

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE
XVIII CICLO

TESI DI LAUREA

**FISIOPATOLOGIA MOLECOLARE
DEI LINFOMI POST-TRAPIANTO**

Candidato:

Daniela Capello

Ringraziamenti

Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine al Prof. Gianluca Gaidano, responsabile della SCDU Ematologia dell'Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", per avermi avviato alla ricerca sull'oncoematologia molecolare, per aver seguito con attenzione e spirito critico i progressi dei miei studi e per le opportunità di crescita personale e professionale che mi ha dato.

Ringrazio Michaela, Clara, Davide e Silvia che mi hanno fornito preziosi consigli per la realizzazione di questa tesi.

Infine, dedico questo lavoro a mio marito che in questi anni mi ha sempre sostenuto con il suo entusiasmo e la sua comprensione e, soprattutto, ai miei figli che, con la loro presenza, mi hanno dato la forza di esprimere al meglio la mia passione per la ricerca scientifica.

INDICE

INTRODUZIONE

1. I disordini linfoproliferativi post-trapianto pag.5
2. Marcatori istogenetici delle neoplasie linfoidi B pag.8
3. Patogenesi molecolare dei PTLD pag.10

SCOPO DELLA RICERCA pag.22

MATERIALI E METODI

1. Pannello tumorale pag.23
2. Estrazione del DNA pag.24
3. Analisi molecolare dei riarrangiamenti IGV pag.24
4. Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni IGV pag.27
5. Analisi mutazionale dei proto-oncogeni PAX5, RHOH/TTF, PIM1, cMYC esone 1 e cMYC esone 2 pag.27
6. Analisi dell'infezione virale pag.28
7. Determinazione del genotipo di EBV ed analisi del gene LMP1 pag.28
8. Studi immunohistochimici di BCL6, MUM1, CD138, catene immunoglobuliniche κ e λ pag.29
9. Analisi statistica pag.30

RISULTATI

1. Caratteristiche del pannello tumorale pag.32
2. Identificazione dei riarrangiamenti IGHV-D-J, IGKV-J e IGLV-J nello spettro clinico-patologico dei PTLD pag.35

3. Utilizzo dei geni IGHV, IGKV e IGLV pag.38
4. Profilo mutazionale dei geni IGV in PTLD pag.39
5. Analisi dell'eterogeneità intraclonale della IMS nei geni IGV pag.42
6. Caratterizzazione dell'infezione da EBV in PTLD pag.44
7. Espressione di BCL6, MUM1 e CD138 pag.45
8. Caratterizzazione molecolare dei PTLD che originano da cellule B del donatore insorti in pazienti sottoposti a trapianto di fegato pag.49

DISCUSSIONE pag.61

BIBLIOGRAFIA pag.68

INTRODUZIONE

1. I DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI POST-TRAPIANTO

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLD) costituiscono una importante complicanza del trapianto d'organo solido dovuta all'immunodeficienza iatrogenica connessa alle procedure trapiantologiche (Penn *et al.*, 1969; Greiner *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001). La maggior parte dei PTLD è caratterizzata da cellule con fenotipo B, dall'infezione da parte del virus di Epstein-Barr (EBV), dal frequente coinvolgimento di siti extranodali e da un comportamento clinico aggressivo (Penn *et al.*, 1969; Greiner *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001). Nonostante tali aspetti generali comuni, i PTLD sono un gruppo di malattie con caratteristiche epidemiologiche, patologiche, molecolari e cliniche eterogenee. Non tutti i casi mostrano un'evidente origine monoclonale ed esiste una certa eterogeneità istopatologica (Penn *et al.*, 1969; Locker *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 1995; Leblond *et al.*, 1998; Dotti *et al.*, 2000; Greiner *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001; Muti *et al.*, 2002).

Da un punto di vista epidemiologico, il rischio di sviluppare un PTLD nei riceventi di trapianto d'organo solido persiste per molti anni dopo il trapianto, a causa del protrarsi indefinito della terapia immunosoppressiva, e varia secondo il tipo d'organo solido trapiantato, il protocollo di terapia immunosoppressiva e lo stato sierologico pre-trapianto per il virus di Epstein-Barr (EBV) e per il citomegalovirus (Greiner *et al.*, 2000).

L'eterogeneità clinico-patologica dei PTLD ha indotto la formulazione di numerose proposte classificative. La proposta classificativa attualmente riconosciuta è

la classificazione della World Health Organization (WHO) delle neoplasie ematologiche, che distingue i PTLD in quattro categorie (Tabella 1): *i*) le *lesioni precoci*, a loro volta suddivise in *iperplasia plasmacitica reattiva* e *PTLD simil-mononucleosico*; *ii*) i *PTLD polimorfi* (P-PTLD); *iii*) i *PTLD monomorfi*, a loro volta sottoclassificati in linfoma diffuso a grandi cellule B (LDGC-B) (immunoblastico, centroblastico, anaplastico) e linfoma di Burkitt/Burkitt-like (LB/LBL); e infine *iv*) il *linfoma di Hodgkin* (Harris *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001).

L'analisi molecolare del riarrangiamento dei geni codificanti le regioni variabili delle immunoglobuline (IGV) e della regione terminale del genoma di EBV ha dimostrato che la clonalità dei geni IGV concorda con la clonalità di EBV e varia secondo l'entità clinico-patologica. Così, le lesioni precoci, cioè l'iperplasia plasmacitica e i PTLD simil-mononucleosici, che generalmente hanno un profilo di riarrangiamento policlonale dei geni IGV, presentano un'infezione da EBV policlonale, mentre i PTLD polimorfi e i PTLD monomorfi sono generalmente monoclonali e presentano un'infezione monoclonale da EBV, suggerendo che EBV abbia infettato la popolazione cellulare B prima dell'espansione neoplastica e abbia quindi giocato un ruolo patogenetico perlomeno nelle fasi iniziali del processo di linfomagenesi.

Il decorso clinico e la prognosi sono estremamente variabili e sono solo in parte prevedibili sulla base delle caratteristiche istopatologiche, tanto che, mentre alcuni casi rispondono clinicamente alla sola riduzione dell'immunosoppressione, altri progrediscono indipendentemente dalla risposta immunitaria dell'ospite e richiedono un trattamento chemioterapico aggressivo (Locker *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 1995; Cesarman *et al.*, 1998; Chadburn *et al.*, 1998). Inoltre, anche la tempistica d'insorgenza rispetto al trapianto è variabile ed include casi ad insorgenza precoce, in prevalenza EBV positivi, e casi ad insorgenza tardiva, frequentemente EBV negativi e patologicamente sovrapponibili ai linfomi non-Hodgkin della popolazione generale (Penn *et al.*, 1969; Locker *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 1995; Leblond *et al.*,

Tabella 1. Classificazione WHO dei PTLD

1. Lesioni precoci

Iperplasia plasmacitica reattiva

PTLD simil-mononucleosico

2. PTLD polimorfi (P-PTLD)

3. PTLD monomorfi

Linfoma diffuso a grandi cellule B (LDGC-B)

Linfoma di Burkitt/Burkitt-like (LB/LBL)

4. Linfoma di Hodgkin

Modificato da Harris et al., IARC Press 2001

1998; Dotti *et al.*, 2000; Greiner *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Jaffe *et al.*, 2001; Muti *et al.*, 2002). Infine, gli studi finora effettuati, sembrano dimostrare che la maggior parte dei PTLD originano da cellule B del ricevente, a differenza di ciò che si osserva nel trapianto di midollo osseo, dove prevalgono neoplasie ematologiche che originano dalle cellule del donatore.

2. MARCATORI ISTOGENETICI DELLE NEOPLASIE LINFODI B

Gli studi molecolari d'istogenesi hanno contribuito in modo efficace alla comprensione dell'eterogeneità delle neoplasie linfoidi sia nell'ospite immunocompetente sia nell'ospite immunocompromesso. Negli ultimi anni, lo studio di un numero sempre maggiore di marcatori genotipici e fenotipici d'istogenesi ha consentito di distinguere le cellule B mature in gruppi a diverso stadio maturativo: *i*) cellule B vergini, *ii*) cellule B del centro germinativo (CG) e *iii*) cellule B post-CG.

Lo stato mutazionale dei geni IGV costituisce uno dei marcatori genotipici di istogenesi più informativi (Figura 1, Figura 2). Il processo di IMS si attiva nelle cellule B in attiva proliferazione nel microambiente del CG durante la risposta immune T-dipendente. La presenza di IMS nei geni IGV indica, quindi, che un linfoma origina da cellule B del CG o post-CG. Un ulteriore livello d'indagine è volto a verificare la presenza di eterogeneità intraclonale determinata da un processo di IMS "ongoing" sui geni IGV e fornisce un'indicazione più precisa sull'origine cellulare del clone neoplastico (Figura 2). In particolare, la presenza d'eterogeneità intraclonale suggerisce che il clone neoplastico derivi da cellule allo stadio differenziativo di centroblasti con reazione tipo CG in atto. L'assenza di eterogeneità intraclonale suggerisce, invece, la derivazione del clone neoplastico da centrociti del CG o cellule B post-CG che hanno terminato la reazione tipo CG (Gaidano *et al.*, 1998a; Gaidano *et*

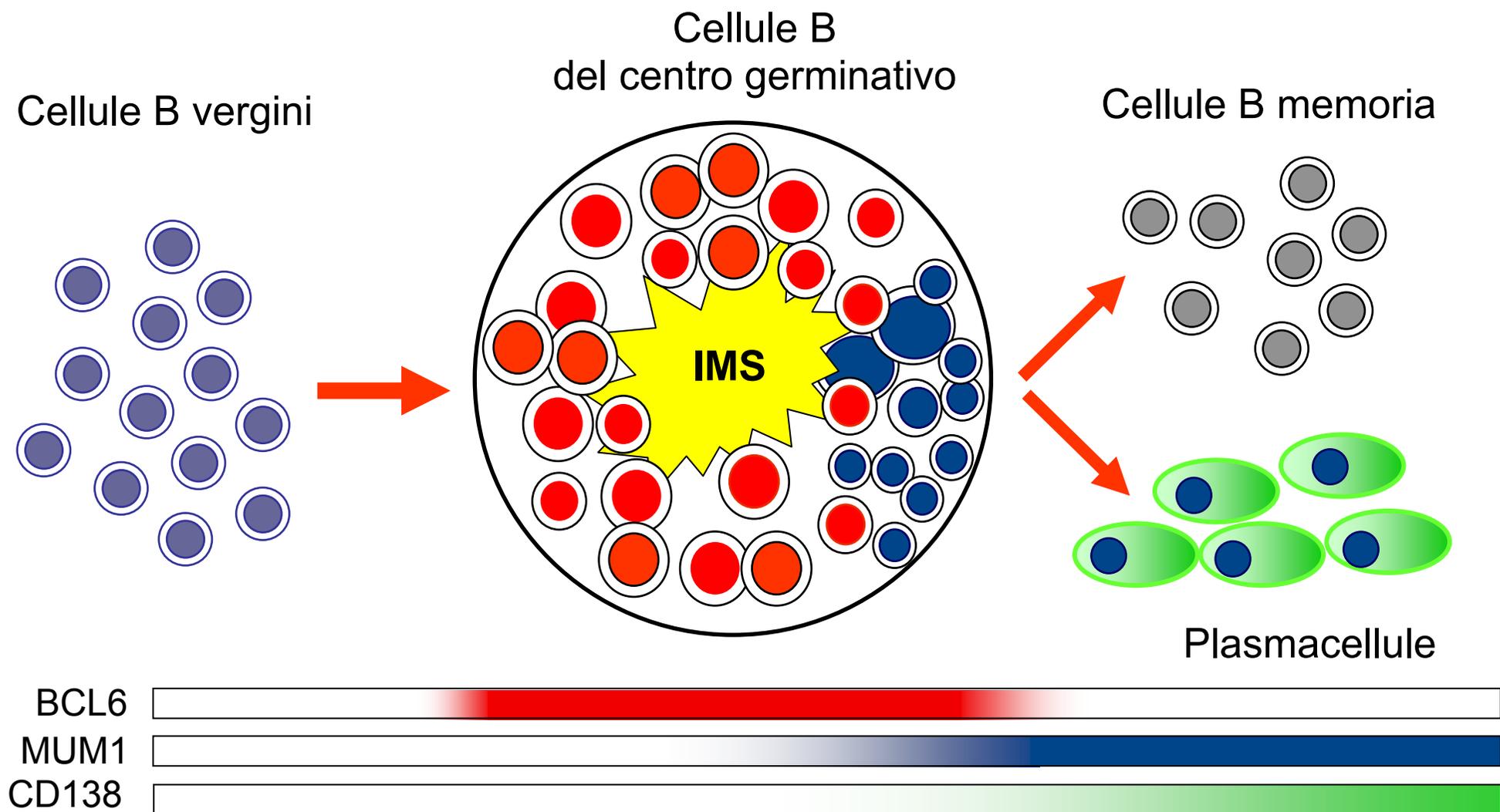


Figura 1. Lo stato mutazionale dei geni IGV costituisce uno dei marcatori genotipici di istogenesi più informativi. Il processo di IMS si attiva nelle cellule B in attiva proliferazione nel microambiente del CG durante la risposta immune T-dipendente. La presenza di IMS nei geni IGV indica, quindi, che un linfoma origina da cellule B del CG o post-CG. Le mutazioni possono essere “ongoing” e 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 dai centroцити tardivi o dalle cellule B post-CG che hanno terminato la reazione di IMS. I marcatori fenotipici sono rappresentati dall’espressione di: *i)* BCL6, limitata ai centroblasti del CG; *ii)* MUM1, espresso dai centroцити e dalle cellule B post-CG; e *iii)* CD138, espresso dalle cellule B post-CG.

al., 1998b; Muller-Hermelink *et al.*, 1998; Pasqualucci *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998; Kuppers *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2001).

I marcatori fenotipici di istogenesi del linfoma a cellule B sono rappresentati dall'espressione delle proteine BCL6, MUM1 and CD138/syndecan-1 e contribuiscono a rifinire la distinzione tra cellule B del CG e cellule B post-CG. Infatti, l'espressione di *BCL6* è specifica dei centroblasti del CG; l'espressione di MUM1 è ristretta ai centroцити del CG e alle cellule B post-CG; infine, l'espressione di CD138/syndecan-1 è limitata alle cellule B post-CG (Figura 1) (Cattoretti *et al.*, 1995; Falini *et al.*, 2000; Carbone *et al.*, 2001a).

Dalla combinazione dei marcatori fenotipici e genotipici deriva un modello istogenetico che permette di distinguere le cellule B mature, sia normali sia neoplastiche in: *i*) cellule B pre-CG, caratterizzate dall'assenza di IMS e con un fenotipo BCL6⁻/MUM1⁻/CD138⁻; *ii*) centroblasti, caratterizzati dalla presenza di IMS "ongoing" e dal fenotipo BCL6⁺/MUM1⁻/CD138⁻; *iii*) centroцити, caratterizzati dalla presenza di IMS stabile e dal fenotipo BCL6⁻/MUM1⁺/CD138⁻; e *iv*) cellule B post-CG caratterizzate dalla presenza di IMS stabile e dal fenotipo BCL6⁻/MUM1⁺/CD138⁺ (Figura 1, Figura 2) (Carbone *et al.*, 2001a; Carbone *et al.*, 2001b; Gaidano *et al.*, 2002).

3. PATOGENESI ED ISTOGENESI MOLECOLARE DEI PTLD

I primi studi sulla patogenesi ed istogenesi delle sindromi linfoproliferative associate ad immunodeficienza sono stati focalizzati sui linfomi non-Hodgkin associati ad immunodeficienza acquisita (AIDS-LNH), la cui comprensione molecolare è attualmente piuttosto avanzata (Gaidano *et al.*, 1998a; Gaidano *et al.*, 1998b; Carbone *et al.*, 2001a; Carbone *et al.*, 2001b).

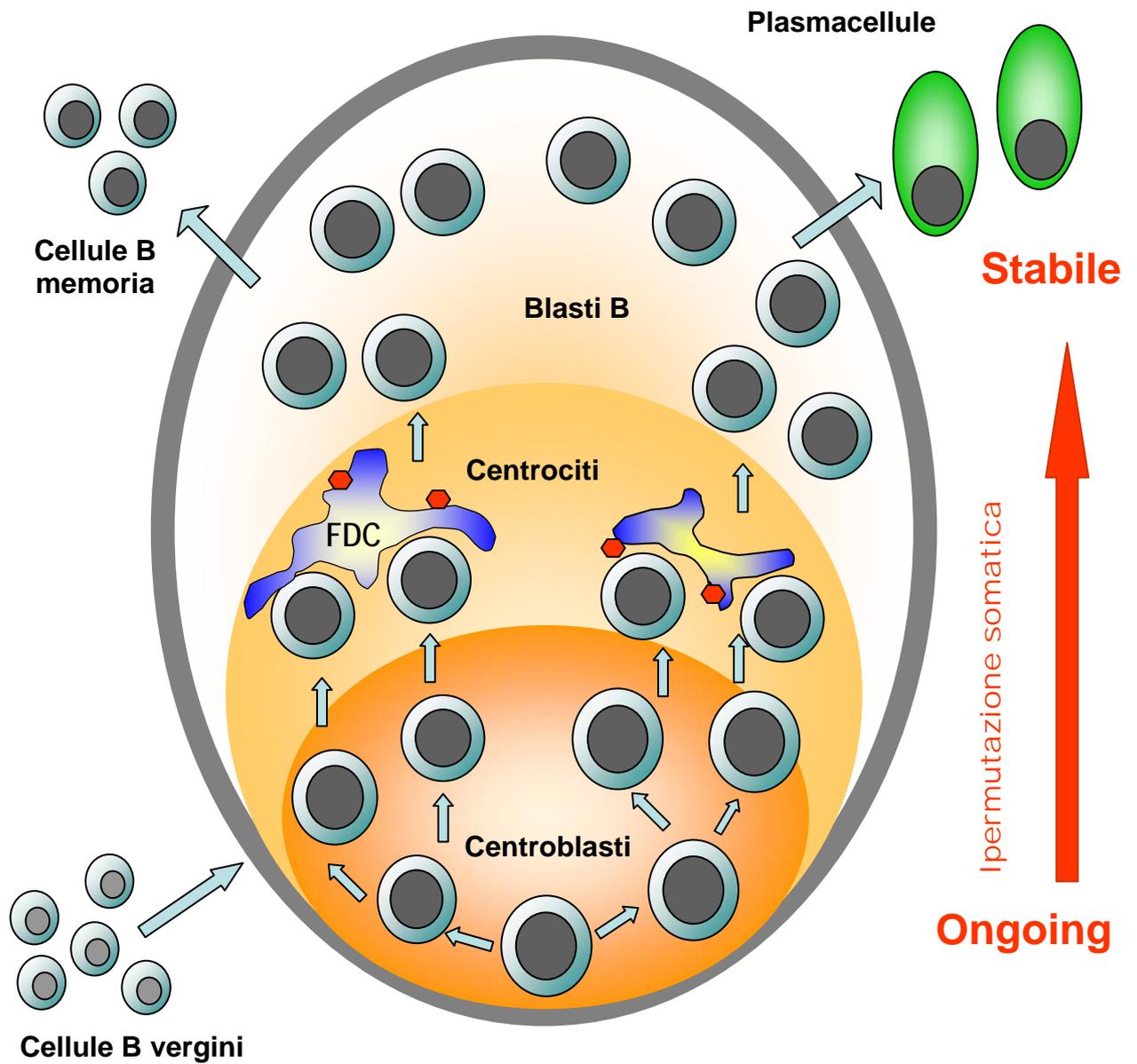


Figura 2. Struttura del centro germinativo (CG). I geni IGV vengono colpiti fisiologicamente all'interno del CG dal meccanismo di IMS. Queste mutazioni possono essere stabili o "ongoing". La presenza di mutazioni "ongoing" suggerisce che il linfoma origini dai centroblasti del CG, mentre la presenza di mutazioni stabili è consistente con la derivazione da centroцити tardivi o da cellule B post-CG che hanno terminato la reazione di IMS

Più recentemente, gli studi in tema di patogenesi ed istogenesi degli AIDS-LNH hanno fornito un adeguato modello d'indagine per altre malattie linfoproliferative associate ad immunodeficienza, in particolare per lo studio dei PTLD.

