

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE  
'A. AVOGADRO'  
XVII CICLO-DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

**ANALISI DEL MECCANISMO DI  
IPERMUTAZIONE SOMATICA FISIOLÓGICA ED  
ABERRANTE NELLE NEOPLASIE LINFOIDI B  
VIRUS CORRELATE**

Candidato: EVA BERRA

# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	pag. 4
1.1 Concetti generali	pag. 4
1.2 Istogenesi e patogenesi dei LNH a cellule B	pag. 6
1.3 Stimolazione antigenica e meccanismo di ipermutazione somatica	pag. 10
1.4 Ipermutazione somatica aberrante	pag. 14
1.5 Virus oncogeni	pag. 17
1.6 I B-LNH virus correlati	pag. 19
<b>2. Scopo del lavoro</b>	pag. 21
<b>3. Materiali e Metodi</b>	pag. 22
3.1 Pannello tumorale ed estrazione del DNA	pag. 22
3.2 Analisi mutazionale di PIM-1, PAX-5, RhoH/TTF, c-MYC esoni 1 e 2 e BCL6	pag. 23
3.3 Analisi mutazionale dei geni IgV <sub>H</sub> e IgV <sub>L</sub>	pag. 25
3.4 Oligonucleotidi proto-oncogeni	pag. 28
3.5 Oligonucleotidi IgV <sub>H</sub>	pag. 29
3.6 Oligonucleotidi IgV <sub>L</sub>	pag. 30
3.7 Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni VH	pag. 32
3.8 Analisi statistiche	pag. 33
3.9 Analisi dell'infezione virale	pag. 34
3.10 Analisi dei markers istogenetici negli AIDS-LNH	pag. 34
<b>4. Risultati</b>	pag. 35
4.1 Frequenza di ipermutazione aberrante negli AIDS-LNH	pag. 35
4.2 Frequenza di ipermutazione aberrante nei LNH HCV correlati	pag. 37
4.3 Analisi del profilo mutazionale della ipermutazione somatica di proto-oncogeni negli AIDS-LNH	pag. 38
4.4 Analisi del profilo mutazionale della ipermutazione somatica di proto-oncogeni nei LNH HCV correlati	pag. 43
4.5 Mutazioni di BCL6 negli AIDS-LNH	pag. 44

4.6 Mutazioni di BCL6 nei LNH HCV correlati	pag. 45
4.7 Utilizzo dei geni VH negli AIDS-LNH	pag. 45
4.8 Riarrangiamenti VL negli AIDS-LNH	pag. 48
4.9 Analisi della regione CDR3 dei geni IgV negli AIDS-LNH	pag. 51
4.10 Analisi del profilo mutazionale dei geni IgV negli AIDS-LNH	pag. 53
4.11 Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni VH negli AIDS-LNH	pag. 54
<b>5. Conclusioni</b>	pag. 56
<b>6. Bibliografia</b>	pag. 63
Ringraziamenti	

# 1.Introduzione

## *1.1 Concetti generali*

Il termine linfoma identifica due gruppi distinti di neoplasie: i linfomi non Hodgkin (LNH) e i linfomi di Hodgkin (LH). Gli studi condotti a partire dalla fine degli anni '70 hanno permesso di capire che queste neoplasie derivano dall'espansione clonale di cellule B o T a diversi stadi di differenziazione. La caratterizzazione molecolare delle più frequenti anomalie citogenetiche associate ai LNH ha permesso, inoltre, l'identificazione di un numero di geni alterati nei B o T LNH. La patogenicità di queste alterazioni è stata confermata dalla loro capacità di causare tumori negli animali transgenici. In più è stato dimostrato che queste lesioni genetiche sono selettivamente associate alle diverse categorie della malattia e rappresentano quindi un marcatore genetico specifico con possibile significato diagnostico per i vari sottotipi di LNH <sup>1,2</sup> (Figura 1).

In base alla classificazione proposta dalla World Health Organization (WHO) nel 1999, i linfomi sono classificati in distinte categorie clinico-patologiche omogenee dal punto di vista morfologico, immunofenotipico, molecolare e clinico <sup>2</sup>.

*Figura 2*

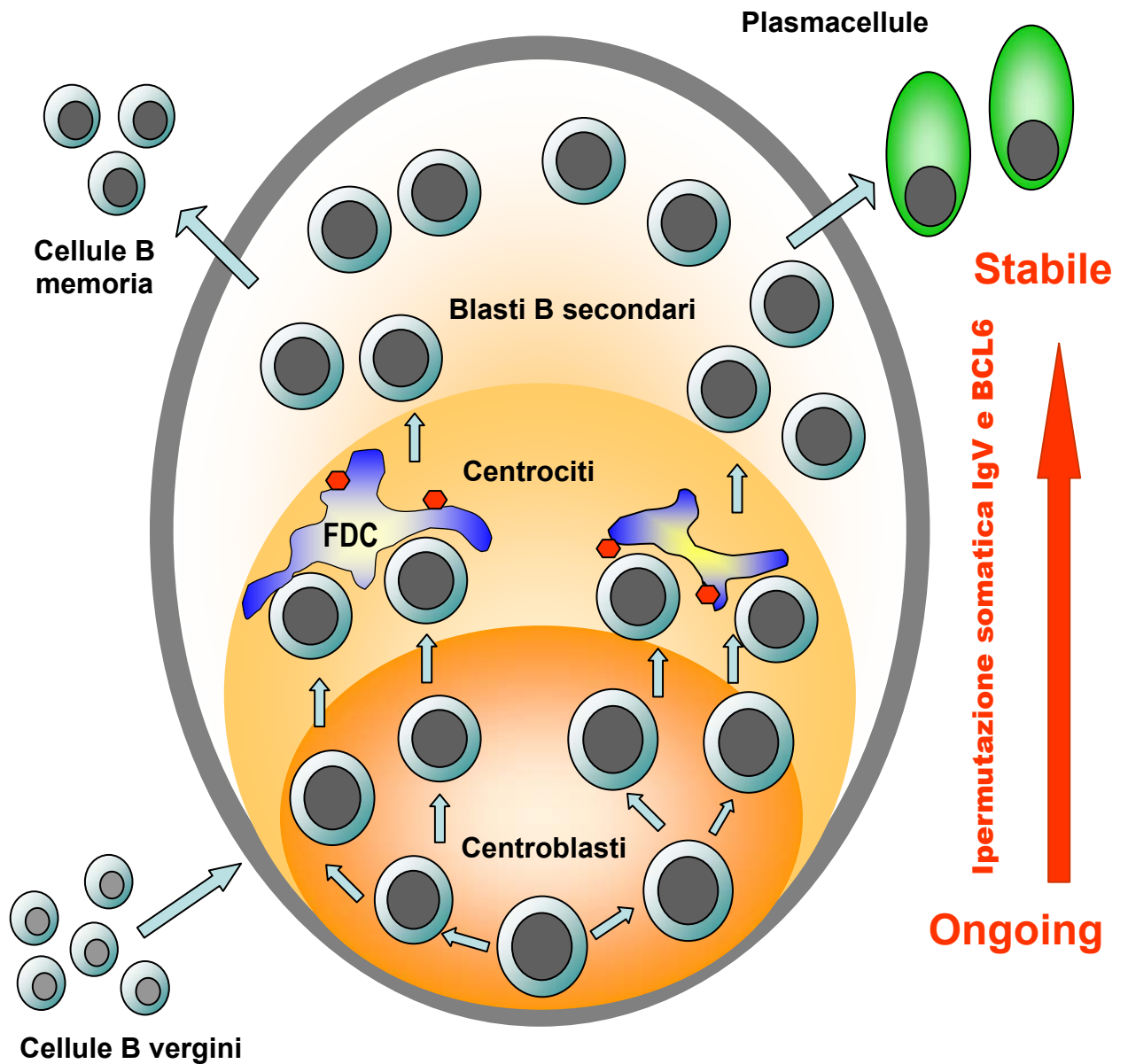
## ***1.2 Istogenesi e patogenesi dei linfomi non-Hodgkin a cellule B***

L'istogenesi dei linfomi può essere studiata identificando il preciso subset cellulare dal quale deriva l'espansione neoplastica.

I linfociti B sono generati nel midollo osseo come risultato di un processo multifasico di differenziazione<sup>3-5</sup>. I precursori delle cellule B cominciano il riarrangiamento dei geni immunoglobulinici (Ig) riarrangiando, in un primo momento, i geni delle catene pesanti (VH) seguiti poi da quelli delle catene leggere (VL). Se il precursore B esprime in superficie un anticorpo funzionale, viene selezionato positivamente all'interno del gruppo di cellule B periferiche. Se invece il riarrangiamento immunoglobulinico non è funzionale, questi precursori vengono eliminati all'interno del midollo. Per molte cellule B, il passo successivo al processo di maturazione è legato alla struttura istologica del centro germinativo (CG) presente nei linfonodi<sup>3-5</sup>. Il CG è costituito da una zona scura, caratterizzata dalla presenza di cellule B in rapida proliferazione e crescita, e da una zona chiara, nella quale le cellule B non proliferanti sono selezionate e indotte alla differenziazione grazie all'interazione con le cellule dendritiche e i linfociti T helper<sup>3-8</sup>. All'interno del CG, le cellule B accumulano mutazioni puntiformi all'interno dei geni delle regioni variabili delle immunoglobuline (IgV) (fenomeno conosciuto come *ipermutazione somatica, SHM*), che modifica l'affinità dell'anticorpo verso l'antigene. Solo le cellule B che hanno acquisito mutazioni che hanno

aumentato l'affinità dell'anticorpo sono positivamente selezionate e differenziano in cellule B memoria o plasmacellule, mentre la maggioranza delle cellule B muoiono per apoptosi all'interno del CG<sup>3-8</sup>.

E' stato dimostrato che, oltre ai geni immunoglobulinici, anche un proto-oncogene definito BCL6, acquisisce fisiologicamente mutazioni durante il transito della cellula B attraverso il CG. BCL6 appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali contenenti i domini zinc finger ed è espresso selettivamente dalle cellule B del CG. Modelli animali hanno dimostrato che BCL6 è indispensabile per la normale formazione del CG<sup>9</sup>. Le mutazioni dei geni IgV e BCL6 possono essere "ongoing" o stabili. La presenza di mutazioni "ongoing" suggerisce un'origine della cellula B dai centroblasti del CG, mentre la presenza di mutazioni stabili è consistente con la derivazione da centrociti tardivi o da cellule B post-CG che hanno terminato la reazione di SHM<sup>10,11,12</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Struttura del centro germinativo (CG). I geni BCL6 e IgV vengono colpiti fisiologicamente all'interno del CG dal meccanismo di ipermutazione somatica. Queste mutazioni possono essere stabili o "ongoing". La presenza di mutazioni "ongoing" suggerisce un'origine della cellula B dai centroblasti del CG, mentre la presenza di mutazioni stabili è consistente con la derivazione da centrocyti tardivi o da cellule B post-CG che hanno terminato la reazione di SHM

In base all'assenza o alla presenza di ipermutazione somatica dei geni IgV e BCL6, i B-LNH possono essere quindi distinti in due categorie istogenetiche:

(1) i B-LNH che derivano da cellule B pre-CG prive delle mutazioni nei geni IgV e BCL6 e rappresentati dal linfoma mantellare (LM) e da una frazione di



leucemie linfatiche croniche (LLC); e (2) i B-LNH che derivano da cellule B del CG caratterizzate dalla presenza di mutazioni in BCL6 e IgV e rappresentati dal linfoma follicolare (LF), dal linfoma linfoplasmocitoide (LLP), dal linfoma di Burkitt (LB), dal linfoma diffuso a grandi cellule (LDGC) e dal linfoma associato alle mucose (MALT)<sup>9</sup> (Figura 1).

La patogenesi dei linfomi non-Hodgkin a cellule B è un processo multifasico di accumulo progressivo di lesioni molecolari che provocano la deregolazione di proto-oncogeni e la inattivazione di geni onco-soppressori<sup>2</sup>. Le alterazioni molecolari più frequentemente riscontrate nelle neoplasie B sono le traslocazioni cromosomiche e le mutazioni puntiformi<sup>13</sup>. Le mutazioni puntiformi, qualora colpiscano regioni codificanti, possono introdurre sostituzioni aminoacidiche o codoni di stop, con conseguente alterazione strutturale e funzionale del prodotto proteico. Qualora invece le mutazioni puntiformi colpiscano regioni regolatorie di un gene, queste lesioni molecolari ne possono alterare il controllo trascrizionale. Altri meccanismi di instabilità genomica riscontrati nelle neoplasie B possono includere difetti nella segregazione cromosomica e l'inattivazione del meccanismo "DNA mismatch repair"<sup>13</sup>.

### ***1.3 Stimolazione antigenica e meccanismo di ipermutazione somatica***

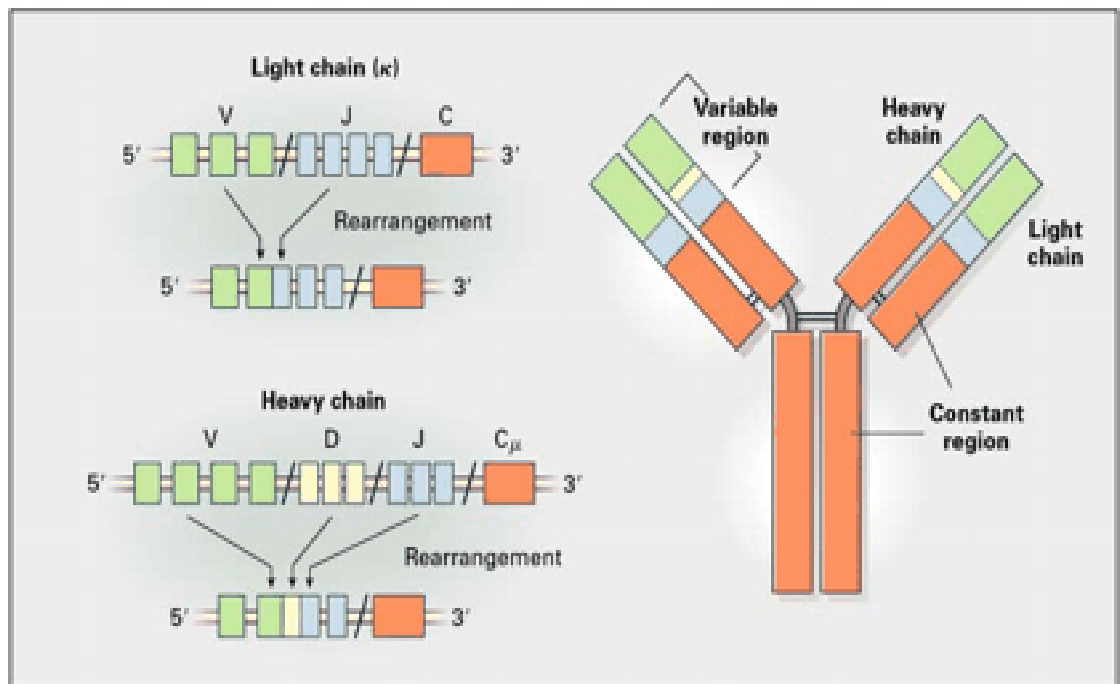
Se un organismo non fosse in grado di produrre gli anticorpi (Ig) morirebbe rapidamente di infezione. Queste molecole ci difendono dalle infezioni inattivando virus e tossine batteriche reclutando il sistema del complemento e vari tipi di globuli bianchi per uccidere i microorganismi invasori e i parassiti più grandi. Sintetizzati esclusivamente dai linfociti B, le Ig si producono in milioni di forme, ciascuna con una diversa sequenza di aminoacidi e un diverso sito legante per l'antigene. Le Ig sono fra le proteine più abbondanti del sangue e sono il 20% delle proteine del plasma. Sono costituite da due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche kappa o lambda. Ciascuna catena è composta da una regione costante (C) e da una regione variabile (V) (Figura 3)<sup>11</sup>. Le sequenze codificanti le regioni V si generano durante la maturazione della cellula B nel midollo osseo attraverso il processo di riarrangiamento somatico dei segmenti genici V, D e J per la catena pesante e V e J per la catena leggera (Figura 3). Il genoma umano, codifica per 52 geni funzionali V, 27 segmenti D e 6 segmenti J per le catene pesanti delle immunoglobuline. Per catene leggere di tipo kappa, sono stati identificati 43 geni funzionali V e 4 segmenti J, mentre 34 geni V e 4 segmenti J sono noti per le catene leggere tipo lambda. Ogni gene V è costituito da sequenze ipervariabili, definite regioni determinanti la complementarietà

(Complementarity-Determining Region, CDR) 1 e 2 e da sequenze a variabilità più limitata, che formano le cosiddette regioni cornice (Framework Region, FR) 1 e 2 con funzioni strutturali. Nel processo di riarrangiamento somatico, la fusione dei geni V, D e J genera una ulteriore regione ipervariabile, il CDR3 che possiede una sequenza unica, caratteristica di ogni cellula B matura <sup>14</sup>.

