

Daniela Capello

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

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Il Anno di Corso

Anno Accademico 2003-2004

Relazione Scientifica

Elenco delle Pubblicazioni

Attività Formativa

Relazione Scientifica

PATOGENESI MOLECOLARE dei DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI ASSOCIATI a TRAPIANTO d'ORGANO SOLIDO

Introduzione

L'incidenza dei disordini linfoproliferativi è significativamente aumentata, rispetto la popolazione generale, negli individui affetti da immunodeficienza congenita, acquisita o iatrogenica. Lo sviluppo di neoplasie linfoidi nei riceventi di trapianto d'organo solido costituisce una importante complicanza dell'immunodeficienza iatrogenica connessa alle procedure trapiantologiche. L'incidenza varia secondo il grado di immunosoppressione indotta nel ricevente, ed è pertanto minima in corso di trapianto di rene o fegato e massima nei trapianti combinati di cuore-polmone. Nel complesso, la quasi totalità dei disordini linfoproliferativi post-trapianto (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders - PTLD) origina da cellule B, presenta infezione da parte di EBV, e si manifesta con un comportamento clinico aggressivo con coinvolgimento frequente di siti extra-nodali. Malgrado queste caratteristiche comuni, i PTLD sono fra loro clinicamente e biologicamente eterogenei. Infatti, non tutti i casi mostrano un'evidente origine monoclonale ed esiste una certa eterogeneità istopatologica. Inoltre, la tempistica d'insorgenza rispetto all'epoca del trapianto è variabile ed include casi ad insorgenza "precoce" (pochi mesi dal trapianto) e casi ad insorgenza "tardiva" (anni dal trapianto). Infine, alcuni PTLD regrediscono con la riduzione della terapia immunosoppressiva e, quindi, con il ripristino della risposta immunitaria, mentre altri casi progrediscono indipendentemente dallo stato immunologico del paziente.

Analogamente alle neoplasie linfoidi associate ad immunodeficienza acquisita (AIDS), la patogenesi dei PTLD è considerata un processo multifasico che coinvolge sia fattori predisponenti dell'ospite, sia alterazioni intrinseche al clone neoplastico. Esempi di fattori predisponenti dell'ospite includono la riduzione della immunosorveglianza indotta dalla terapia immunosoppressiva cronica e,

presumibilmente, l'esaltazione della stimolazione antigenica dovuta all'organo trapiantato ed alle infezioni ricorrenti.

L'eterogeneità clinico-patologica dei LPTLD ha indotto la formulazione di numerose proposte classificative. La proposta classificativa attualmente riconosciuta è la classificazione della World Health Organization (WHO), che distingue i PTLD in: *i*) iperplasia plasmacitica, *ii*) PTLD polimorfo e *iii*) PTLD monomorfo, comprendente linfoproliferazioni morfologicamente simili a quelle comunemente classificate, nel paziente immunocompetente, come linfoma diffuso a grandi cellule e linfoma di Burkitt. Malgrado i recenti progressi realizzati nella comprensione delle caratteristiche biologiche dei PTLD, l'attuale sistema classificativo di queste malattie, basato sulla sola morfologia, non ha valore prognostico.

Gli studi molecolari hanno contribuito significativamente alla comprensione dell'eterogeneità clinica e biologica delle malattie linfoproliferative. Esistono marcatori molecolari che consentono di distinguere le cellule B mature in gruppi a diverso stadio maturativo: *i*) cellule B vergini, *ii*) cellule B del centro germinativo (CG) e *iii*) cellule B post-CG. Il marcatore genotipico più utilizzato per lo studio della istogenesi delle cellule B è rappresentato dalla presenza di ipermutazione somatica nei geni che codificano per le regioni variabili delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline (IgV). Il processo di ipermutazione somatica si attiva nelle cellule B in attiva proliferazione nel microambiente del CG durante la risposta immune T-dipendente. Tale processo conduce all'accumulo progressivo di mutazioni puntiformi nelle sequenze codificanti le IgV e contribuisce alla produzione di cloni di cellule B esprimenti recettori per l'antigene ad elevata affinità. La presenza di mutazioni nei geni che codificano per le IgV indica, quindi, che un linfoma origina da cellule B del CG o post-CG. Un ulteriore livello di indagine, volta a verificare la presenza di eterogeneità intraclonale, dovuta ad un processo di ipermutazione "ongoing" sui geni IgV, fornisce una indicazione più precisa sulla origine cellulare del clone neoplastico. In particolare, la presenza di eterogeneità intraclonale suggerisce che il linfoma derivi da cellule allo stadio differenziativo di centroblasto con reazione tipo CG in atto; l'assenza di eterogeneità intraclonale suggerisce, invece, una derivazione del clone neoplastico da centroцитi del CG o cellule B post-CG che hanno terminato la reazione tipo CG. L'espressione delle proteine BCL6, MUM1 e CD138 sono i principali markers fenotipici utilizzati per definire la derivazione di un linfoma da cellule B del CG o post-CG. BCL6 è un regolatore trascrizionale selettivamente espresso dalle cellule B del CG, MUM1 identifica

le cellule B che stanno uscendo dal CG e le cellule B post-CG, mentre CD138 è un marker specifico delle cellule B pre-terminalmente differenziate.

