaduti o refrattari alla chemioterapia. Fu osservato che la somministrazione del solo AcMo alla dose di 375 mg/m<sup>2</sup> infusione endovenosa settimanale per 4 settimane, determinava una risposta in circa il 50% dei pazienti e che il 6% otteneva una risposta completa (2). Tuttavia, la risposta non aumentava incrementando il dosaggio, né il numero di somministrazioni né la intensità di dose (3). La risposta poteva aumentare se il farmaco era somministrato in prima linea ma non si osservavano benefici sulla durata di risposta (4). Successivamente veniva osservato prima *in vitro* e poi *in vivo* che Rituximab sinergizzava con i chemioterapici contro linee tumorali di linfoma (5), mentre in clinica numerosi studi randomizzati dimostravano la superiorità dell'associazione Rituximab-chemioterapia rispetto alla chemioterapia da sola nei linfomi indolenti (3). In uno studio del German low-grade lymphoma study group (GLGLS) (Dreyling, ASH 2003), sono stati valutati 65 pazienti randomizzati tra FCM e R-FCM. È stato visto che l'associazione con Rituximab induce una percentuale di risposte significativa-

mente superiore alla chemioterapia da sola. Sempre il GLGLS ha valutato 394 pazienti randomizzati tra CHOP e Rituximab-CHOP, osservando risposte simili (93 vs 97%) ma una sopravvivenza libera da eventi e una sopravvivenza globale superiore nel braccio R-CHOP (6). Markus et al. hanno valutato 322 pazienti con linfoma follicolare che hanno ricevuto CVP da solo o in associazione con Rituximab ed hanno osservato che le risposte erano significativamente superiori nell'associazione (81% risposte globali, 40% risposte complete) piuttosto che nel braccio senza AcMo (57% e 10%). Inoltre, i pazienti del braccio R-CVP avevano un tempo di fallimento dal trattamento e un tempo di progressione più lungo dei pazienti del braccio con chemioterapia solamente (7).

### ***Rituximab nel mantenimento dei linfomi indolenti.***

È ancora non completamente chiarito se il Rituximab è utile per il mantenimento dei linfomi a basso grado per ridurre il tempo di progressione di malattia. Hainsworth et al. hanno trattato 62 pazienti con linfoma follicolare o a basso grado con 4 somministrazioni settimanali di Rituximab, seguito da altre 4 somministrazioni ogni 6 mesi per 2 anni (4). In questo studio il tempo di progressione della malattia era più lungo di quanto atteso. In uno studio di Ghielmini et al., 128 pazienti pre-trattati e 58 pazienti naive sono stati trattati con Rituximab per 4 cicli e quindi randomizzati a mantenimento con Rituximab ogni 2 mesi per 8 mesi vs osservazione (8). In questo studio, il tempo di progressione era significativamente più lungo nei pazienti in mantenimento, anche se questo beneficio era principalmente ristretto ai pazienti precedentemente non trattati.

Tuttavia la confusione sul significato vero del Rituximab come mantenimento nei linfomi indolenti sta nel fatto che 40% dei pazienti responsivi che ricadono dopo almeno 6 mesi rispondono nuovamente con una durata di risposta simile alla prima (9). Pertanto non è ovvio se è preferibile eseguire un mantenimento o trattare il paziente nuovamente solo in caso di progressione. Nel tentativo di rispondere a questo quesito, Hainsworth et al. hanno randomizzato pazienti trattati con 4 cicli di Rituximab a nuovo trattamento alla ricaduta o mantenimento, osservando che i tempi per un nuovo trattamento era simile nei 2 gruppi (10). È in corso uno studio ECOG finalizzato a chiarire se il mantenimento abbia nessun beneficio sul nuovo trattamento alla ricaduta.

### ***Rituximab nei linfomi aggressivi.***

Rituximab in associazione a CHOP è ormai consacrato come trattamento di scelta per l'induzione nel linfoma B diffuso a grandi cellule (LBDGC). Infatti uno studio GELA del 2002 dimostrò che l'associazione R-CHOP in pazienti tra 60 e 80 anni era superiore a CHOP solamente in termini di risposte complete, sopravvivenza libera da eventi e sopravvivenza globale (11). Questi dati sono stati confermati in uno studio intergruppo ECOG-CALGB-SWOG di 632 pazienti anziani con LBDGC (12). Questo studio ha anche dimostrato che l'eventuale mantenimento con l'AcMo non era necessario nel braccio R-CHOP, mentre migliorava la



sopravvivenza nel braccio che aveva ricevuto una induzione con CHOP da solo, ottenendo sopravvivenze simili al braccio indotto con R-CHOP.

### ***Rituximab nel TMO***

Il Rituximab è in corso di valutazione anche nell'induzione e nella terapia adiuvante al trapianto di midollo osseo autologo (ABMT). In uno studio eseguito al Memorial Sloan Kettering Cancer Center, è stato valutato il ruolo del Rituximab in aggiunta all'ICE come seconda induzione seguita da ABMT in pazienti con LBDGC refrattari o ricaduti.<sup>13</sup> Il tasso di risposte complete risultava significativamente superiore rispetto a un gruppo storico indotto con ICE solamente (53% vs 27%), senza significative differenze in termini di tossicità o numero di cellule CD34 raccolte. Dopo autotrapianto, la sopravvivenza libera da progressione sembrava significativamente superiore rispetto al gruppo storico tratto con ICE (54% vs 43% a 2 anni).

Numerosi altri studi hanno valutato il ruolo del Rituximab dopo ABMT. (13) In uno studio di fase II, sono stati valutati 29 pazienti con LNH aggressivo sottoposti a ABMT e successivamente a 4 infusioni settimanali dell'AcMo alla dose di 375 mg/m<sup>2</sup> dal giorno +42 e dal giorno +180 post-ABMT. In questi pazienti la sopravvivenza libera da eventi era pari all'83% mentre la sopravvivenza globale era 88%. Si osservava neutropenia grado 3-4 in circa il 50% dei pazienti. È in corso uno studio di fase 3 da parte dello US Intergroup che mira a valutare l'efficacia del rituximab dopo ABMT (14).

### **AcMo radioconiugati**

Nonostante i risultati incoraggianti con il Rituximab, i pazienti inevitabilmente ricadono e diventano resistenti anche all'AcMo. I radioconiugati anti-CD20 offrono una possibilità di superare questo problema. I radioconiugati hanno il vantaggio di aggiungere ai vari meccanismi di azione di un AcMo non coniugato quello di uccidere non solo le cellule che l'AcMo lega, ma anche il tessuto tumorale circostante per effetto delle radiazioni emesse dall'isotopo legato e di aver pertanto una maggior efficacia terapeutica. Tuttavia sono difficili da impiegare nella comune pratica clinica perché richiedono strutture adeguate per la manipolazione del radiofarmaco.

*Ibritumomab-Y90* è un  $\beta$ -emittente e pertanto la biodistribuzione è difficile da visualizzare e la sua somministrazione richiede 7-8 giorni di preparazione. La successiva singola somministrazione del farmaco (0.4 mCi/kg) è in grado di determinare risposte del 74% (15% risposte complete) nei linfomi refrattari al Rituximab (15). In uno studio in cui 143 LNH refrattari al Rituximab sono stati randomizzati per Ibritumomab o Rituximab, le risposte erano superiori con il radioconiugato (80% vs 56%), anche se poi non si sono osservate differenze nel tempo di progressione di malattia (16).

*Tositumomab-I131* è un  $\beta$  e  $\gamma$ -emittente e può essere effettuata una dosimetria per

somministrare il radioconjugato a un dosaggio paziente-specifico ma anch'esso richiede circa una settimana di preparazione. In uno studio multicentrico di 60 pazienti pretrattati, si osservava un tasso di risposte del 65% (81% nei LNH follicolari) e la durata di risposta era significativamente superiore che dopo l'ultima chemioterapia.<sup>17</sup> Similmente si hanno risposte nel 65% dei pazienti resistenti al Rituximab. Nei pazienti non pretrattati le risposte sono state ancora superiori (97% risposte globali, 63% risposte complete).<sup>18</sup> Sono in corso degli studi SWOG-CALGB di fase III che valutano R-CHOP (18) vs CHOP seguito da Tositumomab-I131.

I maggiori effetti collaterali dei radioimmunoconjugati sono la mielodepressione secondaria al trattamento e il rischio di sviluppo di sindromi mielodisplastiche o leucemie acute, che si aggira intorno al 1.5% con Ibritumomab e al 6% con Tositumomab.

### Altri AcMo

Altri AcMo impiegati a livello clinico nel trattamento dei linfomi sono alemtuzumab (anti-CD52), epratuzumab (anti-CD22), apolizumab (anti-HLA-DR), e galiximab (anti-CD80) ma nessuno di questi ha dato risposte superiori al Rituximab (3). Tra questi, *alemtuzumab*, che determina una risposta in solo il 14% dei linfomi B, sta assumendo un ruolo molto importante nel trattamento delle leucemie linfatiche croniche ad alto rischio e nella terapia dei linfomi T. Nelle leucemie linfatiche croniche sembra molto utile nelle forme ad alto rischio resistenti alla fludarabina, in particolare nelle forme con mutazioni di p53, dove è in grado di determinare una risposta in almeno il 40% dei casi (19). Il ruolo dell'alemtuzumab nei linfomi T è stato valutato principalmente in uno studio di fase II di 22 pazienti con micosi fungoide/sindrome di Sezary (MF/SS) (20). La risposta globale a alemtuzumab era del 55%, con 32% remissioni complete. Tuttavia, alemtuzumab è accompagnato da mielodepressione severa e alto rischio di infezioni o riattivazione del CMV. Tali effetti immunosoppressori sono però anche alla base dei vari studi che stanno sperimentando alemtuzumab nel condizionamento ai trapianti di cellule staminali allogenici.

### Bibliografia

1. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004; 104: 2635-2642.
2. MacLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Brukler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2825-2833.
3. Cheson BD. What is new in lymphoma? *CA Cancer J Clin*. 2004; 54: 260-272.

4. Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA, 3rd, Scullin DC, Jr., Corso SW, Yardley DA, Morrissey L, Greco FA. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 4261-4267.
5. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol.* 2001; 114: 800-809.
6. Hiddemann W, Dreyling M, Forstpointner R, al. e. Combined immuno-chemotherapy (R-CHOP) significantly improves time to treatment failure in first line therapy of follicular lymphoma- results of a prospective randomized trial of the German low-grade lymphoma study group. *Blood.* 2003; 102.
7. Markus R, Imrie K, Belch A, al. e. An international multi-center, randomized, open-label phase III trial comparing rituximab added to CVP chemotherapy to CVP alone in untreated stage II/IV follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 2003; 102.
8. Ghielmini M, Schmitz S-F, Cogliatti S, al. e. Prolonged treatment with rituximab significantly improves event free survival and duration of response in patients with follicular lymphoma: a randomized SAKK trial. *Blood.* 2002; 100: 161a.
9. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, Maloney DG, Weaver RL, Rosenberg J, Levy R. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 3135-3143.
10. Hainsworth JD, Litchy S, Greco FA. scheduled rituximab maintenance therapy versus rituximab retreatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma responding to single agent rituximab: a randomized trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Blood.* 2003; 102: 231.
11. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 235-242.
12. Habermann TM, Weller EA, Morrisson VA, al. e. Phase III trial of rituximab-CHOP (R-CHOP) vs. CHOP with a second randomization to maintenance rituximab (MR) or observation in patients 60 years of age or older with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003; 102.
13. Kewalramani T, Zelenetz AD, Nimer SD, Portlock C, Straus D, Noy A, O'Connor O, Filippa DA, Teruya-Feldstein J, Gencarelli A, Qin J, Waxman A, Yahalom J, Moskowitz CH. Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2004; 103: 3684-3688.
14. Horwitz SM, Negrin RS, Blume KG, Breslin S, Stuart MJ, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Wong RM, Shizuru JA, Horning SJ. Rituximab

- as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004; 103:777-783
15. Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, Emmanouilides C, Czuczman MS, Saleh MN, Cripe L, Wiseman G, Olejnik T, Multani PS, White CA. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 3262-3269.
  16. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman G, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Multani PS, White CA. Randomized controlled trial of itrium-90 labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2453-2463.
  17. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, Lister TA, Stagg RJ, Tidmarsh GF, Kroll S, Wahl RL, Knox SJ, Vose JM. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3918-3928.
  18. Kaminski MS, Tuck M, Regan D, et al. High response rate and durable remissions in patients with previously untreated, advanced-stage follicular lymphoma treated with tositumomab and iodine I-131 tositumomab (Bexxar). *Blood*. 2002; 100: 356a.
  19. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, Moran M, Lucas M, Lin T, Hackbarth ML, Proffitt JH, Lucas D, Grever MR, Byrd JC. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 2004; 103: 3278-3281.
  20. Lundin J, Hagberg H, Repp R, Cavallin-Stahl E, Freden S, Juliusson G, Rosenblad E, Tjonnfjord G, Wiklund T, Osterborg A. Phase 2 study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood*. 2003; 101: 4267-4272.

## Anti-idiotypic vaccination for hematological malignancies

*Roberto M. Lemoli*

Institute of Hematology and Medical Oncology "L. & A. Seràgnoli", University of Bologna

We previously showed that positively selected peripheral blood CD14<sup>+</sup> monocytes from multiple myeloma (MM) patients can be induced to differentiate into fully functional, mature, CD83<sup>+</sup> dendritic cells (DC) highly efficient in priming autologous T lymphocytes in response to the patient-specific tumor idiotype (Id). We have recently scaled up our manufacturing protocol for application in a phase I-II clinical trial of anti-Id vaccination with DC in MM patients. Circulating monocytes were labeled with clinical grade anti-CD14 microbeads and positively selected with the CliniMACS instrument. Cells were then grown, according to Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, in FCS-free medium in cell culture bags, and differentiated to DC with GM-CSF plus IL-4 followed by either TNF- $\alpha$  or a cocktail of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and prostaglandin-E<sub>2</sub>. Before maturation, Mo-DC were pulsed with the autologous Id as whole protein or Id-derived peptides. Thirteen MM patients, who had been treated with two courses of high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support, entered in the clinical study. CD14<sup>+</sup> monocytes were enriched from 16.1 $\pm$ 5.7% to 95.5 $\pm$ 3.2% (recovery 67.9 $\pm$ 15 %, viability >97%). After cell culture, phenotypic analysis showed that 89.6 $\pm$ 6.6% of the cells were DC. We obtained 2.89 $\pm$ 1  $\times$ 10<sup>8</sup> DC/leukapheresis which represented 24.5 $\pm$ 9% of the initial number of CD14<sup>+</sup> cells. Notably, the cytokine cocktail induced a significantly higher percentage and yield (31 $\pm$ 10.9 of initial CD14<sup>+</sup> cells) of DC than TNF- $\alpha$  alone, secretion of larger amounts of IL-12, potent stimulatory activity on allogeneic and autologous T cells. Storage in liquid nitrogen did not modify the phenotype or functional characteristics of pre-loaded DC. The recovery of thawed, viable DC, was 78 $\pm$ 10%. Ten patients received a series of by-monthly immunizations consisting of three subcutaneous and two intravenous injections of Id-keyhole limpet hemocyanin (KLH)-pulsed DC (5 $\times$ -, 10 $\times$ -, 50 $\times$ 10<sup>6</sup> cells and 10 $\times$ -, 50 $\times$ 10<sup>6</sup> cells, respectively). The patient-specific Id was used as whole protein in 4 patients whereas 6 additional patients had their DC charged with Id (VDJ)-derived HLA class I restricted peptides. The administration of Id-pulsed DC was well tolerated without clinically significant side effects. So far, 6 patients have been fully evaluated for their

immunological response to DC vaccination. Six out of 6 patients developed a humoral and T-cell proliferative response to KLH. Moreover, 5/6 showed circulating IFN-g-secreting T cells by Elispot. None of the patients mounted a B-cell response to Id whereas 6/6 developed a Id-specific T-cell proliferative response and 4/6 IFN-g-secreting T cells. Delayed-type hypersensitivity (DTH) tests showed 6/8 and 2/8 patients responsive to KLH and tumor Id, respectively. With a median follow up of 16 months, 6/10 patients have stable disease, 1 patient is in molecular CR and 3 patients progressed. In summary, positive selection of circulating CD14<sup>+</sup> monocytes allows the generation of mature and functional DC suitable for clinical trials and cryopreservation does not affect the phenotype and function of pre-loaded DC. Injections of cryopreserved Id-pulsed DC are safe and induce T-cell tumor-specific responses. Based on these results, a DC-based phase II trial of anti-Id vaccination with VDJ-derived HLA class I restricted peptides and KLH has been recently opened.



# **MIELOMA MULTIPLO**





## **Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): long-range experience at Mayo Clinic**

*Robert A. Kyle*

Mayo Medical School, Division of Hematology, Rochester, USA

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is characterized by the presence of a serum M-protein < 30 g/dL, fewer than 10% plasma cells in the bone marrow, none or a small amount of M-protein in the urine, and absence of lytic lesions, anemia, hypercalcemia, or renal insufficiency related to the plasma cell proliferative process. MGUS has been reported in approximately 3% of persons older than 70 years.

We performed a population based epidemiologic study to determine the prevalence of MGUS among residents of Olmsted County Minnesota aged 50 years and older as of January 1, 1995. Serum samples were collected from 76% of the 28,063 enumerated residents of Olmsted County  $\geq$  50 years of age. The prevalence increased with advancing age with a prevalence almost 4 fold higher in persons  $\geq$  80 years of age compared to those age 50-59 years. The prevalence remained constant throughout the collection period, suggesting that patients who frequently seek medical care are at no greater risk for MGUS than the apparent healthier population who do not seek medical care regularly. The size of the M-protein ranged from unmeasurable to 30 g/L. The median size of the M-protein was 5 g/L. We concluded that MGUS was one of the most common premalignant disorders in the general population aged 50 years and older. Compared to earlier studies, the prevalence of MGUS is significantly more than previously recognized; 3 fold higher in patients  $\geq$  50 years of age and approximately twice that previously reported in persons  $\geq$  70 years of age.

In an effort to determine the outcome of patients with MGUS, we reviewed the medical records of all patients with a monoclonal gammopathy who were evaluated at Mayo Clinic from 1956 - 1970. Patients with multiple myeloma (MM), Waldenström's macroglobulinemia (WM), primary systemic Amyloidosis (AL), lymphoma or related disorders were excluded. These 241 patients were followed for 3,579 person years (median, 13.7 years; range, 0-39 years). Only 14 (6%) were alive and had no substantial increase in M-protein during a median follow-up of 33 years. Twenty-five additional patients (10%) had a serum M-protein value of 30 g/L or greater but did not require chemotherapy for MM, WM, or AL. One hun-

dred thirty-eight patients (57%) died without evidence of symptomatic MM, WM, AL or a related disorder. Sixty-four patients (27%) developed a malignant plasma cell proliferative disorder during follow-up. The actuarial rate of disease development was 17% at 10 years, 34% at 20 years, and 39% at 25 years, which is approximately 1.5% per year. Forty-four (69%) of the 64 patients with progression had MM. The interval from diagnosis MGUS to the development of a malignant plasma cell proliferative process was 10.4 years (median 1 - 32 years).

In an effort to confirm the findings of the 241 patients from the United States and foreign countries, we followed a group of 1,384 MGUS patients from the 11 counties of Southeastern Minnesota evaluated at Mayo Clinic from 1960 to 1994. A reduction of uninvolved (normal or background) immunoglobulins was found in 38% of 840 patients who were evaluated, while 31% of the 418 who had immunofixation of urine had a monoclonal light chain. Bone marrow contained 0 - 10% plasma cells (median - 3%).

The 1,384 patients were followed-up for a total of 11,900 person years (median - 15.4 years). During follow-up MM, WM, AL, lymphoma or chronic lymphocytic leukemia developed in 115 patients (8%). The cumulative probability of progression to one of these disorders was 10% at 10 years, 21% at 20 years and 26% at 30 years (1% per year). Patients were at risk of progression even after 25 years or more of stable MGUS. An additional 32 patients had an increase in M-protein to more than 30 g/L, or a percentage of plasma cells increasing to > 10% but symptomatic MM or WM did not develop.

The number of patients with progression to a plasma cell disorder (115 patients) was 7.3 x the number expected. The risk of MM developing was increased 25 fold, WM 46 fold and AL 8.4 fold. Seventy-five (65%) of the 115 patients progressed to MM. In 32%, the diagnosis of MM was made more than 10 years after the M-protein was recognized, while 5 patients were diagnosed after 20 years of follow-up. At the time of recognition of MGUS, one cannot distinguish a patient whose condition will remain stable from one in whom progression to a plasma cell malignancy will develop. In this series of 1,384 patients the size of the M-protein at diagnosis was the most important predictor of progression to a plasma cell disorder. Risk of progression with a serum M-protein value of 15g/L was almost 2 fold greater than the risk of progression with an M-protein value of 5g/L and the risk of progression with 25 g/L was 4.6 x that of a value of 5 g/L. Patients with an IgM or an IgA M-protein had an increased risk of progression compared with patients who had an IgG protein ( $p = 0.001$ ). A novel highly sensitive serum free light chain (FLC) assay has recently been introduced. We evaluated 47 patients with MGUS and documented progression to myeloma or a related malignancy and compared them to 50 age and gender matched patients with MGUS and no evidence of progression after 5 years of follow-up. The presence of an abnormal kappa/lambda FLC ratio was associated with a higher risk of progression (relative risk 2.5). This increased risk of progression has recently been confirmed in a large cohort study of 1,148 patients with MGUS.