Le cellule che portano un riarrangiamento non funzionale e che quindi non sono in grado di esprimere una Ig di superficie vanno incontro a morte cellulare programmata (apoptosi) <sup>11</sup>. Al contrario, le cellule che riarrangiano in maniera funzionale i geni per le catene pesanti e leggere escono dal midollo osseo, portano un riarrangiamento dei geni IgV germinale, e sono dette naive. Durante il transito nel CG, le cellule B naive possono incontrare il loro antigene specifico. Il legame dell'antigene alla Ig di superficie avvia il processo di stimolazione antigenica e, nel contesto del microambiente del CG, determina l'attivazione del meccanismo di SHM <sup>14</sup>. Tale meccanismo consiste nella generazione di mutazioni puntiformi a carico dei geni IgV ed è finalizzato a maturare l'affinità della Ig di superficie per l'antigene. Si stima che la frequenza della mutazione somatica in questi geni sia di circa  $10^{-3}$  a coppia di nucleotidi, valore circa un milione di volte superiore alla frequenza di mutazione spontanea in altri geni. Da una singola cellula B derivano sub-cloni che differiscono per le mutazioni acquisite durante il processo di SHM. I sub-cloni che portano mutazioni tali da aumentare l'affinità per l'antigene

sono selezionati per sopravvivere, mentre i sub-cloni che portano mutazioni tali da diminuire l'affinità per l'antigene, o mutazioni che portano all'introduzione di codoni di stop all'interno del riarrangiamento originariamente funzionante (mutazioni "crippling"), vanno incontro ad apoptosi. All'uscita dal CG, dopo lo spegnimento della SHM, le mutazioni che ne derivano vengono mantenute negli stadi di maturazione post-CG<sup>10,11,12</sup>.

Attualmente è possibile valutare il ruolo patogenetico della stimolazione antigenica mediante analisi molecolare della sequenza dei geni IgV delle cellule linfoidi B<sup>11</sup>. Nel contesto delle malattie linfoproliferative, alcuni segni molecolari suggeriscono un ruolo della stimolazione antigenica nel processo di trasformazione neoplastica, quali *i*) un utilizzo sbilanciato da parte delle cellule B neoplastiche di un segmento genico V rispetto a quello documentato nelle cellule B normali; *ii*) l'attivazione costitutiva nella cellula B neoplastica del meccanismo di SHM; e *iii*) una distribuzione non casuale delle mutazioni generate dal meccanismo di SHM, tali da favorire l'accumulo nella regione CDR di mutazioni in grado di modificarne la sequenza aminoacidica mantenendo immodificata la sequenza aminoacidica della regione FR. Segni molecolari di stimolazione antigenica sono stati documentati sia nel contesto delle malattie linfoproliferative dell'ospite immunocompetente, sia nel contesto dei linfomi post-trapianto d'organo, suggerendo la presenza di un antigene o superantigene nel sostenere l'espansione neoplastica.



**Figura 3.** Riarrangiamento V-D-J nella genesi della cellula B. Le immunoglobuline sono costituite da due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche. Ciascuna catena è composta da una regione costante (C) e da una regione variabile (V). La regione V delle immunoglobuline si genera durante la maturazione della cellula B nel midollo osseo attraverso il processo di riarrangiamento somatico dei segmenti genici V-D-J per la catena pesante e V-J per la catena leggera. In questo processo viene deletato dal cromosoma il DNA localizzato tra i segmenti genici che vanno incontro a riarrangiamento.  
*Modificata da Küppers et al., New Engl J Med 1999; 341: 1520-1529.*

Tuttavia, recentemente è stato dimostrato che almeno altri 2 geni non immunoglobulinici, BCL6 e FAS/CD95, risultano essere mutati nelle loro sequenze in 5' nelle cellule B normali del centro germinativo<sup>15,16</sup>. Poiché si è dimostrato che il processo di ipermutazione somatica colpisce quindi più geni di quanto originariamente sospettato, si è ipotizzato che la forte deriva mutazionale del microambiente del CG possa favorire la linfomagenesi tramite l'accumulo di multiple lesioni genetiche in una cellula B, alcune delle

quali possono coinvolgere proto-oncogeni e favorire la trasformazione neoplastica.

#### ***1.4 Ipermutazione somatica aberrante***

Studi recenti hanno dimostrato che il meccanismo di ipermutazione somatica è aberrante nel 50% dei casi di linfoma diffuso a grandi cellule B nell'immunocompetente <sup>15</sup>. Come conseguenza, alcuni proto-oncogeni coinvolti nella linfomagenesi possono essere soggetti ad accumulo di mutazioni somatiche sia nelle regioni 5' regolatorie sia nelle regioni codificanti <sup>15</sup>. I proto-oncogeni colpiti da ipermutazione aberrante nel linfoma diffuso a grandi cellule B includono: PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC.

**PAX-5** appartiene ad una famiglia composta da 9 geni (PAX1-9) tutti codificanti per fattori trascrizionali <sup>18</sup>. Codifica un fattore di trascrizione chiamato BSAP (B-cell-activator-protein) implicato nella regolazione del differenziamento delle cellule B, nel controllo del loro sviluppo e nel bilanciamento tra la proliferazione delle cellule B e la secrezione delle Ig <sup>18</sup>. Diversi studi hanno dimostrato inoltre che BSAP può essere un importante repressore dell'espressione delle Ig dal momento che va a bloccare l'enhancer  $\alpha$  delle catene pesanti a 3'. Pertanto la down-regulation di BSAP osservata nelle plasmacellule potrebbe essere essenziale per l'alta produzione di Ig in queste cellule <sup>19,20</sup>. In più BSAP, PAX-2 e PAX-8 sono in grado di inibire, *in vitro*, le funzioni di p53 suggerendo un possibile contributo di questi geni allo

sviluppo di alcune neoplasie <sup>21</sup>. Questo gene è, inoltre, implicato in traslocazioni cromosomiche con il locus delle catene pesanti delle Ig in circa il 50% dei linfomi linfoplasmocitoidi <sup>22</sup>.

***RhoH/TTF*** codifica una piccola GTP-binding protein che appartiene alla superfamiglia Ras ed è espressa unicamente nei tessuti ematopoietici <sup>23</sup>. Il locus di RhoH/TTF, mappato sulla banda 4p13, è lungo circa 35 Kb e contiene 2 esoni separati da un introne di circa 30 Kb. Il primo esone non è codificante, mentre il secondo contiene l'intera porzione codificante del gene <sup>24</sup>. E' implicato in rare traslocazioni cromosomiche in linfomi non-Hodgkin che coinvolgono i geni LAZ-3/BCL6 <sup>23</sup>.

***PIM-1*** codifica una serina-treonina chinasi implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare <sup>25</sup>. Coopera attivamente con il gene c-MYC nella linfomagenesi contribuendo alla trasformazione neoplastica attraverso il controllo del meccanismo di apoptosi. Alcuni studi hanno dimostrato che l'attività chinasi di PIM-1 è essenziale per stimolare l'apoptosi mediata da c-MYC, mentre non sembra avere effetti sull'espressione di altre proteine legate a questo processo come p53 e p27. PIM-1 sembra, infatti, stimolare piuttosto che inibire l'apoptosi mediata da c-MYC aumentando l'attivazione delle proteine CASPASI-3 like <sup>26</sup>.

***c-MYC***, infine, codifica un fattore trascrizionale implicato nel controllo della crescita, della proliferazione, del differenziamento cellulare e della apoptosi di molti tipi cellulari. E' ampiamente implicato nella tumorigenesi attraverso

molti meccanismi, tra cui la traslocazione cromosomica <sup>27</sup>. c-MYC è composto da 3 esoni dei quali solo il secondo e il terzo codificanti ed è regolato da un complesso meccanismo sia a livello trascrizionale che post trascrizionale. La traslocazione di c-MYC in uno dei loci dei geni immunoglobulinici è presente nel 100% dei casi di linfoma di Burkitt. Infatti, nell'80% dei casi c-MYC viene traslocato nel locus dei geni delle catene pesanti, mentre nel restante 20% nel locus  $\kappa$  o  $\lambda$  delle catene leggere <sup>28</sup>.

Contrariamente ai geni IgV e BCL6, tuttavia, i proto-oncogeni PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC non mostrano un livello significativo di mutazioni nelle cellule B normali del centro germinativo. Pertanto, l'ipermutazione somatica che colpisce i proto-oncogeni PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC è detta *ipermutazione aberrante*, per distinguerla dalla ipermutazione somatica fisiologica dei geni IgV e BCL6 <sup>17</sup>. Le mutazioni introdotte dal processo di ipermutazione aberrante sono somatiche, avvengono indipendentemente dalla traslocazione cromosomica del proto-oncogene colpito dalla mutazione, e mostrano uno spettro mutazionale simile a quello della ipermutazione somatica dei geni IgV <sup>29</sup>. Nell'ambito dello spettro clinico-patologico delle neoplasie linfoidi B, il fenomeno della ipermutazione aberrante di proto-oncogeni pare essere ristretto al linfoma diffuso a grandi cellule. In particolare, è stato proposto che l'ipermutazione aberrante di proto-oncogeni associata a linfoma diffuso a grandi cellule B



risulti da un malfunzionamento tumore-specifico del meccanismo di ipermutazione somatica <sup>17</sup>.

### ***1.5 Virus oncogeni***

L'infezione da virus oncogeni è la causa di circa il 10-15% dei tumori umani. I virus oncogeni possono essere distinti in virus a DNA e virus a RNA. Esempi di virus oncogeni a DNA sono: a) *hepadnavirus*, tra cui il virus dell'epatite B (HBV) associato al carcinoma epatocellulare <sup>30</sup>; b) *herpesvirus*, tra cui il virus di Epstein-Barr (EBV) associato ad alcuni tipi di linfoma e al carcinoma nasofaringeo, e lo human herpesvirus-8 (HHV8), associato al sarcoma di Kaposi, al linfoma delle cavità corporee e alla malattia di Castelman <sup>31</sup>; c) *papovavirus*, tra cui il virus del papilloma umano (HPV), associato al carcinoma della cervice uterina <sup>32</sup> e il *poliomavirus* SV40 verosimilmente associato al mesotelioma e ad altri tumori <sup>33</sup>. I virus oncogeni a RNA comprendono: a) *retrovirus*, tra cui il virus della leucemia a cellule T umana di tipo 1 (HTLV1), associato alla leucemia/linfoma a cellule T nell'adulto <sup>34</sup>; b) *flavivirus*, tra cui il virus dell'epatite C (HCV) associato al carcinoma epatocellulare <sup>35</sup>.

Una caratteristica comune ai virus oncogeni conosciuti è l'infezione persistente e di lunga durata dell'ospite, che costituisce la condizione necessaria alla trasformazione neoplastica. Nei tumori umani, l'infezione virale è condizione necessaria, ma non sufficiente, allo sviluppo del tumore. I

virus, infatti, non si comportano come un cancerogeno completo, ma hanno azione iniziante o promuovente la carcinogenesi. E' quindi necessaria la deregolazione di altre vie, tramite lesioni genetiche addizionali all'azione del virus, affinché una cellula diventi completamente trasformata. I virus oncogeni umani contribuiscono alla trasformazione neoplastica mediante meccanismi diretti ed indiretti. I virus che portano uno o più oncogeni con capacità trasformanti agiscono con meccanismo diretto e sono: EBV, SV40, HPV e HHV-8. Altri virus promuovono la trasformazione neoplastica indirettamente grazie alla stimolazione cronica del sistema immunitario o tramite modificazione del microambiente cellulare. Virus che agiscono con meccanismo indiretto sono HCV ed HBV. 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 immunocompetente, al contrario, le cellule trasformate dal virus riescono ad evadere l'immunosorveglianza. Infatti, gli individui affetti dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o sottoposti a immunosoppressione iatrogenica in seguito a trapianto sono a rischio per lo sviluppo di linfomi correlati ad EBV e carcinomi della cervice uterina correlati ad HPV.

Tre diversi virus sono associati alla patogenesi dei B-LNH e sono: EBV, HHV-8 e HTLV1.

## ***1.6 I B-LNH virus correlati***

I linfomi non-Hodgkneegli AIDS correlati (AIDS-LNH) rappresentano una significativa sorgente di morbilità e di mortalità negli individui HIV positivi. Gli AIDS-LNH rappresentano un gruppo eterogeneo di linfomi associati a percorsi patogenetici diversi e, in accordo con la sede corporea di sviluppo e con i criteri di classificazione istologici, possono essere distinti in: AIDS-LNH sistemici, linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (AIDS-LPSNC), linfomi primitivi delle cavità sierose (AIDS-PEL) e linfomi plasmoblastici AIDS correlati (AIDS-PBL). Gli AIDS-LNH sistemici sono istologicamente classificati in: linfoma di Burkitt AIDS correlato (AIDS-LB) caratterizzato dalla traslocazione cromosomica che coinvolge il gene c-MYC e i geni immunoglobulinici, da mutazioni in p53 e BCL6 e nel 30% dei casi dall'infezione da parte di EBV <sup>36</sup>; e in linfoma diffuso a grandi cellule AIDS-correlato (AIDS-LDGC) caratterizzato da mutazioni in BCL6 e dall'infezione di EBV <sup>37,38</sup>. Tutti gli AIDS-LPSNC sono istologicamente rappresentati dai LDGC <sup>37</sup>. Nonostante la loro eterogeneità clinico-patologica, molti AIDS-LNH derivano da cellule B che hanno subito la reazione del CG e che quindi sono state esposte al meccanismo di ipermutazione somatica che normalmente colpisce i geni IgV, BCL6 e FAS. In particolare, una frazione di AIDS-LDGC, gli AIDS-LB e i AIDS-LPSNC presentano un profilo a tipo CG, mentre i rimanenti AIDS-LDGC, i PEL e i PBL presentano un profilo post-CG correlato al percorso differenziativo delle plasmacellule <sup>39</sup>.

L'infezione provocata dal virus dell'epatite C (HCV) coinvolge circa 170 milioni di persone nel mondo <sup>40</sup> ed è correlata ad epatite cronica, cirrosi e cancro epatocellulare <sup>41</sup>. L'HCV è stato associato a diversi processi immunomediati, inclusi i disordini ematologici; infatti HCV è caratterizzato da linfotropismo e la sua replicazione nelle cellule mononucleate del sangue periferico potrebbe essere implicata in alcune malattie linfoproliferative <sup>42</sup>. L'ipotesi di un diretto coinvolgimento di HCV nei disordini linfoproliferativi è suggerita da studi che hanno evidenziato la presenza di proteine e particelle replicative HCV correlate nei linfociti periferici e nei campioni bioptici di linfoma <sup>43,44</sup>. Un recente studio basato su 66 lavori ha mostrato che l'infezione da HCV è abbastanza comune nei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin <sup>45</sup>. Si stima infatti che circa il 15% dei casi di LNH presentino questa infezione (una frequenza piuttosto alta rispetto all'1.5% della popolazione in generale), suggerendo quindi un possibile ruolo di HCV nello sviluppo di queste neoplasie <sup>46</sup>.