Durante il primo anno di ricerca è stata effettuata un'analisi dettagliata dell'istogenesi molecolare dei PTLD. Utilizzando i marcatori genotipici e fenotipici precedentemente descritti, abbiamo potuto dimostrare che la quasi totalità dei PTLD deriva da cellule B transitate attraverso il CG, indipendentemente dal tipo di organo trapiantato, dall'intervallo di tempo trascorso fra il trapianto e l'insorgenza del linfoma, dall'istologia e dalla sede di origine del tumore. Malgrado la comune derivazione da cellule B che hanno transitato attraverso il CG, i PTLD rivelano un certo grado di eterogeneità molecolare e fenotipica che riflette un differente stadio di maturazione e competenza immunologica della cellula B di origine. Tale eterogeneità può essere suddivisa in tre gruppi: i) i PTLD che presentano le caratteristiche di una cellula B residente nel CG e che sta attivamente manifestando una reazione tipo CG. Questi PTLD presentano un processo di ipermutazione somatica ongoing, esprimono BCL6 e sono morfologicamente classificati come DLBCL centroblastici o BL; ii) PTLD con fenotipo BCL6⁻/MUM1⁺/CD138⁻ e comprendenti i PTLD polimorfi ed i linfomi diffusi a grandi cellule immunoblastici. Tali PTLD hanno concluso la reazione del CG ma non hanno ancora raggiunto gli stadi terminali di differenziamento, iii) PTLD che originano da cellule B post-CG pre-terminalmente differenziate con fenotipo BCL6⁻/MUM1⁺/CD138⁺. Vi sono compresi i PTLD morfologicamente classificati come polimorfi e linfomi diffusi a grandi cellule immunoblastici. Nel corso del nostro studio, abbiamo, inoltre, riscontrato un'elevata percentuale di PTLD privi di riarrangiamento funzionale delle Ig. Un recettore per l'antigene (BCR) funzionale è un requisito essenziale perché la cellula B non vada incontro ad apoptosi all'interno del CG ed è inoltre necessario per lo sviluppo e progressione di molti linfomi. E' possibile che i PTLD privi di BCR funzionale siano protetti dall'apoptosi attraverso meccanismi diversi dall'interazione con l'antigene.

In questo secondo anno di ricerca abbiamo approfondito lo studio della patogenesi e della istogenesi dei PTLD monoclonali mediante la caratterizzazione molecolare dei riarrangiamenti IgV. Il progetto è stato articolato in tre fasi così distinte: i) determinazione dello stato funzionale dei geni IgV delle catene pesanti e leggere per definire l'incidenza di PTLD con BCR funzionale e BCR non funzionale, ii) analisi del profilo mutazionale e dell'utilizzo preferenziale di geni IgV, dei PTLD con BCR

funzionale, allo scopo di definire il ruolo della stimolazione antigenica nello sviluppo e progressione della malattia; iii) caratterizzazione molecolare dei PTLD con BCR non funzionale allo scopo di comprendere i meccanismi antiapoptotici non dipendenti dall'interazione del BCR con l'antigene.

Materiali e Metodi

Pannello tumorale. Questo studio è stato effettuato su 54 campioni di LPT monoclonali a cellule B derivati da 54 pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido, 41 uomini e 13 donne. L'età media è di 45,5 anni (1-67) Il tempo medio trascorso fra il trapianto e l'insorgenza del linfoma è di 72 mesi (2-158). In base alla classificazione di Armitage, 9 casi sono stati definiti ad insorgenza precoce (<12 mesi dal trapianto) e 45 casi ad insorgenza tardiva (>12 mesi dal trapianto). Quattordici casi sono stati classificati di stadio I, 15 di stadio II, 10 di stadio III e 15 di stadio IV. I campioni, in parte fissati in formalina ed in parte congelati, sono stati classificati, in base alla classificazione WHO, in *Polymorphic Cell Lymphoma* (PCL; n=16), *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL; n=35) *Burkitt Lymphoma* (BL; n=3). I casi classificati come DLBCL sono stati ulteriormente suddivisi, in base alla morfologia, in DLBCL centroblastici (n=17) e DLBCL immunoblastici (n=18).