La patogenesi molecolare delle neoplasie linfoidi B associate ad immunodeficienza iatrogena è un processo multifasico che presuppone fattori predisponenti legati all'ospite e alterazioni intrinseche al clone neoplastico (Figura 3). I fattori predisponenti dell'ospite includono la riduzione dell'immunosorveglianza, la deregolazione immunologica e l'esaltazione della stimolazione antigenica. I fattori correlati al clone neoplastico includono l'infezione da parte di virus oncogeni, e l'attivazione di proto-oncogeni e/o l'inattivazione di geni oncosoppressori mediante molteplici meccanismi, fra i quali il processo di IMS aberrante.

Ad oggi, nel contesto dei PTLD, è stato chiarito il ruolo patogenetico dei virus oncogeni ed in parte quello delle lesioni molecolari dei proto-oncogeni e dei geni oncosoppressori (Delecluse *et al.*, 1995; Dotti *et al.*, 2000). Tuttavia, sono scarsamente comprese le implicazioni patogenetiche della stimolazione antigenica e dell'attività aberrante del processo di IMS.

3.1 INFEZIONE DA VIRUS ONCOGENI

EBV infetta circa il 95% dei PTLD ad insorgenza precoce (entro 12 mesi dal trapianto di organo solido) e il 50% dei PTLD ad insorgenza tardiva (Knowles, 2001). L'infezione da parte di EBV è un potente stimolo alla espansione policlonale ed alla immortalizzazione dei linfociti B (Figura 3). Studi *in vitro* hanno dimostrato che, fra i geni espressi dal virus nella fase latente dell'infezione, i seguenti sono indispensabili per garantire tale effetto: Latent Membran Protein (*LMP1*), Epstein-Barr Nuclear Antigen (*EBNA*)2, *EBNA3A* e *EBNA3C* (Finberg, 2001).

LMP1 agisce come un recettore di membrana costitutivamente attivato, mimando il segnale generato dall'interazione CD40/CD40-ligando.

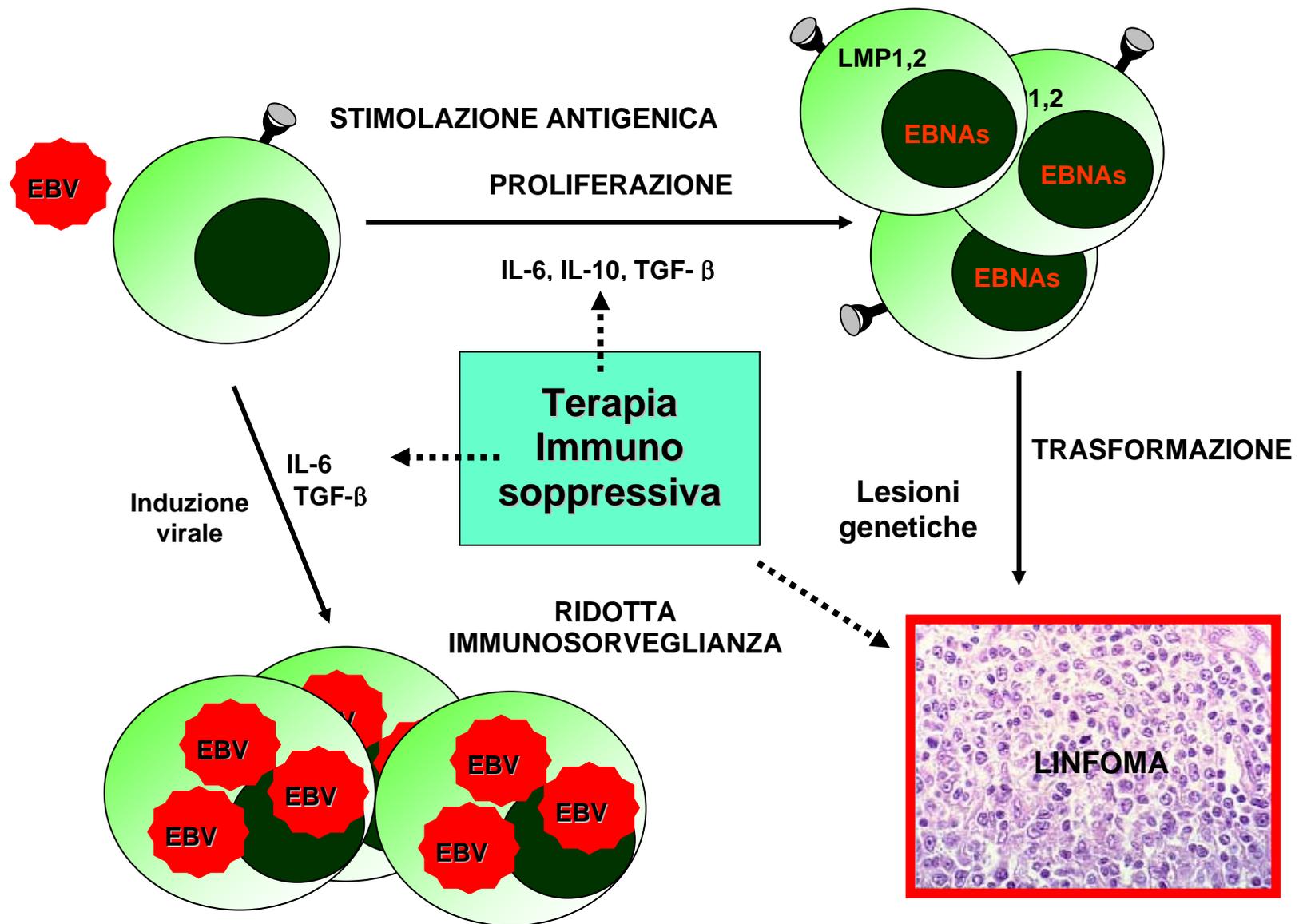


Figura 3. Meccanismi di linfomagenesi nei PTLD. La terapia immunosoppressiva induce una deregolazione del sistema immunitario ed un'alterazione dell'assetto citochinico che favoriscono l'aumento delle cellule B infettate da EBV. Lo stesso EBV induce la produzione di citochine (IL6, IL10) che stimolano la proliferazione cellulare. Queste condizioni, associate alla stimolazione antigenica cronica, favoriscono una proliferazione incontrollata delle cellule B che può progredire, con l'acquisizione di lesioni genetiche trasformanti, verso lo sviluppo di una forma neoplastica.

Secondo un modello ben caratterizzato, *LMP1* promuove la proliferazione cellulare attivando la via del fattore trascrizionale NF- κ B tramite l'interazione con TNF-receptor-associated-factor e la cascata delle MAP-kinasi (Liebowitz *et al.*, 1992; Mosialos *et al.*, 1995; Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996). Altri meccanismi coinvolti nell'attività trasformante di *LMP1* includono la deregolazione del proto-oncogene anti-apoptotico *BCL2* e del suo omologo virale *BHRF1*, così come la stimolazione della proliferazione cellulare mediante deregolazione citochinica e chemochinica (Peng *et al.*, 1992; Rowe *et al.*, 1994; Gires *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 1997; Zeidler *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998). *LMP2A* è in grado di attivare una via di traduzione del segnale analoga a quella generata dal BCR (Caldwell *et al.*, 1998).

I geni virali *EBNA2*, *EBNA3A* e *EBNA3C* agiscono in maniera indiretta interferendo con la via del fattore trascrizionale CBF1 (Tomkinson *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1993; 1994).

Nel contesto dei PTLD, il pattern di espressione dei geni di latenza, e quindi dei geni immortalizzanti, varia secondo l'entità clinico-patologica. Le lesioni precoci e i PTLD polimorfi hanno, generalmente, un profilo di espressione dei geni di latenza tipo III, che comprende l'espressione di *LMP1*, *LMP2A*, *EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3A* e *EBNA3C*. Viceversa, i PTLD monomorfi hanno un profilo di espressione dei geni di latenza di tipo II, con la sola espressione di *EBNA1*, *LMP1* e *LMP2* o di tipo I con la sola espressione di *EBNA1* (Kuppers *et al.*, 2003). Tali osservazioni suggeriscono l'esistenza, per i PTLD, di distinti percorsi patogenetici associati all'infezione da EBV. Le lesioni precoci e i PTLD polimorfi sono espansioni policlonali, oligoclonali o monoclonali la cui crescita è verosimilmente sostenuta dall'attività dei geni immortalizzanti di EBV. Al contrario, nei PTLD monomorfi, l'infezione da EBV ha avuto un ruolo iniziale nel processo di linfomagenesi; tuttavia, un sistema immunitario in parte competente ha selezionato cloni di cellule B infettate da EBV caratterizzate da un profilo d'espressione di geni virali ristretto e quindi in grado di sfuggire alla pressione

selettiva della risposta immune. In questa situazione, il vantaggio proliferativo acquisito dalla cellula non dipenderebbe più dall'attività dei geni immortalizzanti di EBV, ma dall'acquisizione di ulteriori lesioni a carico di proto-oncogeni o geni oncosoppressori cellulari.

3.2 ALTERAZIONI DI PROTO-ONCOGENI E GENI ONCO-SOPPRESSORI

A differenza delle neoplasie linfoidi della popolazione generale e dei linfomi HIV-correlati, nei PTLD le anomalie citogenetiche ricorrenti sono rare e nessuna delle entità clinico-patologiche mostra un profilo cariotipico specifico (Delecluse *et al.*, 1995). Mentre i PTLD classificati come lesioni precoci e classificati come polimorfi, sono tipicamente privi delle lesioni molecolari più comunemente note, i PTLD monomorfi possono essere associati ad alcune delle lesioni genetiche che si riscontrano in altri tipi di neoplasia linfoide. In particolare, i PTLD monoclonali, morfologicamente classificati come LDGC-B si associano frequentemente a mutazioni della regione regolatoria del proto-oncogene BCL6 e, più raramente, a mutazioni dei geni *RAS* o del gene onco-soppressore *p53* (Chadburn *et al.*, 1998, Dotti *et al.*, 2000). Il riarrangiamento di BCL6, presente nel 40% dei casi di LDGC-B della popolazione generale e nel 30% dei casi di LDGC-B HIV-correlati, è invece raro, se non addirittura assente, nel LDGC-B post-trapianto. Il riarrangiamento di *cMYC* nei PTLD è eccezionale e ristretto ai rari casi di linfoma di Burkitt. I PTLD polimorfici presentano frequentemente mutazioni della regione regolatoria di BCL6. In questo gruppo di PTLD, le mutazioni di BCL6 sembrano possedere un valore prognostico in quanto sono predittive di mancata regressione del clone neoplastico dopo riduzione della terapia immunosoppressiva (Chadburn *et al.*, 1998).

3.3 RECETTORE PER L'ANTIGENE E STIMOLAZIONE ANTIGENICA

Le cellule B esprimono sulla superficie cellulare un recettore per l'antigene costituito da 4 catene immunoglobuliniche, rappresentate da due catene pesanti identiche, di tipo μ , δ , α , o γ , e due catene leggere identiche, di tipo κ o λ . Ciascuna catena è composta da una regione costante e da una regione variabile (Figura 4) (Küppers *et al.*, 1999). La regione variabile si genera durante la maturazione della cellula B nel midollo osseo attraverso il processo di riarrangiamento somatico dei segmenti genici V-D-J (V = variabile, D = diversità, J = joint / giunzione) per la catena pesante e V-J per la catena leggera (Figura 3) (Janeway *et al.*, 2003; Küppers *et al.*, 1999). Ogni gene V è costituito da sequenze ipervariabili, definite regioni determinanti la complementarità (Complementarity-Determining Region, CDR) 1 e 2 e da sequenze a variabilità più limitata, che formano le cosiddette regioni cornice (Framework Region, FR) 1, 2 e 3. Nel processo di riarrangiamento somatico, la fusione dei geni V, D e J genera un'ulteriore regione ipervariabile, il CDR3, che possiede una sequenza unica, caratteristica di ogni cellula B matura. I domini CDR costituiscono le porzioni immunoglobuliniche che formano la tasca per l'antigene, mentre i domini FR svolgono prevalentemente una funzione strutturale (Janeway *et al.*, 2003).

Fisiologicamente, le cellule che acquisiscono un riarrangiamento non funzionale, e che non sono quindi in grado di esprimere un recettore per l'antigene di superficie adeguato, vanno incontro a morte cellulare programmata (apoptosi) (Janeway *et al.*, 2003; Küppers *et al.*, 1999). Al contrario, le cellule che riarrangiano correttamente lasciano il compartimento midollare per colonizzare gli organi linfoidi secondari. Queste cellule, dette *naive*, esprimono in superficie catene immunoglobuliniche con regioni variabili germinali, cioè prive di mutazioni somatiche. Durante il transito negli organi linfoidi secondari, le cellule B *naive* possono incontrare il loro antigene specifico. Il legame dell'antigene al recettore di superficie avvia il processo di stimolazione antigenica e, nel microambiente del CG, nel contesto di una

risposta immune T-dipendente, determina l'attivazione del meccanismo di ipermutazione somatica (IMS) (Janeway *et al.*, 2003). Tale meccanismo consiste nell'acquisizione di mutazioni puntiformi a carico delle sequenze codificanti le regioni variabili delle catene pesanti e leggere ed è finalizzato ad incrementare l'affinità di legame del recettore di superficie per l'antigene. Da una singola cellula B derivano sub-cloni che differiscono per le mutazioni acquisite durante il processo di IMS. I sub-cloni che acquisiscono mutazioni tali da accrescere l'affinità per l'antigene sono selezionati per sopravvivere. Al contrario, i sub-cloni che acquisiscono mutazioni tali da diminuire l'affinità per l'antigene, o che causano l'introduzione di codoni di stop all'interno di un riarrangiamento originariamente funzionante (mutazioni "crippling"), vanno incontro ad apoptosi. Al termine della reazione del CG, le cellule B sono caratterizzate da un profilo mutazionale oramai stabile e procedono verso gli stadi di maturazione post-CG (Müller-Hermelink *et al.*, 1998; Küppers *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2001).

Nel contesto delle malattie linfoproliferative, l'analisi molecolare dei geni IGV espressi dalle cellule tumorali consente di valutare il ruolo della stimolazione antigenica nel processo di trasformazione neoplastica (Küppers *et al.*, 1999). In particolare, un utilizzo preferenziale, da parte di una neoplasia B, di uno specifico segmento genico IGV indica che, in un certo momento dello sviluppo della neoplasia, si è verificato un processo di selezione da parte di un antigene. Tale antigene può essere rappresentato sia da un autoantigene (reazione autoimmune) sia da un antigene esogeno. Tale ipotesi è ulteriormente supportata se, nell'ambito della stessa malattia, s'identificano, in maniera ricorrente, sequenze CDR3 con levato grado di omologia.

La distribuzione non casuale delle mutazioni generate dal meccanismo di IMS, tale da favorire l'accumulo di mutazioni in grado di modificare la sequenza aminoacidica nelle sequenze CDR, e di mutazioni silenti nelle sequenze FR, è un ulteriore segno molecolare a sostegno del ruolo dell'antigene nello sviluppo di una neoplasia B.