Il meccanismo mediante il quale l'infezione dovuta ad HCV favorisca lo sviluppo dei LNH non è noto. Infatti la presenza di HCV è stata riscontrata nelle cellule stromali associate al tessuto tumorale, ma non nei linfociti B neoplastici. L'analisi del riarrangiamento immunoglobulinico VDJ suggerisce la possibilità che la stimolazione antigenica cronica delle cellule B dovuta all'infezione da parte di HCV contribuisca all'espansione di queste cellule e alla loro evoluzione in tumore <sup>46</sup>.

## **2. Scopo del lavoro**

La finalità del progetto di ricerca del ciclo di Dottorato è stata triplice:

- 1) Valutare il coinvolgimento della ipermutazione aberrante di proto-oncogeni nello spettro clinico patologico dei linfomi non-Hodgkin virus correlati, in particolare associati ad AIDS (AIDS-LNH) e ad infezione da parte di HCV (HCV-LNH), tramite l'analisi delle mutazioni di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC
- 2) Valutare il coinvolgimento del meccanismo di ipermutazione somatica fisiologica nello spettro clinico patologico di AIDS-LNH, tramite l'analisi dei geni immunoglobulinici al fine di rifinirne l'istogenesi molecolare
- 3) Valutare l'utilizzo e il profilo mutazionale dei geni IgV al fine di individuare eventuali bias all'interno delle diverse categorie clinico patologiche di AIDS-LNH e di valutare una eventuale pressione antigenica sull'espansione del clone tumorale

## **3. Materiali e metodi**

### ***3.1 Pannello tumorale ed estrazione del DNA***

Per valutare il coinvolgimento dell'ipermutazione aberrante di proto-oncogeni nello spettro clinico patologico dei linfomi non-Hodgkin virus correlati sono stati analizzati 39 campioni di AIDS-LNH e 32 campioni di B-LNH provenienti da pazienti con infezione cronica da HCV rappresentativi delle diverse categorie tumorali. In particolare, per quanto riguarda gli AIDS-LNH sono stati studiati 18 linfomi diffusi a grandi cellule (AIDS-LDGC), 11 linfomi di Burkitt (AIDS-LB), 6 linfomi primitivi delle cavità sierose (AIDS-PEL) e 4 linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (AIDS-LPSNC), mentre per quanto riguarda i HCV-LNH sono stati analizzati 20 linfomi diffusi a grandi cellule (HCV-LDGC n=20), 3 linfomi associati alla mucosa (HCV-MALT n=3), 4 leucemie linfatiche croniche/ linfomi a piccoli linfociti (HCV-LLC/SLLs n=4), 3 linfomi follicolari (HCV-LF n=3), 1 linfoma mantellare (HCV-MCL n=1) e 1 plasmocitoma (HCV-LPL n=1).

Per l'analisi del meccanismo di ipermutazione fisiologica tramite lo studio dei geni IgV all'interno del pannello tumorale di AIDS-LNH, il numero dei casi studiati è stato ampliato fino a raggiungere i 67 campioni. In particolare sono stati studiati 34 AIDS-LNH sistemici, 10 linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (AIDS-LPSNC), 10 linfomi plasmoblastici della cavità orale

(AIDS-PBL), e 4 linfomi primitivi delle cavità sierose (AIDS-PEL). A questo pannello sono state aggiunte 7 linee cellulari di linfoma di Burkitt (AIDS-LB) e 2 linee cellulari di AIDS-PEL. In accordo con la classificazione WHO (World Health Organization), gli AIDS-LNH sistemici includono i linfomi diffusi a grandi cellule (AIDS-LDGC n=20) e gli AIDS-LB (n=14).

Tutti i campioni sono stati raccolti prima della terapia. In base alle analisi morfologiche ed immunofenotipiche la frazione di cellule tumorali, in tutti i preparati, era maggiore o uguale al 70%. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il metodo “salting-out” con lisi cellulare seguita da digestione con Pronase E e precipitazione con etanolo. Per i casi in cui era disponibile solo il materiale incluso in paraffina, il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale (QIAamp DNA mini kit, QUIGEN, Milano).

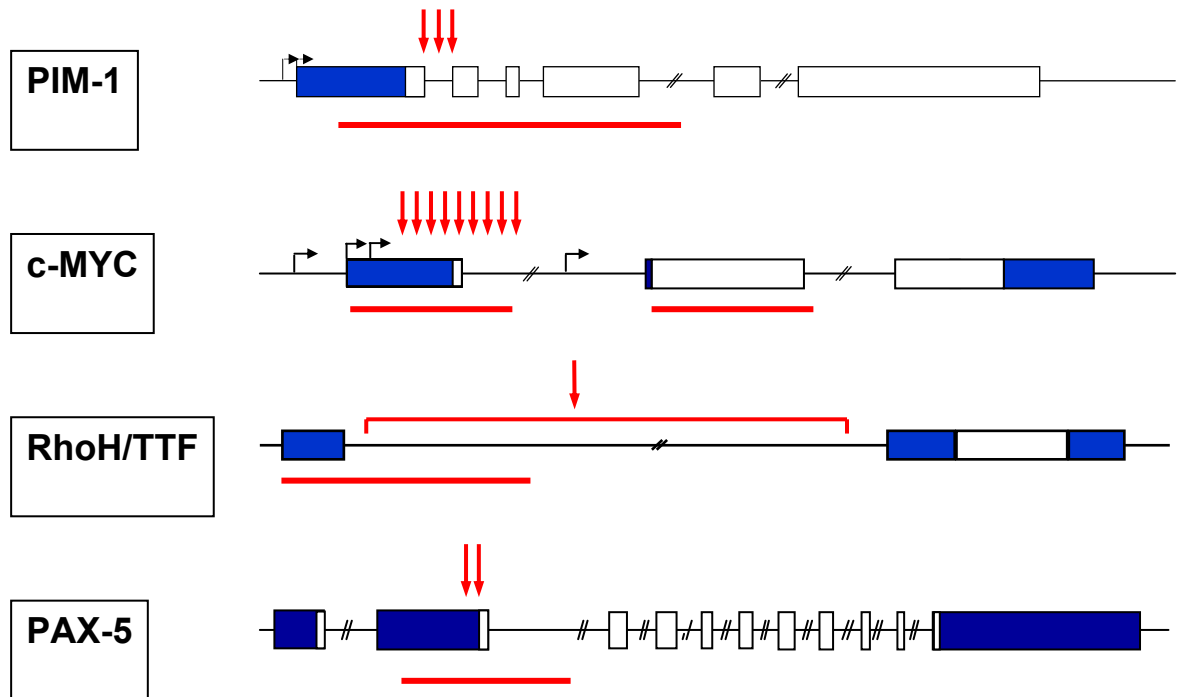
### ***3.2 Analisi mutazionale di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1, c-MYC***

#### ***esoni 1 e 2 e BCL6***

PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC sono stati amplificati mediante PCR a partire da DNA genomico utilizzando primers specifici. La regione amplificata, comunemente indicata come MMR (Minimal Mutated Region), dista, per tutti i geni analizzati, circa 1.5 Kb dal sito d’inizio della trascrizione ed è stata precedentemente dimostrata contenere > del 90% delle mutazioni nei linfomi diffusi a grandi cellule dell’immunocompetente. Questa regione comprende sia regioni codificanti nel caso di PIM-1 (esoni 1, 2, 3 e 4) e di c-

MYC (esone 2), sia regioni regolatorie, nel caso di RhoH/TTF, PAX-5 e c-MYC esone 1 (Figura 4). Gli ampimeri purificati sono stati sequenziati mediante il sequenziatore automatico ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) utilizzando il kit di sequenza ABI Prism Big Dye Terminator Kit version 1.1 (Applied Biosystem). La sequenza di entrambi i filamenti di DNA è stata eseguita utilizzando i primers forward (F) e reverse (R) utilizzati per l'amplificazione in PCR e, dove si sia reso necessario, sono stati disegnati primers interni per completare la sequenza nelle regioni centrali del frammento. La grandezza dei frammenti amplificati di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1, c-MYC esoni 1 e 2 e BCL6 è, rispettivamente, di 861 bp, 1109 bp, 1009 bp, 1301 bp, 1167 bp e 739 bp. La sequenza di ogni prodotto di PCR è stata confrontata con quella wild-type presente su GenBank utilizzando i numeri di accesso AF386791 per PAX-5, AF386789 per RhoH/TTF, AF386792 per PIM-1, X00364 per c-MYC esoni 1 e 2, e AY189709 per BCL6.





**Figura 4.** Analisi mutazionale di PIM-1, c-MYC, RhoH/TTF e PAX-5 nei B-LNH virus correlati. Sono indicati i 4 loci genomici e le regioni codificanti e non codificanti (in bianco e in blu, rispettivamente). La linea rossa indica il frammento amplificato. Le frecce nere indicano i siti di inizio della trascrizione, quelle rosse i siti coinvolti nelle traslocazioni cromosomiche.

### 3.3 Analisi mutazionale dei geni $IgV_H$ e $IgV_L$

I geni  $IgV_H$  sono stati amplificati con un set di sei primers specifici per la sequenza leader di ciascuna famiglia  $IgV_H$ <sup>49,50,51</sup> e con un primer degenerato specifico per la sequenza  $J_H$ . I campioni per i quali non è stato ottenuto nessun riarrangiamento clonale dei geni  $IgV_H$  utilizzando i primers leader sono stati amplificati con un set di sei primers specifici per la regione framework (FR) 1 o FR2 di ciascuna famiglia  $IgV_H$  in unione con un primer degenerato  $J_H$ <sup>52</sup> (Figura 5).

Anche i riarrangiamenti dei geni delle catene leggere ( $IgV_L$ ) sono stati amplificati con un set di primers specifici per le sequenze leader delle

famiglie di geni  $IgV_k$  e  $IgV_\lambda$  in unione ad appropriati primers degenerati  $J_k$  o  $J_\lambda$ <sup>50,51</sup>. I campioni per i quali non è stato ottenuto nessun riarrangiamento monoclonale dei geni  $IgV_L$  con i primers leader, sono stati amplificati con un set di primers specifici per la regione FR1 delle famiglie di geni  $V_k$  e  $V_\lambda$  in unione con gli appropriati primers degenerati  $J_k$  o  $J_\lambda$ <sup>50-53</sup> (Figura 5).

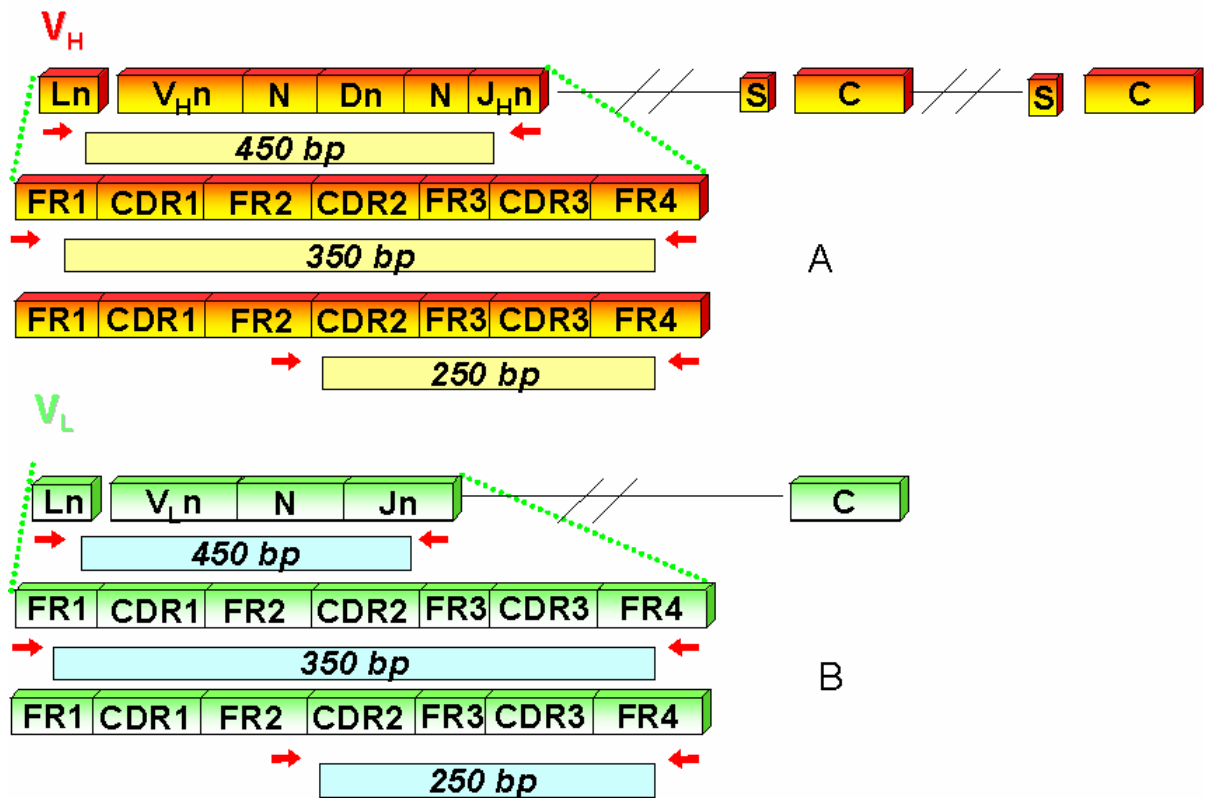
Il protocollo PCR utilizzato è il seguente: un ciclo di denaturazione a 95°C per 10', 60°C la temperatura di annealing, 35 cicli finali.

Anche in questo caso, i prodotti di PCR ottenuti sono stati separati su un gel di agarosio al 2%, purificati e sequenziati come i geni studiati per il meccanismo di ipermutazione aberrante. Per la sequenza, è stato usato il primer situato nella regione 5' (quindi il primer leader, FR1 o FR2) specifico per l'amplimero trovato. Il protocollo di sequenza è il seguente: 98°C per 3' (1 ciclo), 96°C per 10'' seguiti da uno step a 60°C per 4' (28 cicli).

Le sequenze dei geni  $IgV_H$  e  $IgV_L$  ottenute, sono state allineate usando V-BASE sequence directory (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) utilizzando i seguenti programmi: MacVector 6.0.1 (Oxford Molecular Group PLC, Oxford, UK), DNA Plot (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/DNAPLOT.html>) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Le sequenze  $V_H$  e  $V_L$  sono state considerate mutate nel caso in cui la frequenza di mutazione fosse risultata uguale o superiore al 2% rispetto alla "germline"  $V_H$  e/o  $V_L$  trovata. Le mutazioni che colpiscono l'ultimo nucleotide sono state escluse dall'analisi

mutazionale in quanto possono essere il risultato di una delezione al sito di “joining”. I criteri per l’identificazione del segmento D nella regione CDR3 sono i seguenti: (a) 100% di omologia con un elemento D di almeno 7 bp o (b) una differenza di una singola base su un frammento D di almeno 8 bp <sup>47</sup>. La lunghezza del V<sub>H</sub> CDR3 è stata determinata conteggiando il numero di aminoacidi (aa) tra la posizione 94 alla fine della regione FR3 (normalmente 2 aa a valle della cisteina conservata) e la posizione 102 all’inizio della regione FR4 (corrispondente al triptofano conservato in tutti i segmenti J<sub>H</sub>). La lunghezza del V<sub>L</sub> CDR3 è stata determinata conteggiando il numero degli aa tra la posizione 88 alla fine della regione FR3 e la posizione 97 all’inizio della regione FR4 (normalmente la fenilalanina conservata in tutti i segmenti J<sub>L</sub>).

La carica della regione V<sub>H</sub> CDR3, definita da un punto isoelettrico (pI) stimato, è stata determinata utilizzando il programma MacVector.



**Figura 5.** Strategia di PCR utilizzata per l'analisi dei riarrangiamenti IGHV-D-J (pannello A), IGKV-J e IGLV-J (pannello B).