Analisi Molecolare. I riarrangiamenti IgV sono stati ottenuti mediante PCR utilizzando un set di primers senso, specifici per le diverse famiglie V_H e V_L , associati a primers antisenso, degenerati, in grado di riconoscere i diversi segmenti J_H , J_k o J_λ . I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi in agarosio e sottoposti a sequenziamento diretto. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed allineate alle sequenze depositate nel database "*V-BASE sequenze directory*" (MRC Centre for protein Engineering, Cambridge, UK) per determinare le sequenze germinali V, D e J d'origine e definire il tasso di mutazione della regione V. Le sequenze V_H sono state considerate mutate se il tasso di mutazione risultava \geq e al 2.0%. Per valutare la distribuzione delle mutazioni nelle complementarity determining regions (CDRs) e framework region (FRs) sono stati utilizzati i modelli statistici binomiale e multinomiale.

Analisi della configurazione del K-deleting Element (KDE). Lo stato di inattivazione del locus k è stato definito in seguito all'analisi della configurazione del KDE mediante due distinte PCR. Con la prima reazione è stata determinata la presenza di riarrangiamento del KDE con il 'Recombination Signal Sequence' localizzato all'interno dell'introne frapposto fra il segmento Jk e la regione Ck. Con la seconda reazione è stata determinata la presenza di riarrangiamento del KDE con un segmento Vk

Analisi delle presenza di infezione virale. La presenza di infezione del clone tumorale da parte di EBV è stata valutata mediante ibridazione *in situ* dei trascritti virali EBER. I casi EBER+ sono stati analizzati per l'espressione delle proteine virali LMP1 e EBNA2, con anticorpi specifici, mediante tecniche di immunistochemical.

Risultati

Analisi dei riarrangiamenti V_H nello spettro clinico-patologico dei PTLD. Utilizzando diverse strategie di PCR è stato possibile ottenere un riarrangiamento clonale V_H in tutti i PTLD analizzati. Solo 44/54 (82%) riarrangiamenti V_H sono risultati, in seguito all'analisi di sequenza, funzionali. In 5 casi il riarrangiamento è risultato non funzionale a causa di un riarrangiamento VDJ che non ha mantenuto la cornice di lettura corretta. In 3 casi, invece, il riarrangiamento è diventato non funzionale a causa dell'introduzione di codoni di stop in seguito al processo di ipermutazione somatica (mutazioni *crippling*). In due casi il riarrangiamento è risultato non funzionale in seguito a riarrangiamento aberrante costituito da una fusione V-VDJ, in un caso e un riarrangiamento VDJ-J nel secondo caso. In nessuno di questi 10 casi è stato possibile identificare il riarrangiamento funzionale.

Nel complesso, le frequenze relative delle famiglie e dei geni V_H funzionali utilizzati dai PTLD riflettono il repertorio di riarrangiamenti riscontrato nelle cellule B normali mature. In particolare, la famiglia V_H3 , che rappresenta la famiglia V_H con più geni ed è, normalmente, la più frequentemente utilizzata, è stata riscontrata in 19/44 (43%) casi, seguita dalla famiglia V_H4 (14/44; 33%) e dalla famiglia V_H1 (6/44; 14%). Per quanto riguarda l'utilizzo dei segmenti D e J_H non sono stati riscontrate differenze rispetto il repertorio B normale.

Analisi dei riarrangiamenti V_L nello spettro clinico-patologico dei PTLD. Utilizzando diverse strategie di PCR è stato possibile ottenere un riarrangiamento V_L clonale in 43/54 (80%) PTLD analizzati. Di questi, solo 26/43 (60%) riarrangiamenti V_L sono risultati, in seguito all'analisi di sequenza, potenzialmente funzionali. In 2 casi il riarrangiamento è risultato non funzionale a causa di un riarrangiamento VDJ che non ha mantenuto la cornice di lettura corretta. In 5 casi, invece, il riarrangiamento è diventato non funzionale a causa dell'introduzione di codoni di stop in seguito al processo di ipermutazione somatica (mutazioni *crippling*). In dieci casi il riarrangiamento V_k potenzialmente funzionale è risultato inattivato in seguito a riarrangiamento del KDE. L'analisi dei casi con riarrangiamento V_L funzionale ha identificato un riarrangiamento V_k in 12/26 (46%) PTLD e un riarrangiamento V_λ in 12/26 (46%) casi. In due casi sono stati identificati 1 riarrangiamento V_k e 1 riarrangiamento V_λ funzionali.

Nel complesso, le frequenze relative delle famiglie e dei geni V_L funzionali utilizzati dai PTLD riflettono il repertorio di riarrangiamenti riscontrato nelle cellule B normali mature. In particolare, per quanto riguarda il locus V_k , la famiglia V_{k1} , è la più frequentemente utilizzata (5/12, 42%), seguita dalla famiglia V_{k3} (3/12; 25%) e dalla famiglia V_{k4} (2/12; 17%). Per quanto riguarda il locus V_λ , la famiglia $V_{\lambda1}$, è la più frequentemente utilizzata (3/12, 25%), seguita dalle famiglie $V_{\lambda3}$ e $V_{\lambda4}$ (2/12; 17% per entrambe). Anche per quanto riguarda l'utilizzo dei segmenti J_L non sono stati riscontrate differenze rispetto il repertorio B normale.