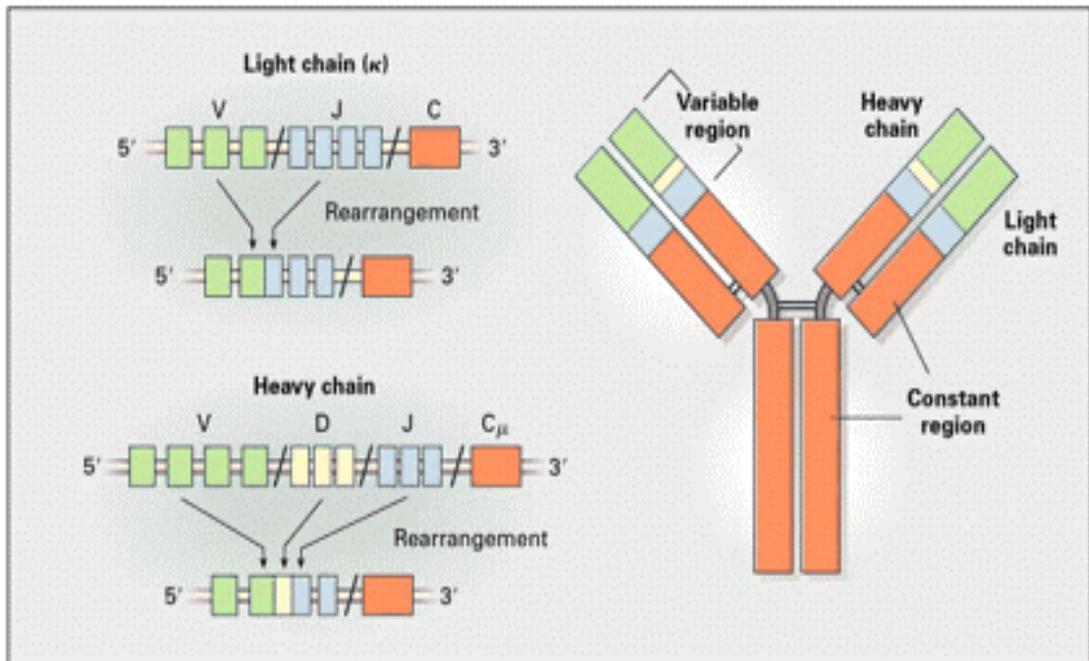


Figura 4. Riarrangiamento V-(D)-J nella genesi della cellula B. Le immunoglobuline sono costituite da due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche. Ciascuna catena è composta da una regione costante (C) e da una regione variabile (V). La regione V delle immunoglobuline si genera durante 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.

Il ruolo fondamentale svolto dalla stimolazione antigenica nel sostenere l'espansione neoplastica è stato recentemente dimostrato in alcune malattie linfoproliferative dell'ospite immunocompetente (De Re *et al.*, 2000; Stevenson e Caligaris-Cappio, 2004).

Un ulteriore aspetto riguardante lo studio dei riarrangiamenti dei geni IGV nelle neoplasie linfoidi riguarda la possibilità di identificare dei nuovi marcatori molecolari, rappresentati dallo stato mutazionale dei geni V e/o da particolari combinazioni di riarrangiamenti V(D)J con valore diagnostico e prognostico, come si sta ampiamente verificando nell'ambito della leucemia linfatica cronica (Stevenson e Caligaris-Cappio, 2004)

3.4 IPERMUTAZIONE SOMATICA ABERRANTE

Durante la risposta immune T-dipendente le cellule B attivate dall'antigene vanno incontro ad un'espansione clonale nei centri germinativi e subiscono il processo di IMS. Il processo fisiologico di IMS non colpisce esclusivamente i geni IGV, in quanto, altri geni normalmente espressi nel centro germinativo, fra i quali BCL6 (Peng *et al.*, 1999), CD95/FAS (Muschen *et al.*, 2000), CD79a e CD79b (Gordon *et al.*, 2003) acquisiscono mutazioni somatiche in cellule B normali del centro germinativo. Tuttavia, il significato biologico di queste mutazioni non è stato ancora compreso.

Un processo di IMS alterato è stato identificato in più del 50% dei LDGC-B sia sistemici (Pasqualucci *et al.*, 2001), sia del sistema nervoso centrale (Montesinos-Rongen *et al.*, 2004) nonché in linfomi aggressivi associati ad HIV (Gaidano *et al.*, 2003). In seguito al malfunzionamento del processo di IMS, un certo numero di geni, normalmente espressi nel centro germinativo, fra i quali i proto-oncogeni PIM1, cMYC, RhoH/TTF e PAX5, acquisiscono mutazioni in una regione compresa fra 1000 e 2000 basi a valle del sito di inizio di trascrizione (Figura 5). Il meccanismo di IMS che

colpisce i proto-oncogeni PAX5, RhoH/TTF, PIM1 e cMYC, è definito aberrante in quanto, contrariamente ai geni IGV, BCL6, CD95/FAS, CD79a e CD79b, questi proto-oncogeni non mostrano un livello significativo di mutazioni nelle cellule B normali mature.

PAX5 / B-cell activator protein (BSAP) codifica per un fattore di trascrizione implicato nella regolazione della proliferazione e del differenziamento delle cellule B (Morrison *et al.*, 1998). RhoH/TTF codifica una piccola GTP-binding protein che appartiene alla superfamiglia Ras ed è espressa unicamente nei tessuti ematopoietici (Preudhomme *et al.*, 2000). PIM1 codifica una serina-treonina chinasi implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule B (Hoover *et al.*, 2001). cMYC codifica un fattore trascrizionale implicato nel controllo della crescita, della proliferazione, del differenziamento cellulare e della apoptosi di molti tipi cellulari (Boxer, 2001). Nei proto-oncogeni PIM1, PAX5, RhoH/TTF e cMYC, le regioni colpite dal processo di IMS aberrante sono coinvolte nelle traslocazioni cromosomiche, suggerendo che questo processo possa avere un ruolo nella genesi dei riarrangiamenti cromosomici (Figura 5) (Pasqualucci *et al.*, 2001).

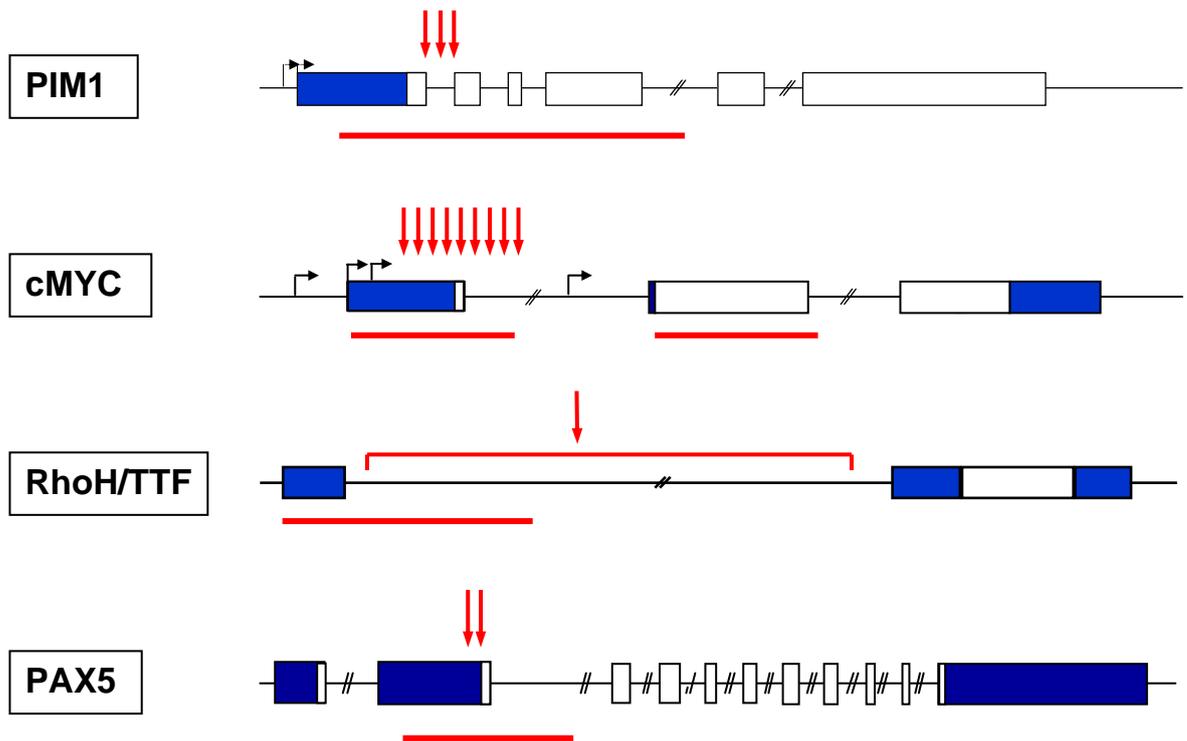


Figura 5. Analisi mutazionale di PIM1, cMYC, RhoH/TTF e PAX5 in PTLD. Sono indicati i 4 loci genomici e le regioni codificanti e non codificanti (in bianco e in blu, rispettivamente). La linea rossa indica il frammento sottoposto ad analisi mutazionale. Le frecce nere indicano i siti di inizio della trascrizione, quelle rosse i siti coinvolti nelle traslocazioni cromosomiche

SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è stato la definizione dei meccanismi molecolari che sono alla base dello sviluppo delle varie entità clinico-patologiche di PTLD insorti dopo trapianto di organo solido. Particolare attenzione è stata posta alla caratterizzazione dei PTLD che originano da cellule B del donatore e, a tale riguardo, parte del progetto è stata finalizzata allo studio dei PTLD che originano da cellule B del donatore, insorti in pazienti sottoposti a trapianto di fegato.

Lo studio è stato articolato in tre obiettivi specifici: *i)* fornire un'analisi completa ed esaustiva dell'istogenesi molecolare dei PTLD originati da cellule B mediante l'analisi combinata di marcatori genotipici e fenotipici d'istogenesi; *ii)* definire il ruolo della stimolazione antigenica nello sviluppo e progressione dei PTLD mediante la caratterizzazione dell'uso e del profilo mutazionale dei geni IGV; *iii)* valutare il coinvolgimento del meccanismo di IMS aberrante nella patogenesi dei PTLD tramite l'analisi mutazionale dei geni PAX5, RhoH/TTF, PIM1 e cMYC.

MATERIALI E METODI

1. PANNELLO TUMORALE

Lo studio di caratterizzazione molecolare dell'istogenesi e patogenesi dei PTLD è stato effettuato su 50 campioni di PTLD, raccolti da pazienti sottoposti a trapianto di organo solido presso le strutture ospedaliere dell'Università di Pavia e dell'Università di Bergamo e presso l'Ospedale Niguarda di Milano. I campioni provenivano dalle sedi nodali o extranodali coinvolte dalla proliferazione neoplastica. Quarantacinque casi sono stati raccolti nel corso delle procedure di routine diagnostica prima che venisse effettuata la terapia specifica, mentre in 5 casi il PTLD è stato diagnosticato durante l'autopsia. I casi sono stati selezionati in base alla loro origine da cellule B e in base alla loro monoclonalità, dimostrata dagli studi immunostochimici e/o molecolari. In questo studio non sono stati inclusi casi di iperplasia plasmacitica.

Per lo studio mirato alla caratterizzazione dei PTLD derivati da cellule B del donatore, è stata raccolta una casistica consecutiva di 15 PTLD monoclonali insorti in pazienti sottoposti a trapianto di fegato presso l'Ospedale Niguarda di Milano. Per definire l'origine genetica delle cellule tumorali, è stato utilizzato un sistema di multiplex PCR che analizza 13 *short tandem repeats* e 2 loci tetranucleotidici (Amp/STR Identifier PCR Amplification kit, Applied Biosystems, Milano).

I campioni tumorali sono stati conservati in parte mediante congelamento ed in parte mediante fissazione ed inclusione in paraffina. Gli studi morfologici e immunofenotipici hanno determinato che la frazione delle cellule maligne era pari o maggiore al 60%.

2. ESTRAZIONE DEL DNA

Per l'estrazione del DNA dai campioni criopreservati è stata utilizzata la tecnica "salting out extraction" che prevede un'estrazione rapida del DNA mediante lisi cellulare, precipitazione delle proteine con sali e recupero del DNA con etanolo (Miller *et al.*, 1988). In sintesi, i tessuti congelati sono stati sminuzzati e risospesi in un volume adeguato di soluzione di lisi, composta da: Tris-HCl pH 8,2 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, sodio dodecil solfato 0,5% e pronase E ad una concentrazione finale di 400 µg/ml. La sospensione è stata quindi incubata per 12 ore a 37°C in agitatore termostato. Le proteine sono state rimosse mediante precipitazione con NaCl ad una concentrazione finale pari a 1,6 M e centrifugazione a 2800 rpm. Il DNA è stato recuperato dal surnatante per precipitazione, mediante aggiunta di etanolo assoluto e, successivamente, disciolto in un adeguato volume di tampone Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0. La concentrazione del DNA è stata ricavata mediante lettura spettrofotometrica della densità ottica a 260 e 280 nm utilizzando uno spettrofotometro Beckam DU 640. Per l'estrazione dei campioni istologici inclusi in paraffina è stato utilizzato un kit commerciale (QIAamp DNA mini Kit, QIAGEN, Milano) seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice.

3. ANALISI MOLECOLARE DEI RIARRANGIAMENTI IGV

I riarrangiamenti IGV sono stati ottenuti mediante PCR, utilizzando un set di primers senso, specifici per le diverse famiglie IGHV, IGKV e IGLV, complementari alle regioni Leader, framework region (FR) 1 o FR2, associati a primers antisense, in grado di riconoscere i diversi segmenti IGHJ, IGKJ e IGLJ complementari alla FR4 (Figura 6)

(Küppers *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1997; Fais *et al.*, 1998; Farner *et al.*, 1999; Capello *et al.*, 2003; Capello *et al.*, 2006).

La reazione PCR è stata eseguita con 300 ng di DNA genomico, Tris-HCl 10 mM pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, ciascun primer 300 nM, dNTPs 100 µM ed 1 U Taq Polimerasi (HotStart Taq QIAGEN, Milano) in un volume finale di 30 µl. La reazione PCR è consistita in 35 cicli (45 per i campioni biotici inclusi in paraffina) di denaturazione (30 secondi a 95°C), appaiamento (30 secondi a 60°C) ed estensione (30 secondi a 72°C), in un termociclatore I-Cycler (Bio-Rad).

I prodotti amplificati sono stati separati mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio e purificati usando il kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf, Amburgo, Germany) seguendo le istruzioni della ditta produttrice e direttamente sequenziati usando il kit Big-Dye v2.0 (Applied Biosystem, Milano) ed il sequenziatore automatico ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystem). Per determinare le sequenze germinali V, D e J d'origine e definire il tasso di mutazione della regione V, le sequenze ottenute sono state analizzate ed allineate alle sequenze depositate nei database "V-BASE sequenze directory" (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>; MRC Centre for protein Engineering, Cambridge, UK) ed ImMunoGeneTics (IMGT, <http://imgt.cines.fr>; Montpellier, France). Le sequenze IGHV, IGKV e IGLV sono state considerate mutate se il tasso di mutazione risultava \geq al 2.0%. I criteri per l'identificazione dei segmenti genici D sono stati: (a) omologia di almeno 7 paia di basi consecutive con un segmento D germinale; (b) la differenza di una singola coppia di basi all'interno di una regione di omologia di almeno 8 paia di basi (Klein *et al.*, 1994).

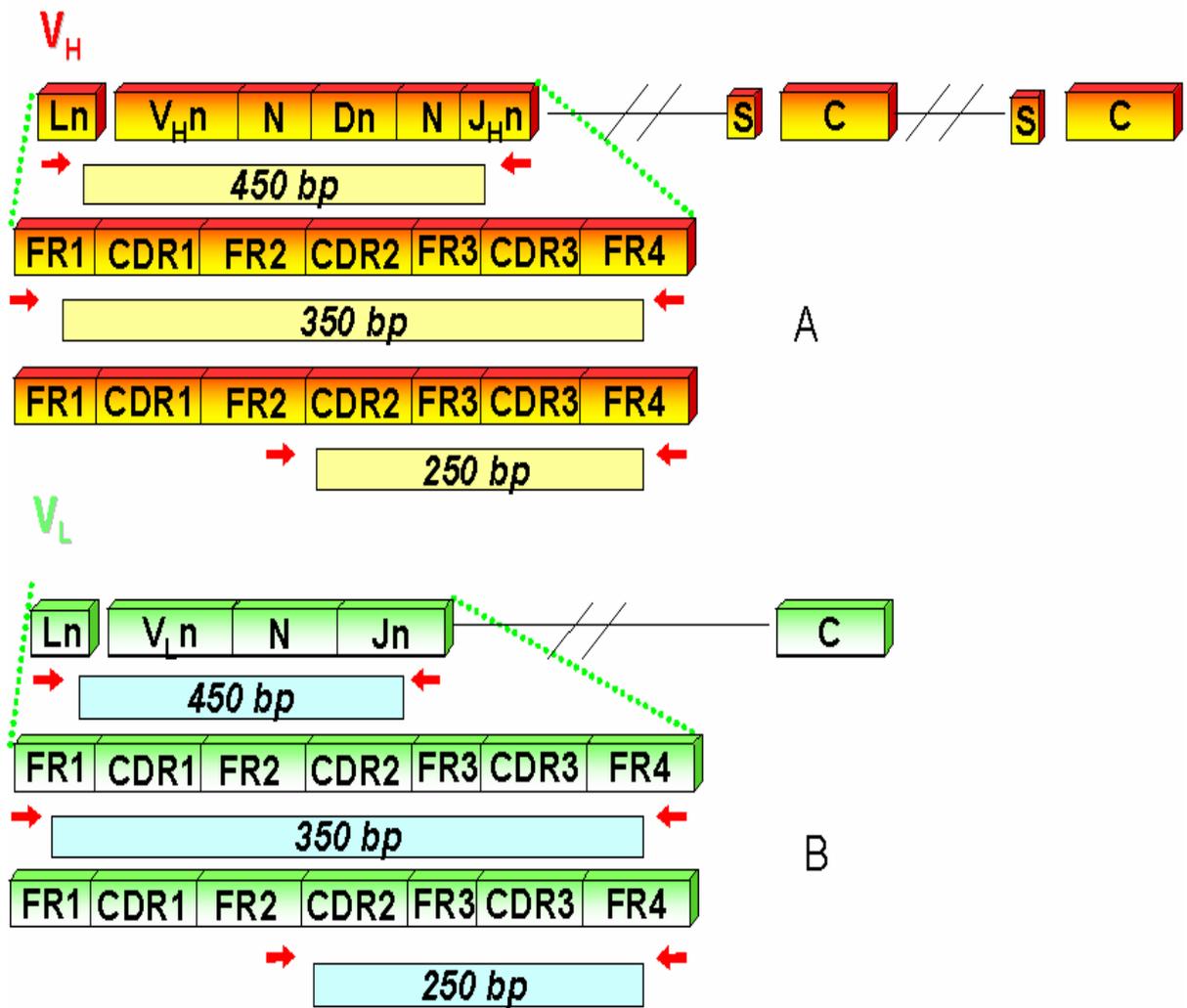


Figura 6. Strategia di PCR utilizzata per l'analisi dei riarrangiamenti IGHV-D-J (pannello A), IGLV-J e IGLV-J (pannello B).