### 3.4 Oligonucleotidi proto-oncogeni.

Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione di PIM-1, PAX-5, RhoH/TTF, c-MYC esone 1, c-MYC esone 2 e BCL6 sono: PIM1-F, 5'-CCC TCA GTT GTC CTC CGA CTC-3'; PIM-1-R, 5'-GAT GTT TTC GTC CTT GAT GTC; PAX-5-F, 5'-TGT CCA CAC GCA GCG GGT CC -3'; PAX-5-R, 5'-AAG AGC TGA AAT GTC GCC GCC G -3'; RhoH/TTF-F, 5'-CTG CCC CAC ACA CAC TAA C-3'; RhoH/TTF-R, 5'-AAC TCT TCA AGC CTG TGC TG-3'; MYC-1-F, 5'-CAC CGG CCC TTT ATA ATG CG-3'; MYC-1R, 5'-CGA TTC CAG GAG AAT CGG AC-3'; MYC2-F, 5'-CCG CTG GTT CAC TAA GTG CG-3'; MYC-2R, 5'-GGA TGG GAG GAA

ACG CTA AAG-3'; BCL6-10F, 5'-CTC TTG CCA AAT GCT TTG-3', e BCL6-12R, 5'-CAC GAT ACT TCA TCT CAT C-3'.

### **3.5 Oligonucleotidi IgV<sub>H</sub>**

I primers (senso) specifici per la sequenza leader sono V<sub>H</sub>1: 5'- ATG GAC TGS ACC TGG AGV ATC C -3', V<sub>H</sub>2: 5'- CAC RCT CCT GCT GCT GAC CA -3', V<sub>H</sub>3a: 5'- GCT GGG TTT TCC TTG TTG C -3', V<sub>H</sub>3b: 5'- ATG GAG TTK GGR CTG AGC TG -3', V<sub>H</sub>4: 5'- ATG AAR CAC CTG TGG TTY TTC CT -3', V<sub>H</sub>5: 5'- CCT CCT CCT GGC TGT TCT C -3', V<sub>H</sub>6: 5'- CTG TCT CCT TCC TCA TCT TCC -3'. I primers (senso) specifici per la sequenza FR1 sono V<sub>H</sub>1: 5'- CTC AGT GAA GGT YTC CTG CAA GG -3', V<sub>H</sub>2: 5'- TCC TGC GCT GGT GAA ASC CAC AC -3', V<sub>H</sub>3: 5'- GGT CCC TGA GAC TCT CCT GTG CAG -3', V<sub>H</sub>4: 5'- CCC TGT CCC TCA CCT GCR CTG TC -3', V<sub>H</sub>5: 5'- AAA AGC CCG GGG AGT CTC TGA RGA -3', V<sub>H</sub>6: 5'- TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G -3'<sup>50-52</sup>. I primers (senso) specifici per la sequenza FR2 sono V<sub>H</sub>1.1: 5'- GGA CAA RGG CTT GAG TGG AT -3', V<sub>H</sub>1.2: 5'- GGA MAA SGS CTT GAG TGG AT -3', V<sub>H</sub>4-5: 5'- GGG AAR GGV CTG GAG TGG AT -3', V<sub>H</sub>3.11: 5'- GDT CCG CCA GGC TCC AG -3', V<sub>H</sub>3.12: 5'- GGT CCG SCA AGC TCC AG -3', V<sub>H</sub>2: 5'- GAT CCG TCA GCC CCC AG -3', V<sub>H</sub>3.21: 5'- GGA AAA GGT CTG GAG TGG GT -3', V<sub>H</sub>3.22: 5'- GGG AAG GGT CTG GAG TGG GT -3', V<sub>H</sub>3.22a: 5'- GGG AAA GGG CTG GAG TGG GT -3' e V<sub>H</sub>6: 5'- TCG

AGA GGC CTT GAG TGG -3'. Il primer degenerato (antisenso) specifico per la sequenza J<sub>H</sub> è: 5'- CTY ACC TGA RGA GAC RGT GAC C -3'. Al fine di escludere la possibilità di una contaminazione, le sequenze ottenute dall'amplificazione dei geni IgV<sub>H</sub> sono state analizzate e confrontate con il database delle sequenze precedentemente ottenute nel nostro laboratorio.

### **3.6 Oligonucleotidi IgV<sub>L</sub>**

Le sequenze dei primers (senso) V<sub>K</sub> leader sono V<sub>K</sub>I/II: 5'- AGC TCC TGG GCC TSC TRM TGC TCT -3', V<sub>K</sub>III: 5'- TCT CTT CCT CCTGCT ACT CTG GCT -3' , V<sub>K</sub>IV: 5'- ATG GTG TTG CAG ACC CCA GGT CTT -3'.

La sequenza del primer degenerato (antisenso) J<sub>K</sub> è: 5'- GTT TGA TYT CCA SYT TGG TCC C -3'. La sequenza del primer (antisenso) J<sub>K</sub>5 è: 5'- GTT TAA TCT CCA GTC GTG TCC -3'. Le sequenze dei primers (senso) V<sub>λ</sub> leader sono V<sub>λ</sub>1: 5'- CTG GTC YCC TCT CYT CCT CAC -3', V<sub>λ</sub>2: 5'- TCC TCC TCA CCC TCC TCA CTC -3', V<sub>λ</sub>3: 5'- CTC CTK CTC CCC CTC CTC ACT -3', V<sub>λ</sub>3e: 5'- CTC CTG CTC CCA CTC CTC AAC -3', V<sub>λ</sub>3h: 5'- GCC TGG ACC GTT CTC CTC CTC -3', V<sub>λ</sub>3j: 5'- GCC TGG ACC GCT CTC CTT CTG -3', V<sub>λ</sub>3l: 5'- TCT GGC TCA CTC TCC TCA CTC -3', V<sub>λ</sub>3r: 5'- CCT CGG CGT CCT TGC TTA CTG -3', V<sub>λ</sub>4a: 5'- CTC TTC CCT CTC CTC CTC CAC -3', V<sub>λ</sub>4b: 5'- CCT CAC CCT CCT CCT CCA CTG -3', V<sub>λ</sub>4c: 5'- CCT ACT GCC CTT CAT TTT CTC -3', V<sub>λ</sub>5: 5'- TGY TCC TCT CTC ACT GCA CAG -3', V<sub>λ</sub>6: 5'- CCT CCT CGC TCA CTG

CAC AG -3', V<sub>λ</sub>7: 5'- ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTT -3', V<sub>λ</sub>8: 5'-  
ATG GCC TGG ATG ATG CTT CTC -3', V<sub>λ</sub>9: 5'- TGC TCC TCA CCC  
TCC TCA GTC -3', V<sub>λ</sub>10: 5'- CTG GGC TCT GCT CCT CCT GAC -3'. Le  
sequenze dei primers degenerati (antisenso) J<sub>λ</sub> sono J<sub>λ</sub>: 5'- CTA GGA CGG  
TCA GCT YGG TCC C -3' e J<sub>λ</sub>7: 5'- CGA GGA CGG TCA GCT GGG TGC  
C -3'. Le sequenze dei primers (senso) V<sub>K</sub> FR1 sono V<sub>K</sub>1 Kupp: 5'- GAC  
ATC CRG WTG ACC CAG TCT CCW TC -3', V<sub>K</sub>2 Kupp 5'- CAG WCT  
CCA CTC TCC CTG YCC GTC A -3', V<sub>K</sub>3 Kupp: 5'- TCT CCA TGS CAC  
CCT GTC TKT GTC TC -3', V<sub>K</sub>4 Kupp: 5'- AGA CTC CCT GGC TGT  
GTC TCT GGG C -3', V<sub>K</sub>5 Kupp: 5'- CAG TCT CCA GCA TTC ATG TCA  
GCG A -3', V<sub>K</sub>6 Kupp: 5'- TTT CTS TCT GTG ACT CCA RRG GAG AA -  
3'. Le sequenze dei primers (senso) V<sub>λ</sub> FR1 sono V<sub>λ</sub>1 Kupp: 5'- GGT CCT  
GGG CCC AGT CTG TG -3', V<sub>λ</sub>2 Kupp: 5'- CAG TCT GCC CTG ACT  
CAG CCT -3', V<sub>λ</sub>3a Kupp: 5'- CTC AGC CAC CCT CAG TGT CCG T -3',  
V<sub>λ</sub>3b Kupp: 5'- CTC AGC CAC CCT CGG TGT CAG T -3', V<sub>λ</sub>4 Kupp: 5'-  
TTT CTT CTG AGC TGA CTC AGG AC -3', V<sub>λ</sub>5-9 Lipsky: 5'- CAG SCT  
GTG CTG ACT CAG CC -3', V<sub>λ</sub>6 Kupp: 5'- GAG TCT CCG GGG AAG  
ACG GTA -3', V<sub>λ</sub>7 Kupp: 5'- GTG GTG ACT CAG GAG CCC TCA C -3',  
V<sub>λ</sub>7-8 Lipsky: 5'- CTG TGG TGA CYC AGG AGC C -3', V<sub>λ</sub>9 Kupp: 5'-  
GCT GAC TCA GCC ACC TTC TGC A -3', V<sub>λ</sub>10 Lipsky: 5'- CAG GCA  
GGG CWG ACT CAG C -3' <sup>50-53</sup>.

### ***3.7 Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni $V_H$***

La presenza di eterogeneità intraclonale, indicativa di ipermutazione somatica “ongoing”, è stata valutata in 15 casi di AIDS-LNH. Il riarrangiamento clonale  $V_H$  è stato amplificato utilizzando la Taq DNA polimerasi “high-fidelity” Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e clonato con il vettore plasmidico pCR4-TOPO (Invitrogen, Ltd, Paisley, UK). Sono stati “piccati” ed analizzati almeno 20 cloni per paziente. Le sequenze sono state analizzate ed allineate utilizzando i programmi Mac Vector 6.0.1 e Multiple Sequence Alignment. Per la valutazione dell'attività ongoing sono stati considerati solo i cloni con identico CDR3. Sono state utilizzate le seguenti definizioni: mutazione non confermata (la mutazione è stata osservata solo in un clone), mutazione confermata (la mutazione è stata osservata in più di un clone). Solo i casi che presentavano più di una mutazione confermata e/o più di due mutazioni non confermate sono stati considerati “ongoing”. Nel nostro laboratorio, l'errore stimato per la Taq DNA polimerasi è dello 0.01% (0.04 mutazioni/  $V_H$  clone)<sup>48</sup>.



### ***3.8 Analisi statistiche***

L'elaborazione statistica sui dati ottenuti dall'analisi dei geni coinvolti nel meccanismo di ipermutazione aberrante, è stato utilizzato il software SPSS (versione 6 per Windows). Le differenze riscontrate nelle frequenze di mutazione sono state ritenute statisticamente significative con un valore di  $p < 0.05$ . La frequenza di mutazione normalizzata per ogni singolo nucleotide è stata confrontata con la frequenza di mutazione attesa tramite il test  $\chi^2$  così come la frequenza di mutazione riscontrata all'interno dei motivi RGYW/WRCY.

Per la valutazione statistica comparativa tra l'utilizzo dei geni IgV negli AIDS-LNH e nei corrispondenti LNH dell'immunocompetente, sono stati creati 2 database comprensivi dei dati  $V_H$  e  $V_L$  di 190 LDGC e 70 LB dell'immunocompetente. Le sequenze utilizzate sono depositate in GenBank o sono state pubblicate in letteratura.

I database  $IgV_H$  e  $IgV_L$  con le informazioni concernenti l'utilizzo di V, D e J, le frequenze di mutazione e la lunghezza del CDR3 sono stati costruiti usando Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA). Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il programma Statistical Product and Service Solutions (SPSS). La significatività delle differenze nell'utilizzo dei  $V_H$ ,  $V_L$ , D e  $J_H$  tra i vari gruppi di AIDS-LNH studiati, è stata determinata usando il test di Fisher a 2 code  $p$ , e il test  $\chi^2$  con l'adattamento di Bonferroni per i confronti multipli. Per calcolare la significatività delle differenze nella lunghezza del CDR3 e nella

frequenza delle mutazioni tra i gruppi diversi di B-LNH analizzati, sono stati utilizzati il test parametrico t e il test nonparametrico di Mann-Whitney. Per valutare la distribuzione delle mutazioni nel CDR3 e nel FR sono stati usati 2 metodi statistici: il modello di distribuzione binomiale di Chang-Casali e il modello di distribuzione multinomiale <sup>54,55</sup>. In tutti i casi le differenze sono state considerate significative quando il valore di  $p < .05$ .

### ***3.9 Analisi dell'infezione virale***

L'analisi dell'infezione da parte di EBV è stata valutata tramite l'analisi in PCR dei frammenti EBNA-1 ed EBNA-3.

### ***3.10 Analisi dei markers istogenetici negli AIDS-LNH***

I markers istogenetici nei casi di AIDS-LNH includono le mutazioni dei geni  $IgV_H$  e BCL6 e l'espressione delle proteine BCL6 e CD138 che distinguono il fenotipo CG da quello post-CG. L'espressione di BCL6 e di CD138 è stata quantificata utilizzando rispettivamente gli anticorpi monoclonali B-B4 (Serotec, Oxford, England) e PG-B6 (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark).

## 4. Risultati

### *4.1 Frequenza di ipermutazione aberrante negli AIDS-LNH.*

I risultati ottenuti dopo sequenziamento automatico di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC hanno evidenziato che l'ipermutazione aberrante di proto-oncogeni è un fenomeno relativamente frequente negli AIDS-LNH. Infatti, mutazioni in almeno 1 dei 4 geni analizzati sono state trovate in 19/39 (48.7%) campioni di AIDS-LNH: 10/18 (55.5%) AIDS-LDGC, 4/11 (36.3%) AIDS-LB, 4/6 (66.6%) AIDS-PEL e 1/4 (25%) AIDS-LPSNC.

Mutazioni in più di 1 gene sono state trovate in 9/39 (23.1%) AIDS-LNH e in particolare 6/18 (33.3%) AIDS-LDGC, 2/11 (18.1%) AIDS-LB e 1/4 (25%) AIDS-LPSNC.

PAX-5 è stato trovato mutato in 8/39 (20.5%) casi, RhoH/TTF in 9/39 (23.1%), PIM-1 in 5/39 (12.8%), e c-MYC in 7/27 (25.9%) (Tab.1).

L'analisi del corrispondente DNA germinale, attuata in alcuni casi selezionati, ha formalmente confermato la natura somatica delle mutazioni, come riscontrato precedentemente nei LDGC dell'immunocompetente.

Le mutazioni di c-MYC riscontrate in casi di AIDS-NHL associati a riarrangiamenti di c-MYC con i loci delle immunoglobuline (tutti gli AIDS-LB e un caso di AIDS-LDGC) sono state escluse dall'analisi, in quanto

verosimilmente dovute alla traslocazione cromosomica e non all'effetto dell'ipermutazione somatica.

Le mutazioni di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC non si associano ad un particolare stadio differenziativo ma si riscontrano sia in linfomi che derivano dal CG (AIDS-LB e una parte di AIDS-LDGC) sia in linfomi che derivano da cellule B post-CG (AIDS-PEL, AIDS-LPSNC e la restante parte di AIDS-LDGC). Inoltre, la presenza di ipermutazione somatica aberrante, è indipendente dall'infezione di EBV, perché le mutazioni in uno o più dei proto-oncogeni testati sono state riscontrate in 10/23 (43.5%) AIDS-LNH EBV positivi e in 9/16 (56.2%) AIDS-LNH EBV negativi.

La dettagliata caratterizzazione dei markers istogenetici (l'espressione di BCL6 e di CD138) è disponibile per 23 casi di AIDS-LNH. Tutti i AIDS-LB mostrano il fenotipo BCL6+/CD138- tipico delle cellule B del CG, e tutti i casi di AIDS-PEL mostrano il fenotipo post-CG BCL6-/CD138+. All'interno del gruppo degli AIDS-LNH sistemici (AIDS-LDGC e AIDS-LPSNC), 9 casi esprimono il fenotipo BCL6-/CD138+ e 1 caso il fenotipo BCL6+/CD138-. Il confronto tra il profilo istogenetico e le mutazioni in PAX-5, RhoH/TTF PIM-1 e c-MYC mostra la presenza di ipermutazione somatica aberrante in 8/15 (53.3%) casi BCL6-/CD138+ e in 3/8 (37.5%) casi BCL6+/CD138-.