Combinando i risultati ottenuti dall'analisi dei riarrangiamenti V_H e V_L risulta che soli 23/54 (43%) PTLD codificano per un BCR potenzialmente funzionale. In 31/54 (57%) casi, o il riarrangiamento V_H o il riarrangiamento V_L , o entrambi sono non risultati non produttivi.

Analisi del profilo mutazionale dei geni V_H e V_L nello spettro clinico-patologico dei PTLD. La presenza di ipermutazione somatica è stata riscontrata in 44/54 PTLD, con una frequenza media di mutazione del $9,2 \pm 5,9\%$ (mediana 8,6%, intervallo 2,1-24%). I casi con riarrangiamenti IgV non mutati erano prevalentemente P-PTLD (5/16; 31%) mentre costituivano solo una frazione di DLBCL-CB (2/17; 18%) e DLBCL-IB (2/18; 11%). L'analisi mutazionale dei geni V_H e V_L è stata eseguita sui soli casi con

riarrangiamento funzionale, in quanto i riarrangiamenti non produttivi non possono essere sottoposti ad alcun tipo di selezione da parte dell'ambiente extra-cellulare. Il profilo di distribuzione delle mutazioni che causano una sostituzione aminoacidica (*Replacement mutations*, R) e di quelle che sono silenti (*Silent mutations*, S) all'interno delle diverse regioni codificanti del gene V_H è stato analizzato per definire se le cellule tumorali sono state selezionate in base alla capacità di esprimere di un antigene strutturalmente funzionale (regioni FRs strutturalmente conservate, con un eccesso di mutazioni S rispetto all'atteso) e per evidenziare la possibile selezione del clone tumorale in base alla capacità di legare, con elevata affinità, uno specifico antigene (un eccesso di mutazioni R, rispetto all'atteso, nelle regioni CDRs). L'analisi statistica della distribuzione delle mutazioni R e S all'interno delle regioni FRs e CDRs è stata eseguita su 29 LPT con riarrangiamento IgV funzionale e con tasso di mutazione >2,0%, utilizzando i modelli binomiale e multimomiale. Un eccesso statisticamente significativo di mutazioni S (p<0,05) nelle regioni FRs, rispetto a ciò che è atteso in base ad una distribuzione casuale delle mutazioni, è stato osservato in 12/29 (41%) PTLD. Un eccesso statisticamente significativo (p<0,05) di mutazioni R nelle regioni CDRs, rispetto a ciò che è atteso in base ad una distribuzione casuale delle mutazioni, è stato osservato in 8/29 (28%) PTLD.

Analisi della presenza di genoma virale in PTLD. Mediante ibridazione *in situ* dei trascritti virali EBER, la presenza di EBV è stata riscontrata in 30/52 (58%) PTLD, in particolare in 9/12 (75%) P-PTLD, 18/36 (50%) DLBCL e 3/4 BL/BLL. Tutti i casi in cui sono stati identificati esclusivamente riarrangiamenti V_H e/o V_L non funzionali sono risultati positivi per l'infezione da EBV

Discussione

L'obiettivo di questo studio è stato quello di contribuire alla comprensione della patogenesi e della istogenesi dei PTLD mediante un'analisi approfondita dei geni V_H e V_L riarrangiati in PTLD. Un primo aspetto che emerge dall'analisi mutazionale è che la quasi totalità dei PTLD origina da cellule B che hanno subito il processo di ipermutazione somatica, transitando attraverso il centro germinativo, mentre

una frazione di casi non ha subito il processo di ipermutazione somatica. Tale frazione di casi è costituita prevalentemente da P-PTLD. L'analisi di markers fenotipici di istogenesi effettuata durante il primo anno di ricerca ha suggerito che i P-PTLD originano da cellule B post- CG che non hanno ancora raggiunto gli stadi terminali di differenziamento. Si può ipotizzare che almeno una frazione di P-PTLD derivi da cellule B che sono transitate attraverso il CG ma che non sono state in grado di attivare il processo di ipermutazione somatica. La sopravvivenza di tali cellule nel CG è da imputarsi a EBV o/e ad altre lesioni genetiche in grado di bloccare il processo apoptotico.