4. ANALISI DELL'ETEROGENEITA' INTRACLONALE DEI GENI IGHV

La eterogeneità intraclonale, indicatore della presenza di un processo di IMS "ongoing", è stata valutata mediante amplificazione del riarrangiamento clonale IGHV-D-J con Taq polimerasi ad elevata fedeltà (PfuTurbo, Stratagene, La Jolla, CA, USA), sottoclonaggio in vettori plasmidici pCR4-TOPO (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) e sequenziamento con sequenziatore ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Per ciascun campione tumorale sono stati analizzati almeno 20 sottocloni. Sono stati considerati positivi per la presenza di IMS "ongoing" i casi con un numero di mutazioni significativamente superiore a quello atteso in base alla frequenza di errore della polimerasi (valutazione con test statistico t di Student). La stima della frequenza di errore della nostra strategia sperimentale è stata eseguita sequenziando una regione dell'esone 2 di *cMYC* (+4486/+5068) amplificata da DNA di fibroblasti normali ed inserita in plasmidi pCR4-TOPO, seguendo le stesse procedure di PCR e di clonaggio utilizzate per l'analisi dei segmenti IGHV-D-J (Gaidano *et al.*, 2003). La stima d'errore nel nostro laboratorio è stata dello 0,01%, che equivale a circa 0,04 mutazioni/clone IGHV-D-J.

5. ANALISI MUTAZIONALE DEI PROTO-ONCOGENI PAX5, RHOH/TTF, PIM1, cMYC ESONE 1 E cMYC ESONE 2

Per l'analisi mutazionale dei proto-oncogeni PAX5, RhoH/TTF, PIM1 e cMYC sono state scelte regioni geniche che si è visto contenere più del 90% delle mutazioni finora identificate nel LDGC-B sia dell'ospite immunocompetente, sia dell'ospite immunocompromesso (Pasqualucci *et al.*, 2001; Gaidano *et al.*, 2003; Liso *et al.*, 2006). Queste regioni distano, per tutti i geni analizzati, circa 1,5 Kb dal sito d'inizio di

trascrizione e comprendono sia sequenze codificanti, nel caso di PIM1 (esoni 1, 2, 3 e 4) e di cMYC (esone 2), sia sequenze regolatorie, nel caso di RhoH/TTF, PAX5 e cMYC esone 1 (Figura 5).

Gli amplimeri ottenuti sono stati sequenziati su entrambi i filamenti utilizzando il kit di sequenza ABI Prism Big Dye Terminator Kit v2 (Applied Biosystem) ed il sequenziatore automatico ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystem). La dimensione dei frammenti amplificati di PAX5, RhoH/TTF, PIM1, cMYC esoni 1 e 2 è, rispettivamente, di 861 bp, 1109 bp, 1009 bp, 1301 bp, 1167 bp. La sequenza di ogni prodotto di PCR è stata confrontata con quella germinale depositata in GenBank (AF386791 per PAX5, AF386789 per RhoH/TTF, AF386792 per PIM1, X00364 per cMYC esoni 1 e 2).

6. ANALISI DELL'INFEZIONE VIRALE

L'infezione da EBV è stata indagata mediante ibridizzazione *in situ* (ISH) delle sequenze di piccoli RNA codificati dal virus di Epstein-Barr (EBERs) (Carbone *et al.*, 2001a). Per i casi EBER positivi, l'espressione delle proteine virali LMP1 ed EBNA2 è stata eseguita mediante immunostochimica con anticorpi specifici diretti contro LMP1 e EBNA2 (CS1-4 e PE2; Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark) (Carbone *et al.*, 2001a).

7. DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO DI EBV ED ANALISI DEL GENE LMP1

Il genotipo (tipo 1 o tipo 2) di EBV è stato determinato analizzando, con primers specifici, una regione polimorfica del gene EBNA2. Il gene LMP1 è stato analizzato con

primers specifici per la regione C-terminale del gene. Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti: LMP1 for 5'-CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA-3'; LMP1 rev 5'-CTG GGG GTG GTG ATC ATC TC-3'; EBNA2 for 5'-AGG CTG CCC ACC ATG AGG AT-3'; EBNA2 rev 5'-GCC ACC TGG CAG CCC TAA AG-3'. Le reazioni di amplificazione per entrambi i geni sono state eseguite con 300 ng di DNA genomico, Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, ciascun primer 300 nM, dNTPs 300 µM e 0,5 U Taq Polimerasi (Hot Start Taq, QIAGEN) in un volume finale di 30 µl. La reazione PCR è consistita in 37 cicli (45 per i campioni biotici inclusi in paraffina) di denaturazione (30 secondi a 95°C), appaiamento (40 secondi a 62°C per EBNA2, ad una temperatura di 56°C per il gene LMP1) ed estensione (40 secondi a 72°C), in un termal cycler Bio-Rad.

Le linee cellulari AS2831A e BC1, sono state utilizzate rispettivamente come controlli per LMP1 wild-type e per Δ 30LMP1. Le linee cellulari AG876 e BC1 sono state utilizzate come controlli, rispettivamente, per EBNA2 di tipo 1 ed EBNA2 di tipo 2.

8. STUDI IMMUNOISTOCHIMICI DI BCL6, MUM1, CD138 E DELLE CATENE IMMUNOGLOBULINICHE κ e λ

L'immunoistochimica è stata eseguita mediante i metodi di rilevazione del complesso avidina-biotina-perossidasi (ABC-px), fosfatasi-alcalina-anti-fosfatasi-alcalina (APAAP) ed avidina-streptavidina (Hsu *et al.*; 1981; Cordell *et al.*; 1984). La proteina BCL6 è stata indagata utilizzando l'anticorpo monoclonale (MoAb) PG-B6 (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark) (Flenghi *et al.*, 1995). L'espressione di MUM1 è stata indagata utilizzando l'anticorpo policlonale ICSAT/M-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) (Carbone *et al.*, 2001b). L'espressione di CD138 è stata evidenziata usando l'anticorpo monoclonale MoAb B-B4 (Serotec, Oxford,

England) (Wijdenes *et al.*, 1996). Tutti gli antigeni sono stati analizzati su sezioni di tessuto fissate in paraffina. Per la rivelazione di MUM1 e BCL6, le sezioni fissate in paraffina sono state trattate in un forno a microonde a 250 W per 30 secondi in una soluzione di EGTA pH 8, 1 mM. L'immunocolorezione di MUM1 e BCL6 è stata eseguita in un immunomarcatore automatico (Nexes, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). L'immunocolorezione di CD138 è stata effettuata utilizzando il metodo APAAP (Cordell *et al.*, 1984). Solo una marcatura definita e precisa su inequivocabili cellule maligne è stata accettata come positiva. Nel caso dei P-PTLD, la fissazione è stata valutata su immunoblasti atipici, cellule linfoidi di media grandezza e su cellule con nuclei irregolari simili a centrociti.

L'espressione di superficie e citoplasmatica delle catene κ e λ è stata effettuata su sezioni di tessuto fissate, mediante il metodo di rilevazione del complesso streptavidina-biotina con diaminobenzidina come cromogeno. Per le catene κ è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale A8B5 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Per le catene λ l'anticorpo monoclonale N10/2 (DakoCytomation).

9. ANALISI STATISTICA

I dati riguardanti l'utilizzo dei segmenti V, D, J e le frequenze di mutazione sono stati inseriti in fogli di lavoro Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA). Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il software "*Statistical Package for the Social Sciences*" (SPSS) v.12.0. Per stimare le differenze nell'utilizzo dei diversi segmenti genici sono stati impiegati il test di Fisher a due code o il test χ^2 a due code, con aggiustamento di Bonferroni per confronti multipli. L'elaborazione statistica dei dati riguardanti la distribuzione delle mutazioni tra i segmenti genici CDR e FR è stata realizzata

utilizzando il modello di distribuzione binomiale e il modello di distribuzione multinomiale (Chang *et al.*, 1994; Lossos *et al.*, 2000).

Al fine di verificare la presenza di stimolazione antigenica, è stata valutata la distribuzione delle mutazioni che determinano modificazioni della sequenza aminoacidica (*Replacement mutations*, R) e delle mutazioni silenti (*Silent mutations*, S) all'interno dei riarrangiamenti funzionali dei geni IGHV. Sono stati considerati segni di stimolazione antigenica: *i*) la presenza di un numero inferiore all'atteso di mutazioni R nelle regioni FR (indice che sono state selezionate cellule neoplastiche che hanno acquisito mutazioni che mantengono immutate le sequenze FR e che, quindi, esprimono un recettore funzionale); *ii*) la presenza di un numero superiore all'atteso di mutazioni R nelle regioni CDR (indice che sono state selezionate le cellule neoplastiche con un recettore caratterizzato da una maggiore affinità di legame per l'antigene) (Chang *et al.*, 1994; Lossos *et al.*, 2000).

RISULTATI

1. CARATTERISTICHE DEL PANNELLO TUMORALE

Le caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati sono riportate in Tabella 2. Quarantuno pazienti sono maschi e nove sono femmine. L'età mediana al trapianto è 44,5 anni (intervallo 2-70). I pazienti affetti da PTLD sono stati sottoposti a trapianto di cuore (n=35), rene (n=9) e polmone (n=6). La maggior parte dei pazienti ha ricevuto ciclosporina A e azatioprina come terapia immunosoppressiva (vedi Tabella 2 per i dettagli). L'intervallo mediano di tempo trascorso tra il trapianto e l'insorgenza del PTLD è stato di 73,5 mesi (intervallo 2-1928). Secondo la definizione di Armitage (Armitage *et al.*, 1991), 7 PTLD sono stati classificati come PTLD ad insorgenza precoce (≤ 12 mesi dal trapianto) e 43 come PTLD ad insorgenza tardiva (≥ 12 mesi). Secondo la stadiazione di Ann Arbor, quattordici casi sono stati classificati come stadio I di malattia, 14 come stadio II, 8 come stadio III e 14 come stadio IV. Tutti i PTLD inclusi nello studio hanno avuto origine da cellule B e comprendono 10 P-PTLD, 35 LDGC-B e 5 LB/LBL. I casi di LDGC-B presentano morfologia di linfoma centroblastico (n=16) e linfoma immunoblastico (n=19). I dati sulle modalità di trattamento, la risposta e l'esito, sono dettagliati in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei PTLD

Caso	Istologia	Sesso	TX	Età al TX	Terapia immuno soppressiva	Intervallo dal TX (mesi)	Sede del tumore	Stadio	Modalità di trattamento	Risposta	Esito (mesi dal PTLD)
1	LB/LBL	M	cuore	52	C + A	38	polmone	IV	n.n.	PD	deceduto a 10 giorni
2	LB/LBL	M	cuore	27	C + A	106	tonsilla	IE	CT + RT	PD	deceduto a 22 mesi
3	LB/LBL	M	cuore	49	C + A	92	cute	IV	CT + IgHD	CR	vivente a 57 mesi
4	LB/LBL	M	cuore	13	C + A	94	guancia	IE	CT + RT	PR	deceduto a 18 mesi
5	LB/LBL	M	polmone	25	C + A	40	tonsilla	IE	CT + RT	PD	deceduto a 10 mesi
6	LDGC-B, CB	F	rene	61	C + A	82	linfonodo	II	CT + IgHD	CR	vivente a 45 mesi
7	LDGC-B, CB	M	cuore	35	C + A	81	linfonodo	III	CT + C + IgHD	CR	vivente a 52 mesi
8	LDGC-B, CB	M	cuore	43	C + A	113	massa mesenterica	II	CT	PR	deceduto a 15 mesi
9	LDGC-B, CB	M	cuore	48	C + A	110	stomaco	IV	CT	CR	vivente a 70 mesi
10	LDGC-B, CB	M	cuore	52	C + A	128	linfonodo	IV	P	n.d.	deceduto a 1 giorno
11	LDGC-B, CB	M	cuore	59	C + A	60	linfonodo	II	CT + RT	PD	deceduto a 8 mesi
12	LDGC-B, CB	F	cuore	21	C + A	102	linfonodo	I	RT + antiCD20	CR	vivente a 29 mesi
13	LDGC-B, CB	M	cuore	27	C + A	78	cute	IV	CT	CR	deceduto a 12 mesi
14	LDGC-B, CB	M	rene	32	C + A	51	linfonodo	III	CT	n.v.	deceduto a 3 mesi
15	LDGC-B, CB	M	cuore	24	C + A	95	linfonodo	II	CT + antiCD20	PR	deceduto a 4 mesi
16	LDGC-B, CB	M	cuore	70	C + A	102	linfonodo	II	RT + antiCD20	CR	vivente a 15 mesi
17	LDGC-B, CB	F	polmone	41	C + A	63	linfonodo	III	CT	CR	vivente a 21 mesi
18	LDGC-B, CB	M	cuore	48	C + A	192	cute	IE	CT + C	CR	vivente a 22 mesi
19	LDGC-B, CB	M	cuore	59	C + A	80	digiuono	IIIE	CT + C + antiCD20	CR	vivente a 41 mesi
20	LDGC-B, CB	M	cuore	59	C + A	44	milza	III	no trattamento	PD	deceduto a 5 mesi
21	LDGC-B, CB	M	cuore	56	C + A	75	fegato	IV	CT + IgHD + RF	CR	vivente a 31 mesi
22	LDGC-B, IB	M	rene	64	C + A	36	fegato	IV	n.a.	n.d.	diagnosi autoptica
23	LDGC-B, IB	M	cuore	57	C + A	5	polmone	IV	n.a.	n.d.	diagnosi autoptica
24	LDGC-B, IB	M	cuore	57	C + A	43	cute	IV	CT + IgHD	SD	deceduto a 4 mesi
25	LDGC-B, IB	M	cuore	45	C + A	28	mediastino	IV	CT + IgHD	PR	deceduto a 3 mesi
26	LDGC-B, IB	F	rene	49	C + A	64	stomaco	IIIE	CT + C	CR	deceduto a 16 mesi
27	LDGC-B, IB	M	cuore	44	FK506+A	42	retroperitoneo	I	IFN + IgHD	CR	vivente a 137 mesi
28	LDGC-B, IB	M	rene	46	C + A	72	linfonodo	III	n.a.	n.d.	diagnosi autoptica
29	LDGC-B, IB	M	cuore	42	C + A	90	cuore	IE	CT	PR	deceduto a 3 mesi

Caso	Istologia	Sesso	TX	Età al TX	Terapia immuno soppressiva	Intervallo dal TX (mesi)	Sede del tumore	Stadio	Modalità di trattamento	Risposta	Esito (mesi dal PTLD)
30	LDGC-B, IB	M	cuore	56	C + A	56	linfonodo	II	CT	PR	deceduto a 1 mese
31	LDGC-B, IB	M	polmone	27	C + A	128	linfonodo	IV	CT + antiCD20 + IgHD	CR	vivente a 25 mesi
32	LDGC-B, IB	M	rene	30	n.d.	72	tonsilla	IIE	n.n.	n.n.	n.n.
33	LDGC-B, IB	F	rene	26	n.d.	90	digiuono	IIE	n.n.	n.n.	n.n.
34	LDGC-B, IB	M	cuore	56	C + A	108	cute	IE	CT + C + RT + IgHD + LTC	CR	deceduto a 38 mesi
35	LDGC-B, IB	M	cuore	56	C + A	84	linfonodo	IV	n.a.	n.d.	diagnosi autoptica
36	LDGC-B, IB	M	rene	28	C + P	156	rene	IE	CT + C + RT	PD	deceduto a 4 mesi
37	LDGC-B, IB	F	rene	30	C + A	108	milza	IV	CT	n.v.	deceduto a 1 mese
38	LDGC-B, IB	F	cuore	12	C + A	72	linfonodo	III	CT + antiCD20	CR	vivente a 21 mesi
39	LDGC-B, IB	F	polmone	24	C + A	9	peritoneo	IV	CT + IgHD	CR	vivente a 60 mesi
40	LDGC-B, IB	M	polmone	52	C + A	11	linfonodo	III	CT	PD	deceduto a 6 mesi
41	P-PTLD	M	polmone	46	C + A	5	polmone	IIE	CT	SD	deceduto a 1 mese
42	P-PTLD	M	cuore	67	C + A	6	polmone	IIE	no trattamento	CR	vivente a 76 mesi
43	P-PTLD	M	cuore	38	C + A	152	tonsilla	IE	CT + RT	CR	deceduto a 16 mesi
44	P-PTLD	M	cuore	54	C + A	6	polmone	IE	C	CR	vivente a 54 mesi
45	P-PTLD	M	cuore	53	C + A	2	lingua	IE	no trattamento	CR	vivente a 23 mesi
46	P-PTLD	M	cuore	20	C + A	79	linfonodo	II	CT	PD	deceduto a 18 mesi
47	P-PTLD	M	cuore	20	C + A	22	linfonodo	II	CT	n.v.	deceduto a 20 mesi
48	P-PTLD	M	cuore	66	C + A	84	linfonodo	III	CT	n.v.	deceduto a 6 mesi
49	P-PTLD	F	cuore	18	C + A	51	linfonodo	I	C	CR	vivente a 41 mesi
50	P-PTLD	M	cuore	2	C + A	70	epididimo	I	C	CR	vivente a 50 mesi

^aP-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immonoblastico; LB/LBL, linfoma di Burkitt Burkitt-like.

^bM, maschio; F, femmina

^cTX, trapianto

^dC, ciclosporina A; A, azatioprina; P, prednisone; FK506, tacrolimus; n.d., non disponibile.

^en.a. non applicabile; n.n., non noto.

^fCT, chemioterapia (il regime variava ed era stabilito in base all'età, allo stadio e al PS del paziente); C, chirurgia; antiCD20, rituximab; RT, radioterapia; IgHD, immunoglobuline ad alte dosi; RF, radiofrequenza; P, prednisone; IFN interferone; LTC, linfociti T citotossici.

^gCR, remissione completa; PR, remissione parziale; SD, malattia stabile; PD, malattia in progressione; n.v., non valutabile.