**Tabella 1.** Frequenza del meccanismo di ipermutazione aberrante all'interno del pannello di AIDS-LNH

Istologia	<i>PAX-5</i>	<i>RhoH/TTF</i>	<i>PIM-1</i>	<i>c-MYC</i> esone 1 <sup>a</sup>	<i>c-MYC</i> esone 2 <sup>a</sup>
AIDS-LNH	8/39 (20.5%)	9/39 (23.1%)	5/39 (12.8%)	3/27 (11.1%)	4/27 (14.8%)
AIDS-LNH sistemici					
AIDS-LB	3/11 (27.3%)	2/11 (18.1%)	1/11 (9.09%)	n.a. <sup>b</sup>	n.a. <sup>b</sup>
AIDS-LDGC	4/18 (22.2%)	4/18 (22.2%)	4/18 (22.2%)	2/18 (11.1%)	3/18 (16.7%)
AIDS- LPSNC	0/4	1/4 (25%)	0/4	0/4	1/4 (25%)
AIDS-PEL	1/6 (16.7%)	2/6 (33.3%)	0/6	1/6 (16.7%)	0/6

<sup>a</sup> Le mutazioni in *c-MYC* esoni 1 e 2 sono state considerate solo negli AIDS-LNH privi di grossi riarrangiamenti del gene

<sup>b</sup> n.a., non applicabile

#### ***4.2 Frequenza di ipermutazione aberrante nei LNH HCV correlati.***

I risultati ottenuti dopo sequenziamento diretto di *PAX-5*, *RhoH/TTF*, *PIM-1* e *c-MYC* hanno evidenziato che l'ipermutazione aberrante di proto-oncogeni è un fenomeno relativamente frequente anche nei LNH HCV correlati. Infatti, mutazioni in almeno 1 dei 4 geni analizzati sono state trovate in 10/32 (31%) campioni di HCV-LNH: in particolare 8/20 (40%) HCV-LDGC, 1/3 HCV-

MALT e 1/1 HCV-MCL. Mutazioni in più di 1 gene sono state trovate in 5/32 (16%) HCV-LNH ed in particolare 4/20 (20%) HCV-LDGC e 1/1 HCV-MCL (Tab.2).

PAX-5 è stato trovato mutato in 5/32 (16%), RhoH/TTF in 4/32 (13%) PIM-1 in 4/32 (13%) casi e c-MYC in 4/32 (13%) (Tab.2).

**Tabella 2.** Frequenza del meccanismo di ipermutazione aberrante all'interno del pannello di LNH HCV correlati

Istologia	<i>PAX-5</i>	<i>RhoH/TTF</i>	<i>PIM-1</i>	<i>c-MYC</i> esoni 1 e 2
LNH HCV correlati	5/32 (16%)	4/32 (13%)	4/32 (13%)	4/32 (13%)
HCV-LDGC	4/20 (20%)	4/20 (20%)	4/20 (20%)	2/20 (10%)
HCV-MALT	0/3	0/3	0/3	1/3
HCV-MCL	1/1	0/1	0/1	1/1
HCV-LLC, HCV-FL, HCV-LPL	0/8	0/8	0/8	0/8

#### ***4.3 Analisi del profilo mutazionale della ipermutazione somatica di proto-oncogeni negli AIDS-LNH***

L'analisi è stata effettuata su un totale di 68 mutazioni trovate in 19 casi. La frequenza mutazionale media, calcolata solo sui casi risultati mutati, è compresa tra  $0.05 \times 10^{-2}/\text{bp}$  nel caso di c-MYC esone 1 e  $0.43 \times 10^{-2}/\text{bp}$  nel caso di c-MYC esone 2 senza nessuna differenza significativa all'interno delle categorie clinico-patologiche di AIDS-LNH. La maggior parte delle

mutazioni riscontrate sono sostituzioni di singole basi (n=62), mentre solo in 5 casi di AIDS-LNH sono state osservate piccole delezioni o inserzioni. Delle 62 sostituzioni di singole basi, 36 sono transizioni e 26 transversioni, con un rapporto transizioni/transversioni pari a 1.38 (atteso 0.5;  $p < .0001$ ;  $\chi^2$  test) (Tab.3). L'analisi del pattern mutazionale, considerando tutte insieme le sostituzioni nucleotidiche osservate in PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC, mostra una ratio G+C/A+T pari a 1.82, simile a quella riportata nei riarrangiamenti IgV out-of-frame nell'uomo e a 2 linee cellulari di LB mutate in vitro <sup>56</sup>. Le differenze individuali nei rapporti transizioni/transversioni e nelle ratios G+C/A+T osservate sui geni c-MYC esone 2 e RhoH/TTF, possono essere dovute al limitato numero di eventi mutazionali osservato. La frequenza di mutazioni che colpisce la base G all'interno dei motivi RGYW è, in tutti i geni, più alta di quanto atteso (PAX-5, 14% versus 4.2%; RhoH/TTF, 9% versus 4.5%; PIM-1, 14% versus 3.4%; c-MYC esoni 1 e 2, 21% versus 3.4%).

In PIM-1 e c-MYC, alcune mutazioni sono localizzate in esoni codificanti e possono provocare sostituzioni aminoacidiche con potenziali conseguenze strutturali e funzionali. In particolare, 4 mutazioni in PIM-1 trovate in 3 AIDS-LNH sono mutazioni "missense" localizzate all'interno dell'esone 4 che codifica il dominio serina-treonina chinasi del gene. Queste mutazioni possono provocare un cambiamento nella struttura e nella funzione della proteina codificata da PIM-1. In c-MYC, sono state trovate 18 mutazioni

“missense” in 4 AIDS-LNH. Queste mutazioni sono state trovate all’interno dell’esone 2 che codifica per il dominio di trans-attivazione del gene e rappresenta un hot-spot mutazionale nelle traslocazioni alleliche di c-MYC nei LB e nel plasmocitoma di topo<sup>24</sup>. In particolare, 2 di queste mutazioni (Pro57Ser nel caso 2378 e Pro60Ser nel caso 2256) si trovano vicino o cadono all’interno del sito funzionale di fosforilazione Thr58-Ser62. Alcuni studi hanno dimostrato che le mutazioni che colpiscono questi residui aboliscono la fosforilazione del dominio di transattivazione del gene c-MYC, con conseguente difettosa regolazione della proteina p107 ed aumento dell’attività trasformante. Le mutazioni introdotte dal meccanismo di ipermutazione somatica aberrante potrebbero avere quindi profondi effetti sulla funzione di questo proto-oncogene (Tab.4).



**Tabella 3.** Analisi mutazionale di BCL6, RhoH/TTF, PAX-5, PIM-1 e c-MYC nel pannello di AIDS-LNH

Caso	Istologia	Mutazioni				
		<i>BCL6</i>	<i>RhoH/TTF</i>	<i>PAX-5</i>	<i>PIM-1</i>	<i>c-MYC</i>
110	AIDS-LDGC	T439G, C475G, C479T, A821C	604Δ4 bp	C1018G, G1400A	G1916A	-
112	AIDS-LDGC	C479G	-	-	-	-
120	AIDS-LDGC	A527G, 783Δ4 bp	-	1069Δ199 bp	C1363A	-
568	AIDS-LDGC	-	-	-	-	C4524A, G4537T, C4547G, C4595G, A4600C, A4606G, G4619T, C4623G, G4814A, G4832C, A4902G, A4975T, C5009A, C2778T
1001	AIDS-LDGC	-	A819T, C820T, A898C	-	-	-
1138	AIDS-LDGC	-	-	-	G1764A, G1765C	G4996T
1139	AIDS-LDGC	T418A, C425A, G503A, C601A, G678A	-	-	-	-
1905	AIDS-LDGC	C479G, A609T	-	-	-	<sup>a</sup>
2378	AIDS-LDGC	C885A	-	-	C1720T, C1721G	C4686T, C4689T
2410	AIDS-LDGC	C479G, G533A, A537T, C788G	-	G904A	-	-
2413	AIDS-LDGC	G733T, C744T	-	-	-	-
2414	AIDS-LDGC	763Δ5 bp	1026Δ3 bp, G1034C	-	-	-
2771	AIDS-LDGC	C601T, C685T, G758C, T780C, 836ΔT, C875G, C920G, T954C, G975A, T1023C	C448T, T558C, G694A, T783C, C784T, C945A, T987C	A1324T	-	-
2772	AIDS-LDGC	C779T	-	-	-	G2594A
642	AIDS-LB	C479T, C517A	-	-	-	<sup>a</sup>
645	AIDS-LB	-	T557G, A563G, C638T, A643G	805Δ25 bp	-	<sup>a</sup>
1142	AIDS-LB	706+G, 1098ΔT	-	-	-	<sup>a</sup>
1143	AIDS-LB	T705C, T717A, G756C	-	-	-	<sup>a</sup>
1220	AIDS-LB	T562G, G835A	418Δ31 bp, T987C	C1436G	-	<sup>a</sup>
1248	AIDS-LB	-	-	-	G1496A	<sup>a</sup>
2106	AIDS-LB	-	-	C1394T	-	<sup>a</sup>
2415	AIDS-LB	T562C	-	-	-	<sup>a</sup>
HLB-6	AIDS-PEL	C820G, T1084G	A658G, A854G	-	-	-
BC-2	AIDS-PEL	T604C	-	C1436T	-	-
BCLB-1	AIDS-PEL	C842G, T849A	-	-	-	-
CRO-AP/3	AIDS-PEL	T446C, C479T, T521C, C538G, T563C, G793A	G573A	-	-	-
CRO-AP/5	AIDS-PEL	T542C, T548A	-	-	-	T2678A, G2691A
2254	AIDS-LPSNC	C479T, A537G	-	-	-	-
2256	AIDS-LPSNC	G488A, G496A, A498T, T548G, T553G, T566G, T568C, T622G, G753C, T782C, G808A, G820A, T917G, G956A, A970C, G1002A, T1028C	G546A, A652C, T669C, A748T, A757G	-	-	G4682A, C4698T, A4993G, C5027G
2257	AIDS-LPSNC	C444G, T499A	-	-	-	-

<sup>a</sup> le mutazioni di c-MYC negli AIDS-LB e nel caso 1905 sono escluse dall'analisi perché è presente la trslocazione del gene con le Ig e le mutazioni possono essere dovute a questo meccanismo.

**Tabella 4.** Sostituzioni aminoacidiche provocate dall'ipermutazione aberrante negli AIDS-LNH

Caso	Istologia	Gene	Mutazione	Localizzazione	Codone <sup>a</sup>	Sostituzione aminoacidica	
110	LDGC	PIM-1	G1916A	esone 4	AGC>AAC	S146N	
568	LDGC	c-MYC	C4524A	esone 2	CCC>ACC	P2T	
			G4537T	esone 2	AGC>ATC	S6I	
			C4547G	esone 2	AAC>AAG	N9K	
			C4595G	esone 2	TGC>TGG	C25W	
			A4600C	esone 2	GAG>GCG	E27A	
			A4606G	esone 2	GAG>GGG	E29G	
			G4619T	esone 2	CAG>CAT	Q33H	
			C4623G	esone 2	CAG>GAG	Q35E	
			G4814A	esone 2	CAG>CAA	Q98E	
			G4832C	esone 2	GAG>GAC	E104D	
			A4902G	esone 2	ATC>GTC	I128V	
			A4975T	esone 2	TAC>TTC	Y152F	
			C5009A	esone 2	AAC>AAA	N163K	
1138	LDGC	c-MYC	G4996T	esone 2	AGC>ATC	S159I	
			PIM-1	G1764A	esone 4	AAG>AAA	K95K
				G1765C	esone 4	GTG>CTG	V96L
2378	LDGC	c-MYC	C4686T	esone 2	CTG>TTG	L56L	
			C4689T	esone 2	CCC>TCC	P57S	
		PIM-1	C1720T	esone 4	CCT>TGT	P81C	
2256	LPSNC	c-MYC	G4682A	esone 2	GAG>GAA	E54E	
			C4698T	esone 2	CCC>TCC	P60S	
			A4993G	esone 2	GAC>GGC	D158G	
			C5027G	esone 2	AGC>AGG	S169R	

<sup>a</sup> Sono indicate in tabella solo le mutazioni di c-MYC trovate in assenza di grossi riarrangiamenti.

#### ***4.4 Analisi del profilo mutazionale della ipermutazione somatica di proto-oncogeni nei LNH HCV correlati***

La frequenza media di mutazione in questo pannello tumorale, calcolata solo tenendo conto dei casi mutati, varia da  $0.38 \times 10^{-3}$  per bp nel caso di c-MYC esone 1 e  $6.76 \times 10^{-3}$  nel caso di c-MYC esone 2. La maggior parte delle mutazioni riscontrate sono sostituzioni di singole basi (n=51) (Tab.5). Solo in 1 caso sono state osservate piccole delezioni o inserzioni di DNA. Delle 51 mutazioni osservate, 35 sono transizioni e 16 sono trasversioni con un rapporto di 2.18 (atteso 0.5,  $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test). L'analisi del pattern mutazionale, considerando gli effetti cumulativi delle sostituzioni nucleotidiche osservate in PAX-5, RhoH/TTF PIM-1 e c-MYC, rivela che le basi G+C vengono colpite con una frequenza 3.5 volte maggiore rispetto alle basi A+T. Anche se sembra che le mutazioni cadano generalmente all'interno dei motivi RGWY/RWCY, la prevalenza non è statisticamente significativa (PAX-5 10% versus 5.8%; RhoH/TTF 13% versus 7%; PIM-1, 6.7% versus 5.41% e c-MYC esone 1, 2% versus 0.8%). Anche in questo gruppo di linfomi alcune mutazioni trovate all'interno di PIM-1 e c-MYC possono provocare modificazioni strutturali e funzionali sulla proteina codificata. In particolare, 6 mutazioni di PIM-1 trovate in 2 LNH HCV correlati cadono all'interno di queste regioni. Due di queste mutazioni provocano sostituzioni aminoacidiche (Pro79Ala nel caso 4093 e Asn7Lys nel caso 4100), mentre le rimanenti 4 mutazioni sono mutazioni silenti.

**Tabella 5.** Analisi mutazionale di BCL6, RhoH/TTF, PAX-5, PIM-1 e c-MYC nel pannello di LNH HCV correlati

Caso	Istologia	BCL6	RhoH/TTF	PAX-5	PIM-1	c-MYC esoni 1 e 2
4076	MALT	-	-	-	-	G3031A
4079	LDGC	T570C, C780G, C786G, T838A	-	-	-	-
4081	FL	G722C, T736C	-	-	-	-
4082	LDGC	G734T, G809C	A295C, T300C, A373T, A421G, T488C, C515T, G538T, A582C, A748G, G884A, C885A, C890A, A894G, G900A, $\Delta$ TCACCGGTTT (869- 878)	G948A, G1017C, C1185T, G1206A, G1266A, G1287A, G1333A, G1347A, C1350T, G1381A	1097 $\Delta$ G, C1345T, G1495A, G1497A	-
4083	CLL/SLL	A1065G	-	-	-	-
4085	LDGC	A465C, A4787G	G700A, C885T	-	-	-
4087	MCL	-	-	G847T	-	G3004A
4089	CLL/SLL	A583G, C789G, G1003A	-	-	-	-
4090	LDGC	-	-	-	-	G2397A
4093	LDGC	G479C, A508G, G1067C	T956G	-	C1119T, G1127C, G1242A, C1875T, C1720G	-
4100	LDGC	T510C, G541A, T633G	-	C848T, C1052A	C1158G, T1177C, C1191A, A1746G	-
4159	LDGC	T488A, G954A	-	G1134A	-	-
4160	LDGC	C958T	-	-	-	-
4161	LDGC	A495G, T557C, C786G, G779A,	A852G, C885G	G1045C	C1325T	-
4163	LDGC	G859A, G954A,	-	-	-	-
4164	LDGC	-	-	-	-	G2709A
4165	MALT	G805A,	-	-	-	-

#### 4.5 Mutazioni di BCL6 negli AIDS-LNH

Sono state osservate mutazioni del gene BCL6 in 24/39 (61.5%) casi di AIDS-LNH (Tab.3). In particolare, sono risultati mutati 11/18 (61.1%) AIDS-LDGC, 5/11 (45.4%) AIDS-LB, 3/4 (75%) AIDS-LPSNC e 5/6 (83.3%) AIDS-PEL. Sono state osservate 71 sostituzioni nucleotidiche, di cui 36 transizioni e 35 transversioni e 5 delezioni o inserzioni. Il rapporto transizioni/transversioni è pari a 1.03 (atteso 0.5,  $p=0,05$ ,  $\chi^2$  test) e il rapporto G+C/A+T è pari a 1.15.