Despite the results of laboratory tests, one must follow the patient, the serum protein electrophoreses, and clinical evaluation as long as the patient lives.

## Meccanismi molecolari nella patogenesi del mieloma multiplo e dell'amiloidosi AL

*Giampaolo Merlini*

Centro per le Amiloidosi Sistemiche, Laboratori di Biotecnologie, IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi di Pavia

Il mieloma multiplo (MM) e l'amiloidosi causata da catene leggere immunoglobuliniche monoclonali (AL) hanno in comune la presenza di un clone plasmacellulare midollare.

Il mieloma multiplo è una neoplasia delle cellule B differenziate in modo terminale (plasmacellule) caratterizzata da traslocazioni cromosomiche che frequentemente pongono oncogeni sotto il controllo degli "enhancers" immunoglobulinici e da un'intensa interazione con il microambiente midollare (1). Sulla scorta di numerose evidenze sperimentali è stato proposto un modello per la patogenesi molecolare del mieloma multiplo. In base al contenuto in cromosomi si possono definire due percorsi patogenetici, che probabilmente si sovrappongono. Circa la metà dei tumori sono non iperdiploidi, con elevata incidenza di traslocazioni reciproche coinvolgenti la regione delle catene pesanti immunoglobuliniche (IgH) e 5 partners ricorrenti [11q13 (cyclina D1), 6p21 (cyclina D3), 4p16 (FGFR3 e MMSET) 16q23 (c-maf) e 20q11 (mafB)], insieme ad una relativa elevata incidenza di delezione del cromosoma 13/13q14. L'altra metà dei mielomi è invece iperdiploide, associata a trisomie multiple dei cromosomi dispari (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21), ma con scarsa incidenza sia di delezione del cromosoma 13/13q14 che di traslocazioni IgH ricorrenti. La deregolazione dei geni della cyclina D (D1, D2 e D3) sembra essere un evento pressoché universale delle prime fasi della patogenesi del mieloma, comportando una profonda alterazione della via del gene oncorepressore retinoblastoma (Rb). La deregolazione delle cycline D può essere provocata dalla traslocazione cromosomica primaria, o da meccanismi molecolari ancora non definiti (come accade nei mielomi iperdiploidi che hanno coinvolgimento prevalente della cyclina D1 e, meno frequentemente, della D2). La deregolazione di uno dei 3 geni delle cycline può rendere le cellule più suscettibili a stimoli proliferativi derivanti dalle interazioni con il microambiente midollare che produce l'IL-6 e altre citochine, il tutto esita nella espansione selettiva di un clone plasmacellulare. Anomalie cariotipiche comprendenti traslocazioni IgH, trisomie 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21 e monosomie del cromosoma 13 o delezioni 13q14 sono frequentemente presenti anche in soggetti con gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) (3). Sebbene la deregolazione dei geni della cyclina D sembra svolgere

un ruolo primario nelle fasi iniziali della patogenesi, ci sono evidenze che la via del gene del Rb possa essere ulteriormente alterata dalla metilazione ed inattivazione di p16INK4a in una importante frazione di MGUS e MM. La progressione tumorale si associa con traslocazioni cromosomiche secondarie rappresentate in modo paradigmatico dalle traslocazioni di c-myc. Mutazioni reciprocamente esclusive di *K-* o *N-Ras* sono rare o assenti nei casi di MGUS, mentre mutazioni in *Ras* sono presenti nel 30-40% dei MM iniziali, e mutazioni di FGFR3 si osservano nei MM avanzati. Al contrario della "pathway" del Rb, il coinvolgimento di p53 (mutazioni e/o delezioni) si osserva nelle fasi molto avanzate della malattia. Ulteriore danno della via Rb per inattivazione di p18INK4c può essere raramente osservata nelle fasi tardive del MM. Recentemente è stata proposta una classificazione del MM basata sul tipo di traslocazione e di ciclina espressa (classificazione TC) che presenta una buona correlazione con la prognosi e la risposta alla terapia (4). I MM del sottotipo TC1 (18%, caratterizzati da ottima risposta alla chemioterapia sovramassimale) esprimono elevati livelli di ciclina D1 o D3 come risultato di una traslocazione IgH [t(6;14), t(11;14)]; i MM TC2 (37%, di solito iperdiploidi) esprimono bassi o moderati livelli di ciclina D1 nonostante l'assenza di traslocazione t(11;14); i MM del gruppo TC3 (22%) non rientrano in alcuno degli altri gruppi ed esprimono preferenzialmente la ciclina D2, ma alcuni esprimono bassi livelli anche di D1 o D3. I MM TC4 (16%) esprimono alti livelli di ciclina D2, e anche di MMSET e FGFR3 come risultato della traslocazione t(4;14); mentre i MM TC5 (7%) esprimono i più alti livelli di ciclina D2 in aggiunta ad elevati livelli di c-maf o mafB, a dimostrazione che entrambi i fattori trascrizionali maf sono in grado di promuovere la deregolazione di questa ciclina. In considerazione del ruolo fondamentale delle cicline nella patogenesi del MM, numerosi approcci terapeutici si sono focalizzati su queste molecole.

Le cellule mielomatose interagiscono intensamente con le cellule stromali e con la matrice extracellulare del microambiente midollare. L'adesione delle cellule mielomatose alle proteine della matrice extracellulare conferisce la cosiddetta "cell adhesion-mediated drug resistance" ed il legame delle cellule mielomatose alle cellule stromali midollari induce la trascrizione e la secrezione di citochine [IL-6 e "insulin-like growth factor 1" (IGF-1)] o del "vascular endothelial growth factor" (VEGF) da parte delle cellule stromali, che non solo promuovono la crescita, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule mielomatose ma conferiscono resistenza alla chemioterapia convenzionale. Le molecole di adesione CD44, VLA-4, VLA-5, LFA-1, CD56, CD54, syndecan-1 e MPC-1 mediano l' "homing" delle cellule mielomatose nel midollo osseo. Successivamente, le cellule tumorali si legano alle proteine della matrice extracellulare ed alle cellule stromali midollari. Questo legame non solo determina la localizzazione delle cellule mielomatose al microambiente midollare, ma ha anche importanti implicazioni funzionali e cliniche. Ad esempio il syndecan-1 regola la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, e sue elevate concentrazioni sieriche correlano con elevata massa tumorale, ridotta attività della metalloproteinasi-9, e prognosi severa. Inoltre l'adesione delle cellule mielomatose al collagene, via syndecan-1, induce la sintesi della metalloproteinasi-1, promuovendo il riassorbimento osseo e l'in-

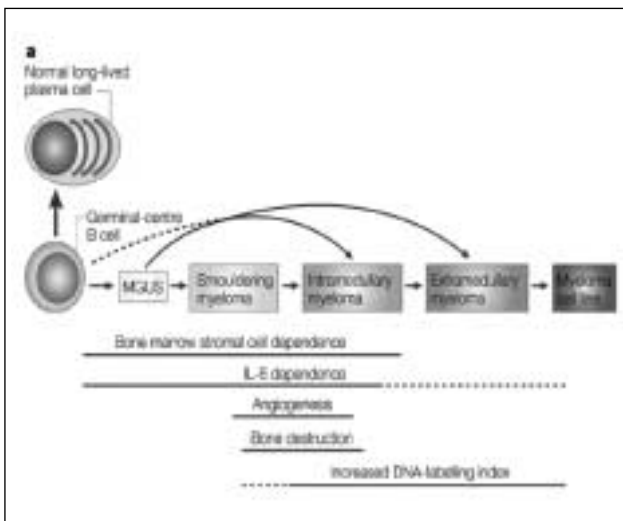
vasione tumorale. Poiché le molecole di adesione giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi del MM, si stanno sviluppando e testando in modelli animali strategie terapeutiche che hanno come bersaglio queste molecole.

L'IL-6, prodotta principalmente dalle cellule stromali midollari, attiva una serie di vie intracellulari che mediano la crescita delle cellule mielomatose, la loro sopravvivenza e chemioresistenza. Analogamente, l'IGF-1 induce proliferazione, sopravvivenza e chemioresistenza attraverso varie vie di trasduzione del segnale. Il VEGF è prodotto sia dalle cellule mielomatose che dalle cellule stromali ed è responsabile, almeno in parte, dell'aumentata angiogenesi nei pazienti con mieloma multiplo. Sia le plasmacellule mielomatose che le cellule mononucleari midollari sintetizzano il TNF $\alpha$  la cui concentrazione sierica appare più elevata nei pazienti con malattia ossea. Il ligando del CD40, un membro della famiglia del TNF $\alpha$ , modula la crescita delle cellule mielomatose sia direttamente che indirettamente attraverso le sue interazioni con il microambiente midollare.

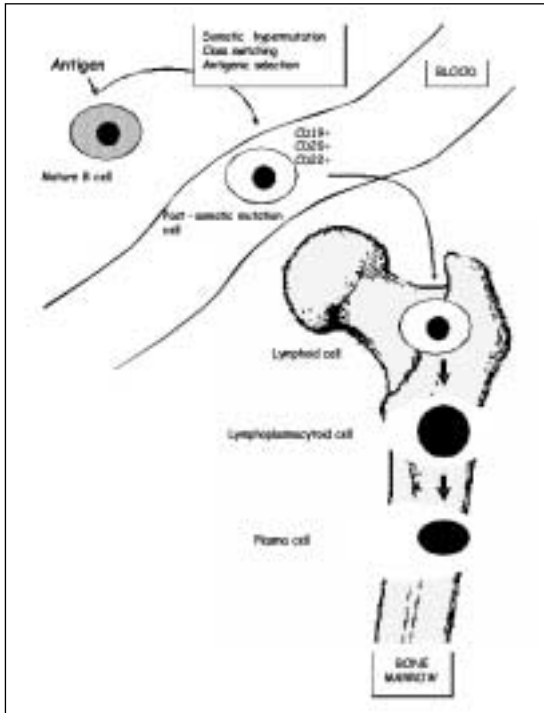
La Figura 1 riassume le fasi dello sviluppo del mieloma multiplo.