Un secondo aspetto che emerge da questo studio è l'esistenza di più del 50% di PTLD con riarrangiamenti IgV non funzionali. In base alle caratteristiche mutazionali dei riarrangiamenti non funzionali, in particolare in base all'elevata frequenza di casi con mutazioni crippling o con riarrangiamenti secondari delle catene pesanti, si può desumere che la in attivazione del BCR, nella maggior parte dei casi, ha avuto luogo durante il transito attraverso il centro germinativo. Dato che un recettore per l'antigene strutturalmente funzionale è richiesto per la sopravvivenza delle cellule B normali nel centro germinativo, il riscontro di una elevata frequenza di casi incapaci di esprimere catene V_H e V_L funzionali suggerisce che una frazione di PTLD origini da cellule B che, pur non esprimendo i recettori di superficie funzionali, sfuggono l'apoptosi e sono in grado di proliferare in assenza di stimolazione da parte dell'antigene. L'espansione clonale di cellule B altrimenti destinate alla morte per apoptosi potrebbe essere sostenuta dal meccanismo che coinvolge l'infezione da EBV, infatti l'espressione delle oncoproteine LMP1 e/o LMP-2A mimano i segnali normalmente generati da CD40 e dal BCR.

Infine, per quanto riguarda i PTLD che esprimono Ig funzionali, l'analisi statistica del profilo mutazionale suggerisce che meno del 50% dei casi origini da cellule B selezionate per l'espressione di un recettore strutturalmente funzionale e solo una piccola frazione di casi sia stato selezionato per l'espressione di un BCR ad elevata affinità di legame per l'antigene.

Nel complesso, quindi, questo studio evidenzia come i PTLD siano una malattia linfoproliferativa a cellule B mature in cui l'antigene svolge un ruolo marginale. L'obiettivo dei prossimi studi sarà duplice: da un lato si cercherà di comprendere quali siano i meccanismi attraverso i quali la cellula linfomatosa riesce a sfuggire alla morte per apoptosi indotta dalla mancanza di un BCR funzionale; parallelamente,

aumentando la casistica, si cercherà di caratterizzare la frazione di PTLD stimolati o/e selezionati dall'antigene.

Bibliografia

1. Penn I, Hammon W, Brettschneider L, Starzl TE. Malignant lymphoma in transplantation patients. *Transplant Proc.* 1969;1:106-112.
2. Greiner T, Armitage JO, Gross TG. Atypical lymphoproliferative diseases. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2000:133-146.
3. Harris N, Swerdlow S, Frizzera G, Knowles D, eds. *Post-transplant lymphoproliferative disorders.* Lyon: IARC Press; 2001.
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC Press; 2001.
5. Locker J, Nalesnik M. Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation. *Am J Pathol.* 1989;135:977-987.
6. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 1995;85:552-565.
7. Leblond V, Davi F, Charlotte F, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol.* 1998;16:2052-2059.
8. Dotti G, Fiocchi R, Motta T, et al. Epstein-Barr virus negative lymphoproliferative disorders in long-term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation.* 2000;69:827-833.
9. Swinnen LJ. Transplantation-related lymphoproliferative disorder: a model for human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Semin Oncol.* 2000;27:402-408.
10. Muti G, Cantoni S, Oreste P, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. *Haematologica.* 2002;87:67-77.
11. Müller-Hermelink HK, Greiner A. Molecular analysis of human immunoglobulin heavy chain variable genes (IgVH) in normal and malignant B cells. *Am J Pathol.* 1998;153:1341-1346.
12. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341:1520-1529.
13. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, Zhu D, Forconi F, Hamblin TJ. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res.* 2001;83:81-116.

14. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:11816-11821.
15. Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutations of Ig genes. *Science*. 1998;280:1750-1752.
16. Cattoretti G, Chang C-C, Cechova, C, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 1995;86:45-53.
17. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000;95:2084-2092.
18. Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, et al. Expression profile of MUM1/IRF-4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood*. 2001;97:744-751.
19. Ariatti C, Vivenza D, Capello D, et al. Common-variable immunodeficiency-related lymphomas associate with mutations and rearrangements of BCL-6: pathogenetic and histogenetic implications. *Hum Pathol*. 2000;31:871-873.
20. Carbone A, Gloghini A, Capello D, Gaidano G. Genetic pathways and histogenetic models of AIDS-related lymphomas. *Eur J Cancer*. 2001;37:1270-1275.
21. Gaidano G, Cerri M, Capello D, et al. Molecular histogenesis of plasmablastic lymphoma of the oral cavity. *Br J Haematol*. 2002;119:622-628.
22. Timms JM, Bell A, Flavell JR, et al. Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet*. 2003;361:217-223.
23. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukaemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102:1515-1525.
24. Fais F, Gaidano G, Capello D, et al. Immunoglobulin V region gene use and structure suggest antigen selection in AIDS-related primary effusion lymphomas. *Leukemia*. 1999;13:1093-1099.
25. Küppers R, Zhao M, Hansmann M-L, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 1993;12:4955-4967.
26. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*. 2000;95:651-659.
27. Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Variable gene analysis of B cell subsets derived from a 4-years-old child. Somatic mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med*. 1994;180:1383-1393.
28. Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today*. 1994;15: 367-373.

