

LA B-LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: CARATTERISTICHE BIOLOGICHE

Federico Caligaris-Cappio, Massimo Geuna, Daniela Gottardi,
Luisa Granziero, Paola Circosta, Paolo P. Ghia.

Cattedra di Immunologia Clinica, Università di Torino, Divisione Universitaria di Immunologia Clinica, Ospedale Muriziano Umberto I; Torino e Laboratorio di Immunologia Oncologica, I.R.C.C. Candiolo (TO).

La Leucemia Linfatica Cronica a B cellule (B-LLC) è la leucemia più frequente nel mondo occidentale con un'incidenza di 50 casi/100.000 dopo i 70 anni (1). Non è associata con l'esposizione a sostanze chimiche, né a radiazioni ionizzanti e neppure è più comune in soggetti con sindromi da immunodeficienza. Piuttosto, si evidenzia una suscettibilità genetica. La B-LLC è infatti rara nelle popolazioni dell'est asiatico e nei giapponesi emigrati negli USA, mentre è assai più frequente nelle popolazioni caucasiche e negre. E' stata anche documentata una tendenza familiare con il caratteristico fenomeno dell'anticipazione: infatti esistono famiglie in cui la malattia appare nelle generazioni successive ad un'età sempre più precoce.

Tre sono le caratteristiche biologiche fondamentali della B-LLC (2): 1) rappresenta il prototipo delle neoplasie caratterizzate da difetti nell'induzione dell'apoptosi; 2) i pazienti sviluppano una severa immunodeficienza, ed in particolare una marcata ipogammaglobulinemia che peggiora con il progredire della malattia; 3) i pazienti hanno un'elevata prevalenza di fenomeni autoimmuni caratterizzati dalla produzione di autoanticorpi (autoAb) che sono policlonali e diretti contro autoantigeni (Ag) espressi unicamente dalle cellule ematiche (3). Questi autoAb sono responsabili di citopenie autoimmuni talora assai severe.

L'origine e le caratteristiche della cellula neoplastica.

La cellula neoplastica è un piccolo, fragile linfocita maturo le cui caratteristiche fenotipiche sono molto simili a quelle dei B linfociti che si osservano nella zona mantellare (MZ) dei follicoli linfatici secondari (4). La caratteristica distintiva della B-LLC è la co-espressione della molecola CD5 con livelli di immunoglobuline di superficie (sIg) molto bassi (e talora non evidenziabili). Si tratta in genere di IgM ± IgD e solo eccezionalmente si osservano IgG o IgA.

L'ipotesi comunemente accreditata è che la B-LLC derivi dalla trasformazione neoplastica di B linfociti CD5+ anergici e autoreattivi localizzati nei follicoli linfatici degli organi linfatici secondari (4). Quest'ipotesi deriva da una serie di osservazioni: a) le sIg monoclonali espresse sulla membrana dei B linfociti neoplastici hanno un'attività autoanticorpale policlonale generalmente a tipo fattore reumatoide; b) livelli di sIgM bassi come sulla superficie delle cellule di B-LLC si trovano unicamente nei B linfociti normali anergizzati dall'incontro con un autoAg; c) i B linfociti CD5+ normali si trovano nella MZ dei follicoli linfatici secondari e spesso producono autoAb naturali, polireattivi e a bassa affinità codificati dallo stesso repertorio di geni V delle Ig che si osservano nella maggior parte dei casi di B-LLC.

In circa la metà dei casi di B-LLC i geni V delle Ig presentano mutazioni somatiche (5-8). Questo significa che, almeno in questi casi, la cellula di origine è un linfocita B memoria che ha incontrato l'Ag nei centri germinativi. I restanti casi non presentano mutazioni somatiche e dunque la cellula di origine è un linfocita B naive che non ha incontrato l'Ag. Inoltre, è stato documentato che le B-LLC non mutate sono anche caratterizzate dall'aver percentuali molto più elevate di B linfociti CD38+ (8). Questa dicotomia ha una rilevante implicazione clinica dal momento che la prognosi delle LLC naive è significativamente più severa di quella delle LLC memoria (7, 8).