#### ***4.6 Mutazioni di BCL6 nei LNH HCV correlati.***

L'analisi mutazionale di BCL6 è stata effettuata su tutti e 32 i campioni. Sono risultati mutati 14/32 (44%) casi, in particolare 10/20 (50%) HCV-LDGC, 1/3 HCV-MALT, 2/4 HCV-LLC/SLLs e 1/3 HCV-LF. Sono state osservate 34 sostituzioni nucleotidiche, delle quali 19 transizioni e 15 transversioni, con un rapporto pari a 1.26 (atteso 0.5,  $p=0.06$ ,  $\chi^2$  test) (Tab. 4). Le mutazioni osservate mostrano una prevalenza di G+C rispetto ad A+T con un rapporto di 1.26. Inoltre, come atteso, le mutazioni cadono di prevalenza all'interno dei motivi RGYW/WRCY (10% versus 4%,  $p=0.01$ ).

#### ***4.7 Utilizzo dei geni $V_H$ negli AIDS-LNH***

E' stato amplificato un riarrangiamento Ig $V_H$  clonale in 65/67 (97%) AIDS-LNH, di questi 58/65 (89.2%) funzionali. In 3 casi è stato trovato un codone di stop all'interno dell'originale sequenza  $V_H$  produttiva (mutazione crippling), in 4 casi è stato amplificato solo il riarrangiamento non produttivo (Tab.6). I casi con solo il riarrangiamento non produttivo sono stati esclusi dall'analisi. Nei rimanenti 2 casi non è stato trovato nessun riarrangiamento. La distribuzione delle famiglie  $V_H$  negli AIDS-LNH non rispecchia la complessità del repertorio  $V_H$  germinale: la famiglia  $V_H$  usata più frequentemente è la  $V_{H4}$  (26/61; 42.6%), seguita dalla famiglia  $V_{H3}$  (20/61; 32.8%) e  $V_{H1}$  (7/61; 11.4%). L'analisi statistica ha evidenziato una selezione positiva e negativa legata ad alcune famiglie. In particolare la famiglia  $V_{H4}$  è

positivamente selezionata negli AIDS-LDGC e AIDS-LB (23/45; 51.1%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (83/260; 31.9%  $p=0.02$ ) e alle cellule B normali (24.8%;  $p<0.001$ )<sup>56</sup> al contrario della famiglia  $V_H3$  che risulta negativamente selezionata negli AIDS-LDGC e AIDS-BL (14/45; 31.1%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (141/260; 54.2%;  $p<0.01$ ) e alle cellule B normali (53.9%;  $p<0.01$ )<sup>56</sup>. Analizzando la distribuzione dei singoli geni  $V_H$ , il gene riarrangiato con maggiore frequenza è  $V_H4-34$  sia negli AIDS-LDGC (9/29; 31%) che negli AIDS-LB (4/16; 25%). L'utilizzo di questo gene è significativamente alto negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (3.9%;  $p<0.001$ )<sup>56</sup>.

**Tabella 6.** Analisi dei riarrangiamenti V<sub>H</sub> e profilo mutazionale negli AIDS-LNH

Caso	Istologia	EBV status	Famiglia V <sub>H</sub>	Gene V <sub>H</sub> germline	% di mutazione	D	J <sub>H</sub>	Funzionalità	Rapporto R/S FR <sup>a</sup>	Rapporto R/S CDR <sup>a</sup>
110	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	23.0	2-2	4b	+	<b>20/1*</b>	13/8
112	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	10.2	7-27	4b	+	9/4	6/3
120	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	20.3	3-10	4b	+	<b>22/16*</b>	7/5
1138	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 2	2-70	2.68	na	1	crippled	-	-
1902	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 1	1-69	13.5	2-2	6b	+	<b>11/11*</b>	7/2
2378	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	4.12	3-9+7-27+2-	2	+	5/3	2/2
2411	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-b	3.66	6-19	4b	+	3/2	2/1
2413	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 1	1-02	4.76	na	1	+	<b>3/2*</b>	<b>9/1*</b>
2727	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-39	16.8	2-21	5b	+	<b>19/16*</b>	9/6
2768	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	6.10	2-15	4b	crippled	-	-
2771	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-30.2	14.4	2-8	2	crippled	-	-
2772	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	11.6	3-16	5b	+	<b>10/10*</b>	8/6
2773	LDGC	-	V <sub>H</sub> 1	1-02	12.5	2-2	3b	+	<b>16/15*</b>	5/1
3668	LDGC	-	V <sub>H</sub> 1	1-46	1.01	3-22	5b	+	-	-
3671	LDGC	-	V <sub>H</sub> 3	3-15	15.3	na	6b	+	<b>15/13*</b>	<b>13/5*</b>
3674	LDGC	-	V <sub>H</sub> 3	3-07	6.12	7-27	3b	+	<b>6/4*</b>	<b>7/1*</b>
3675	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-59	21.6	na	4b	+	<b>22/21*</b>	12/8
3682	LDGC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-07	8.21	3-22	5a	+	<b>2/5*</b>	3/2
3687	LDGC	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	5.49	3-3	6c	+	6/5	3/2
1630	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-33	4.42	1-26	4b	+	<b>3/0*</b>	<b>9/1*</b>
1677	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-30	0	3-10	6b	+	-	-
2218	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-33	3.80	3-10	6c	+	4/3	2/1
2254	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-23	6.18	2-2	4b	+	<b>6/5*</b>	4/3
2255	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 6	6-01	7.92	3-22	3a	+	<b>5/7</b>	<b>11/1*</b>
2256	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	21.6	3-10	6c	+	<b>27/24*</b>	9/3
2257	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-04	8.33	4-17	4d	+	11/8	2/2
2280	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-04	6.80	na	3a	+	<b>7/5*</b>	<b>9/0*</b>
2283	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	6.59	na	3b	+	9/2	3/5
2285	LPSNC	POS	V <sub>H</sub> 3	3-15	6.00	3-10	4a	+	<b>3/3*</b>	3/5
642	LB	-	V <sub>H</sub> 2	2-05	6.39	3-22	4b	+	<b>7/5*</b>	<b>5/1*</b>
1140	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-09	1.30	6-13	4a	+	-	-
1143	LB	-	V <sub>H</sub> 3	3-23	16.5	1-26	4a	+	14/12	5/3
1155	LB	POS	V <sub>H</sub> 5	5-51	7.21	na	4b	+	<b>8/3*</b>	<b>10/1*</b>
1219	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-04	18.5	2-2	2	+	<b>19/15*</b>	<b>14/6*</b>
1220	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	3.28	D4	2	+	4/2	2/0
1248	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-61	8.08	2-2	4b	+	<b>5/5*</b>	<b>9/5*</b>
1907	LB	-	V <sub>H</sub> 3	3-43	-	na	4b	out of frame	-	-
2410	LB	-	V <sub>H</sub> 3	3-49	4.93	na	3b	+	4/1	<b>6/1*</b>
2415	LB	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	11.9	3-16	4b	+	<b>6/9*</b>	<b>12/3*</b>
3673	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-39	11.2	na	5b	+	<b>13/8*</b>	8/4
3680	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-13	13.4	3-22	1	out of frame	-	-
3683	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-33	5.78	3-3	6b	+	<b>7/7*</b>	<b>7/0*</b>
3685	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-30	7.43	2-15	4b	out of frame	-	-
AS283	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-23	9.40	na	4b/5b	out of frame	-	-
BRG-IgM	LB	-	V <sub>H</sub> 3	3-07	2.04	na	4b	+	<b>0/3*</b>	2/1
ESIII	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-61	6.70	na	4b	+	<b>8/5*</b>	7/1
HBL2	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	6.52	3-16	6c	+	10/4	4/1
HBL3	LB	-	V <sub>H</sub> 4	4-34	15.2	6-19	5b	+	<b>11/18*</b>	<b>14/1*</b>
Pa682	LB	POS	V <sub>H</sub> 3	3-30	7.48	na	4b	+	<b>7/4*</b>	<b>8/3*</b>
842	PEL	-	V <sub>H</sub> 1	1-24	7.90	na	4b/5b	+	<b>8/5*</b>	<b>9/1*</b>
1899	PEL	-	V <sub>H</sub> 3	3-23	6.50	2-15	5a	+	<b>4/5*</b>	4/3
1912	PEL	POS	V <sub>H</sub> 4	4-39	6.00	na	4b	+	<b>5/3*</b>	4/3
1928	PEL	POS	V <sub>H</sub> 3	3-73	12.1	na	3a	+	<b>13/11*</b>	6/6
HBL6	PEL	POS	V <sub>H</sub> 5	5-51	5.78	na	6b	+	<b>6/4*</b>	4/3
BC2	PEL	POS	V <sub>H</sub> 3	3-73	5.72	2-2	6b	+	<b>7/5*</b>	5/1
2439	PBL	-	V <sub>H</sub> 3	3-30	0	na	6b	+	-	-
2440	PBL	POS	V <sub>H</sub> 5	5-51	0	3-16	6b	+	-	-
2441	PBL	POS	V <sub>H</sub> 1	1-46	0	2-15	6b	+	-	-
2442	PBL	POS	V <sub>H</sub> 5	5-51	0	4-11	6b	+	-	-
2443	PBL	-	V <sub>H</sub> 1	1-e	0	3-10	6b	+	-	-
2444	PBL	POS	V <sub>H</sub> 6	6-01	7.60	na	6b	+	6/5	6/0
2445	PBL	POS	V <sub>H</sub> 3	3-11	0	na	6b	+	-	-
2862	PBL	POS	V <sub>H</sub> 3	3-30	10.8	6-19	4b	+	3/2	7/4
2926	PBL	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	15.6	3-16	5b	+	<b>9/7*</b>	<b>3/4*</b>
2929	PBL	POS	V <sub>H</sub> 4	4-34	5.26	3-3	3a	+	<b>1/3*</b>	3/1

<sup>a</sup> Numero di mutazioni replacement (R) / silent (S) osservate. La significatività del R/S osservato rispetto all'atteso ( $p < 0.05$ ) è indicato in grassetto e con un asterisco.

#### **4.8 Riarrangiamenti $V_L$ negli AIDS-LNH**

E' stato amplificato un riarrangiamento  $V_L$  clonale in 48/60 (80%) AIDS-LNH, di questi 40/48 (83.3%) funzionali. Complessivamente, 18/40 (45%) AIDS-LNH riarrangiano un gene  $V_K$  funzionale e 22/40 (55%) un gene  $V_\lambda$  funzionale (Tab. 7). E' stata osservata una prevalenza di riarrangiamenti  $V_\lambda$  negli AIDS-LB (9/15; 60%), nei PEL (5/6; 83.3%) e nei PBL (2/3), ma non nei LDGC (6/17; 35.3%). La distribuzione delle famiglie  $V_K$  negli AIDS-LNH non riflette la complessità del repertorio germinale e non rispecchia la normale distribuzione nelle cellule B normali <sup>57</sup>. La famiglia riarrangiata più frequentemente è la  $V_{K1}$  (7/18; 38.8%) seguita da  $V_{K4}$  (6/18; 33.3%) e  $V_{K3}$  (5/18; 27.7%). In particolare la famiglia  $V_{K4}$  risulta positivamente selezionata negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (5.30%;  $p<0.001$ ) al contrario della famiglia  $V_{K2}$  che risulta essere sottorappresentata negli AIDS-LNH (0/19) rispetto alle cellule B normali (19%;  $p=0.03$ ) <sup>57</sup>. Analizzando la distribuzione dei geni  $V_K$ , il più frequentemente riarrangiato negli AIDS-NHL risulta essere  $V_{K4-1}$  (6/19; 31.6%) seguito da  $V_{K1-39/1D-39}$  (5/19; 26.3%). L'utilizzo del gene  $V_{K4-1}$  è significativamente alto negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (5.3%;  $p<0.001$ ) <sup>57</sup> ed è preferenzialmente riarrangiato negli AIDS-LDGC e negli AIDS-LB (4/17; 23.5%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (7/54; 12.9%). Anche il gene  $V_{K1-39/1D-39}$  è



particolarmente frequente negli AIDS-LDGC (4/11; 36.3%) rispetto ai LDGC dell'immunocompetente (3/28; 10.7%) e alle cellule B normali (10.6%)<sup>57</sup>.

Nei casi con un riarrangiamento  $V_{\lambda}$ , le famiglie più frequenti risultano essere  $V_{\lambda}1$  e  $V_{\lambda}3$  (8/22; 36.4%) seguite da  $V_{\lambda}2$  (3/22; 13.6%). E' stato osservato negli AIDS-LNH un utilizzo preferenziale della famiglia  $V_{\lambda}9$  (2/22; 9.1%) rispetto alle cellule B normali (0.58%;  $p < 0.01$ )<sup>53</sup>. Il gene riarrangiato con maggiore frequenza è  $V_{\lambda}1-44$  (4/22; 18.2%) seguito da  $V_{\lambda}1-47$  (3/22; 13.64%).