29. Lossos IS, Tibshirani N, Narasimhan B, Levy R. The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol.* 2000;165:5122-5126.
30. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.* 1988;16:10881-10890.
31. Gaidano G, Pasqualucci L, Capello D, et al. Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2003; in press.
32. Farner NL, Dörner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V λ J λ repertoire. *J Immunol.* 1999;162:2137-2145.
33. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1981;75:734-738.
34. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984;32:219-229.
35. Flenghi L, Ye BH, Fizzotti M, et al. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am J Pathol.* 1995;147:405-411.
36. Wijdenes J, Voojjs WC, Clément C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996;94:318-323.
37. Armitage JM, Kormos RL, Stuart RS, et al. Post-transplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression. *J Heart Lung Transplant.* 1991;10:877-887.
38. Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000;95:1797-1803.
39. Brezinschek H-P, Foster SJ, Brezinschek RI, Dörner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. *J Clin Invest.* 1997;99:2488-2501.
40. Kraj P, Rao SP, Glas AM, Hardy RR, Milner ECB, Silberstein LE. The human heavy chain IgV region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J Immunol.* 1997;158:5824-5832.
41. Atkinson MJ, Cowan MJ, Feeney AJ. New alleles of IGKV genes A2 and A18 suggest significant human IGKV locus polymorphism. *Immunogenetics.* 1996;44:115-120.
42. Paessler M, Kossev P, Tsai D, et al. Expression of SHP-1 phosphatase indicates post-germinal center cell derivation of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest.* 2002;82:1599-1606.
43. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell.* 1991;65:1107-1115.

44. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.* 1997;16:998-1008
45. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*

Elenco delle Pubblicazioni

Anno 2003-2004

Lavori su riviste internazionali con Impact Factor

- A1. **Capello D**, Cerri M, Muti G, Berra E, Oreste P, Deambrogi C, Rossi D, Dotti G, Conconi A, Viganò M, Magrini U, Ippoliti G, Morra E, Gloghini A, Rambaldi A, Paulli M, Carbone A, Gaidano G
MOLECULAR HISTOGENESIS OF POSTTRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS
Blood 102:3775-3785, 2003 **I.F. 10.120**
- A2. Forconi F, **Capello D**, Berra E, Rossi D, Gloghini A, Cerri M, Muti G, Morra E, Paulli M, Magrini U, Lucioni M, Rambaldi A, Lauria F, Carbone A, Stevenson FK, Gaidano G
INCIDENCE OF NOVEL N-GLYCOSYLATION SITES IN THE B-CELL RECEPTOR OF LYMPHOMAS ASSOCIATED WITH IMMUNODEFICIENCY
Br J Haematol,124:604-609, 2003 **I.F. 3.267**
- A3. Rossi D, Gaidano G, Gloghini A, Deambrogi C, Franceschetti S, Berra E, Cerri M, Vendramin C, Conconi A, Viglio A, Muti G, Oreste P, Morra E, Paulli M, **Capello D**, Carbone A
FREQUENT ABERRANT PROMOTER HYPERMETHYLATION OF O-6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE AND DEATH-ASSOCIATED PROTEIN KINASE GENES IN IMMUNODEFICIENCY-RELATED LYMPHOMAS
Br J Haematol 123:475-478, 2003 **I.F. 3.267**
- A4. Nardini E, Neri F, Vicenzi E, **Capello D**, Gaidano G, Vitolo U, Menard S, Balsari A
THYMIC FUNCTION AND IMMUNOGLOBULIN MUTATION GENETYPE IN B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS
Int J Cancer 107:958-961, 2003 **I.F. 4.375**
- A5. Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poirel H, Buhard O, Aubry A, Martin A, Krimi A, Leblond V, Gabarre J, Davi F, Charlotte F, Berger F, Gaidano G, **Capello D**, Canioni D, Bordessoule D, Feuillard J, Gaulard P, Delfau MH, Ferlicot S, Eclache V, Prevot S, Guettier C, Lefevre PC, Adotti F, Hamelin R.
THE MUTATOR PATHWAY IS A FEATURE OF IMMUNODEFICIENCY-RELATED LYMPHOMAS
PNAS 101:5002-5007, 2004 **I.F. 4.233**
- A6. Rossi D, **Capello D**, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M, Carbone A, Gaidano G.
ABERRANT PROMOTER METHYLATION OF MULTIPLE GENES THROUGHOUT THE CLINICO-PATHOLOGIC SPECTRUM OF B-CELL NEOPLASIA
Haematologica 89:154-164, 2004 **I.F. 3.453**