Gli studi sui meccanismi molecolari nella patogenesi del MM e sul ruolo del microambiente midollare hanno fornito le basi per l'identificazione e validazione di nuove terapie mirate al superamento della chemioresistenza ed al miglioramento della sopravvivenza. In futuro la definizione del profilo genetico e proteomico consentirà di disegnare terapie molecolari specifiche per il singolo paziente con l'obiettivo di ottimizzare la terapia al minor costo di tossicità.

L'amiloidosi AL è caratterizzata da un clone con le caratteristiche biologiche intermedie fra quelle della MGUS e quelle del MM (5). Nostri studi basati sull'utilizzo di anticorpi anti-idiotipo monoclonali hanno dimostrato che il clone amiloidogenico è composto non solo da plasmacellule mature, ma anche da cellule più immature linfoplasmocitoidi midollari e da linfociti B maturi circolanti. Questi ultimi possono essere indotti *in vitro* a differenziarsi a plasmacellule iden-



**Figura 1** - (da Kuehl & Bergsagel, Nat Rev Cancer 2002;2:175-187) Stadi del mieloma multiplo. Il MM origina da una cellula B che ha incontrato l'antigene. Circa il 30-50% dei mielomi origina da una MGUS e non sempre attraverso una fase di mieloma indolente (smoldering). Inizialmente il MM è circoscritto al midollo, ma nelle fasi avanzate della malattia può acquisire la capacità di crescere in regioni extramidollari, come nel fluido pleurico o nella cute. La transizione da MGUS a MM si manifesta con un aumento delle plasmacellule clonali in foci multipli midollari e con lesioni osteolitiche.



**Figura 2** - Dopo l'incontro con l'antigene specifico, probabilmente in modo T-dipendente, il linfocito B maturo va incontro a ipermutazioni somatiche e "switching" di classe. Le cellule B con migliorate capacità leganti l'antigene (cellule postmutazioni somatiche) sono selezionate per mezzo dei recettori immunoglobulinici di superficie. Una proporzione di queste cellule alla fine va incontro a differenziazione nel midollo osseo fino a plasmacellula attraverso tappe intermedie di cellula linfoide e linfoplasmacitoide. Uno schema generale è proposto sulla scorta degli esperimenti *in vitro* nei quali i linfociti B circolanti idiotipo-positivi sono stati indotti a differenziarsi per mezzo di IL-3 e IL-6 in plasmacellule del tutto simili a quelle midollari.

tiche a quelle midollari e sintetizzanti la immunoglobulina amiloidogenica. È stato pertanto proposto che le cellule B mature circolanti riforniscano il compartimento midollare, come illustrato in Figura 2. Cellule clonali circolanti sono state inoltre rilevate con PCR clone-specifica. Il clone amiloidogenico ha una cinetica minima, ma misurabile, con solo una piccola parte di cellule nella fase S del ciclo cellulare e, come atteso anche in base allo schema della Figura 1, la malattia è caratterizzata da assenza di evoluzione verso forme aggressive. È possibile, ma non dimostrato, che le plasmacellule amiloidogeniche si accumulino nel midollo a causa di una inibizione del meccanismo di apoptosi.

Anche nel clone amiloidogenico sono state documentate numerose anomalie cromosomiche per mezzo di tecnica FISH eseguita su cellule clonali identificate con anticorpi anti-catena leggera. La perdita di un cromosoma 18 è stata documentata nel 72% dei casi (6), e traslocazioni coinvolgenti il locus IgH nel 75% dei casi. Fra i possibili partners, la traslocazione  $t(11;14)(q13;q32)$ , che coinvolge il locus della ciclina D1, è stata osservata nel 55% dei casi (7), mentre la PCR inversa ha identificato trascritti ibridi della traslocazione  $t(4;14)(p16.3;q32)$  in circa il 14% dei campioni analizzati (8). Inoltre, uno studio con tecnica FISH condotto su plasmacellule isolate ha documentato la delezione di 13q14 in circa il 30% dei casi. Anche se i dati disponibili sono limitati, sembra che le anomalie cromosomiche e la deregolazione di oncogeni tipiche del MM siano presenti anche nell'amiloidosi AL.

Il quadro clinico nell'amiloidosi AL è dominato dai danni d'organo causati dalla aggregazione delle catene leggere in fibrille amiloidi. I meccanismi molecolari

che sono alla base della polimerizzazione delle proteine amiloidogeniche sono stati recentemente elucidati (9). L'importanza della struttura primaria del dominio variabile della catena leggera (VL) è indicata da numerose osservazioni: l'inusuale preponderanza di catene leggere lambda rispetto alle kappa; la pressoché costante associazione fra catene leggere lambda della famiglia lambda VI ed amiloidosi, e la aumentata rappresentazione di catene leggere lambda derivate dal gene germline *3r* fra quelle amiloidogeniche (10). L'instabilità strutturale di VL è considerato il fattore principale alla base della amiloidogenicità. Il processo di aggregazione viene favorito dalle condizioni del microambiente (pH, soluti, temperatura) e dalla interazione con costituenti della matrice extracellulare. Anche se attualmente l'approccio terapeutico più efficace si basa sulla riduzione o eliminazione del clone amiloidogenico per mezzo di chemioterapia, la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della formazione dei depositi di amiloide in organi bersaglio sta aprendo nuove strategie terapeutiche (11).

### Bibliografia essenziale

1. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple mieloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 175-187.
2. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple mieloma. *Oncogene* 2001; 20: 5611-22.
3. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-24
4. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104: 607-18.
5. Perfetti V, Vignarelli MC, Casarini S, Ascari E, Merlini G. Biological features of the clone involved in primary amyloidosis (AL). *Leukemia*. 2001; 15: 195-202.
6. Fonseca, R. Ahmann GJ, Jalal SM, et al. Chromosomal abnormalities in systemic amyloidosis. *Br. J. Haematol.* 1998; 103: 704-10.
7. Hayman, SR, Bailey RJ, Jalal SM, et al. Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2001; 98: 2266-8.
8. Perfetti V, Coluccia AM, Intini D, et al. Translocation t(4;14)(p16.3;q32) is a recurrent genetic lesion in primary amyloidosis. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1599-603.
9. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med.* 2003; 349:583-96.
10. Perfetti V, Casarini S, Palladini G, et al. Analysis of V $\lambda$ -J $\lambda$  expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies *3r* (?III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood.* 2002; 100: 948-53.
12. Merlini G, Westermarck P. The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies. *J Intern Med.* 2004; 255: 159-78.



## Genetic heterogeneity in multiple myeloma

*Hervé Havet-Loiseau*

University Hospital, Nantes, France

Multiple myeloma (MM) is characterized by the accumulation of malignant plasma cells (PC) within the bone marrow. Clinically, patients with MM usually present bone pain related to lytic bone lesions, frequent anaemia, and less often, renal impairment. Despite improvements in the clinical management of patients in the past decade, especially with the use of high dose therapy in the youngest patients, the disease remains ultimately fatal. However, this uniform evolution hides a tremendous heterogeneity, with patients inescapably evolving in a few weeks, while others may enjoy a more than 10-year survival. This prognostic heterogeneity is reminiscent from other haematological malignancies, like acute leukaemias, in which cytogenetics has been shown to directly drive evolution and survival. The idea was that genetics may define the natural history of tumours in general, but that this theory has been only demonstrated in some haematopoietic tumours, especially because of intrinsic characteristics (like easier cell availability, higher proliferation, or simpler oncogenesis).

Compared to acute leukaemias, very few large cytogenetic series have been reported (1-5). Analysis of these series showed that karyotypes in MM are mostly normal. These data contrasted with other reports showing that DNA index or interphase fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) experiments were abnormal in more than 80% of the patients (6-10). These discrepancies reflect the low proliferative index of PC. The median labelling index in MM is lower than 1%, (11) so much lower than that of remaining normal bone marrow myeloid cells. Thus, because the bone marrow is usually only partially infiltrated by malignant PC, normal myeloid cells display a proliferative advantage, leading to an apparently normal karyotype in 60% to 70% of the patients with MM. This technical pitfall lead some investigators to use other techniques, not based on proliferation, such as interphase FISH, to get insight MM oncogenesis (9, 10, 12, 14). However, this strategy presupposes to identify recurrent chromosomal abnormalities and to generate probes specific for these karyotypic changes.

### Analysis of the cytogenetic literature

An extensive analysis of the cytogenetic literature revealed several recurrent cytogenetic abnormalities. The first finding was that informative (abnormal)

karyotypes are usually highly complex, with two main subgroups: one represented by the gain of several chromosomes, defining hyperdiploidy, and a second subgroup characterized by pseudo-, hypo- or tetraploidy (gathered as non-hyperdiploid cases), with the accumulation of many structural chromosomal changes. Interestingly, hyperdiploidy (observed in about a half of the patients with abnormal karyotypes) was characterized by the gain of non-random chromosomes, especially odd chromosomes (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 and 21). Hyperdiploid karyotypes present usually few structural changes. On the other hand, some chromosomes are frequently lost, and especially chromosome 13 (in about half of the patients with an informative karyotype). Among the many structural abnormalities observed in the karyotypes, the most frequent are those involving the long arm of chromosome 1 (50%, not specific of MM), and the 14q32 chromosomal region (~ 30%). This low number of recurrent abnormalities opened the door to possible interphase FISH analyses using probes specific for these chromosomal changes.

### **14q32 abnormalities**

The 14q32 chromosomal region is rearranged in several B-cell lymphomas, usually with specific chromosomal partners (for review, see (15)). These translocations are almost constant, and are considered as primary events in the lymphomagenesis. In contrast, in MM they appeared to be much less frequent, until Bergsagel and colleagues reported that illegitimate rearrangements involving the gene encoding the Ig heavy chain (*IGH*), located at 14q32, were observed in almost 100% of human myeloma cell lines (HMCL) (16). Moreover, they showed that most of these rearrangements involved switch sequences, raising the hypothesis of errors occurring during the switch process. These data prompted some authors to develop FISH probes specific for the *IGH* gene, enabling to look for illegitimate *IGH* rearrangements directly on interphase PC (12-17). The analysis of large cohorts of patients showed that cytogenetics largely underestimated the incidence of 14q32 abnormalities: 60% to 70% of patients with MM presented an illegitimate *IGH* recombination (12-17). However, in contrast to B-cell lymphomas, these chromosomal changes were not constant. The analysis of patients at relapse did not show a higher incidence, demonstrating that they were not secondary changes acquired during evolution (17). On the other hand, they were observed with a similar incidence in monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS), clearly showing that these genetic rearrangements were not sufficient for oncogenesis (18).