La quasi totalità delle cellule di LLC è nella fase G0 del ciclo cellulare. Tuttavia, queste cellule resting esprimono sulla superficie una serie di molecole, tra cui CD23 e CD27, che in altre circostanze indicano un'attivazione cellulare. Inoltre, esprimono lo mRNA per la quasi totalità delle citochine testate e producono e secernono numerose citochine (9). Il ruolo di queste citochine nella storia naturale della malattia è tuttavia oscuro. Alcune, quali TGF- β e IFN- γ possono essere responsabile di circuiti autocrini negativi che contribuiscono a ostacolare il processo di apoptosi. Altre, quali TNF- α e CD23 solubile sono state proposte quali possibili fattori di crescita autocrini. Tuttavia, nessuna citochina è individualmente capace di forzare il blocco in G0 e le cellule di B-LLC non sono in grado di rispondere ai mitogeni che causano la proliferazione dei B linfociti normali. In altri termini, le cellule di B-LLC presentano uno stato di attivazione frustrata oltre al quale sono incapaci di procedere.

È verosimile che un ruolo importante nel determinare questa situazione sia giocato dal B cell receptor (BCR). Il BCR è un complesso multimerico di membrana formato dalle sIg e dall'eterodimero Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) che traduce lo stimolo recepito dalle sIg nel segnale biochimico che porta all'attivazione e proliferazione cellulare. Il domain extracellulare di CD79b è assente nella maggior parte dei pazienti con B-LLC (10). Una variante troncata di CD79b deriva per un meccanismo di splicing alternativo e manca dell'esone 3 che codifica per la porzione extracellulare della molecola (11). Questa variante di splicing è stata trovata in numerosi linee cellulari B ed in tutti i casi di B-LLC analizzati, suggerendo che il meccanismo di splicing alternativo possa essere implicato nel causare i ridotti livelli di BCR sulla superficie delle cellule di B-LLC (12). È ragionevole ritenere che questi ridotti livelli possano essere responsabili della difettiva trasduzione del segnale che è propria delle cellule di B-LLC e le accomuna ai B linfociti anergici. In accordo con questa possibilità anche altre molecole, quale CD22, che sono collegate con il BCR in quanto ne amplificano il segnale, sono assenti o debolmente espresse dalle cellule di B-LLC.

È sorprendente come una cellula resting ed anergica quale la cellula neoplastica di B-LLC abbia un'intrinseca instabilità genetica e presenti numerose aberrazioni genomiche (13-18). Le anomalie predominanti portano o ad una perdita o ad un incremento di materiale genico. Le traslocazioni sono rare e, quando presenti, portano a perdita di materiale genico piuttosto che alla creazione di un gene di fusione o all'iperespressione di un oncogene suggerendo che i geni patogeneticamente rilevanti si comportino come geni oncosoppressori.

La fluorescence in situ hybridisation (FISH) rivela la presenza di anomalie citogenetiche in una percentuale di casi che arriva fino all'80% (13-18). Le anomalie più comuni sono delezioni e traslocazioni in 13q e la trisomia del cromosoma 12. È interessante osservare che i casi con

mutazioni somatiche dei geni delle Ig hanno la delezione 13q14, mentre i casi germ line hanno la trisomia del cromosoma 12. Mutazioni o delezioni di p53 al 17p13.3 sono state riportate nel 15% circa dei pazienti e delezioni nelle bande 11q22-q23 sono presenti nel 20% dei pazienti. Inoltre, il braccio lungo del cromosoma 11 a livello di 11q22-q23 ospita il gene mutato nell'ataxia-teleangiectasia (ATM) (19). I soggetti con AT sono omozigoti per ATM, cioè le mutazioni interessano ambedue gli alleli. Il fatto che questi pazienti abbiano un'aumentata suscettibilità a sviluppare neoplasie linfoidi ha portato ad analizzare ATM nei pazienti con B-LLC dimostrando che numerosi pazienti hanno mutazioni in ATM (19, 20). Dal momento che, in taluni casi, il gene ATM è mutato nella linea germinale si è sviluppata l'ipotesi che i soggetti eterozigoti per ATM possano essere predisposti a sviluppare una LLC (20).

Il problema dell'apoptosi

La progressione della LLC è influenzata in maniera decisiva da un'apoptosi assente o difettiva (2). Gli studi sulla capacità che le cellule di B-LLC hanno di evitare l'apoptosi sono essenzialmente incentrati sulla famiglia Bcl-2 (21-23). Infatti, e pur in assenza della traslocazione t(14;18) tipica del linfoma follicolare, la proteina Bcl-2 cioè il classico antidoto all'apoptosi è iperespressa nelle cellule di B-LLC. Inoltre, le cellule di B-LLC esprimono elevati livelli anche di Bcl-xL e Bax, mentre Bcl-xS è presente soltanto in tracce ed in una ridotta percentuale di casi. Pertanto, il pattern di espressione dei geni della famiglia Bcl-2 è fortemente squilibrato in favore della soppressione dell'apoptosi (2). Un'altra molecola di notevole interesse è Fas (CD95) (24). Le cellule di LLC sono generalmente Fas negative e, quand'anche rese Fas positive da un processo di attivazione *in vitro* sono generalmente resistenti all'apoptosi mediata da Ab anti-Fas. Peraltro, nei casi in cui si osserva una sensibilità all'azione apoptogena di Ab anti-Fas questa sembra essere indipendente dall'espressione di Bcl-2.