- A7. Ferreri AJ, Dell'Oro S, **Capello D**, Ponzoni M, Ruzzolino P, Rossi D, Pasini D, Ambrosetti A, Orvieto E, Ferrarese F, Arrigoni G, Foppoli M, Reni M, Gaidano G
 ABERRANT METHYLATION IN THE PROMOTER REGION OF THE REDUCED FOLATE CARRIER GENE IS A POTENTIAL MECHANISM OF RESISTENCE TO METHOTREXATE IN PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMAS
Br J Haematol 126:657-664 89:154-164, 2004 **I.F. 3.267**
- A8. Cerri M, **Capello D**, Muti G, Rambaldi A, Paulli M, Gloghini A, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Franceschetti S, Conconi A, Morra E, Pasqualucci L, Carbone A, Gaidano G
 ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION IN POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS
Br J Haematol in corso di stampa, 2004 (lettera) **I.F. 3.267**
- A9. **Capello D**, Guarini A, Berra E, Mauro FR, Rossi D, Ghia E, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G.
 EVIDENCE OF BIASED IMMUNOGLOBULIN VARIABLE GENE USAGE IN HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
Leukemia, in corso di stampa, 2004 **I.F. 5.116**

Lavori su riviste nazionali senza Impact Factor

- B1. **Capello D**, Berra E, Cerri M, Gaidano G.
 POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. MOLECULAR ANALYSIS OF HISTOGENESIS AND PATHOGENESIS
Minerva Med 95:53-64, 2004

Abstract su atti di Congressi internazionali e nazionali

- 1) **Capello D**, Guarini A, Rossi D, Berra E, Mauro FR, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G. A SUBSET OF HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (B-CLL) DISPLAY A BIASED USAGE OF VH3-72 AND IgVK GENES: IMPLICATIONS FOR ANTIGEN RECOGNITION IN LEUKEMOGENESIS. *Blood* 102: 187a, 2003
- 2) Rossi D, Cerri M, **Capello D**, Berra E, Muti G, Rambaldi A, Paulli M, Gaidano G. ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION IS INVOLVED IN THE MOLECULAR PATHOGENESIS OF POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. *Blood* 102: 896a, 2003
- 3) Rossi D, Guarini A, **Capello D**, Berra E, Mauro FR, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G. BIASED USAGE OF VH3-72 AND IGVK GENES AND HOMOLOGOUS IGVH AND IGV L CDR3S IN HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: IMPLICATIONS FOR ANTIGEN RECOGNITION IN LEUKEMOGENESIS. *The Hematology Journal* 5 (s2):S97, 2003
- 4) Cerri M, Rossi D, **Capello D**, Muti G, Berra E, Deambrogi C, Vendramin C, Franceschetti S, Morra E, Rambaldi A, Paulli M, Gaidano G. ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION IS INVOLVED IN THE MOLECULAR PATHOGENESIS OF POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. *The Hematology Journal* 5 (s2):S3-S4, 2003
- 5) Berra E, Deambrogi C, **Capello D**, Rossi D, Pasqualucci L, Cerri M, Matolcsy A, Paulli M., Dalla-Favera R, Gaidano G. ABERRANT HYPERMUTATION OF MULTIPLE PROTO-ONCOGENES DURING THE TRANSFORMATION OF FOLLICULAR LYMPHOMA INTO DIFFUSE LARGE CELL LYMPHOMA. *Tumori* 3: 145, 2004