The analysis of a large number of HMCL revealed that 3 main 14q32 translocations were observed, each accounting for about 25% of the 14q32 rearrangements: t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) and t(14;16)(q23;q32). Cloning of some of these translocations showed that t(11;14) involved the *CCND1* gene on chromosome 11, leading to overexpression of cyclin D1 (similarly to mantle cell lymphomas) (19). The role of cyclin D1 overexpression in the oncogenesis is not clear, since these MM do not present a higher proliferation than those lacking

cyclin D1 activation (20). Of note, PC bearing the t(11;14) present a peculiar lymphoplasmacytic morphology, reminiscent to mature PC (20, 21).

Translocation t(14;16) involved the *c-maf* oncogene on chromosome 16, deregulating the expression of the *c-maf* protein (22). *C-maf* is a transcription factor that control the expression of genes like *CCND2*, *integrin-β7*, or *CCR1* (23). Its deregulation may lead to disturbances in the control of cell cycle, apoptosis, or cell-cell interactions. The situation appeared more complex for the t(4;14). The translocation deregulated two genes on chromosome 4: *FGFR3*, and a novel gene, *MMSET* (*Multiple Myeloma SET* domain) (24). Whereas *FGFR3* is translocated on the der(14) and overexpressed, most of the *MMSET* exons remain on the der(4), leading to its abnormal expression in PC bearing the translocation. Two reports did show that *FGFR3* was not always overexpressed in PC with the t(4;14), focusing the major role on *MMSET* (25, 26). So far, the physiological role of *MMSET* is not known. Because it contains a *SET* domain, this protein may play a role in the control of chromatin conformation.

The analysis of these specific 14q32 translocations in large series of patients showed that the respective incidence of each of the 3 translocations was different than that observed in HMCL (17, 27, 27, 28). Whereas t(11;14) and t(4;14) were found in 15%-20% of the patients each, t(14;16) was observed in less than 5% of the patients. This probably reflects differences in the potentialities of these translocations in generating cell lines in vitro. The analysis of MGUS also revealed some differences, t(4;14) and t(14;16) occurring very rarely in these individuals (18, 25). However, other authors found different results, with a similar t(4;14) incidence in MM and MGUS (29). Finally, these analyses showed that about half of the 14q32 translocations observed in patients did involve other chromosomal partners, probably not recurrent. Whether these latter 14q32 translocations are random and represent epiphenomenons is an unresolved question.

### Chromosome 13 deletions

Chromosome 13 present frequent rearrangements in MM (about 50% of the patients with an abnormal karyotype), all leading to the loss of genetic material. Cytogenetic and comparative genomic hybridisation studies identified a minimal common deleted region centred on the 13q14 region. (1-5, 30, 31). However, it is important to keep in mind that about 90% of chromosome 13 abnormalities are total monosomies (13, 30, 31). Whether partial interstitial deletions produce similar biological significance is currently unknown. Nevertheless, analyses of large cohorts of patients using interphase FISH showed that half of the patients present a loss of this region, a similar incidence to that found with cytogenetics (11, 13, 17, 34). In contrast to 14q32 translocations, which are observed in the large majority of the PC, chromosome 13 abnormalities may not be present in all the PC. In our experience, positive cases present a median of 75% of PC presenting the deletion, with a range varying from 20% to 100% (personal data August 2004 and (37)). These results favour the hypothesis of a secondary genetic event. However, other authors did not describe this variability (13). This discrepancy is

actually not resolved, but is apparently not explained by differences in technical methods.

### **Ploidy abnormalities**

Besides these specific chromosomal abnormalities, more global chromosome changes are observed, i.e., changes in the ploidy mode. Two subgroups can be identified: one subgroup characterized by the gain of chromosomes (>48, usually 53 to 60 chromosomes), defining hyperdiploidy, and another subgroup presenting less than 48 chromosomes, defining non-hyperdiploidy (pseudo- and hypodiploidy). An extensive review of the cytogenetic literature revealed that each of these subgroups represents half of the patients with an informative karyotype. Hyperdiploidy is characterized by the gain of non-random chromosomes, especially odd chromosomes (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, and 21). It is interesting to note that hyperdiploidy is also frequently observed in another B-cell malignancy, i.e., childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL), but that in ALL, extra-chromosomes are essentially the even chromosomes. Why (and how) two B-cell malignancies present gains of different non-random chromosomes? No hypothesis is currently available to explain this bias in chromosome gains. Another characteristics of hyperdiploid karyotypes is the low incidence of structural chromosomal abnormalities. In contrast, non-hyperdiploid karyotypes are characterized by a high complexity and a frequent loss of chromosomes, especially chromosomes 13, 8, 14, and 16. Some of these non-hyperdiploid karyotypes present a few tetraploid metaphases, corresponding to the duplication of the pseudo- or hypodiploid clone.

### **Correlations between recurrent chromosomal abnormalities**

As previously suggested, these recurrent chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but present tight links. The first recognized association was the relationship between chromosome 13 loss and some 14q32 translocations. A chromosome 13 abnormality is observed in 85% to 90% of patients presenting a t(4;14) or a t(14;16), whereas present in 40% to 50% of other patients (15, 25, 34). A similar association has been demonstrated between chromosome 13 and non-hyperdiploidy.<sup>5,26</sup> Whereas monosomy 13 is observed in 30%-35% of the patients with an hyperdiploid karyotype, it is present in about 85% of non-hyperdiploid patients. Finally, correlation of 14q32 translocations with ploidy revealed interesting findings. Most specific 14q32 rearrangements, i.e., t(11;14), t(14;16), and albeit to a lesser degree, t(4;14), are observed in non-hyperdiploid karyotypes (personal data, August 2004, and (28)). In contrast, other non-recurrent 14q32 translocations appear to be more frequent in hyperdiploid clones, strengthening the random character of these abnormalities. Thus, MM patients can be divided in two subgroups: one with mostly hyperdiploid karyotypes, with a low incidence of chromosome 13 abnormalities and of recurrent 14q32 translocations, and another group characterized by non-hyperdiploidy, a high incidence of deletions

13 and of recurrent 14q32 translocations. These two groups may correspond to different oncogenetic pathways.

### **Impact on clinical management**

Cytogenetics has become the most important prognostic factor in several haematopoietic tumours, especially in acute leukaemias. Several concordant data support a similar impact in MM. The first implication of cytogenetics in survival has been the evaluation of chromosome 13 abnormalities. Many reports have demonstrated that patients presenting this factor displayed a shorter survival, independently of the type of treatment (conventional or high doses) (11, 27, 33, 35, 36). This pejorative impact seems to persist in the context of allogeneic bone marrow transplantation (personal data and (37)). A matter of debate regards the technique used for its identification, i.e., cytogenetics or FISH. It appears that chromosome 13 abnormalities are a more powerful predictor of poor outcome when identified on karyotype (38). This finding probably reflects the sum of several pejorative prognostic factors, such as chromosomal abnormalities, chromosome 13 loss, and high proliferation. Nevertheless, chromosome 13 abnormalities predict a poor prognosis even when identified by interphase FISH, which enables to detect much more positive patients (50% versus 15%) (27, 35, 39). More recently, the prognostic value of 14q32 translocations has been evaluated. Concordant data were obtained showing the poor prognosis associated with t(4;14), even with high dose therapy (25, 27, 40, 41). However, it is important to keep in mind that most t(4;14)-positive patients also present monosomy 13. Further large studies will be needed to evaluate the individual prognostic power of these two chromosomal abnormalities.

Other genetic lesions have been identified as predictors of longer survival. In contrast to previous cytogenetic studies, (42) t(11;14) has been shown to confer a better prognosis, especially for patients treated with high dose chemotherapy (41). However, numbers reported so far are quite small, and more extensive studies are warranted to definitely assess its prognostic value. Hyperdiploidy has also been associated with longer survival (5). However, this conclusion has been obtained in patients presenting an abnormal karyotype (by definition), and should be confirmed by other series. Interestingly, recent reports have shown that patients with trisomy 11 displayed a high expression of cyclin D1, with levels close to that observed in the cases with t(11;14) (43, 44). Since chromosome 11 is one of the most often gained chromosomes in hyperdiploidy, these data raise the question of the prognostic role of cyclin D1 expression in hyperdiploid cases.

### **Concluding remarks**

Recent progresses in the evaluation of genetics in MM lead to a better understanding of MM oncogenesis (45). The analysis of large series of patients enabled to clarify the position of individual chromosomal abnormalities, defining two types of MM. The first one is characterized by the gain of multiple specific chromosomes, a low incidence of chromosome 13 abnormalities, and a low incidence

of recurrent 14q32 translocations. This group would display quite long survivals, possibly related to high cyclin D1 expression. The second type of MM is characterized by the accumulation of multiple chromosomal breaks, pseudo- or hypodiploidy, a high incidence of chromosome 13 losses, and a high incidence of recurrent 14q32 translocations, especially t(11;14) and t(4;14). Interestingly, this oncogenetic model fits quite well with data generated by expression microarray experiments. Even though this novel genomic test has not yet been extensively used in MM (essentially because of the need for PC purification), data analyses according to cyclins D1 and D2 expression generated a very similar model (46). One group is characterized by cyclin D1 overexpression (gathering t(11;14)-positive and hyperdiploid cases), and a second group is characterized by cyclin D2 overexpression (gathering most other non-hyperdiploid cases, and especially t(4;14)- and t(14;16)-positive patients). These two oncogenetic models are very similar, and should allow a novel approach of MM. However, they both take into account only a part of the genetic heterogeneity observed in MM, and thus necessary reflect only a part of the biological diversity of the disease. Further large scale analyses, including pan-genomic microarray studies are still warranted in order to better understand the pathophysiology of MM.