**Tabella 7.** Analisi dei riarrangiamenti V<sub>L</sub> e profilo mutazionale negli AIDS-LNH

Caso	Istologia	EBV status	Famiglia V <sub>L</sub>	Gene V <sub>L</sub> germline	% di mutazione	J <sub>L</sub>	Funzionalità	Rapporto R/S FR <sup>a</sup>	Rapporto R/S CDR <sup>a</sup>
120	LDGC	POS	V <sub>λ</sub> 2	V <sub>λ</sub> 2-8	11.2	J <sub>κ</sub> 3b	+	<b>8/4*</b>	<b>15/6*</b>
			V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-11	0	J <sub>κ</sub> 5	out of frame	-	-
1138	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	2.81	J <sub>κ</sub> 1	crippled	-	-
1902	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	7.72	J <sub>κ</sub> 1	+	9/4	4/5
1905	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-20	0	J <sub>κ</sub> 3	out of frame	-	-
2411	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	3.51	J <sub>κ</sub> 4	+	4/2	4/0
2413	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-5	5.61	J <sub>κ</sub> 1	+	<b>3/3*</b>	<b>8/2*</b>
2772	LDGC	-	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-19	9.58	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>5/5*</b>	4/2
2768	LDGC	POS	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-10	3.87	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	2/2	2/0
3668	LDGC	-	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	3.18	J <sub>κ</sub> 1	+	2/1	2/0
3671	LDGC	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-44	11.7	J <sub>λ</sub> 3b	+	<b>10/8*</b>	10/4
3674	LDGC	-	V <sub>κ</sub> 2	V <sub>κ</sub> 2-30	0	J <sub>κ</sub> 2	out of frame	-	-
			V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-11	0	J <sub>κ</sub> 4	out of frame	-	-
3675	LDGC	-	V <sub>κ</sub> 2	V <sub>κ</sub> 2-30	0	J <sub>κ</sub> 1	out of frame	-	-
3682	LDGC	POS	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-11	7	J <sub>κ</sub> 4	+	<b>7/4*</b>	5/4
3687	LDGC	-	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	2.97	J <sub>κ</sub> 1	+	<b>2/2*</b>	3/2
1630	LPSNC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-27	0	J <sub>κ</sub> 2	+	-	-
			V <sub>κ</sub> 2	V <sub>κ</sub> 2-24	0	J <sub>κ</sub> 2	+	-	-
2218	LPSNC	POS	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-1	7.31	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	4/3	2/3
2254	LPSNC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-5	2.83	J <sub>κ</sub> 2	+	3/2	1/1
2255	LPSNC	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	8.12	J <sub>κ</sub> 2	+	<b>8/6*</b>	5/4
2256	LPSNC	POS	V <sub>κ</sub> 6	V <sub>κ</sub> 6-21	8.14	J <sub>κ</sub> 2	+	4/3	3/1
2257	LPSNC	POS	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-20	4.21	J <sub>κ</sub> 4	+	4/2	<b>5/1*</b>
2280	LPSNC	POS	V <sub>λ</sub> 9	V <sub>λ</sub> 9-49	0	J <sub>λ</sub> 7	+	-	-
2285	LPSNC	POS	V <sub>λ</sub> 8	V <sub>λ</sub> 8-61	4.66	J <sub>λ</sub> 3b	out of frame	-	-
642	LB	-	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-15	2.10	J <sub>κ</sub> 1	+	2/0	3/1
1140	LB	POS	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-44	3.40	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	2/0	7/1
1155	LB	POS	V <sub>λ</sub> 2	V <sub>λ</sub> 2-8	3.06	J <sub>λ</sub> 3b	+	<b>1/2*</b>	<b>5/1*</b>
1219	LB	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-47	1.02	J <sub>λ</sub> 3b	+	-	-
1220	LB	-	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	0	J <sub>κ</sub> 3	out of frame	-	-
1248	LB	-	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	2.33	J <sub>κ</sub> 4	+	<b>1/3*</b>	2/1
1907	LB	-	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	3.33	J <sub>κ</sub> 2	+	<b>2/3*</b>	2/3
3673	LB	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-47	5.10	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>4/2*</b>	<b>9/0*</b>
3680	LB	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-37/1D-37	5.71	J <sub>κ</sub> 4	out of frame	-	-
3683	LB	POS	V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	2.36	J <sub>κ</sub> 1	+	0/0	<b>2/0*</b>
			V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-47	9.21	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	out of frame	-	-
3685	LB	POS	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-44	1.12	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	-	-
BRG-IgM	LB	-	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-21	1.83	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	-	-
			V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	0	J <sub>κ</sub> 2	out of frame	-	-
ESIII	LB	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-47	5.78	J <sub>λ</sub> 3b	+	9/2	6/0
2410	LB	-	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-15	0	J <sub>κ</sub> 4	+	-	-
Pa682	LB	POS	V <sub>κ</sub> 3	V <sub>κ</sub> 3-20	4.11	J <sub>κ</sub> 4	+	3/0	0/3
			V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-12	5.59	J <sub>λ</sub> 3b	out of frame	-	-
HBL2	LB	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-51	3.74	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>2/1*</b>	5/3
			V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-33/1D-33	0	J <sub>κ</sub> 4	out of frame	-	-
HBL3	LB	-	V <sub>λ</sub> 1	V <sub>λ</sub> 1-44	12.7	J <sub>λ</sub> 1	+	<b>11/11*</b>	9/6
BC2	PEL	POS	V <sub>λ</sub> 2	V <sub>λ</sub> 2-14	2.38	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>0/2*</b>	3/2
1899	PEL	-	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-19	12.9	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>7/9*</b>	11/10
842	PEL	-	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-21	6.94	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>5/7*</b>	6/2
1912	PEL	POS	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-9	2.83	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	2/1	<b>5/0*</b>
			V <sub>κ</sub> 2	V <sub>κ</sub> 2-28/2D-28	0	J <sub>κ</sub> 1	out of frame	-	-
			V <sub>κ</sub> 1	V <sub>κ</sub> 1-39/1D-39	0	J <sub>κ</sub> 4	out of frame	-	-
HBL6	PEL	POS	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	3.00	J <sub>κ</sub> 3	+	<b>2/2*</b>	<b>5/0*</b>
BCBL1	PEL	-	V <sub>λ</sub> 3	V <sub>λ</sub> 3-9	5.67	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	<b>7/3*</b>	<b>5/1*</b>
2926	PBL	POS	V <sub>λ</sub> 9	V <sub>λ</sub> 9-49	2.89	J <sub>λ</sub> 2/J <sub>λ</sub> 3a	+	1/0	2/2
2442	PBL	POS	V <sub>κ</sub> 4	V <sub>κ</sub> 4-1	1.87	J <sub>κ</sub> 1	+	-	-
2443	PBL	-	V <sub>λ</sub> 6	V <sub>λ</sub> 6-57	0	J <sub>λ</sub> 3b	+	-	-

<sup>a</sup> Numero di mutazioni replacement (R) / silent (S) osservate. La significatività del R/S osservato rispetto all'atteso ( $p < 0.05$ ) è indicato in grassetto e con un asterisco.

#### ***4.9 Analisi della regione CDR3 dei geni IgV negli AIDS-LNH***

In base ai criteri adottati (vedi Materiali e Metodi) è stato possibile assegnare una famiglia D in 41/61 (67.2%) riarrangiamenti “in-frame”. La distribuzione delle famiglie D nel pannello di AIDS-LNH riflette quella osservata nelle cellule B normali e nei LNH aggressivi dell’immunocompetente. In particolare la famiglia D più frequentemente riarrangiata è la famiglia D3 (18/41; 43.9%) seguita dalla famiglia D2 (12/41; 29.3%) e dalla famiglia D6 (4/41; 14.6%) (Tab. 6). Quando si esamina la distribuzione dei singoli frammenti D, il segmento più frequentemente riarrangiato risulta essere il D2-2 (7/40; 17.5%), seguito dal D3-10 (6/40; 15%) e dal D3-16 (5/40; 12.5%). L’utilizzo del segmento D2-2 risulta essere significativamente alto negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (3.87%,  $p < 0.01$ ), ed è positivamente selezionato negli AIDS-LDGC e AIDS-LB (6/31; 19.3%;  $p < 0.04$ ) rispetto ai LDGC e LB dell’immunocompetente (3/68; 4.41%). L’analisi della distribuzione dei segmenti D all’interno del pannello studiato evidenzia che particolari frammenti D si associano a specifiche categorie di AIDS-LNH e che esistono riarrangiamenti preferenziali di frammenti D con specifici geni  $V_H$ . In particolare 4/6 (66.6%) segmenti D3-10 sono riarrangiati dagli AIDS-LPSNC ( $p < 0.01$ ), mentre 4/5 segmenti D3-16 sono preferenzialmente riarrangiati con il gene VH4-34. L’associazione del gene

VH4-34 con il frammento D3-16 (4/13; 30.8%) è selettivo per gli AIDS-LNH mentre è assente nei LDGC e LB dell'immunocompetente (0/14,  $p=0.03$ ).

L'utilizzo delle famiglie  $J_H$  negli AIDS-LNH è del tutto sovrapponibile a quello osservato nelle cellule B normali e nell'immunocompetente. In particolare, la famiglia  $J_H$  più frequentemente riarrangiata è la  $J_{H4}$  (23/61; 37.7%), seguita da  $J_{H6}$  (17/61; 27.9%) e da  $J_{H3}$  (8/61; 13.1%) (Tab. 6). La distribuzione delle famiglie  $J_H$  è significativamente diversa tra i casi mutati e i casi non mutati all'interno del pannello. Infatti si identifica un utilizzo virtualmente esclusivo della famiglia  $J_{H6}$  nei casi non mutati vs i casi mutati (7/9; 77.7% vs 10/52; 19.23%;  $p<0.002$ ).

L'uso dei segmenti  $J_K$  negli AIDS-NHL riflette la rappresentazione osservata nelle cellule B normali <sup>57</sup>, e nell'immunocompetente, mentre è stata evidenziata una selezione positiva e negativa riguardo specifici frammenti  $J_\lambda$  (Tab.7). In particolare, la famiglia  $J_{\lambda 2/3}$  risulta essere positivamente selezionata negli AIDS-LNH (20/22; 90.9%) rispetto alle cellule B normali (39%;  $p<0.02$ ); al contrario, la famiglia  $J_{\lambda 7}$  risulta essere negativamente selezionata rispetto alle cellule B normali (54.1%;  $p<0.02$ ) <sup>53</sup>.

La lunghezza media del CDR3 negli AIDS-LNH è di 13.2 aa. La lunghezza più breve è stata riscontrata negli AIDS-LB (11.3aa), mentre la più lunga è stata osservata negli AIDS-PBL (15.5aa). L'analisi aminoacidica del CDR3 ha messo in evidenza che 2 casi (1 AIDS-LDGC e 1 AIDS-PBL) presentano una sequenza aminoacidica altamente omologa: entrambi i casi

riarrangiano lo stesso frammento D (D3-16) e lo stesso gene J (J<sub>H</sub>5b). Entrambi i casi riarrangiano un gene V<sub>λ</sub>.

#### ***4.10 Analisi del profilo mutazionale dei geni IgV negli AIDS-LNH***

L'analisi mutazionale ha messo in evidenza che 60/67 (89.5%) dei AIDS-LNH risulta essere mutata nei geni IgV. La frequenza media di mutazione per i geni V<sub>H</sub> è 9.36% (mediana 7.35%, range 2.04-23.04%), per i geni V<sub>L</sub> la frequenza media è del 5.45% (mediana 4.06%, range 2.1-13%). Analizzando i singoli gruppi clinico-patologici di AIDS-LNH, i casi non mutati sono significativamente rappresentati dagli AIDS-PBL (6/10; 60%; p<0.0001), mentre tra i casi mutati, il profilo mutazionale risulta essere comparabile nelle diverse categorie di AIDS-LNH.

L'analisi della distribuzione delle mutazioni “replacement” (R) e “silent” (S) nei geni V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> è stata eseguita al fine di determinare la pressione dell'antigene sulla selezione delle cellule tumorali. Sono stati utilizzati due modelli statistici: la distribuzione binomiale di Chang-Casali e la distribuzione multinomiale. I risultati ottenuti sono sovrapponibili per tutti esclusi 6 casi analizzati.

L'analisi combinata delle sequenze V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> ha evidenziato la tendenza a mantenere le sequenze delle regioni FR in 41/54 (75.9%) AIDS-LNH, inclusi 18/26 (69.2%) AIDS-LDGC, 14/17 (82.3%) AIDS-LB, 7/7 (100%) AIDS-PEL e 2/4 (50%) AIDS-PBL. Un numero significativamente più alto di

mutazioni R nel CDR, che suggerisce una selezione dovuta all'affinità verso l'antigene, è stato osservato in 24/54 (44.4%) casi inclusi 7/26 (7.92%) AIDS-LDGC, 11/17 (64.7%) AIDS-BL, 4/7 (57.1%) AIDS-PEL e 1/4 (25%) AIDS-PBL.

#### ***4.11 Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni $V_H$ negli AIDS-LNH***

L'analisi delle mutazioni "ongoing" negli AIDS-LNH è stata eseguita clonando 16 riarrangiamenti  $V_H$  clonali derivati da 4 AIDS-LB, 8 AIDS-LDGC e 4 AIDS-LPSNC (Tab.8). In tutti i casi la sequenza  $V_H$  è stata precedentemente stabilita sequenziando il frammento PCR ottenuto ed è stata dimostrata essere somaticamente mutata. In 13/16 (81%) AIDS-LNH la sequenza clonale  $V_H$  non ha mostrato eterogeneità intraclonale indicando l'assenza di mutazioni "ongoing". Una evidente attività "ongoing" è stata riscontrata in 1/8 AIDS-LDGC e 1/4 AIDS-LB, mentre una ridotta attività "ongoing" è stata riscontrata in 1/4 AIDS-LPSNC.

**Tabella 8.** Analisi dell'attività ongoing del meccanismo di ipermutazione somatica sui geni V<sub>H</sub> negli AIDS-LNH

Caso	Istologia	EBV status	Immunofenotipo				Gene V <sub>H</sub> germline	% di mutazione	N° di mutazioni non confermate	N° di mutazioni confermate
			-----							
			LMP1	BCL6	MUM1	CD138				
3674	LDGC	-	-	POS	-	-	3-07	6.12	0	0
3675	LDGC	-	-	POS	-	-	4-59	21.6	3	0
2772	LDGC	-	-	POS	-	-	4-34	11.6	14	11
3687	LDGC	-	-	POS	-	-	4-34	5.49	2	0
1138	LDGC	POS	POS	-	POS	POS	2-70	2.68	0	0
2768	LDGC	POS	POS	-	POS	POS	4-34	6.10	1	0
2378	LDGC	-	-	na	na	na	4-34	4.12	1	0
2727	LDGC	-	-	POS	-	-	4-39	16.8	8	0
2256	LPSNC	POS	POS	-	POS	POS	4-34	21.6	2	4
2257	LPSNC	POS	POS	-	POS	POS	4-38	8.33	0	0
2254	LPSNC	POS	POS	-	POS	POS	3-23	6.18	0	0
2255	LPSNC	POS	POS	-	POS	POS	6-01	7.92	2	0
1248	LB	-	-	POS	-	-	4-61	8.08	1	1
3673	LB	-	-	POS	-	-	4-39	11.2	0	0
3683	LB	POS	-	POS	-	-	3-33	5.78	2	0
1219	LB	-	-	POS	-	-	4-04	18.5	13	16

## 5. Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano come le mutazioni di PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC siano un evento frequente nella linfomagenesi dei linfomi che insorgono in pazienti HIV e HCV positivi.

I proto-oncogeni colpiti da ipermutazione somatica codificano proteine con funzioni diverse, tra cui trasduttori di segnale (PIM-1 e RhoH/TTF) e fattori trascrizionali (PAX-5 e c-MYC). Hanno in comune alcune caratteristiche: sono espressi dalle cellule B nel CG, sono coinvolti in traslocazioni cromosomiche in alcuni linfomi e controllano la crescita, il differenziamento e l'apoptosi delle cellule B.

In base alla distribuzione e al tipo di mutazioni, il processo di ipermutazione somatica aberrante, può alterare la funzione di PAX-5, RhoH/TTF PIM-1, e c-MYC attraverso due modalità. Le mutazioni colpiscono sia regioni regolatorie sia regioni codificanti di questi geni. Questo comporta la potenziale deregolazione della trascrizione di alcuni di questi geni (PAX-5, RhoH/TTF e c-MYC) e l'alterazione della proteina codificata (PIM-1 e c-MYC). In questo ultimo caso, le mutazioni che provocano la sostituzione di alcuni aminoacidi potrebbero alterare le proprietà biochimiche e strutturali della proteina.

In particolare, studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che le mutazioni che colpiscono il dominio di trans-attivazione di c-MYC possono deregolarne la funzione interferendo sulla fosforilazione, la stabilità proteica o la repressione



dell'attività trans-attivante attraverso la proteina p107<sup>58,59,60</sup>. Questi risultati suggeriscono che, come nel caso dei LB dove c-MYC è traslocato, almeno alcune delle mutazioni indipendenti dalla traslocazione negli AIDS e HCV-LNH sono state selezionate per la loro abilità nell'alterare la funzione di c-MYC<sup>61</sup>.

Il profilo molecolare dell'ipermutazione somatica aberrante trovato negli AIDS-LNH e negli HCV-LNH è simile a quello visto per i linfomi diffusi a grandi cellule dell'immunocompetente e presenta alcune similitudini con lo spettro mutazionale dei geni IgV e BCL6<sup>62,15</sup>. Primo, la predominanza delle mutazioni riguarda sostituzioni di singoli nucleotidi e le delezioni o inserzioni sono rare o assenti. Secondo, è stata osservata per tutti e quattro i geni una prevalenza di transizioni rispetto alle transversioni, un "bias" per motivi specifici (RGYW/WRCY), ed una elevata ratio di sostituzioni G+C rispetto ad A+T. Terzo, le mutazioni si concentrano in regioni vicine ai siti d'inizio della trascrizione dei geni colpiti dal meccanismo di ipermutazione aberrante come riportato per le IgV e BCL6. Il tasso di ipermutazione somatica aberrante di PAX-5, RhoH/TTF PIM-1 e c-MYC è marcatamente più basso rispetto a quello dei geni IgV e BCL6 riportato nei LDGC dell'immunocompetente. Probabilmente ciò potrebbe essere dovuto ad un possibile basso tasso di mutazione intrinseco e/o ad una biologica selezione dei mutanti. Le mutazioni sembrano essere indipendenti dalle traslocazioni

dei proto-oncogeni, dato che, come documentato nel caso di c-MYC, sono state trovate in casi privi di grosse alterazioni del locus.