- 6) Cerri M, **Capello D**, Muti G, Berra E, Oreste P, Deambrogi C, Rossi D, Dotti G, Conconi A, Viganò M, Magrini U, Ippoliti G, Morra E, Gloghini A, Rambaldi A, Paulli M, Carbone A, Gaidano G. MOLECULAR PATHOGENESIS AND HISTOGENESIS OF POSTTRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. *Tumori* 3: 147, 2004-10-01
- 7) **Capello D**, Pasqualucci I, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Gloghini A, Cerri M, Carbone A, Dalla-Favera R, Gaidano G. ABERRANT HYPERMUTATION OF MULTIPLE PROTO-ONCOGENES IN AIDS-RELATED LYMPHOMAS. *Tumori* 3: 146, 2004
- 8) Berra E, Cerri M, Gloghini A, Deambrogi C, Rossi D, Franceschetti S, Larocca LM, Carbone A, Gaidano G, **Capello D**. EVIDENCE OF BIASED USAGE OF IMMUNOGLOBULIN VARIABLE GENES IN AIDS-RELATED NON-HODGKIN'S LYMPHOMA: IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF THE DISEASE. *Haematologica* 89 (s6):22-23, 2004
- 9) **Capello D**, Guarini A, Berra E, Rossi D, Mauro FR, Cerri M, Deambrogi C, Logan J, Foà R, Gaidano G. HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIAS DISPLAY A BIASED USAGE OF IGV GENES AND HOMOLOGOUS IGVH AND IGLV CDR3S: IMPLICATIONS FOR ANTIGEN RECOGNITION IN LEUKEMOGENESIS. *Haematologica* 89 (s6):165-166, 2004
- 10) Rossi D, Cerri M, **Capello D**, Deambrogi C, Berra E, Franceschetti S, Conconi A, Vendramin C, Benevolo G, Paulli M, Pileri SA, Carbone A, Gaidano G. ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION IS INVOLVED IN PRIMARY MEDIASTINAL LARGE B-CELL LYMPHOMA AND PREFERENTIALLY AFFECTS THE PAX-5 GENE. *Haematologica* 89 (s6):170-171, 2004
- 11) **Capello D**, Dell'Oro S, Ponzoni M, Ruzzolino P, Rossi D, Pasini F, Ambrosetti A, Orvieto E, Ferrarese F, Arrigoni G, Foppoli M, Reni M, Gaidano G, Ferreri AJ. ABERRANT METHYLATION IN THE PROMOTER REGION OF THE REDUCED FOLATE CARRIER GENE IS A POTENTIAL MECHANISM OF RESISTANCE TO METHOTREXATE IN PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMAS. *Haematologica* 89 (s6):171-172, 2004
- 12) Berra E, Marino M, **Capello D**, Cerri M, Deambrogi C, Rossi D, Franceschetti S, Vendramin C, Gloghini A, Carbone A, Gaidano G. PHYSIOLOGICAL AND ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION MECHANISM IN PRIMARY BREAST LYMPHOMA: CLUES FOR THE HISTOGENESIS AND PATHOGENESIS OF THE DISEASE. *Haematologica* 89 (s6):177-178, 2004
- 13) Ascoli V, Natale ME, Giannakakis K, Amoroso F, Carboni V, Richetta G, Calabrò ML, **Capello D**. HHV8 POSITIVE PEL, LONGSTANDING KAPOSI SARCOMA AND IDIOPATIC CD4+ T-LYMPHOCYTOPENIA *Haematologica* 89 (s6):178, 2004
- 14) Cerri M, **Capello D**, Muti G, Rambaldi A, Paulli M, Gloghini A, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Vendramin C, Morra E, Pasqualucci L, Carbone A, Gaidano G. ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION OF PROTO-ONCOGENES IN POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. *Haematologica* 89 (s6):191, 2004
- 15) Cerri M, Muti G, Oreste P, Berra E, Deambrogi C, Dotti G, Rossi D, Lucioni M, Gloghini A, Carbone A, Morra E, Paulli M, Rambaldi A, Gaidano G, **Capello D** ANALYSIS OF IGV GENES SUGGESTS THAT MOST POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS DERIVE FROM B-CELLS THAT HAVE FAILED THE GERMINAL CENTRE REACTION. *Haematologica* 89 (s6):192, 2004
- 16) Deambrogi C, **Capello D**, Rossi D, Franceschetti S, Berra E, Cerri M, Vendramin C, Gloghini A, Carbone A, Gaidano G. HYPERMETHYLATION OF THE 5' CPG ISLAND OF THE FHIT

Seminari, relazioni e letture su invito

- 1) Incontro "Discutiamone Insieme" della Società Italiana di Ematologia Sperimentale "Nuovi marcatori prognostici nella leucemia linfatica cronica". Coordinatore: Prof. G. Gaidano. (Firenze, 11/3/2004). Relazione: **Utilizzo preferenziale di geni VH in pazienti altamente stabili ed indolenti**
- 2) Focus in Ematologia - 5 "Gestione infermieristica del paziente ematologico". Coordinatore: Prof. G. Gaidano. (Novara, 1/10/2004). Relazione: **Il ruolo del laboratorio nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie oncoematologiche**

Attività Formativa

SEMINARI e CORSI

- 1) -"TNF, anti-TNF ed autoimmunità" **Prof. Guido Valesini** (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza, Roma), (10 Marzo 2004)
- 2) -"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes" **Frédéric Rieux-Laucat**, INSERM 429, Hôpital Necker, Paris (3 Maggio 2004)
- 3) -"Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico" **Prof. Angiolo Benedetti**, Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Siena (28 Maggio 2004)
- 4) -"Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems" **Prof. David Murphy**, The Sir Henry Wellcome Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology, University of Bristol (13 Giugno 2004)
- 5) -"Pitfalls of genetic studies in liver disease" **Prof. Christopher Day**, Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK (14 Giugno 2004)
- 6) -"Meccanismi patogenetici della leucemia linfatica cronica" **Prof. Manlio Ferrarini**, IST e Università di Genova (30 Giugno 2004)

CONGRESSI E CONVEGNI

- 1) XLV Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Bergamo 9-12 Novembre 2003
- 2) 45th American Association of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, San Diego Convention Center (CA, USA), 4-10 Dicembre 2003
- 3) 9th Congress of the European Hematology Association (EHA), Ginevra, Svizzera, 10-13 Giugno 2004
- 4) VIII Congresso della Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES), Pavia, 14-16 Settembre 2004