Il meccanismo che sottende la iperespressione di Bcl-2 è sconosciuto e, al momento attuale, l'ipotesi più credibile è che l'iperespressione rappresenti la conseguenza di un stimolo fornito dal microambiente sotto forma di citochine, quali IL-4, IFN- γ e IFN- α . Questa possibilità è sottolineata dal fatto che *in vivo* le cellule di B-LLC si accumulano in maniera progressivamente inarrestabile; al contrario, quando vengono coltivate *in vitro* vanno rapidamente incontro a morte per apoptosi. Questo paradosso suggerisce che l'accumulo *in vivo* (conseguenza della difettiva apoptosi) sia da mettere in relazione ad una interrelazione tra la cellula neoplastica ed il microambiente, interrelazione che verrebbe a mancare *in vitro*. Numerose osservazioni sperimentali (25, 26) sostengono in maniera convincente il ruolo dei T linfociti e delle cellule stromali nell'amplificare un microambiente capace di inibire l'apoptosi dei B linfociti neoplastici. A sua volta, il deficit di apoptosi crea un milieu intracellulare che favorisce la progressione della malattia attraverso una aumentata sopravvivenza, l'incapacità di obbedire ai checkpoints del ciclo cellulare e la induzione della resistenza ai farmaci citostatici ed alla radiazioni. Le interazioni tra clone linfocitario e microambiente sono bidirezionali, sono regolate da molecole di adesione e rese attive dalla produzione di citochine e chemochine.

I dati relativi al problema dell'apoptosi nella LLC portano a tre sostanziali conclusioni: 1) la propensione che le cellule di LLC hanno ad andare spontaneamente in apoptosi *in vitro*

rappresenta un problema nell'interpretazione dei tests *in vitro* utilizzati per valutare l'attività proapoptotica di nuovi farmaci; 2) l'esagerata sopravvivenza ed il progressivo accumulo delle cellule di B-LLC appare essere selettivamente favorita dalla loro interazione con cellule del microambiente; 3) Bcl-2 é certamente rilevante, ma verosimilmente non rappresenta la risposta ultima e definitiva alla domanda su quali molecole e quali geni sono coinvolti nel controllo dell'apoptosi nella B-LLC.

Le cellule di B-LLC e la presentazione dell'Ag

L'immunodeficienza e l'autoimmunità sono probabilmente due aspetti correlati e riconducibili al possibile ruolo dei B linfociti di B-LLC come Ag-presenting cells (APC) (4). Le stesse cellule neoplastiche che si accumulano paiono rappresentare il maggior ostacolo alla produzione di Ab normali e dunque il fattore che determina la progressiva immunocompetenza (2, 27). Almeno quattro osservazioni sono in favore di questa possibilità: 1) le cellule di B-LLC secernono elevate quantità di TGF- β che é un potente inibitore della proliferazione B linfocitaria; 2) esse rilasciano anche alti livelli del recettore solubile del recettore della IL-2 che potrebbe adsorbire la IL-2 circolante e dunque regolare negativamente l'azione dei T linfociti helper; 3) i B linfociti normali attivati sono eccellenti APC, mentre i B linfociti anergici hanno una capacità APC nettamente ridotta che può però essere ripristinata dai segnali forniti dai linfociti T helper. I bassi livelli di sIg, la difettosa espressione di BCR e la mancata espressione delle molecole costimolatorie CD80 e CD86 spiega l'incapacità delle cellule di B-LLC a funzionare come APC; 4) l'accumulo di cellule neoplastiche CD40+ che regolano negativamente l'espressione del CD40 ligando (CD154) sulla superficie dei T linfociti helper interferisce in modo decisivo con l'espletamento di una corretta B/T cognate interaction Ag-specifica (27).

Se la B-LLC é caratterizzata dall'accumulo monoclonale di B linfociti CD5+ anergici e autoreattivi capaci di produrre autoAb naturali polireattivi, diventa conseguente domandarsi perché le manifestazioni autoimmuni che occorrono in così alta percentuale sono invece causate da autoAb policlonali e perché gli autoAb patogeni hanno un bersaglio antigenico ristretto alla linea emopoietica, essendo diretti quasi esclusivamente contro Ag propri della membrana eritrocitaria (anemia emolitica autoimmune) o piastrinica (piastrinopenia autoimmune). La policlonalità degli autoAb patogeni di per se stessa garantisce che essi non vengono prodotti dal clone neoplastico. Inoltre, questi autoAb sono di classe IgG, monoreattivi e ad alta affinità (3).