2. IDENTIFICAZIONE DEI RIARRANGIAMENTI IGHV-D-J, IGKV-J e IGLV-J NELLO SPETTRO CLINICO-PATOLOGICO DEI PTLD

Per identificare i riarrangiamenti clonali IGHV-D-J sono state utilizzate diverse strategie di PCR a seconda del materiale di origine (Figura 6). I campioni derivati da tessuto congelato sono stati analizzati con una serie di primers senso, complementari alle regioni leader e FR1 dei geni IGHV, in associazione ad un primer antisenso degenerato complementare alla FR4 dei geni IGHJ. I campioni provenienti da tessuto fissato ed incluso in paraffina sono stati analizzati con una serie di primers senso, complementari alla FR1 o FR2 dei geni IGHV, in associazione al primer degenerato antisenso, complementare alla FR4 dei geni IGHJ. Per questi campioni non sono state utilizzate le strategie di amplificazione con i primers senso, complementari alle regioni leader, in quanto i prodotti di amplificazione previsti avrebbero avuto una dimensione superiore a quella ottenibile da questo tipo di DNA (Figura 6).

Utilizzando le strategie di PCR precedentemente descritte è stato possibile ottenere un riarrangiamento clonale IGHV-D-J in tutti i PTLD analizzati. La caratterizzazione dettagliata dei riarrangiamenti funzionali e non funzionali identificati nei PTLD è riportata in Tabella 3 ed in Tabella 4, rispettivamente.

L'analisi della sequenza dei prodotti di amplificazione ha rivelato la presenza di un riarrangiamento IGHV-D-J funzionale in 40/50 (80%) casi. In 5 casi è stato identificato un riarrangiamento reso non funzionale dalla presenza di mutazioni inattivanti introdotte dal processo di IMS. In 5 casi il riarrangiamento è risultato non funzionale a causa di un riarrangiamento IGHV-D-J che non ha mantenuto la cornice di lettura corretta (out-of-frame).

Tabella 3. Analisi dei riarrangiamenti funzionali dei geni IGV in PTLD

Caso	Istologia	IGHV-D-J				IGV-J catene leggere		
		IGHV	IGHD	IGHJ	% mutazione	IGV	IGJ	% mutazione
1	BL/BLL	4-59	3-10+3-03	6b	5,45	KV1-33	KJ2	5,98
2	BL/BLL	4-61	7-27	4b	12,0	-	-	-
3	BL/BLL	3-53	2-8	4b	8,37	LV10-54	LJ3b	0
5	BL/BLL	4-61	na	6b	6,54	KV2-28	KJ1	4,86
6	LDGC-B, CB	4-34	na	6	23,2	LV9-49	LJ2/3a	0
7	LDGC-B, CB	4-34	na	4b	11,8	KV3-11	KJ2	8,01
8	LDGC-B, CB	5-51	6-19+2-08	4b	4,06	KV1-6	KJ3	3,52
9	LDGC-B, CB	3-74	2-08+1-07	4b	8,64	-	-	-
10	LDGC-B, CB	2-70	6-25	3b	1,85	LV6-57	LJ3b	3,47
11	LDGC-B, CB	3-33	D5	4b/5a	4,42	LV1-51	LJ2	3,39
12	LDGC-B, CB	1-46	4-23	4b	2,71	LV2-14	LJ1	7,90
13	LDGC-B, CB	3-15	na	2	14,9	LV8-61	LJ3	9,42
14	LDGC-B, CB	4-30.1*	na	3b	7,12	KV1-39	KJ2	5,59
15	LDGC-B, CB	1-18	3-16	4b	8,11	LV1-44	LJ2	6,80
18	LDGC-B, CB	1-69	1-7	6c	0	LV3-21	LJ3	0
19	LDGC-B, CB	3-11	na	6b	0	LV7-43	LJ3	0
20	LDGC-B, CB	3-15	na	4b	15,4	-	-	-
21	LDGC-B, CB	4-61	na	4b	2,54	KV4-1	KJ2	3,20
23	LDGC-B, IB	3-30	3-10	6b	1,62	KV1-5	KJ3	2,31
24	LDGC-B, IB	4-34	6-13	4b	11,6	KV3-20	KJ1	5,92
25	LDGC-B, IB	3-15	4-17	6b	5,28	LV3-10	LJ1	6,25
26	LDGC-B, IB	3-11	3-3	6c	2,8	KV4-1	KJ5	3,80
29	LDGC-B, IB	3-15	2-21	3b	2,25	KV4-1	KJ1	3,93
31	LDGC-B, IB	1-69	3-10	4	17,6	LV3-19	LJ2/3a	0
33	LDGC-B, IB	3-15	na	4b	17,2	LV3-25	LJ2/3a	4,48
34	LDGC-B, IB	4-04	4-23	6b	8,62	LV2-23	LJ2	8,46
35	LDGC-B, IB	3-23	3-9	4b	7,82	KV4-1	KJ4	4,32
36	LDGC-B, IB	4-30.2*	3-10	5b	10,7	KV4-1	KJ3	0
37	LDGC-B, IB	4-34	3-10	6b	2,12	KV3-20	KJ2	0,81
39	LDGC-B, IB	1-69	na	5b	5,26	LV7-46	LJ3	9,60
40	LDGC-B, IB	3-11	3-3	6c	2,80	LV10-54	LV2/3a	0
41	P-PTLD	3-74	-	4b	0	KV1D-33	KJ4	0
42	P-PTLD	3-30.3	4-23	6b	5,64	LV1-51	LJ2/3a	2,21
43	P-PTLD	4-34	D6	6b	4,71	LV3-16	LJ2/3a	0
44	P-PTLD	5-51	3-10	3b	2,77	KV1-5	KJ2	2,50
45	P-PTLD	3-07	D5	6a	12,3	LV9-49	LJ2/3a	2,61
46	P-PTLD	3-15	-	4b	10,3	LV6-57	LJ2	3,86
48	P-PTLD	3-30	3-22+5-12	4b	10,3	LV10-54	LJ3b	6,27
49	P-PTLD	3-30*	3-09	4b	0	LV3-21	LV2	14,5
50	P-PTLD	3-30	4-17	4b	7,62	LV3-21	LJ3	8,00

*, riarrangiamento out-of-frame; -, riarrangiamento non identificato; na, non assegnabile

^aP-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico; LB/LBL, linfoma di Burkitt Burkitt-like.

Tabella 4. Caratteristiche dei riarrangiamenti non funzionali dei geni IGV in PTLD

Caso	Istologia ^a	IGHV-D-J					IGVJ catene leggere			
		IGHV	IGHD	IGHJ	% mutazione	Stato funzionale	IGV	IGJ	% mutazione	Stato funzionale
4	BL/BLL	1-69	2-08	6c	0	out-of-frame	LV2-08	LJ2/3	4,95	mutazione puntiforme -> codone di stop
16	LDGC-B, CB	3-07	3-03	4b	24,1	+	LV7-46	LJ1	26,2	inserzioni/delezioni -> slittamento cornice di lettura
17	LDGC-B, CB	1-69	1-1	3	8,59	+	LV3-10	LJ2/3	6,59	mutazione puntiforme -> codone di stop
22	LDGC-B, IB	3-33	3-10	6	3,60	+	LV1-40	LV3b	3,45	uplicazione V -> slittamento cornice di lettura
27	LDGC-B, IB	3-66	na	6b	8,59	out-of-frame	KV3-15	KJ1	5,42	mutazione puntiforme V -> slittamento cornice di lettura
28	LDGC-B, IB	3-07	na	6b	7,20	mutazione puntiforme -> codone di stop	KV1-5	KJ1	6,32	mutazione puntiforme -> codone di stop
30	LDGC-B, IB	3-30.3	1-26	6b	11,8	mutazione puntiforme -> codone di stop	LV1-40	LJ2/3a	7,66	mutazione puntiforme -> codone di stop
32	LDGC-B, IB	4-34	4-17	6b	7,42	mutazione puntiforme -> codone di stop	KV1-5	KJ1	6,88	mutazione puntiforme -> codone di stop
38	LDGC-B, IB	4-30.2	2-08	na	14,1	mutazione puntiforme -> codone di stop	KV1-33	KJ4	1,11	out-of-frame
47	P-PTLD	4-34	4-17	6b	2,00	uplicazione gene V -> slittamento cornice di lettura	-	-	-	

^aP-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immonoblastico; LB/LBL, linfoma di Burkitt Burkitt-like. -, riarrangiamento non identificato; na, non assegnabile

Per identificare i riarrangiamenti delle catene leggere kappa (IGKV-J) e lambda (IGLV-J) sono state utilizzate molteplici strategie di PCR, analogamente a quanto è stato fatto per la identificazione dei riarrangiamenti IGHV-D-J (Figura 6).

Un riarrangiamento clonale per le catene leggere è stato ottenuto in 46/50 (92%) PTLD (Tabella 3 e 4). Nella maggior parte dei casi è stato ottenuto un riarrangiamento delle catene leggere lambda (27/46; 59%). Un riarrangiamento delle catene leggere potenzialmente funzionale è stato identificato in 35/46 (76%) PTLD. In 8 casi sono stati amplificati riarrangiamenti resi non funzionali da mutazioni inattivanti, introdotte dal processo di IMS. In 3 casi il riarrangiamento è risultato out-of-frame. In 4 casi non è stato possibile identificare alcun riarrangiamento clonale.

I dati ottenuti dall'analisi molecolare dei riarrangiamenti IGHV-D-J, IGKV-J e IGLV-J, suggeriscono che 10/50 (20%) PTLD si sono sviluppati da cellule B che hanno acquisito mutazioni inattivanti che precludono l'espressione di un recettore per l'antigene. L'incidenza dei PTLD con riarrangiamenti inattivati non differisce nei principali gruppi istologici.

3. UTILIZZO DEI GENI IGHV, IGKV E IGLV

Nel complesso, le frequenze relative delle famiglie IGHV utilizzate dai PTLD riflettono il repertorio di riarrangiamenti riscontrato nelle cellule B mature non neoplastiche (Brezinschek *et al.*, 1997). In particolare, la famiglia IGHV3, che rappresenta la famiglia IGHV con più geni ed è, normalmente, la più utilizzata, è stata amplificata in 25/50 (50%) casi, seguita dalla famiglia IGHV4 (15/50; 30%) e dalla famiglia IGHV1 (7/50; 15%) (Figura 7A). Considerando i PTLD per i quali sono stati trovati riarrangiamenti potenzialmente funzionali, i geni più frequentemente riarrangiati sono: IGHV3-15 (6/37; 16,2%), IGHV4-34 (5/37; 13,5%), IGHV1-69, IGHV3-30 e

IGHV4-61 (3/37; 8,11% ciascuno). Mentre l'elevata frequenza di riarrangiamento del gene IGHV4-34 è un evento ricorrente nelle neoplasie delle cellule B mature e non differisce significativamente da ciò che si osserva nel repertorio delle cellule B normali (Brezinschek *et al.*, 1997), l'utilizzo preferenziale del gene IGHV3-15 è significativamente più frequente nei PTLD di quanto atteso ($p < 0,05$) e non è stato finora osservato in altre neoplasie della cellula B.

Per quanto riguarda l'analisi delle catene leggere, la famiglia IGK più utilizzata è IGKV1 (9/19; 47%), seguita da IGKV4 (5/19; 26% e IGKV3 (4/19; 21%) (Figura 7B). La famiglia IGLV utilizzata più frequentemente è IGLV3 (8/27; 30%), seguita da IGLV1 (5/27; 18%), IGLV7 e IGLV10 (3/27; 11%) (Figura 7C). Sebbene i PTLD mostrino una tendenza a utilizzare più dell'atteso le famiglie IGKV4 e IGLV3, nel complesso, l'utilizzo delle diverse famiglie geniche non differisce in maniera significativa da ciò che si osserva nel repertorio B normale (Foster *et al.*, 1997; Farner *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda l'utilizzo dei segmenti IGHD, IGHJ, IGKJ e IGLJ, non sono stati riscontrate differenze particolari rispetto il repertorio B normale (Brezinschek *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 1997; Farner *et al.*, 1999).

4. PROFILO MUTAZIONALE DEI GENI IGV IN PTLD

In base alla presenza di mutazioni somatiche, l'origine della quasi totalità dei PTLD analizzati (47/50; 94%) è da ricondurre a cellule B che hanno subito il processo di IMS (Tabella 3 e 4), con una frequenza media di mutazione pari all'8,6% per i geni IGHV, del 4,6% per i geni IGKV e del 6,3% per i geni IGLV. Nel complesso, la percentuale di mutazione si distribuisce indipendentemente dallo stadio di malattia, dal tempo intercorso dal trapianto d'organo o dal tipo istologico di PTLD.

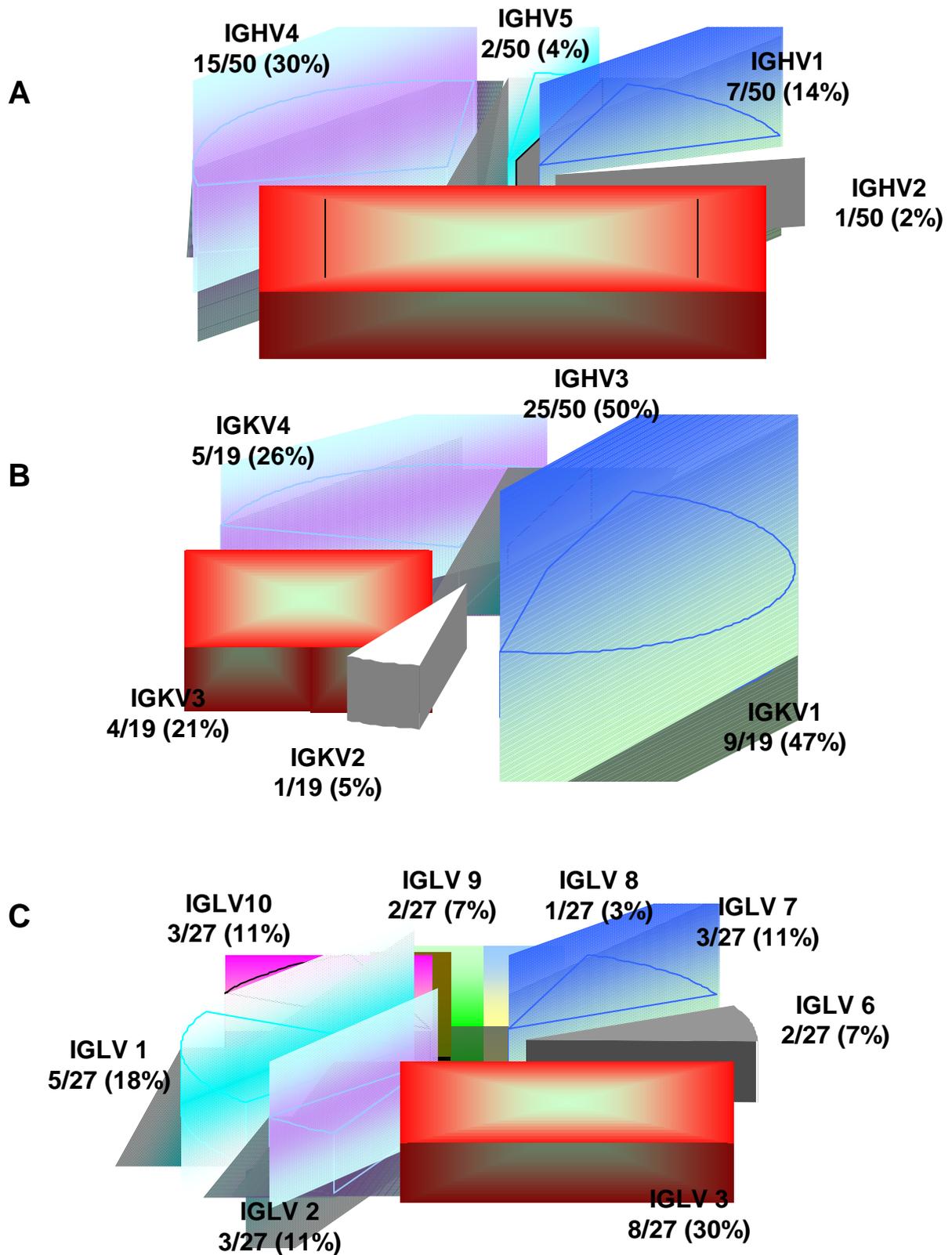


Figura 7. Analisi dei riarrangiamenti dei geni IGV in PTLD. Nel complesso, la rappresentatività delle famiglie IGHV non differisce in modo significativo da ciò che si osserva nel repertorio delle cellule B normali. (A) la famiglia IGHV3, che rappresenta la famiglia IGHV con più geni ed è la più utilizzata nel repertorio B normale, è stata amplificata in 25/50 (50%) casi, seguita dalla famiglia IGHV4 (15/50; 30%) e dalla famiglia IGHV1 (7/50; 15%). Per quanto riguarda le catene leggere, nei PTLD si osserva una frequenza superiore all'atteso dei geni appartenenti alla famiglia IGKV4 (B) e IGLV3 (C).