## References

1. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985; 66: 380-390.
2. Gould J, Alexanian R, Goodacre A, Pathak S, Hecht B, Barlogie B. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* 1988; 71: 453-456.
3. Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel P, Jouet JP, Bauters F, Facon T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995; 85: 2490-2497.
4. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic finding in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82: 41-49.
5. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 2229-2238.
6. Latreille J, Barlogie B, Dosik G, Johnston DA, Drewinko B, Alexanian R. Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. *Blood* 1980; 55: 403-408.
7. Barlogie B, Alexanian R, Dixon D, Smith L, Smallwood L, Delasalle K. Prognostic implications of tumor cell DNA and RNA content in multiple myeloma. *Blood* 1985; 66: 338-341.
8. Tienhaara A, Pelliniemi TT. Flow cytometric DNA analysis and clinical correlations in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 322-330.
9. Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jager U, Heinz R. Multiple myeloma: High inci-

- dence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55: 3854-3859.
10. Flactif M, Zandecki M, Lai JL, Bernardi F, Obein V, Bauters F, Facon T. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. *Leukemia* 1995; 9: 2109-2114.
  11. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, Picken E, Santana-Davila R, Gonzalez-Paz N, Winkler JM, Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Lust JA, Greipp PR, Fonseca R. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 427-436.
  12. Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, Ueda Y, Abe T, Matsuda F, Kashima K, Taniwaki M. The Ig heavy chain is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* 1997; 90: 526-534.
  13. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001; 15: 981-986.
  14. Avet-Loiseau H, Li JY, Facon T, Brigaudeau C, Morineau N, Maloisel F, Rapp MJ, Talmant P, Trimoreau F, Jaccard A, Harousseau JL, Bataille R. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 1998; 58: 5640-5645.
  15. Koppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20: 5580-5594.
  16. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13931-13936.
  17. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R, for the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM). Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185-2191.
  18. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R, on behalf the Intergroupe Francophone du Myélome. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Cancer Res* 1999; 59: 4546-4550.
  19. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996; 88: 674-681.
  20. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B,

- Greipp PR. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002; 99: 3735-3741.
21. Garand R, Avet-Loiseau H, Accard F, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R. t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 2032-2035.
  22. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T, Schrock E, Ried T, Kuehl WM. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 4457-4463.
  23. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004; 5: 191-199.
  24. Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schröck E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997; 16: 260-264.
  25. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101: 1520-1529.
  26. Santra M, Zhan F, Tian E, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood* 2003; 101: 2374-2376.
  27. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-4575.
  28. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Davila R, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 2562-2567.
  29. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-1424.
  30. Avet-Loiseau H, Andree-Ashley LE, Moore II D, Mellerin MP, Feusner J, Bataille R, Pallavicini M. Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma measured using comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1997; 19: 124-133.
  31. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. High incidence of chromosome 13 deletion



- in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000; 96: 1505-1511.
32. Avet-Loiseau H, Daviet A, Saunier S, Bataille R. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomies 13. *Br J Haematol* 2001; 111: 1116-1118.
  33. Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 804-812.
  34. Fonseca R, Oken MM, Greipp PR. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2001; 98: 1271-1272.
  35. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Laï JL, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum b2-microglobulin produce a very powerful myeloma staging system for patients receiving high dose therapy. *Blood* 2001; 97: 1566-1571.
  36. Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000; 95: 1925-1930.
  37. N, Schilling G, Einsele H, Liebisch P, Shimoni A, Nagler A, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Kiehl M, Fauser A, Schwerdtfeger R, Wandt H, Sayer HG, Myint H, Klingemann H, Zabelina T, Dierlamm J, Hinke A, Zander AR. Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation. *Blood* 2004; 103: 4056-4061.
  38. Shaughnessy J Jr, Tian E, Sawyer J, McCoy J, Tricot G, Jacobson J, Anaissie E, Zangari M, Fassas A, Muwalla F, Morris C, Barlogie B. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol* 2003; 120: 44-52.
  39. Kaufmann H, Kromer E, Nosslinger T, Weltermann A, Ackermann J, Reisner R, Bernhart M, Drach J. Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2003; 71: 179-183.
  40. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H, for the Intergroupe Francophone du Myélome. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002; 100: 1579-1583.

41. Chang H, Sloan S, Li D, Zhuang L, Yi QL, Chen CI, Reece D, Chun K, Stewart AK. The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol* 2004; 125: 64-68.
42. Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Hoyer JD, Jalal SM, Greipp PR. Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol* 1998; 101: 296-301.
43. Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D, Testoni N, Tosi P, De Vivo A, Amabile M, Grafone T, Ottaviani E, Giannini B, Cangini D, Bonifazi F, Neri A, Fabris S, Tura S, Baccarani M, Martinelli G. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 2003; 102: 1588-1594.
44. Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, Tomer R, Hofler H, Schuurin E, Kluin PM, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 2004; 104: 1120-1126.
45. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104: 607-618.
46. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Stewart AK, Avet-Loiseau H. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma. *Cancer Res* 2004; 64: 1546-1558.

## Neoangiogenesi e interazioni cellulari nella progressione del mieloma multiplo

*Angelo Vacca, Antonio Pellegrino, Domenico Ribatti\**

Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana,

\*Dipartimento di Anatomia Umana e Istologia, Università degli Studi di Bari

### Angiogenesi midollare nei pazienti con mieloma e con MGUS

Abbiamo preso in considerazione le tipiche condizioni patologiche che rappresentano fasi di progressione dei tumori plasmacellulari: la gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) ed il mieloma multiplo (MM). La progressione è infatti possibile con il passaggio dalla MGUS al MM o dal MM in fase di remissione (parziale o completa; fase “plateau”) alla fase della recidiva o alla fase leucemica. Abbiamo dimostrato strette correlazioni fra angiogenesi midollare e progressione clinico-laboratoristica della malattia (1). Infatti, pazienti con MM alla diagnosi, in recidiva o in fase leucemica (denominati “pazienti con MM attivo”) presentano un’area microvascolare midollare circa 5 volte maggiore rispetto ai pazienti con MGUS o con MM in remissione (denominati “pazienti con MM non attivo”), nei quali l’area microvascolare è invece molto ridotta e simile a quella dei pazienti di controllo (pazienti con anemia sideropenica o macrocitica).

Biopsie midollari dei pazienti con MM, con MGUS e dei pazienti di controllo sono state studiate con tecniche immunistochemiche tramite un anticorpo anti-fattore VIII /von Willebrand, specifico per le cellule endoteliali. Questo studio ha mostrato un’ampia rappresentazione dei neovasi nei pazienti con MM “attivo” rispetto ai pazienti con MM “non attivo” o con MGUS. Nei pazienti di controllo le biopsie sono risultate per lo più avascolari. L’intenza neoangiogenesi nei pazienti con MM “attivo” è caratterizzata da vasi particolarmente sottili, tortuosi, ramificati o da gettoni endoteliali solidi, privi di lume. Al contrario, nei pazienti con MM “non attivo” o con MGUS sono presenti scarsi neovasi, che appaiono rigidi, privi di arborizzazioni e di gettoni vascolari solidi.<sup>1</sup> Uno studio tramite analisi di immagine computerizzata dei neovasi (2) ha dimostrato che nei pazienti con MM “attivo” l’area microvascolare è pari a  $0,50 \pm 0,23 \text{ mm}^2 \times 10^{-2}$ . Nei pazienti con MM “non attivo” e con MGUS è pari a  $0,11 \pm 0,02 \text{ mm}^2 \times 10^{-2}$ . Nei pazienti di controllo è pari a  $0,08 \pm 0,01 \text{ mm}^2 \times 10^{-2}$ . Analoghe variazioni si ottengono tramite la valutazione dei perimetri dei neovasi.

In conclusione, i nostri studi dimostrano che i pazienti con MM “attivo” sono caratterizzati da una “fase vascolare”, e che i pazienti con MM “non attivo” e con MGUS rappresentano invece una “fase avascolare” dei tumori plasmacellulari (3). Analoghi risultati sono stati ottenuti da Rajkumar e Collaboratori in uno studio condotto su 400 pazienti con gammopatie monoclonali (4).

### **Cellule endoteliali microvascolari nei pazienti con mieloma**

Cellule endoteliali estratte dal midollo di pazienti con MM sono state confrontate con cellule endoteliali di pazienti con MGUS e con cellule endoteliali normali da cordone ombelicale (cellule HUVEC) (5). Tramite analisi al microscopio elettronico, le cellule di MM evidenziavano una maggiore attivazione metabolica rispetto alle cellule HUVEC, indicata da iperplasia del reticolo endoplasmatico rugoso, del complesso di Golgi, e dalla presenza di numerosi mitocondri e di strutture lisosomiali. All'analisi al FACS e/o in Western blot, le cellule di MM esprimevano livelli di antigeni vascolari (Tie2/Tek, VEGFR-2, bFGFR-2, CD105-endogлина e VE-caderina) 5-70 volte maggiori rispetto alle cellule di MGUS ed alle cellule HUVEC. Mediante ELISA e zimografia SDS-PAGE sui mezzi condizionati, abbiamo notato che le cellule endoteliali di MM producono quantità di metalloproteinasi (MMP-2 e MMP-9) 4-40 volte più elevate rispetto alle cellule HUVEC. Le cellule endoteliali di MM poste sul Matrigel formano rapidamente (in 12-24 ore) un plesso capillare fitto con numerose giunzioni e ramificazioni, mentre le cellule endoteliali di MGUS e le cellule HUVEC danno luogo ad un plesso molto lasso e scarsamente ramificato. Le cellule di MM inducono un'intensa risposta angiogenica *in vivo* (sistema della CAM), mentre le cellule HUVEC inducono pochissimi vasi. Anche studi effettuati sul cDNA delle cellule di MM hanno confermato un incremento della regolazione di geni angiogenici (isoforme del VEGF e del bFGF, HGF, Tie2/Tek, TGF- $\beta$ , chemochine Gro- $\alpha$ , fibronectina-1, HIF-1 $\alpha$ , ETS-1, ID3, ed osteopontina) rispetto alle cellule HUVEC. Infine, le cellule endoteliali di MM, mostrano elevata espressione di VEGF-A e del recettore specifico VEGFR-2 (mRNA e proteine) ed autofosforilazione costitutiva sia del VEGFR-2 che della chinasi ERK-2 ad esso associata. Tale autofosforilazione è meno evidente o assente nelle cellule endoteliali di MGUS e nelle cellule HUVEC. Nel complesso questi dati sembrano indicare che le cellule endoteliali di MM sono dotate di un fenotipo antigenico, funzionale e genetico simile a quello di cellule endoteliali tumorali.<sup>5</sup>

### **Correlazioni fra angiogenesi e parametri clinico-laboratoristici**

La velocità di crescita delle plasmacelle, valutata mediante “labeling index”, risulta strettamente correlata con l'area microvascolare midollare (6). Inoltre, sussistono strette correlazioni fra area microvascolare, massa plasmacellulare ed anemizzazione, fra area microvascolare e prognosi, (6) nonché fra area microvascolare e marcatori delle plasmacelle, quali la concentrazione sierica e/o urinaria della componente M e la concentrazione plasmatica di IL-6 e di IL-1  $\beta$  (1, 2).

L'incremento dell'area microvascolare e delle cellule endoteliali, è correlato con iperespressione plasmacellulare di molecole di adesione complementari per l'endotelio. Tale fenomeno è responsabile di frequenti interazioni adesive fra plasmacellule e cellule endoteliali e del passaggio in circolo delle plasmacellule con diffusione nel compartimento intra- ed extramidollare (7, 8).