Un'interpretazione che consente di mettere insieme i diversi pezzi del puzzle é fornita dalla possibilità che, in un contesto appropriato, le cellule di B-LLC possano fungere da APC capaci di presentare ai B linfociti normali residui Ag selettivamente ristretti (4). *In vitro*, la stimolazione mediante CD40L del CD40 espresso sulla superficie dei B linfociti di B-LLC regola positivamente l'espressione di CD80 e CD86 e trasforma i B linfociti neoplastici anergici CD80-, CD86- in APC CD80+, CD86+ assai efficienti (27). E' verosimile che *in vivo* le cellule di B-LLC possano, nell'appropriato microambiente, essere attivate dal sistema CD40-CD40L a diventare efficienti APC. E' intuitivo pensare che il microambiente più appropriato a questo tipo di attivazione sia il microambiente splenico. Una delle funzioni fondamentali della milza é quella emocateretica, cioè il sequestro e la rimozione delle cellule ematiche senescenti e/o anormali. Ne consegue che le cellule di B-LLC che si accumulano

progressivamente nella milza finiscono per essere incessantemente esposte ad un gran numero di prodotti di degradazione di cellule ematiche anucleate (eritrociti e piastrine) rimosse dal circolo dal sistema reticoloendoteliale splenico. Non é quindi irragionevole ipotizzare (4) che nel microambiente splenico le cellule di B-LLC vengano a contatto con forme solubili di strutture di membrana eritrocitaria e/o piastrinica e, previa attivazione da parte dei T linfociti attraverso il sistema CD40/CD40L, acquisiscano la capacità di presentare questi prodotti di degradazione di membrana (autoAg) ai B linfociti residui normali. Questi potrebbero essere stimolati a produrre autoAb monoreattivi, patogeni, specificamente mirati contro le strutture di membrana self. Questa ipotesi non solo può spiegare la ristretta specificità degli autoAb patogeni della B-LLC, ma, dal momento che le cellule rimosse dalla milza nell'espletamento della funzione emocateretica sono anucleate, può anche spiegare perché gli autoAb che caratterizzano le malattie autoimmuni sistemiche, quali Ab anti nucleo e anti-DNA, siano tipicamente assenti nella B-LLC e perché malattie autoimmuni sistemiche nella B-LLC siano praticamente assenti.

Bibliografia

1. Rozman C, Montserrat E. *New Engl J Med* 333: 1052, 1995
2. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. *J Clin Oncol* 17:399, 1999
3. Kipps T, Carson DA. *Blood* 81:2475, 1993
4. Caligaris-Cappio F. *Blood* 87:2615, 1996
5. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. *J Clin Invest* 102:1515, 1998
6. Schroeder HW, Dighiero G. *Immunol Today* 15:288, 1994
7. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. *Blood* (in press)
8. Damle RN, Wasill T, Fais F et al. *Blood* (in press)
9. Pistoia V. *Immunol Today* 18:343, 1997
10. Zomas AP, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Seon BK, Catovsky D. *Leukemia* 10:1966, 1996
11. Hashimoto S, Chiorazzi N, Gregersen PK. *Mol Immunol* 32:651, 1995
12. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. *Blood* 93:2327, 1999
13. Dohner H, Stilgenbauer S, Doner K, Bentz M, Lichter P. *J Mol Med* 77:266, 1999
14. Corcoran MM, Rasool O, Liu Y, et al. *Blood* 91:1382, 1998
15. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. *Blood* 89:4153, 1997
16. Matutes E, Oscier DG, Garcia-Marco J, et al. *Brit J Haematol* 92:282, 1996
17. Gaidano GL, Ballerini P, Gong P et al. *Proc Nat Acad Sci USA* 88:5413, 1991
18. Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, Dohner H, Schriever F. *Blood* 93:624, 1999
19. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, et al. *Cancer Res* 1:24, 1999
20. Stankovic T, Weber P, Stewart G et al. *Lancet* 353:26, 1999
21. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. *Blood* 93:3587, 1999
22. Yang E, Korsmeyer SJ. *Blood* 88:386, 1996
23. Reed JC. *Nature* 2387:773, 1997
24. Mainou-Fowler T, Prentice AG. *Leuk Lymphoma* 21:369, 1996
25. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. *Leukemia* 9:1227, 1995
26. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Strychmans P. *Blood* 91:2387, 1998
27. Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. *Nature Med* 3:984, 1997