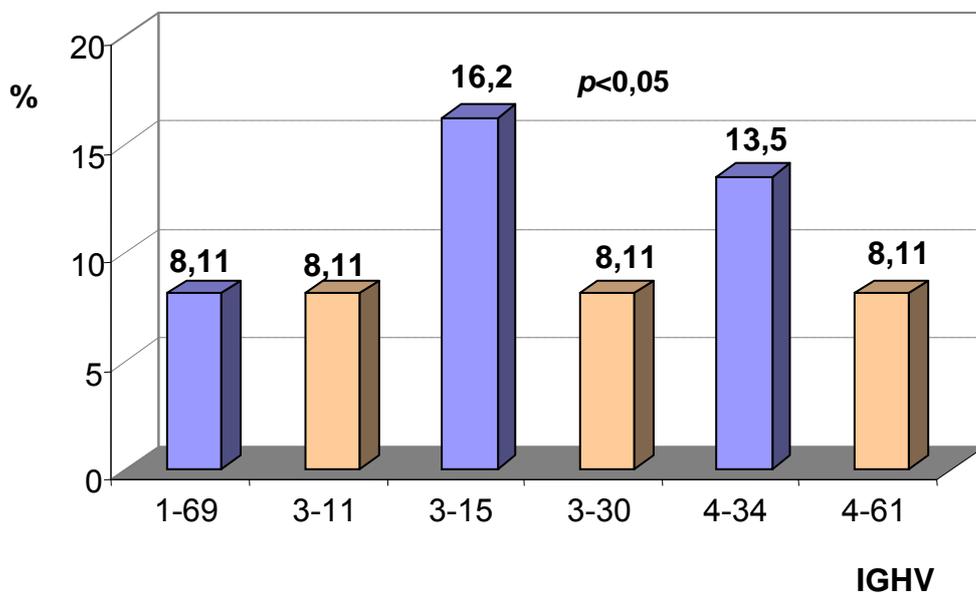


Figura 8. Analisi dell'utilizzo dei geni IGHV in PTLD. Considerando i PTLD per i quali sono stati trovati riarrangiamenti potenzialmente funzionali, i geni più frequentemente riarrangiati sono il gene IGHV3-15 (6/37; 16,2%), IGHV4-34 (5/37; 13,5%), IGHV1-69, IGHV3-30 e IGHV4-61 (3/37; 8,11% ciascuno). Mentre l'elevata frequenza di riarrangiamento del gene IGHV4-34 è un evento ricorrente nelle neoplasie delle cellule B mature e non differisce significativamente da ciò che si osserva nel repertorio delle cellule B normali (Brezinschek *et al.*, 1997), l'utilizzo preferenziale del gene IGHV3-15 è significativamente più frequente nei PTLD di quanto atteso ($p < 0,05$) e non è stato finora osservato in altre neoplasie della cellula B.

Al fine di verificare il ruolo della stimolazione antigenica nella patogenesi dei PTLD è stata analizzata la distribuzione delle mutazioni somatiche nelle regioni FR e CDR in un gruppo rappresentativo di PTLD con riarrangiamento funzionale e IMS dei geni IGHV (n=29) (Chang *et al.*, 1994; Lossos *et al.*, 2000). I risultati dei metodi statistici binomiale e multinomiale sono risultati sovrapponibili in tutti i casi. Un numero di mutazioni R nelle sequenze FR inferiore all'atteso è stato osservato in 12/29 (41%) PTLD, suggerendo, in questi casi una pressione selettiva nel preservare un anticorpo strutturalmente funzionale. Un numero di mutazioni R superiore all'atteso nelle sequenze CDR è stato riscontrato in 9/29 (31%) PTLD, suggerendo, per questi casi, la selezione di un recettore con maggiore affinità per l'antigene.

5. ANALISI DELL'ETERogeneITÀ INTRACLONALE DELLA IMS NEI GENI IGHV

La presenza di IMS "ongoing" dei geni IGHV è stata studiata mediante subclonaggio molecolare di 13 geni IGHV derivati da 13 differenti PTLD (Tabella 5). Il subclonaggio dei geni IGHV permette, infatti, di identificare all'interno del clone tumorale sub-cloni di cellule con mutazioni somatiche a carico dei geni IGHV non rilevabili mediante il solo sequenziamento diretto. Questa eterogeneità intraclonale indica la presenza di IMS "ongoing". In 9/13 (69,2%) PTLD, i cloni IGHV non hanno mostrato eterogeneità intraclonale, indicando l'assenza di IMS "ongoing" (Tabella 5). Contrariamente, 4/13 PTLD (1 LB/LBL, 1 LDGC-B, CB, 1 LDGC-B, IB e 1 P-PTLD) presentavano eterogeneità intraclonale dei geni IGHV, consistente con l'attività "ongoing" del processo di IMS (Tabella 5).

Tabella 5. Analisi della presenza di eterogeneità intraclonale in PTLD

Campione	Istologia	Fenotipo			EBV	IGHV	% di mutazione	Profilo mutazionale			
		BCL6	MUM1	CD138				n° cloni analizzati	n° di basi sequenziate	n° mutazioni	eterogeneità intraclonale [#]
2	LB/LBL	nd	nd	nd	neg	4-61	12,0	26	7280	84	SI
7	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	neg	4-34	11,8	21	5670	5	NO
11	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	POS	3-33	4,42	22	5900	75	SI
13	LDGC-B, CB	neg	neg	neg	neg	3-15	14,9	24	6720	15	NO
15	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	neg	1-18	8,11	23	6230	2	NO
16	LDGC-B, CB	neg	POS	POS	neg	3-07	24,1	30	8400	10	NO
31	LDGC-B, IB	POS	POS	neg	POS	1-69	17,6	27	7800	58	SI
34	LDGC-B, IB	neg	POS	POS	POS	4-04	8,62	20	5780	9	NO
35	LDGC-B, IB	nd	nd	nd	neg	3-23	7,82	24	6680	12	NO
37	LDGC-B, IB	neg	POS	neg	neg	4-34	2,12	22	6050	5	NO
46	P-PTLD	neg	neg	neg	neg	3-15	10,3	20	5500	4	NO
48	P-PTLD	neg	POS	neg	neg	3-30	10,3	25	6975	10	NO
50	P-PTLD	POS	POS	neg	neg	3-30	7,62	21	5670	46	SI

^aP-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immonoblastico; LB/LBL, linfoma di Burkitt Burkitt-like.

[#] definita in base alla presenza di un numero di mutazioni significativamente superiore al numero atteso in base alla frequenza di errore della polimerasi (test t di Student, p<0.05); nd, non disponibile

6. CARATTERIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA EBV IN PTLD

La ricerca degli EBER mediante tecniche di ibridazione *in situ*, ha dimostrato la presenza di EBV in 26/50 (52%) casi, comprendenti 6/10 P-PTLD, 16/35 (46%) LDGC-B, e 4/5 LB/LBL (Tabella 6). Considerando i LDGC-B, la presenza di EBV è significativamente più frequente nei LDGC-B, IB (14/19; 74%), rispetto i LDGC-B, CB (2/16; 12%; $p < 0,01$). Considerando il tempo trascorso tra il trapianto e la diagnosi di PTLD, tutti i PTLD ad insorgenza precoce ($n=7$) sono risultati positivi per EBV, mentre sono EBV positivi solo 19/43 (44%) casi ad insorgenza tardiva. Un confronto tra la positività per EBV e la presenza di selezione antigenica ha rivelato che l'infezione è presente sia nei PTLD stimolati/selezionati dall'antigene (44.4%), sia nei PTLD senza evidenza di stimolazione e selezione antigenica (46.2%).

L'espressione di LMP1 è stata dimostrata in 14/23 PTLD EBER-positivi e si riscontra nei LDGC-B, IB ($n = 9$) e nei P-PTLD ($n = 5$). La sola espressione di LMP1 (latenza tipo I) è stata osservata in 3 LDGC-B, IB e in 1 P-PTLD. La co-espressione di LMP1 ed EBNA2 (latenza tipo III) è stata osservata in 10 casi (comprendenti 6 LDGC-B, IB e 4 P-PTLD) e si riscontra preferenzialmente nei PTLD ad insorgenza precoce (Tabella 2 e 6).

Il genotipo di EBV è stato determinato analizzando, mediante tecnica PCR, una regione polimorfica del gene EBNA2 che consente di discriminare i due genotipi principali di EBV: tipo 1 e tipo 2. La presenza di EBV tipo 1 è stata osservata in 23/26 (88%) PTLD, mentre i rimanenti casi sono risultati essere infettati da EBV tipo 2; in nessun caso è stata osservata coesistenza dei due genotipi (Tabella 5). Le varianti genotipiche di LMP1 sono state indagate, mediante tecnica PCR, amplificando la regione C-terminale, che è stata dimostrata essere deleta in alcuni tipi di neoplasie associate ad EBV. Una sequenza completa di LMP1 (*wild type*, WT) è stata osservata in 14/26 PTLD; in 9 casi (35%) è stata trovata la variante del30-LMP1 ed in 2 casi la

variante del69-LMP1 (Tabella 5). In un solo caso è stata osservata la presenza simultanea di del30-LMP1 e di LMP1 WT.

7. ESPRESSIONE DI BCL6, MUM1 E CD138

Quaranta PTLD (10 P-PTLD, 14 LDGC-B centroblastici, e 16 LDGC-B immunoblastici) sono stati analizzati per l'espressione di BCL6, MUM1 e CD138. Esempi rappresentativi sono mostrati nella Figura 9. L'espressione di BCL6 è stata riscontrata in 9/40 (22,5%) PTLD e si associa selettivamente ai LDGC-B centroblastici (9/14; 64,3%; $p < 0.01$), mentre è consistentemente assente nei P-PTLD (0/10) e nei LDGC-B immunoblastici (0/16). L'espressione di MUM1 è stata rilevata in 29/40 (72,5%) PTLD, occorrendo preferenzialmente nei P-PTLD (9/10; 90%), e nei LDGC-B immunoblastici (16/16; 100%). L'espressione di CD138 è stata riscontrata in 12/40 (30%) PTLD, inclusi 2/10 (20%) P-PTLD, 9/16 (56,2%) LDGC-B immunoblastici e 1/14 (7,14%) LDGC-B centroblastici.

La Tabella 7 riassume la frequenza dei profili fenotipici identificati nei PTLD. Complessivamente, il profilo $BCL6^+/MUM1^{-/+}/CD138^-$ caratterizza il LDGC-B (9/30; 30%) e, in particolare, il LDGC-B centroblastico (9/14; 64,3%). Contrariamente, il profilo $BCL6^-/MUM1^+/CD138^-$ si associa a 7/10 (70%) P-PTLD e a 9/30 (30%) LDGC-B, di cui 7/16 (43,8%) LDGC-B immunoblastici. Infine, il profilo $BCL6^-/MUM1^+/CD138^+$ è espresso in 2/10 (20%) P-PTLD e in 10/30 (33,3%) LDGC-B, compresi 9/16 (56,2%) LDGC-B immunoblastici. Tre PTLD sono risultati negativi per tutti e tre i marcatori.

Tabella 6. Analisi dell'infezione da EBV in PTLD

Caso	Istologia ^a	Organo TX	EBER	Espressione proteine di EBV		Genotipo LMP1	Variante EBV
				LMP1	EBNA2		
1	LB/LBL	cuore	POS	neg	neg	del30	1
3	LB/LBL	cuore	POS	neg	neg	del30	1
4	LB/LBL	cuore	POS	neg	neg	WT	1
5	LB/LBL	polmone	POS	neg	neg	del60	1
10	LDGC-B, CB	cuore	POS	neg	neg	WT	1
11	LDGC-B, CB	cuore	POS	neg	neg	WT	1
23	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	POS	WT	1
24	LDGC-B, IB	polmone	POS	POS	POS	WT	1
25	LDGC-B, IB	polmone	POS	POS	POS	WT	1
27	LDGC-B, IB	cuore	POS	neg	neg	WT	1
28	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	POS	del60	2
29	LDGC-B, IB	cuore	POS	neg	neg	WT	1
30	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	neg	del30	1
31	LDGC-B, IB	rene	POS	neg	neg	WT	1
32	LDGC-B, IB	rene	POS	neg	neg	WT	1
34	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	POS	del30	1
36	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	POS	WT	2
38	LDGC-B, IB	cuore	POS	POS	neg	del30	2
39	LDGC-B, IB	polmone	POS	POS	neg	WT+del30	1
40	LDGC-B, IB	rene	POS	neg	neg	del30	1
41	P-PTLD	cuore	POS	POS	POS	WT	1
42	P-PTLD	polmone	POS	POS	POS	del30	1
44	P-PTLD	cuore	POS	POS	POS	del30	1
45	P-PTLD	cuore	POS	POS	POS	del30	1
47	P-PTLD	cuore	POS	POS	neg	WT	1
49	P-PTLD	cuore	POS	neg	neg	WT	1

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico; WT, wild type

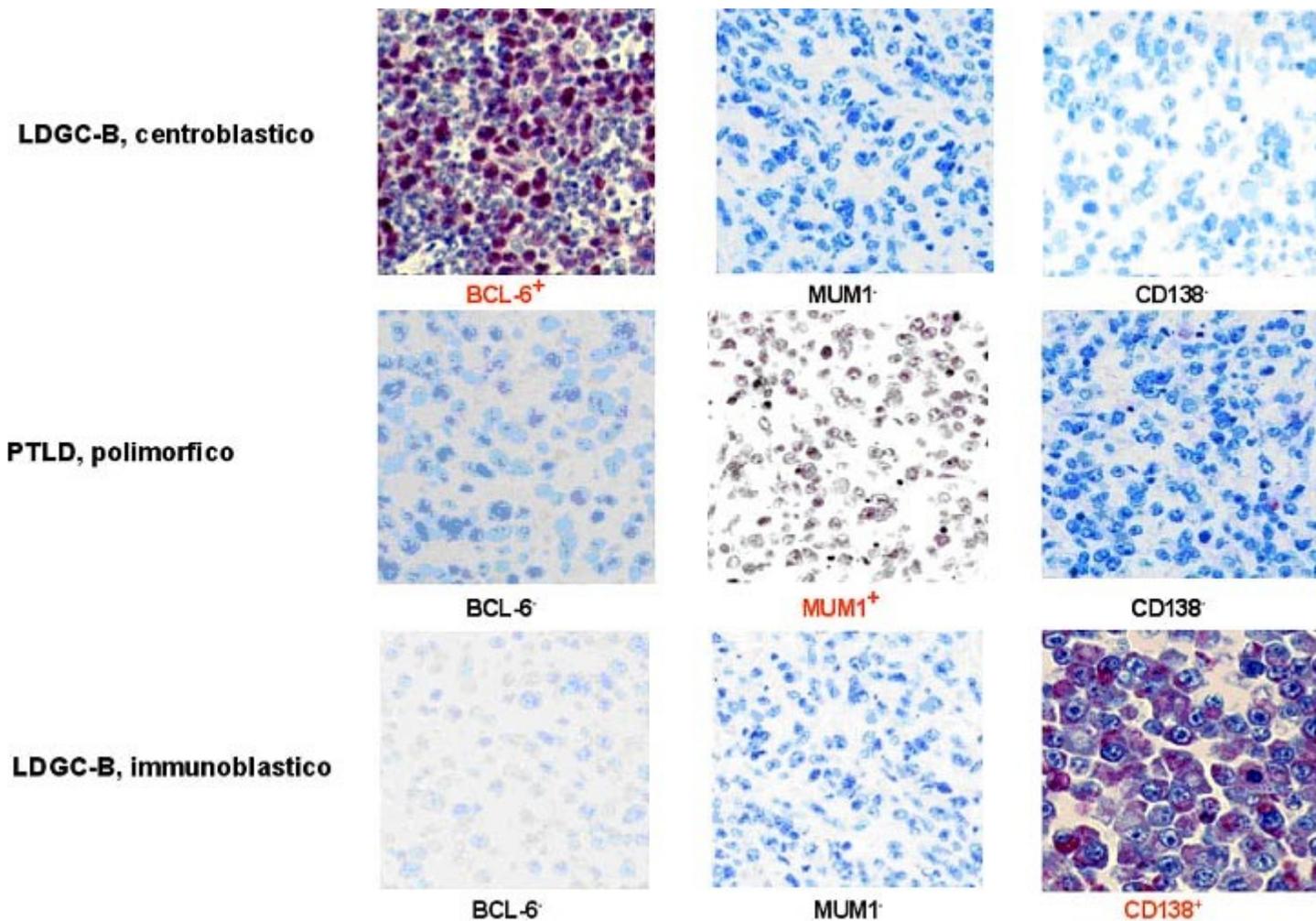


Figura 9. Espressione di BCL6, MUM1 e CD138 in casi rappresentativi di PTLD. L'analisi immunohistochimica è stata eseguita su sezioni di tessuto incluse in paraffina utilizzando le metodiche della immunoperossidasi (MUM1 e BCL6) e APAAP (CD138); controcolorazione con ematossilina-eosina; ingrandimento originale x 250. *Pannello A:* linfoma diffuso a grandi cellule (LDGC-B) centroblastico positivo per espressione di BCL6 e negativo per espressione di MUM1 e CD138. *Pannello B:* PTLD polimorfico positivo per espressione di MUM1 e negativo per espressione di BCL6 e CD138. *Pannello C:* LDGC-B immunoblastico positivo per espressione di CD138 e negativo per espressione di BCL6 e MUM1.

Tabella 7. Espressione di BCL6, MUM1, e CD138 nei PTLD

Istologia ^a	BCL6 ⁺ /MUM1 ^{-/+} /CD138 ⁻ positivi / testati (%)	BCL6 ⁻ /MUM1 ⁺ /CD138 ⁻ positivi / testati (%)	BCL6 ⁻ /MUM1 ⁺ /CD138 ⁺ positivi / testati (%)	BCL6 ⁻ /MUM1 ⁻ /CD138 ⁻ positivi / testati (%)
PTLD	9/40 (22,5%)	16/40 (40%)	12/40 (30%)	3/40 (7,50%)
P-PTLD	0/10	7/10 (70%)	2/10 (20%)	1/10 (10%)
LDGC-B (tutte le varianti)	9/30 (30%)	9/30 (30%)	10/30 (33,3%)	2/30 (6,67%)
LDGC-B, CB	9/14 (64,3%) ^b	2/14 (14,3%)	1/14 (7,14%)	2/14 (14,3%)
LDGC-B, IB	0/16	7/16 (43,8)	9/16 (56,2%)	0/15

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico;

^b Otto casi mostravano il fenotipo BCL6⁺/MUM1⁻/CD138⁻ e 1 caso mostrava il fenotipo BCL6⁺/MUM1⁺/CD138⁻.

8. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI PTLD CHE ORIGINANO DA CELLULE B DEL DONATORE INSORTI IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI FEGATO

8.1 PANNELLO TUMORALE

In questa parte dello studio sono stati analizzati 15 PTLD monoclonali insorti in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. L'analisi dei microsatelliti ha dimostrato l'origine da cellule B del donatore in 9/15 casi (60%; D-PTLD) e l'origine da cellule B del ricevente in 6/15 casi (40%; R-PTLD). I principali dati clinici dei due gruppi di pazienti sono riassunti in Tabella 8. Tutti i D-PTLD sono risultati ad insorgenza precoce (entro un anno dal trapianto) e con localizzazione esclusivamente epatica. Morfologicamente, 7/9 casi sono stati classificati come P-PTLD, 2 casi come LDGC-B, immunoblastici. Al contrario, 5/6 R-PTLD sono stati classificati come linfomi ad insorgenza tardiva ed alla diagnosi, 5/6 casi presentavano una localizzazione extraepatica. Morfologicamente tutti i R-PTLD sono stati classificati come LDGC-B, di tipo centroblastico (4 casi) o immunoblastico (2 casi). Non sono state riscontrate differenze nell'età dei pazienti al trapianto, nel tipo di terapia immunosoppressiva, nella modalità di trattamento del linfoma e nell'outcome.