In contrasto tuttavia con l'ipermutazione somatica fisiologica che colpisce i geni delle IgV e BCL6 nelle cellule B del centro germinativo, il meccanismo di ipermutazione aberrante che coinvolge i proto-oncogeni PAX-5, RhoH/TTF, PIM-1 e c-MYC è selettivamente ristretto ai linfomi aggressivi in quanto le mutazioni in questi geni sono assenti nelle cellule B normali e sono rare o assenti nei linfomi indolenti <sup>17</sup>. La correlazione tra linfoma aggressivo e meccanismo di ipermutazione aberrante può quindi rafforzare ulteriormente il ruolo patogenetico di queste lesioni genetiche nella linfomagenesi. Il meccanismo molecolare che provoca l'ipermutazione aberrante di multipli proto-oncogeni al momento è sconosciuto ma, come suggerito per i LDGC dell'immunocompetente, può riflettere un malfunzionamento del meccanismo di ipermutazione somatica fisiologicamente attivo nelle cellule B del centro germinativo.

All'interno dello spettro clinico-patologico degli AIDS-NHL studiati, il meccanismo di ipermutazione aberrante sembra colpire con una frequenza simile tutte le categorie tumorali investigate così come all'interno del pannello di LNH HCV correlati. Tuttavia, nei LNH HCV correlati, la frequenza dei casi mutati in almeno 1 gene (31%) è più bassa di quella riportata nei linfomi dell'immunocompetente (75%) e AIDS correlati (50%) ma, quando si considerano i loci mutati, la frequenza di mutazione per 100

paia di basi è confrontabile con quella riportata per i casi non HCV infetti. Inoltre, i casi di LNH HCV correlati che presentano mutazioni in almeno uno dei 3 proto-oncogeni PIM-1, PAX-5 e RhoH/TTF sono mutati anche in BCL6. Viceversa, i casi che presentano mutazioni nel gene c-MYC (esone 1) sono germinali in BCL6 e, raramente, presentano mutazioni negli altri geni studiati. Questo dato si differenzia da ciò che si è osservato nei LNH dell'immunocompetente e HIV correlati.

L'analisi mutazionale svolta sui geni IgV ha messo in evidenza che la maggioranza dei AIDS-LNH deriva da cellule B che hanno subito la reazione CG. In particolare, in contrasto con i LNH dell'immunocompetente, la bassa frequenza di attività intraclonale riscontrata negli AIDS-LNH suggerisce che la maggior parte di questi linfomi deriva da cellule B che hanno concluso la reazione CG. L'unico sottogruppo che sembra distinguersi da questa ipotesi sono gli AIDS-PBL. Infatti, questo gruppo presenta un fenotipo tipicamente post-CG (BCL6<sup>-</sup>/MUM-1<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup>) ma, nella maggioranza dei casi, presenta IgV germinali. Questi dati potrebbero suggerire un'origine del clone neoplastico da cellule B che hanno raggiunto uno stadio differenziativo avanzato indipendente dalla reazione CG <sup>63</sup>.

I dati molecolari ottenuti sui geni IgV suggeriscono che l'espansione del clone tumorale negli AIDS-LNH potrebbe essere guidata da un antigene o favorita da un superantigene.

La presenza di ipermutazione somatica e il significativo “clustering” di mutazioni S nelle regioni FR nella maggioranza dei AIDS-LNH e di mutazioni R nelle regioni CDR in una frazione di casi infatti, indica che l’espansione clonale potrebbe essere guidata da antigeni convenzionali. L’analisi svolta sullo studio dei geni IgV ha messo in evidenza un utilizzo preferenziale di particolari geni VH (VH4-34) e VL (VK4-1) in una frazione di AIDS-LNH, ma non di J<sub>H</sub>, D e J<sub>L</sub>. Anche in questa analisi, l’unico sottogruppo che si distingue è rappresentato dagli AIDS-PBL. Infatti si identifica un utilizzo virtualmente esclusivo della famiglia J<sub>H</sub>6 nei casi non mutati rappresentati per la quasi totalità dagli AIDS-PBL. L’elevato utilizzo dei geni della famiglia J<sub>H</sub>6 utilizzati nei riarrangiamenti IgV<sub>H</sub> produttivi e non mutati dei PBL, riflette quello rilevato nelle cellule B normali<sup>56</sup>. L’uso dei geni J<sub>H</sub>6 aumenta infatti nelle cellule B con riarrangiamenti V<sub>H</sub>DJ non mutati e produttivi, mentre diminuisce nelle cellule B con riarrangiamenti produttivi, ma mutati. L’analisi della lunghezza del CDR3 all’interno dei riarrangiamenti V<sub>H</sub>DJ delle cellule B normali, suggerisce che un CDR3 lungo, caratterizzato dall’utilizzo dei geni della famiglia J<sub>H</sub>6, può favorire la selezione positiva di cellule B nel repertorio germinale non mutato, mentre può svantaggiare l’espansione guidata da un antigene<sup>56</sup>.

Il gene VH4-34, usato preferenzialmente dagli AIDS-LNH, contiene un sito di glicosilazione naturale (Asn-X-Ser/Thr) all’interno della regione CDR2. Studi recenti hanno dimostrato che la glicosilazione del recettore B può giocare un

ruolo importante nello sviluppo di alcune neoplasie in quanto le sequenze VH caratterizzate da questi siti vengono positivamente selezionate dalle cellule tumorali <sup>64</sup>. L'utilizzo di geni VH come VH4-34 potrebbe facilitare l'introduzione di particolari oligosaccaridi che potrebbero favorire l'interazione del recettore B con le lectine delle cellule stromali all'interno del CG permettendo la sopravvivenza o la crescita del clone tumorale <sup>64</sup>.

Infine, l'utilizzo preferenziale dei geni VH4-34 e VK4-1 in una frazione di AIDS-LNH, può suggerire una stimolazione del clone B pre-neoplastico dovuta ad un superantigene con attività autoreattiva e/o polireattiva <sup>65</sup>. I candidati come probabili antigeni/superantigeni implicati nella patogenesi dei AIDS-LNH non sono ancora stati identificati.

Alcuni fenomeni autoimmuni sono collegati allo sviluppo di neoplasie B <sup>66</sup>. Tuttavia non è chiaro se questi fenomeni abbiano origine dalle cellule neoplastiche o dalle rimanenti cellule B <sup>67,68</sup>. In entrambi i casi, l'autoimmunità può svilupparsi insieme al tumore oppure seguirne lo sviluppo o, ancora, può diventare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie linfoidi B <sup>69</sup>.

In letteratura VH4-34 e VK4-1 sono associati all'anemia emolitica autoimmune dove il recettore B codificato dai due geni riconosce autoantigeni <sup>70,71</sup>. Si può quindi ipotizzare che, nella patogenesi di una parte di AIDS-LNH, possa essere coinvolto anche un autoantigene.

Lo studio del meccanismo di ipermutazione somatica fisiologica ed aberrante all'interno di un gruppo di neoplasie B virus correlate, può costituire uno strumento classificativo utile a raffinare la distinzione dei linfomi virus correlati in categorie più omogenee e a comprendere meglio la patogenesi di queste malattie. Inoltre, l'identificazione di particolari geni VH utilizzati in maniera preferenziale da sottogruppi di linfomi AIDS correlati potrebbe costituire un potenziale marcatore prognostico come visto per le leucemie linfatiche croniche.

## Bibliografia

1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361
2. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting. Airlie house , Virginia, 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835
3. Burrows PD, Cooper MD. B cell development and differentiation. *Curr Opin Immunol* 1997;9:239
4. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev* 1997;136:1115
5. Gordon J, Gregory CD, Grafton G, et al. Signals for survival and apoptosis in normal and neoplastic B lymphocytes. *Adv Exp med Biol* 1996;406:139
6. Kosko-Vilbois MH, Zentgraf H, Gerdes J, et al. To “B” or not to “B” a germinal center? *Immunol Today* 1997;18:2257
7. Liu YJ, de Bouteiller O, Fugier-Vivier I. Mechanism of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 1997;9:256
8. Berek C. Somatic mutations and memory. *Curr Opin Immunol* 1993;5:218
9. Dalla Favera R., Gaidano G. Lymphomas in Cancer. Principles e Practice of Oncology. 6<sup>th</sup> edition. De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001;45:2215-2235
10. 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.
11. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;34:1520-1529.

12. 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.
13. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649
14. Janeway CA. *Immunobiologia.* Piccin. 2003; 127-160, 229-303.
15. Pasqualucci L., Migliazza A., Fracchiolla N., William C., Neri A., Baldini L., Chaganti R.S., Klein U., Kupper R., Rajewsky K., Dalla-Favera R. BCL6 mutations in normal germinal center B-cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95: 11816-11821
16. Shen H.M., Peters A., Baron B., Zhu X., Storb U. Mutation of BCL6 gene in normal B-cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 1998;280: 1750-1752
17. Pasqualucci L., Neumelster P., Goossens T., Nanjangod G., Chaganti R.S. K., Küppers R., Dalla-Favera R., Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412: 341-346
18. Stapleton P, Weith A, Urbanek P, Kozmik Z, Busslinger M. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nat Genet* 1993;3:292
19. Busslinger M, Urbanek P. The role of BSAP (PAX-5) in B-cell development. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:595
20. Neurath MF, Max EE, Strober W. BSAP (PAX-5) regulates the murine immunoglobulin 3' alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:5336
21. Stuart ET, Haffner R, Oren M, et al. Loss of p53 function through PAX mediated transcriptional repression. *EMBO J* 1995;14:



22. Morrison A.M., Nutt S.L., Thevenin C., Rolink A., Busslinger M. Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (PAX-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin. Immunol.* 1998;10: 133-142
23. Preudhomme C., et al Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 2000;19: 2023-2032
24. Preudhomme E, Roumier C, Denis C, et al. Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization. *Genomics* 1997;43:89
25. Hoover D., Friedmann M., Reeves R., Magnuson N.S. Recombinant human pim-1 protein exhibits serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 2001;266: 14018-14023
26. Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Sugiyama A, et al. Pim-1 kinase stimulates c-Myc-mediated death signalling upstream of caspase-3 (CPP32)-like protease activation. *Oncogene* 1997;15:1471
27. Dang C.V. C-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19: 1-11
28. Boxer L, Dang CV. Translocations involving c-MYC and c-MYC function. *Oncogene* 2001;20:5595
29. Goossens T., Klein U., Koppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:2463-2468
30. Brechot C., Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology.*2004;127:56
31. Swaminathan S., Molecular biology of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Semin. Hematol.* 2003;40:107
32. Wolf JK., Franco EL., Arbeit JM., et al. Innovations in understaining the biology of cervical cancer. *Cancer* 2003;98(9 suppl):2064

33. Barbanti-Brodano G., Sabbioni S., Martini F., Negrini M., et al. Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* 2004;318:1-9
34. Barmak K., Harhaj E., Grant C., Alefantis T., et al. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology* 2003;308:1-12
35. Liang TJ., Heller T. Pathogenesis of hepatitis C associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:62-71
36. Ballerini P., Gaidano G., Gong J.Z., et al. Multiple genetic lesions in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993;81: 166-176
37. Jaffe E.S., Harris N.L, Stein H., Vardiman J.V. eds. World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press 2001
38. Dalla Favera R., Gaidano G., *Cancer, Principles e Practice of Oncology* Lippincott Williams & Wilkins 2001
39. Carbone A., Gloghini A., Larocca L.M., Capello D., Pierconti F., Canzonieri V., Tirelli U., Dalla-Favera R., Gaidano G. Expression profile of MUM1/IRF-4, BCL6 and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 2001;97: 744-75
40. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-62
41. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;354 :41-52
42. Pena LR, Nand S, De Maria N, Thiel DH. Hepatitis C Virus infection and lymphoproliferative disorders. *Dig Dis Sci* 2000; 45:1854-60
43. Silvestri F, Bacarani M. Hepatitis C virus-related lymphomas. *Br J Haematol* 1997;99:475-80

44. Gasparotto D, De Re V, Baiocchi M. Hepatitis C virus, B-cell proliferation and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2002;43:747-51
45. Negri E, Little D, Baiocchi M, La Vecchia C, Franceschi S. B-cell non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection: a systematic review. *Int J Cancer* 2004;111:1-8
46. Gisbert JP, Garcia-Buey L, Pajares JM, Moreno-Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003;125:1723-32
47. Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Variable gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child. Somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med* 1994;180:1383-1393.
48. 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 posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 2003;102:3775-3785
49. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol.* 1992; 29: 193.
50. Fais F, Gaidano G, Capello D, Gloghini A, Ghiotto F, Roncella S, Carbone A, Chiorazzi N, Ferrarini M. Immunoglobulin V region gene use and structure suggest antigen selection negli AIDS-related primary effusion lymphomas. *Leukemia.* 1999; 13: 1093-1099.
51. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukaemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1515-1525.

52. 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.
53. Farner NL, Dörner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human  $V_{\lambda}J_{\lambda}$  repertoire. *J Immunol* 1999; 162: 2137-2145.
54. Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgVH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today.* 1994;15:367-373.
55. Lossos IS, Tibshirani N, Narasimhan B, et al. The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol.* 2000;165:5122-5126
56. Brezinschek HP, 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.
57. Foster SJ, Brezinschek H-P, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 1614-1627.
58. Yano T, Sander CA, Clark HM, Dolezal MV, Jaffe ES, Raffeld M. Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. *Oncogene.* 1993; 8:2741-2748.
59. Gu W, Bhatia K, Magrath IT, Dang CV, Dalla-Favera R. Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science.* 1994; 264:251-254.
60. Hoang AT, Lutterbach B, Lewis BC, et al. A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the c-Myc transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 15:4031-4042.
61. Bhatia K, Huppi K, Spangler G, Siwarski D, Iyer R, Magrath I. Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nature Genet.* 1993; 5:56-61.

62. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al. Distribution and pattern of BCL6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*. 2000; 95, 651-659.
63. Gaidano G, Cerri M, Capello D, Berra E, deambrogi C, Rossi D, Larocca LM, Campo E, Gloghini A, Tirelli U, Carbone A. Molecular histogenesis of plasmablastic lymphoma of the oral cavity. *Br J H* 2002;119:622-629
64. Zhu D, McCarty H, Ottensmeier CH, et al. Acquisition of potential novel N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 2002;99:2562-2568
65. Silverman GJ, Nayak JV, La Cava A. B-cell superantigens: molecular and cellular implications. *Int Rev Immunol*. 1997;14:259-290
66. Ruzickova S, Pruss A, Odendahl M, Wolbart K, Burmester GR, Scholze J, Dörner T, Hansen A. Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin light-chain diversity in VH4-34 expressing single leukemic B cells. *Blood* 2002;100(9):3419-3422
67. Sthoeger ZM, Sthoeger D, Shtalrid M, Sigler E, Geltner D, Berrebi A. Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1993;43:252-264
68. Ishida F, Saito H, Kitano K, Kiyosawa K. Cold agglutinin disease by autoanti-i blood type antibody associated with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol*. 1998;67:69-73
69. Bahler DW, Swerdlow SH. Clonal salivary gland infiltrates associated with myoepithelial sialadenitis (Sjögren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansion. *Blood* 1998;91:1864-1872.
70. Leo A, Kreft H, Hack H, Kempf T, Roelcke D. Restriction in the repertoire of the immunoglobulin light chain subgroup in pathological cold agglutinins with anti-Pr specificity. *Vox sanguinis* 2004;86:141-147
71. Mockridge CI, Chapman CJ, Spellerberg MB, Sheth B, Fleming TP, Isenberg DA,

Stevenson FK. Sequence analysis of VH4-34 encoded antibodies from single B cells of two patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol. 1998;114:129-136

## *RINGRAZIAMENTI*

*Ringrazio il Prof. Gianluca Gaidano per tutte le opportunità e gli insegnamenti che mi ha dato in questi anni di lavoro a Novara presso il suo laboratorio. Ringrazio Daniela, Clara e Michaela che sono state non solo colleghe di lavoro, ma anche amiche. Inoltre un pensiero va a Davide, Silvia e Chiara con l'augurio di una brillante carriera. Infine dedico questo lavoro alla mia famiglia e, soprattutto, al mio piccolo grande uomo Lorenzo che, con il suo arrivo, ha dato un senso a tutto quanto...*