### **Fattori angiogenici delle plasmacellule**

I nostri dati indicano che le plasmacellule dei pazienti con MM "attivo" secernono il fattore angiogenico FGF-2. Abbiamo utilizzato tecniche ELISA sui lisati plasmacellulari e tecniche di inibizione dell'angiogenesi con anticorpi anti-FGF-2 (2). Il VEGF rappresenta un altro fattore angiogenico di origine plasmacellulare dimostrato per la prima volta da Bellamy et al. (9). Oltre a stimolare l'angiogenesi, tale fattore induce la produzione di IL-6 da parte delle cellule stromali midollari. L'IL-6, a sua volta, rappresenta un potente fattore di crescita per le plasmacellule con meccanismo paracrina. Inoltre, FGF-2 e VEGF sono fattori di crescita plasmacellulari con meccanismo autocrino (9). Oltre ad indurre angiogenesi, il VEGF incrementa la permeabilità capillare, consentendo alla fibrina, un potente fattore angiogenico, di passare negli spazi interstiziali. I neovasi dei pazienti con MM "attivo" esprimono inoltre acquaporina-1, una glicoproteina in grado anch'essa di aumentare la permeabilità dell'endotelio microvascolare (10). Pertanto, VEGF ed acquaporina-1 inducono sinergicamente iperpermeabilità capillare e quindi automantengono l'angiogenesi attraverso il passaggio della fibrina negli spazi interstiziali. Altri fattori angiogenici secreti dalle plasmacellule sono IL-6, HGF-SF ed IL-1 (11-13). Infine, le plasmacellule attivano le cellule stromali midollari stimolandone il rilascio di numerosi fattori angiogenici, fra i quali soprattutto TNF- $\alpha$  e GM-CSF (14-16).

### **Interazioni fra plasmacellule e neovasi tramite l'integrina $\alpha_v\beta_3$**

Linee cellulari di MM e plasmacellule midollari di pazienti sono state studiate circa la capacità di interagire con i maggiori componenti della parete microvascolare, la vitronectina e la fibronectina.<sup>17</sup> Sia le linee che le plasmacellule fresche erano capaci di aderire alla vitronectina ed alla fibronectina. Tale adesione era inibita in presenza dell'anticorpo monoclonale neutralizzante anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$ . L'integrina causava la formazione di complessi fosforilati di adesione focale e l'aggregazione di placche di adesione focale contenenti la subunità  $\beta_3$ , le proteine del citoscheletro vinculina, cortactina, e paxillina, le tirosino-chinasi FAK e pp60<sup>src</sup>, la proteina Grb-2, e la tirosino-chinasi ERK-2 nella loro forma fosforilata (attivata). Sia la vitronectina che la fibronectina, in presenza dell'integrina, stimolavano la proliferazione plasmacellulare, inducevano la produzione ed il rilascio dell'attivatore del plasminogeno UPA, ed incrementavano il rilascio delle forme attivate delle metalloproteinasi MMP-2 ed MMP-9. Ciò può essere interpretato come evidenza di un nuovo meccanismo di invasione e diffusione: angiogenesi ed adesione delle plasmacellule alla parete del vaso provocano incremen-

to della capacità proliferativa e proteolitica delle plasmacellule, e quindi una maggiore capacità diffusiva di tali cellule nelle sedi intra- ed extramidollari.

### **Infiltrato infiammatorio e angiogenesi**

Il microambiente tumorale è in grado di svolgere una rilevante funzione di supporto alla progressione neoplastica. L'infiltrato infiammatorio dello stroma tumorale, rappresentato da macrofagi, fibroblasti, mastociti e linfociti, contribuisce attivamente ad indurre la fase vascolare mediante la secrezione di numerosi fattori angiogenici che agiscono in sinergismo con quelli secreti dalle cellule neoplastiche. Ad esempio, alcune chemochine e fattori angiogenici sono in grado di indurre i mastociti a secernere TNF- $\alpha$ , IL-8, VEGF, istamina ed eparina (18). Inoltre, i mastociti costituiscono la principale riserva di enzimi proteolitici, quali triptasi e chimasi. I nostri dati hanno confermato l'elevato potere angiogenico dei mastociti, mediato dal VEGF e dall'FGF-2 contenuti nei loro granuli secretori (19). Infatti, abbiamo dimostrato che nei pazienti con MM sussistono strette correlazioni fra estensione dell'area microvascolare, numero dei mastociti e produzione di triptasi e di VEGF (19). Simili correlazioni sono state dimostrate nei pazienti con linfoma non-Hodgkin (20, 21).

### **Angiogenesi e prognosi nel mieloma**

I nostri studi evidenziano che il rischio di progressione da MGUS o da MM "non attivo" a MM "attivo" aumenta quando il *labeling index* plasmacellulare e l'area microvascolare sono contemporaneamente molto elevati.<sup>1</sup> Inoltre, nell'ambito dei pazienti con MM "attivo" che presentavano un'ampia area microvascolare ed elevato *labeling index* è possibile individuare un ulteriore dato prognosticamente negativo: tali pazienti rispondono in maniera rapida alla terapia ('*early responders*'), ma altrettanto rapidamente vanno incontro alla recidiva. Viceversa, nei pazienti con MM "attivo", nei quali l'area microvascolare ed il *labeling index* sono inferiori, la sopravvivenza mediana è maggiore (1). Uno studio di Rajkumar et al. (22), condotto nella Mayo Clinic di Rochester, ha dimostrato che la sopravvivenza mediana dei pazienti con MM è inversamente correlata con la densità microvascolare midollare e con il *labeling index*. Simili risultati sono stati ottenuti da Pruneri et al. (23).

Sono stati effettuati studi che evidenziano strette correlazioni tra densità microvascolare in pazienti con MM al III stadio (Durie & Salmon) e chemioterapia convenzionale o trapianto autologo di cellule staminali (24). Dopo chemioterapia, la densità microvascolare era ridotta nei pazienti responsivi, mentre era invariata o addirittura incrementata nei pazienti non responsivi. In presenza di ridotta densità microvascolare, il periodo di sopravvivenza libero da malattia era superiore rispetto ai pazienti nei quali non si verificava tale riduzione. Inoltre, la riduzione della densità microvascolare correlava strettamente con la riduzione dei livelli sierici delle principali citochine angiogeniche (FGF-2, VEGF, HGF-SF) nei pazienti con MM in II-III stadio responsivi alla terapia citostatica. Le

stesse citochine non si riducevano invece nei pazienti refrattari, ovvero in coloro che mostravano progressione di malattia. È verosimile che la densità microvascolare si riduca in conseguenza degli effetti citotossici che il trattamento citostatico determina sulle cellule endoteliali. In uno studio su pazienti con MM in prima diagnosi, sottoposti a doppio autotrapianto e successiva terapia di mantenimento con IFN- $\alpha$ , la densità microvascolare era inversamente correlata alla sopravvivenza libera da malattia ed alla sopravvivenza a lungo termine (25).

## Conclusioni

Sono state ormai acquisite prove convincenti circa l'importanza dell'angiogenesi midollare nel favorire la progressione del MM. È prevedibile che le ricerche dei prossimi anni siano volte ad identificare le combinazioni più efficaci di agenti antiangiogenici verso i fattori angiogenici principali, i protocolli ottimali di somministrazione, gli agenti stabili con lunga emivita, in modo da ideare protocolli terapeutici sempre più efficaci, nonché combinazioni sequenziali di chemioterapici con agenti antiangiogenici per il controllo della malattia minima residua. L'obiettivo finale è quello di indurre la "fase avascolare" nei pazienti con MM e di trasformare questa malattia in una MGUS che è compatibile con una vita normale.

## Bibliografia

1. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994; 87: 503-508.
2. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albini A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 3064-3073.
3. Vacca A, Ribatti D, Roccaro AM, Frigeri A, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001; 28: 543-550.
4. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Russell SJ, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2210-2216.
5. Vacca A, Ria R, Semeraro F, Merchionne F, Coluccia M, Boccarelli A, Scavelli C, Nico B, Gernone A, Battelli F, Tabilio A, Guidolin D, Petrucci MT, Ribatti D, Dammacco F. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 3340-3348.
6. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases. *Biological and clinical studies. Leuk Lymphoma* 1995; 20: 27-38.

7. Vacca A, Di Loreto M, Ribatti D, Di Stefano R, Gadaleta-Caldarola G, Iodice G, Caloro D, Dammacco F. Bone marrow of patients with active multiple myeloma: angiogenesis and plasma cell adhesion molecules LFA-1, VLA-4, LAM-1 and CD44. *Am J Hematol* 1995; 50: 9-14.
8. Vacca A, Ria R, Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti E, Dammacco F.  $\alpha_v\beta_3$  integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol* 2001; 29: 993-1003.
9. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 728-733.
10. Vacca A, Frigeri A, Ribatti D, Nicchia GP, Nico B, Ria R, Svelto M, Dammacco F. Microvessel over-expression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001; 113: 415-421.
11. Børset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Sundan A, Waage A. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* 1996; 88: 3998-4004.
12. Nakamura M, Merchav S, Carter A, Ernst TJ, Demetri GD, Furukawa Y, Anderson K, Freedman AS, Griffin JD. Expression of a novel 3.5-kb macrophage colony-stimulating factor transcript in human myeloma cells. *J Immunol* 1989; 143: 3543-3547.
13. Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D, Rubartelli A, Milianni A, Shaw AR, Lansdorp PM, Di Guglielmo R. Production of interleukin-1 by bone marrow myeloma cells. *Blood* 1989; 74: 380-387.
14. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85.
15. Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5277-5281.
16. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989; 73: 517-526.
17. Vacca A, Ria R, Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti E, Dammacco F.  $\alpha_v\beta_3$  integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol* 2001; 29: 993-1003.
18. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F. The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol* 2001; 115: 514-521.
19. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Minischetti M, Marzullo A, Herken R, Roncali L, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br J Cancer* 1999; 79: 451-455.



20. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Marzullo A, Calvi N, Roncali L, Dammacco F. Do mast cells help to induce angiogenesis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas? *Br J Cancer* 1998; 77: 1900-1906.
21. Vacca A, Ribatti D, Rucio L, Giacchetta F, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Iurlaro M, Dammacco F. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 965-970.
22. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3111-3116.
23. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJM, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F, Baldessari C, Freschi M, Baldini L, Goldanica M, Neri A, Carboni N, Bertolini F, Viale G. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2002; 118: 817-820.
24. Sezer O, Niemöller K, Eucker J, Jacob C, Kaufmann O, Zavrski I, Dietel M, Possinger K. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2000; 79: 574-577.
25. Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple.