8.2 CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA

Tutti i D-PTLD sono risultati MUM1 positivi / BCL6 negativi, mentre l'espressione di BCL6 è stata riscontrata esclusivamente in 4 R-PTLD classificati come LDGC-B centroblastici (Tabella 9). Tutti i PTLD sono risultati positivi per l'espressione di CD79a e CD20. L'espressione di CD30 è stata riscontrata in 5/9 D-PTLD (Tabella 9).

Tabella 8. Caratteristiche cliniche dei D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia ^a	Sesso ^b	Anno del TX	Organo TX	Età al TX	Immuno soppressione ^c	Tr->PLD, mesi	Sede del tumore	Stadio	Terapia ^d	Risposta ^e	Outcome, mesi dal TX
D-PTLD												
D1	P-PTLD	M	2001	fegato	62	CyA+Aza	7	fegato	IE	nessuna	na	diagnosi autoptica
D2	P-PTLD	M	2000	fegato	59	CyA + P	5	fegato	IE	Ch+anti-CD20+Acycl	RC	vivo a 55 mesi
D4	P-PTLD	M	2001	fegato	47	CyA + P	8	fegato	IE	CT+Acycl	RC	vivo a 42 mesi
D5	P-PTLD	M	2002	fegato	48	CyA	7	fegato	IE	CT	progressione	morto a 6 mesi
D6	P-PTLD	M	2001	fegato	50	CyA	7	fegato	IE	CT	progressione	morto a 3 mesi
D7	P-PTLD	M	2002	fegato	42	CyA	6	fegato	IE	CT	RC	vivo a 30 mesi
D8	P-PTLD	M	2004	fegato	45	CyA	5	fegato	IE	CT	responsivo	vivo a 6 mesi
D3	LDGC-B, IB	M	1999	fegato	33	CyA + P	7	fegato	IE	CT+HDlg+Acycl+RF	RC	vivo a 70 mesi
D9	LDGC-B, IB	M	2005	fegato	52	Cy+P	7	fegato	IE	CT	RC	vivo a 19 mesi
R-PTLD												
R1	LDGC-B, IB	F	1993	fegato	40	CyA+Aza	63	peritoneo	IVE	CT+HDlg+Acycl	RC	vivo a 88 mesi
R2	LDGC-B, IB	F	1993	fegato	55	CyA + P	95	linfonodo	III	CT	RC	vivo a 48 mesi
R3	LDGC-B, IB	M	1992	fegato	45	CyA+Aza	110	cute	IE	Ch+CT	RC	vivo a 50 mesi
R4	LDGC-B, IB	M	1996	fegato	53	CyA	64	linfonodo	III	CT	responsivo	morto a 2 mesi
R5	LDGC-B, CB	M	1998	fegato	62	CyA + P	46	fegato	IE	CT+Acycl	RC	vivo a 38 mesi
R6	LDGC-B, CB	M	na	fegato	70	na	na	linfonodo	nd	nd	nd	diagnosi autoptica

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico

^b M, maschio, F, femmina

^c CyA, ciclosporina A; Aza, azatioprina; P, prednisone

^d Ch, chirurgia; CT, chemioterapia; Acycl, aciclovir; HDlg, immunoglobuline ad alte dosi

^e RC, risposta completa

Tabella 9. Profilo immunofenotipico dei D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia ^a	Immunoistochimica					
		BCL6	MUM1	CD138	CD20	CD79a	CD30
D-PTLD							
D1	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	neg
D2	P-PTLD	neg	POS	POS	POS	POS	POS
D4	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	POS
D5	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	POS
D6	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	neg
D7	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	POS
D8	P-PTLD	neg	POS	neg	POS	POS	neg
D3	LDGC-B, IB	neg	POS	POS	POS	POS	POS
D9	LDGC-B, IB	neg	POS	POS	POS	POS	neg
R-PTLD							
R1	LDGC-B, IB	neg	POS	neg	POS	POS	neg
R2	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	POS	POS	neg
R3	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	POS	POS	neg
R4	LDGC-B, IB	neg	POS	neg	POS	POS	neg
R5	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	POS	POS	neg
R6	LDGC-B, CB	POS	neg	neg	POS	POS	neg

^aP-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico

8.3 ANALISI DELLA PRESENZA DI EBV IN D-PTLD E R-PTLD

Mediante ibridazione *in situ* dei trascritti virali EBER, la presenza di EBV è stata riscontrata in tutti i D-PTLD e in un solo caso di R-PTLD (Tabella 10). Tutti i D-PTLD sono risultati positivi per l'espressione delle onco-proteine virali LMP1 e EBNA2 (Tabella 10), mentre il R-PTLD EBER positivo esprimeva la sola proteina LMP1. L'analisi del genotipo di EBV ha rivelato la presenza della variante tipo 1 in 8 casi (7 D-PTLD e 1 R-PTLD), mentre la variante tipo 2 è stata riscontrata in 2 D-PTLD. In 7/9 D-PTLD è stata identificata la variante deleta del gene LMP1 (del60 in 5 casi e del30 in 2 casi). Solo in 3 casi (1 R-PTLD e 2 D-PTLD) è stata riscontrata la presenza del gene LMP1 wild type

8.4 ANALISI DEI RIARRANGIAMENTI IGV IN D-PTLD E R-PTLD

La caratterizzazione molecolare dei riarrangiamenti IGHV-D-J è riportata in Tabella 11. E' stato possibile identificare un riarrangiamento funzionale IGHV-D-J in 14/15 casi. La presenza di IMS è stata riscontrata in 9/14 (64%) PTLD, con una frequenza media di mutazione del 7,25% (intervallo 2,36-14,4%). Cinque casi (3 D-PTLD e 2 R-PTLD) sono risultati privi di mutazioni somatiche.

Nel complesso, l'utilizzo delle diverse famiglie V, D e J in D-PTLD e R-PTLD è risultato sovrapponibile al repertorio di riarrangiamenti riscontrato nelle cellule B normali mature. Tuttavia, l'analisi dell'utilizzo dei singoli geni IGHV ha evidenziato il riarrangiamento del gene IGHV4-39 in 3 D-PTLD. L'utilizzo di IGHV4-39 è altrimenti raro nel repertorio B normale ed è anche scarsamente utilizzato nel contesto di altre neoplasie linfoidi.

8.5 ANALISI DEL PROFILO MUTAZIONALE DEI GENI IGHV IN D-PTLD E R-PTLD

Il profilo di distribuzione delle mutazioni che causano una sostituzione

Tabella 10. Analisi dell'infezione da EBV in D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia ^a	Espressione			Genotipo EBV	Variante LMP1
		EBER	LMP1	EBNA2		
D-PTLD						
D1	P-PTLD	POS	POS	POS	1	del60
D2	P-PTLD	POS	POS	POS	1	del30
D3	P-PTLD	POS	POS	POS	1	del60
D4	P-PTLD	POS	POS	POS	1	WT
D5	P-PTLD	POS	POS	POS	1	WT
D6	P-PTLD	POS	POS	POS	1	del60
D7	P-PTLD	POS	POS	POS	1	del30
D8	LDGC-B, IB	POS	POS	POS	2	del60
D9	LDGC-B, IB	POS	POS	POS	2	del60
R-PTLD						
R1	LDGC-B, IB	POS	POS	neg	1	WT
R2	LDGC-B, IB	neg	-	-	-	-
R3	LDGC-B, IB	neg	-	-	-	-
R4	LDGC-B, IB	neg	-	-	-	-
R5	LDGC-B, CB	neg	-	-	-	-
R6	LDGC-B, CB	neg	-	-	-	-

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico; WT, wild type; -, non eseguito

Tabella 11. Analisi molecolare dei riarrangiamenti IGHV-D-J in D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia ^a	IGH			% MUT	Stato funzionale	Profilo mutazionale	
		IGHV	IGHD	IGHJ			FR R/S	CDR R/S
D-PTLD								
D1	P-PTLD	5-51	2-2	6b	6,67	+	3/2*	6/4*
D2	P-PTLD	3-15	na	3b	0	+	–	–
D3	P-PTLD	4-39	na	4b	8,11	+	5/7*	3/1*
D4	P-PTLD	3-23	3-3	6c	8,33	+	7/6*	6/6
D5	P-PTLD	4-39	2-15	6b	0	+	–	–
D6	P-PTLD	4-39	3-22	6b	0	+	–	–
D7	P-PTLD	1-2	2-8	4b	3,40	+	6/2	1/1
D8	LDGC-B, IB	3-30	3-3	6b	8,61	+	8/8*	6/3*
D9	LDGC-B, IB	–	–	–	–	–	–	–
R-PTLD								
R1	LDGC-B, IB	3-30.3	4-23	4b	9,68	+	8/5*	9/3*
R2	LDGC-B, IB	4-61	3-22	5b	0	+	–	–
R3	LDGC-B, IB	1-f	6-19	4b	3,73	+	4/3	3/0
R4	LDGC-B, IB	4-31	na	4b	14,4	+	8/14*	7/2*
R5	LDGC-B, CB	1-58	na	6b	0	+	–	–
R6	LDGC-B, CB	3-74	3-22	6b	2,36	+	4/1	3/0

^a P-PTLD, PTLN polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico; na, non assegnabile.

*Eccesso statisticamente significativo di mutazioni S ($p < 0,05$) nelle regioni FRs o un eccesso statisticamente significativo ($p < 0,05$) di mutazioni R nelle regioni CDRs rispetto a ciò che è atteso in base ad una distribuzione casuale delle mutazioni.

aminoacidica (*Replacement mutations*, R) e di quelle che sono silenziose (*Silent mutations*, S) all'interno delle diverse regioni codificanti del gene IGHV è stato analizzato per definire se le cellule tumorali sono state selezionate in base alla capacità di esprimere di un antigene strutturalmente funzionale (regioni FRs strutturalmente conservate, con un eccesso di mutazioni S rispetto all'atteso) e per evidenziare la possibile selezione del clone tumorale in base alla capacità di legare, con elevata affinità, uno specifico antigene (un eccesso di mutazioni R, rispetto all'atteso, nelle regioni CDRs). L'analisi statistica della distribuzione delle mutazioni R e S all'interno delle regioni FRs e CDRs è stata eseguita su 5 D-PTLD e 4 R-PTLD con riarrangiamento IGHV funzionale e con tasso di mutazione >2,0%, utilizzando i modelli binomiale e multinomiale (Tabella 11). Un eccesso statisticamente significativo di mutazioni S ($p < 0,05$) nelle regioni FRs ed un eccesso statisticamente significativo ($p < 0,05$) di mutazioni R nelle regioni CDRs rispetto a ciò che è atteso in base ad una distribuzione casuale delle mutazioni, è stato osservato in 4/5 D-PTLD ed in 2/4 R-PTLD (Tabella 11).

8.6 ANALISI DELLA PRESENZA DI UN PROCESSO DI IPERMUTAZIONE SOMATICA “ONGOING” ATTIVO SUI GENI IGHV IN D-PTLD E R-PTLD

L'analisi della variabilità intraclonale dei geni IGHV (indicatore della presenza di un processo di ipermutazione somatica “*ongoing*”) è stata effettuata su 4 D-PTLD e 3 R-PTLD con riarrangiamento IGHV funzionale e con tasso di mutazione >2,0%. In 2/4 D-PTLD è stata riscontrata eterogeneità intraclonale (caratteristica che suggerisce la presenza di un processo di ipermutazione somatica “*ongoing*”) (Tabella 12).

8.7 PROFILO MUTAZIONALE DEI PROTO-ONCOGENI CMYC, PIM1, RHOH/TTF E PAX5 IN D-PTLD E R-PTLD

La distribuzione delle mutazioni nei quattro proto-oncogeni analizzati in D-PTLD

Tabella 12. Analisi della presenza di eterogeneità intraclonale in D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia	IGH			%MUT	Profilo mutazionale			
		IGHV	IGHD	IGHJ		n° cloni analizzati	N° di basi sequenziate	n° mutazioni	eterogeneità intraclonale [#]
D-PTLD									
D1	P-PTLD	5-51	2-2	6b	6,67	23	6210	42	SI
D3	P-PTLD	4-39	na	4b	8,11	20	5200	37	SI
D4	P-PTLD	3-23	3-3	6c	8,33	25	7000	12	NO
D7	P-PTLD	1-2	2-8	4b	3,40	21	6300	8	NO
R-PTLD									
R1	LDGC-B, IB	3-30.3	4-23	4b	9,68	20	5600	4	NO
R3	LDGC-B, CB	1-f	6-19	4b	3,73	26	7800	18	NO
R6	LDGC-B, CB	3-74	3-22	6b	2,36	22	6050	5	NO

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico

[#] definita in base alla presenza di un numero di mutazioni significativamente superiore al numero atteso in base alla frequenza di errore della polimerasi (test t di Student, p<0.05)

e R-PTLD è dettagliatamente riportata in Tabella 13. Il processo di IMS aberrante è risultato essere un fenomeno estremamente frequente in queste neoplasie, in quanto è stato riscontrato in 6/9 D-PTLD e in 4/6 R-PTLD. In 4 casi più di un proto-oncogene è risultato essere colpito dal processo mutazionale. Tutti i geni analizzati sono risultati variabilmente colpiti in entrambi i gruppi di malattia e, in particolare, i geni più colpiti sono risultati essere PAX5 e cMYC, entrambi mutati in 5 casi (Figura 9). In totale, in 10 PTLD, sono state identificate 57 mutazioni. La maggior parte delle mutazioni è rappresentata da singole sostituzioni nucleotidiche (n = 55), mentre microdelezioni sono state osservate in soli 2 casi (rispettivamente in PAX5, in D-PTLD 8 e in cMYC, in R-PTLD 6) (Tabella 13). Su 55 mutazioni puntiformi osservate, 28 sono risultate essere transizioni e 27 transversioni, con un rapporto transizioni/transversioni di 1,04 (atteso 0,5; $p < 0,05$). Ventidue dei 55 eventi mutazionali (40%) sono localizzati nei motivi RGYW/WRCY (frequenza di mutazione pari a 0,53% nei motivi RGYW/WRCY versus 0,23% fuori dei motivi RGYW/WRCY; $p = 0,05$).

8.8 IL PROCESSO DI IMS ABERRANTE INTRODUCE MUTAZIONI “MISSENSE” IN D-PTLD E R-PTLD

Mentre la maggior parte delle mutazioni trovate sono distribuite nelle regioni 5' non codificanti, 8 mutazioni interessano le regioni codificanti di cMYC, nello specifico la sequenza dell'esone 2, codificante il dominio di attivazione trascrizionale (Tabella 13, Figura 10). In particolare, tre casi (D-PTLD 4, D-PTLD 8 e R-PTLD 1) presentano, all'interno del dominio transattivante, una sostituzione nucleotidica che causa la sostituzione di un residuo acido (D) con un residuo basico (N o H). Un quarto caso (R-PTLD 6) presenta una delezione a livello del codone 94 che porta a slittamento della cornice di lettura e introduzione di uno stop codon.

Tabella 13. Analisi mutazionale dei geni cMYC, RhoH/TTF, PIM1 e PAX5 in D-PTLD e R-PTLD

Campione	Istologia ^a	IMS		IMS aberrante ^b			
		IGV	BCL6	PIM1	PAX5	RhoH/TTF	MYC esone 1/2
D-PTLD							
D1	P-PTLD	M	GL	GL	T788C; C848G; C853A; G971A; C1108A; G1110A	GL	GL
D2	P-PTLD	GL	GL	GL	GL	GL	GL
D3	P-PTLD	M	GL	C1016G; T1307G; G1406A	GL	GL	GL
D4	P-PTLD	M	GL	GL	GL	GL	C2510T; G4563A
D5	P-PTLD	GL	GL	C1056T	T909C	GL	GL
D6	P-PTLD	GL	GL	GL	G729A; G736A; C797T, A919G, T968A; C1026G; C1061G; G1115A; A1208G	GL	GL
D7	P-PTLD	M	GL	GL	GL	GL	GL
D8	LDGC-B, IB	M	GL	GL	A659G; T788C; G847A; C848G; C853A; G971A; delGCT(1045-1047); C1108A	GL	G4557A; G5026A; G5028A
D9	LDGC-B, IB	--	GL	GL	GL	GL	GL
R-PTLD							
R1	LDGC-B, IB	M	G1030C	GL	GL	GL	G4773C
R2	LDGC-B, CB	GL	GL	GL	GL	GL	GL
R3	LDGC-B, CB	M	G478A	G1691C; G1845A	GL	GL	GL
R4	LDGC-B, IB	M	GL	GL	C848T, C938G; C1338G; C1436T	G114A; T229G; C322G; A340C; C414A; C695G; G698T; G884A; C911G; G920A; G959C; A1058T	C5170G
R5	LDGC-B, CB	M	GL	GL	GL	GL	GL
R6	LDGC-B	M	GL	GL	GL	C827A; G538A	delC4801; G4998A

^a P-PTLD, PTLD polimorfico; LDGC-B, linfoma diffuso a grandi cellule B; CB, centroblastico; IB, immunoblastico

^b Numerazione in accordo alle sequenze X00364 (cMYC), AF386789 (RhoH/TTF), AF386792 (PIM1) e AF386791 (PAX5) depositate in GenBank. del, delezione

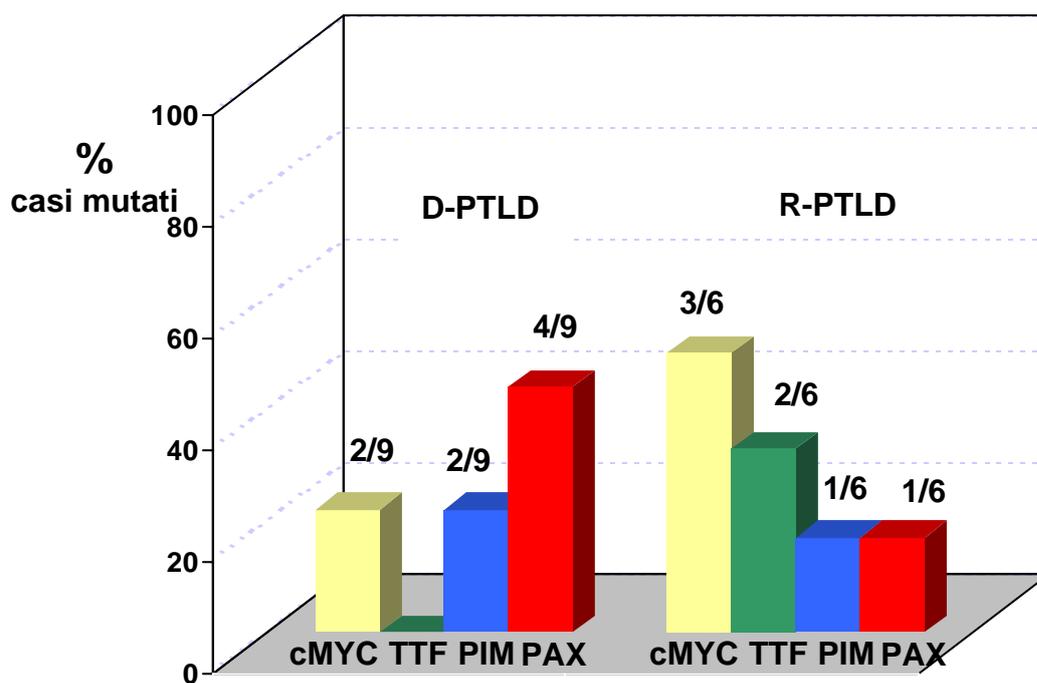


Figura 9. Incidenza del meccanismo di IMS aberrante in D-PTLD e R-PTLD. Il processo di IMS aberrante è risultato essere un fenomeno estremamente frequente in queste neoplasie, in quanto è stato riscontrato in 6/9 D-PTLD e in 4/6 R-PTLD. In 4 casi più di un proto-oncogene è risultato essere colpito dal processo mutazionale.