## Talidomide e i suoi analoghi nella terapia del mieloma multiplo

*Antonio Palumbo*

Divisione di Ematologia dell'Università di Torino, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista

Il mieloma multiplo (MM) è caratterizzato dalla proliferazione di plasmacellule maligne. La malattia interessa prevalentemente la popolazione anziana e rappresenta l'1% di tutti i tumori umani. L'associazione Melphalan-Prednisone (MP) è stato il trattamento standard degli ultimi 40 anni. Negli anni 90', la terapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali ha comportato un significativo miglioramento terapeutico. Negli ultimi anni sono stati sviluppati alcuni nuovi farmaci con importante attività anti-mieloma, fra questi: Talidomide, Revlimid e Velcade.

### Talidomide

La Talidomide è stata introdotta per la prima volta negli anni 50'. È un sedativo ed è attivo contro la nausea e il vomito in gravidanza. Nel 1961 è stata ritirata dal commercio per la sua attività teratogenica. Recentemente la Talidomide è stata studiata in diverse neoplasie umane. I risultati incoraggianti sono stati ottenuti nei disordini plasmacellulari, nel sarcoma di Kaposi e in alcuni tumori solidi. Nel 1998, l'FDA americano ha approvato la Talidomide per il trattamento dell'eritema nodoso nella lebbra. Nel 2003, le autorità australiane e neozelandesi hanno approvato la Talidomide per il trattamento del MM. Numerosi sono i meccanismi d'azione della Talidomide alcuni dei quali ancora non ben definiti. La Talidomide ha un effetto sull'angiogenesi midollari. Il bFGF e il VEGF stimolano l'angiogenesi del midollo osseo. La Talidomide inibisce l'angiogenesi indotta dal bFGF e VEGF (1). La Talidomide agisce inibendo direttamente la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule mielomatose. Induce apoptosi e arresta la mitosi nella fase G1 del ciclo cellulare (2). Il TNF- $\alpha$  stimola la secrezione di IL-6 da parte delle cellule stromali. La Talidomide È in importante inibitore del TNF- $\alpha$ , e quindi della proliferazione indotta dall'IL-6. La Talidomide è considerata un costimolatore dei linfociti T e aumenta la proliferazione e la produzione di IL2 e IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti (3). La Talidomide da sola induce risposte parziali (riduzione della Componente Monoclonale > 50%) in circa il 30% dei pazienti affetti da MM refrattario (4). La dose ottimale di Talidomide non è stata ancora definita. La maggior parte degli autori somministra una dose di circa 200 mg/die. Sono stati utilizzate dose più elevate, fino a 600-800 mg/die, con un importante aumento degli effetti collaterali (Tabella 1).

**Tabella 1** - Talidomide da sola per il mieloma refrattario o recidivato.

Autore	Dose Talidomide	Risposta >50%	EFS
Barlogie	200-800 mg	30%	20% @ 2 anni
Grosbois	Max 800 mg	15%	50% @ 1 anno
Prince	Mediana 600 mg	28%	50% @ 5.5 mesi
Neben	Max 400 mg	20%	45% @ 1 anno
Yakoub-Agha	Mediana 400 mg	48%	50% @ 1 anno
Mileshkin	Max 800 mg	28%	50% @ 6 mesi

L'introduzione dell'associazione Talidomide e Desametasone (TD) rappresenta un nuovo schema d'induzione particolarmente diffuso negli USA. L'associazione TD ha indotto circa il 45% di risposte parziali in pazienti affetti da MM recidivato o refrattario (5, 6). L'associazione TD induce una risposta rapida con tempo mediano di risposta di circa 1-3 mesi (Tabella 2). Alla diagnosi, l'associazione TD induce risposta parziale in circa il 60% dei casi e circa il 10% di remissioni complete (7). Ad oggi nessuno studio ha definito con precisione la durata della remissione indotta da questo trattamento. È stato accertato che l'associazione TD non preclude una futura raccolta di cellule staminali periferiche. I principali effetti collaterali sono legati all'assunzione di cortisone, ed in particolare all'associazione con Talidomide che nei pazienti alla diagnosi induce un'incidenza rilevante di trombosi venose profonde e un discreto numero di neuropatie. La neuropatia è dose relata, ed è funzione della durata del trattamento con Talidomide. L'associazione TD è stata anche usata come terapia di consolidamento in pazienti in remissione parziale dopo trapianto autologo. In quest'esperienza, un'ulteriore riduzione della proteina monoclonale è stata osservata in oltre il 50% dei pazienti che a seguito del trapianto avevano già ottenuto un'importante citoriduzione (8).

In un recente studio, l'aggiunta della Talidomide ad uno schema poli-chemioterapico convenzionale ha indotto un raddoppio della percentuale di risposta parziali da 18% al 36% (9). Nel paziente recidivato l'associazione Talidomide - chemioterapia induce risposte parziali in circa il 60% dei pazienti (Tabella 3). Non è

**Tabella 2** - Talidomide- Desametasone per il mieloma refrattario o recidivato

Autore	Dose Talidomide	Risposta >50%	EFS
Anagnostopoulos	200-800 mg	57%	50% @ 10 mesi
Dimopoulos	400 mg	55%	50% @ 10 mesi
Palumbo	100 mg	52%	50% @ 12 mesi

**Tabella 3** - Talidomide-Chemioterapia per il mieloma refrattario o recidivato.

Autore	Regime	Risposta >50%	PFS
Moheler	Tal-CY- VP16-Dex	68%	50% @ 16 mesi
Gonzales-Porras	Tal-CY-Dex	53%	51% @ 1 anno
Kropff	Hyper CTD	72%	50% @ 11 mesi
Dimopoulos	Pulsed CTD	67%	50% @ 12 mesi
Lee	DT-PACE	32%	ND

chiaro al momento se l'associazione Talidomide - chemioterapia rappresenti un reale vantaggio rispetto all'associazione TD.

Molto interessanti sono i primi risultati ottenuti sull'associazione Talidomide - chemioterapia come terapia d'induzione alla diagnosi. Queste associazioni hanno consentito di raggiungere risposte cliniche mai osservate in precedenza con le terapie convenzionali. In particolare, le associazioni Talidomide-Melphalan (TM), Melphalan-Prednisone-Talidomide (MPT) (10), Talidomide-Adriamicina-Desametasone (TAD), Ciclofosfamide-Talidomide-Desametasone (CTD) hanno evidenziato una probabilità di risposta parziale intorno all'80% e un'incidenza di risposte complete intorno al 10-30%. Se questo netto incremento di risposte si tradurrà in un significativo prolungamento della durata di remissione e della sopravvivenza è in corso di valutazione. Queste associazioni hanno anche evidenziato l'insorgenza di nuove tossicità, in particolare un'importante incidenza di trombosi venosa profondo che richiede profilassi eparinica e che, per motivi ancora non chiari, risulta essere più frequente nei pazienti alla diagnosi rispetto a quelli in recidiva. La neuropatia è il secondo grande effetto collaterale indotto dalla Talidomide. La Talidomide non presenta tossicità ematologica di rilievo. Fondamentale è ricordare la teratogenicità della Talidomide ed il rischio che ne deriva dall'assunzione di questo farmaco da parte di donne fertili. La dimostrazione che la concentrazione di Talidomide nello sperma umano è identica a quella che si riscontra nel siero umano, potrebbe indicare che anche l'uomo può indurre malformazioni fetali.

### **Revlimid**

Analogo della Talidomide (11), ha un importante vantaggio che è rappresentato dall'assenza di teratogenicità e sporadica neurotossicità. Al contrario della Talidomide presenta tossicità ematologica. L'attività in vitro del Revlimid è stata dimostrata su diverse linee cellulari di mieloma umano: Il Revlimid inibisce la proliferazione cellulare e l'incorporazione di Timidina marcata. L'aggiunta di Desametasone ha ulteriormente incrementato l'attività antiproliferativa del Revlimid in vitro. Nei primi studi in vivo il Revlimid da solo ha indotto una risposta parziale in circa il 20% dei pazienti. La dose media somministrata è stata di circa 25 mg/die e il principale fattore limitante è stato la mielo-soppressione. Il Revlimid ha indotto una risposta parziale in circa il 30% dei pazienti affetti da MM in fase avanzata. Diversi studi clinici hanno evidenziato un miglioramento della risposta clinica associando Cortisonici al Revlimid. Numerosi trials sono in corso per valutare l'efficacia clinica di questo farmaco in combinazione con Cortisonici e/o Chemioterapici.

### **Actimid**

Lo sviluppo di numerosi derivati della Talidomide con importante attività immunomodulatoria ha portato alla sintesi e all'identificazione di un nuovo derivato: il CC-4047, Actimid. In uno studio di fase I, l'attività dell'Actimid è stata valutata in pazienti affetti da MM recidivato o refrattario. La mono-somministrazione di

Actimid ha determinato una risposta parziale in circa il 50% dei pazienti e un sorprendente 17% di remissioni complete. I principali effetti collaterali sono stati lievi: eruzione cutanea, neuropatia, costipazione, diarrea e nausea. La neutropenia è risultata essere il principale dose-limiting factor. La somministrazione in vivo di Actimid ha indotto un incremento dei livelli serici del recettore del IL-2 e dei livelli serici IL-12. Questi risultati indicano un'attivazione in vivo di linfociti T, monociti e macrofagi (12).

### **Ringraziamenti**

Si ringrazia Federica Leotta per la preziosa collaborazione.

### **Bibliografia**

1. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 26; 91 (9): 4082-5.
2. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000; 96 (9): 2943-50.
3. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med*. 1998; 187(11): 1885-92.
4. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994; 503-508.
5. Weber DM, Gavino M, Delasalle K, et al. Thalidomide alone or with dexamethasone for multiple myeloma. *Blood* 1999; 94: 604a (abstr 2686).
6. Palumbo A, Bertola A, Falco P, et al. Efficacy of low-dose thalidomide and dexamethasone as first salvage regimen in multiple myeloma. *Hematology Journal*. 2004; 5: 318-324.
7. Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA, et al. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* 2002, 20: 4319-23.
8. Alexanian R, Weber D, Giralt S, Delasalle K. Consolidation therapy of multiple myeloma with thalidomide-dexamethasone after intensive chemotherapy. *Ann Oncol*. 2002;13 (7): 1116-9.
9. Barlogie B, Zangari M, Spencer T, et al. Thalidomide in the management of multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2001; 38: 250-259.
10. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992; 80: 887-90.
11. Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA, et al. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* 2002, 20: 4319-23.
12. Schey SA, Fields P, Barlett JB, et al. Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2004; 22 (16): 3269-76.



Tipografia Viscontea  
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia  
Tel. 0382/526253 r.a. - Fax 0382/423120