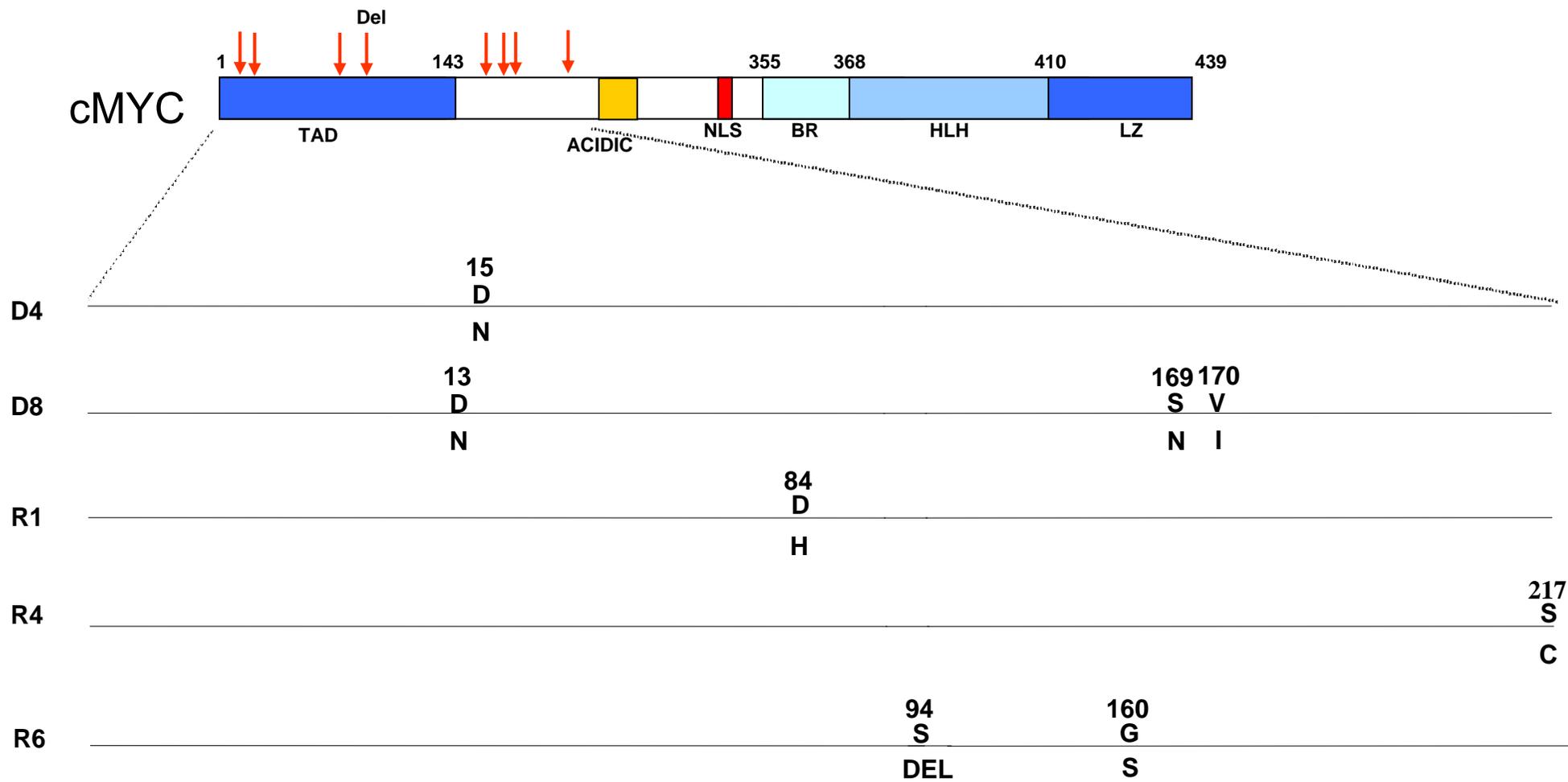


Figura 10. Sostituzioni aminoacidiche introdotte dal meccanismo di IMS aberrante in D-PTLD e R-PTLD nell'esone 2 di cMYC, codificante il dominio di attivazione trascrizionale.

DISCUSSIONE

Questo studio ha avuto come scopo generale la definizione della fisiopatologia molecolare delle varie entità clinico-patologiche di PTLD a cellule B monoclonali insorti dopo trapianto di organo solido. Lo studio è stato articolato in diversi obiettivi, al fine di definire l'istogenesi molecolare e il ruolo della stimolazione antigenica nella patogenesi dei PTLD. Le implicazioni dei dati ottenuti sono molteplici.

In primo luogo, abbiamo dimostrato che la maggior parte dei PTLD deriva da cellule B transitate attraverso il CG. Nonostante questa origine comune, i PTLD presentano profili istogenetici eterogenei che riflettono stadi differenti di maturazione della cellula B normale. In secondo luogo, abbiamo verificato il ruolo della stimolazione del recettore per l'antigene nella patogenesi dei PTLD. La stimolazione antigenica ha avuto un ruolo nel favorire e sostenere la trasformazione neoplastica in una frazione di PTLD. Contestualmente, in un gruppo rilevante di PTLD la mancata espressione del recettore per l'antigene, dovuta a riarrangiamenti non funzionali o mutazioni "crippling" dei geni IGHV non ha impedito la sopravvivenza del clone neoplastico. In terzo luogo abbiamo dimostrato l'elevata incidenza di linfomi che originano da cellule B del donatore, in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Infine, abbiamo osservato che il processo di IMS aberrante è un evento estremamente frequente nel contesto sia dei PTLD derivati da cellule B del donatore, sia dei PTLD originati da cellule B del ricevente e colpisce diversi proto-oncogeni coinvolti nella linfomagenesi. Questi risultati ampliano la nostra conoscenza sull'istogenesi e sulla patogenesi dei PTLD e confermano l'eterogeneità di queste malattie linfoproliferative.

In accordo con precedenti studi condotti sui PTLD EBV+ (Carbone *et al.*, 2001; Timms *et al.*, 2003), i nostri risultati dimostrano che il fenomeno della IMS dei geni IGV

si verifica approssimativamente nel 95% dei PTLD, suggerendo una origine comune di queste malattie linfoproliferative da una cellula B correlata al CG. Le stesse cellule B, correlate al CG e che danno origine ai PTLD, danno anche origine alla maggior parte delle malattie linfoproliferative, sia in condizioni di immunocompetenza sia in condizioni di immunodeficienza che, oltre alla immunosoppressione iatrogenica post-trapianto, includono l'infezione da HIV e le immunodeficienze primarie (Müller-Hermelink *et al.*; 1998; Küppers *et al.*; 1999; Ariatti *et al.*; 2000; Stevenson *et al.*; 2001; Carbone *et al.*; 2001).

Un piccolo gruppo di PTLD a cellule B monoclonali non mostra tracce di IMS dei geni IGV. Questi casi tendono a presentarsi precocemente dopo il trapianto, possono appartenere sia ai tipi morfologici P-PTLD sia LDGC, essere associati ad infezione da EBV e mimare un profilo fenotipico post-CG. Conformemente ai modelli convenzionali di istogenesi delle neoplasie linfoidi B, i PTLD che possiedono geni IGV germinali dovrebbero aver origine da cellule B pre-CG (Müller-Hermelink *et al.*; 1998; Küppers *et al.*; 1999; Stevenson *et al.*; 2001). Tuttavia, l'opinione che tutte le linfoproliferazioni a cellule B che possiedono geni IGV germinali derivino da cellule B pre-CG è stata recentemente messa in discussione dai dati derivati dall'analisi del profilo genico delle leucemie linfatiche croniche (Klein *et al.*, 2001; Rosenwald *et al.*, 2001). Infatti, analogamente ad una frazione di leucemie linfatiche croniche a cellule B, i PTLD con i geni IGV non mutati possono originare da cellule B che sono transitate attraverso il CG senza essere colpite dal fenomeno della IMS (Klein *et al.*, 2001; Rosenwald *et al.*, 2001).

Casi di linfoma EBV+ con fenotipo post-CG, ma privi di mutazioni dei geni IGV sono stati riscontrati anche nel contesto dell'infezione da HIV, mentre sono estremamente rari in altre condizioni, suggerendo che lo sviluppo di linfoproliferazioni positive per EBV, che presentano un profilo immunologicamente nativo ma fenotipicamente un profilo di cellule B differenziate, possa essere specificamente

correlato alla disfunzione immune dell'ospite (Carbone *et al.*, 2001; Gaidano *et al.*, 2002). In tale contesto, la sopravvivenza della cellula neoplastica nel corso del passaggio attraverso il CG può essere attribuita all'espressione dell'oncoproteina virale LMP1 o ad altre lesioni molecolari che prevengono l'apoptosi (Küppers *et al.*; 1999).

Nonostante un'origine comune dalle cellule B correlate al CG, la precisa istogenesi dei PTLD mostra un certo grado di eterogeneità molecolare e fenotipica. Nel contesto di tale eterogeneità possono essere identificate tre principali categorie.

In primo luogo, i PTLD che riflettono i centroblasti, caratterizzati da fenotipo $BCL6^+/MUM1^-/CD138^-$ ed associati all'attività "ongoing" del processo di IMS, sono morfologicamente classificati come LDGC-B centroblastici o come LB/LBL.

Una seconda categoria di PTLD si caratterizza per il fenotipo $BCL6^-/MUM1^+/CD138^-$ e per la presenza di IMS stabile. Tale categoria comprende i tipi morfologici P-PTLD e LDGC-B immunoblastico. Il profilo $BCL6^-/MUM1^+/CD138^-$ suggerisce che questo sottotipo di PTLD sia correlato a centroцити tardivi, che hanno terminato la reazione attraverso il CG ma che non sono ancora stati sottoposti alla differenziazione terminale. Questo profilo istogenetico è il più comune tra i PTLD, ma è raro tra il LDGC-B dell'immunocompetente e tra i linfomi HIV-correlati, rinforzando il concetto che i PTLD possono essere biologicamente diversi dai linfomi di simile istologia (Falini *et al.*, 2000; Carbone *et al.*; 2001).

La terza categoria istogenetica di PTLD presenta caratteristiche istogenetiche sovrapponibili a quelle delle cellule B post-CG e differenziate pre-terminalmente. Infatti, questi PTLD esprimono il fenotipo $BCL6^-/MUM1^+/CD138^+$ e presentano geni IGV con IMS stabile. Tale profilo istogenetico è stato frequentemente riscontrato nei linfomi HIV correlati. Questi PTLD sono morfologicamente rappresentati sia da P-PTLD sia da LDGC-B immunoblastici.

In accordo con quanto osservato nel contesto delle malattie linfoproliferative dell'ospite immunocompetente e HIV correlate, i dati relativi alla stimolazione

antigenica suggeriscono che la stimolazione del recettore per l'antigene possa avere avuto un ruolo nel favorire e sostenere la trasformazione neoplastica. Infatti, da un lato, una frazione di PTLD presenta un numero superiore all'atteso di mutazioni R nelle CDR, indice che le cellule neoplastiche sono state selezionate per l'elevata affinità di legame con l'antigene. Dall'altro, una frazione di PTLD presenta un numero inferiore all'atteso di mutazioni R nelle FR, indice che le cellule neoplastiche sono state selezionate per conservare immutate le sequenze FR. E' possibile che tali casi possiedano un'affinità per l'antigene sufficiente a garantire il legame, e che quindi siano stati selezionati esclusivamente per mantenere inalterata la struttura terziaria dell'immunoglobulina. Alternativamente è possibile che la struttura terziaria delle regioni FR sia stata conservata al fine di favorire il legame di un superantigene. Tuttavia, attualmente non sono noti quali antigeni o superantigeni siano coinvolti nella stimolazione del recettore B dei PTLD.

Un gruppo rilevante di PTLD si caratterizza per la presenza di riarrangiamenti non funzionali dei geni IGV, in maggioranza dovuti a mutazioni "crippling", cioè mutazioni che introducono un codone di stop in un riarrangiamento che in origine era funzionale. Un recettore funzionante è richiesto per la sopravvivenza delle cellule B normali durante il passaggio attraverso il CG. Poiché, alternativamente, le cellule B normali vanno incontro ad apoptosi nel CG, è verosimile che questo gruppo di PTLD, che origina in larga misura da cellule B correlate al CG, sia protetto contro l'apoptosi attraverso meccanismi indipendenti dal legame con l'antigene (Müller-Hermelink *et al.*; 1998; Küppers *et al.*; 1999; Stevenson *et al.*; 2001). Tale protezione può essere dovuta all'attivazione di uno o più percorsi anti-apoptotici, quali l'espressione delle oncoproteine codificate da EBV e/o l'inattivazione di *geni* pro-apoptotici. La sopravvivenza dei PTLD EBV+, che possiedono mutazioni "crippling" dei geni IGV, può essere giustificata, oltre che dall'espressione di LMP1, anche dall'espressione di LMP2A, una proteina virale in grado di fornire alle cellule B segnali di sopravvivenza

anche in assenza del normale segnale del BCR (Caldwell *et al.*, 1998; Longnecker *et al.*, 2000; Portis *et al.*, 2003).

Parte di questa ricerca è stata finalizzata a definire l'incidenza e le caratteristiche clinico-biologiche dei PTLD che originano da cellule B del donatore, in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Le informazioni ottenute da quest'analisi sono molteplici e possiedono implicazioni sia cliniche sia biologiche. Il primo dato che emerge da quest'analisi riguarda l'elevata incidenza di linfomi che originano da cellule B del donatore, in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. In questo studio, i D-PTLD rappresentano più del 50% dei casi diagnosticati nel periodo considerato, e la quasi totalità dei casi insorti entro il primo anno dal trapianto. Considerando che il rischio medio d'insorgenza di linfoma in questo tipo di trapianto è del 2-3%, ne consegue che almeno l'1% dei pazienti trapiantati svilupperà, entro un anno, un linfoma che origina da cellule B del donatore. Ulteriori studi saranno necessari per verificare se l'elevata incidenza di linfomi originati da cellule B del donatore sia una caratteristica legata al trapianto di fegato o se sia un fenomeno associato anche ad altri tipi di trapianto d'organo solido.

I D-PTLD si presentano, da un punto di vista clinico-patologico, come un gruppo di neoplasie estremamente omogeneo. Tutti i casi insorgono precocemente (entro un anno dal trapianto) e con una localizzazione esclusivamente epatica. Il ruolo fondamentale di EBV nella patogenesi di questi tumori è comprovato dalla presenza del genoma virale e l'espressione delle oncoproteine virali LMP1 e EBNA2 in tutti i casi analizzati.

Morfologicamente, tutti i D-PTLD sono classificati come linfomi polimorfici e presentano il fenotipo BCL6 neg / MUM1 pos caratteristico delle cellule B mature pre-terminalmente differenziate. La presenza di IMS somatica nel 63% dei casi suggerisce che la maggior parte di questi linfomi origini da cellule B del donatore che hanno subito una reazione tipo centro germinativo e che quindi abbiano subito la stimolazione da

parte dell'antigene, precedentemente o durante la trasformazione neoplastica. L'ipotesi del ruolo centrale svolto dalla stimolazione antigenica nello sviluppo di queste neoplasie è confermata anche dalla particolare distribuzione delle mutazioni S e R nei geni IGHV e dal particolare utilizzo del gene IGHV4-39 in 3 casi. La presenza di eterogeneità intraclonale in due D-PTLD indica che, almeno in una frazione di casi, le cellule neoplastiche di origine del donatore stanno subendo una reazione tipo centro germinativo e, pertanto, una stimolazione antigenica, in un contesto immune eterologo.

Infine, i D-PTLD oltre ad essere intensamente sottoposti al processo di IMS fisiologica, sono anche soggetti ad un processo di IMS aberrante ad un'intensità comparabile, se non superiore, a quella finora osservata nel LDGC-B. I proto-oncogeni colpiti da IMS codificano proteine con funzioni diverse, tra cui trasduttori di segnale (PIM1 e RhoH/TTF) e fattori trascrizionali (PAX-5 e c-MYC). Ma 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 IMS aberrante, può alterare la funzione di PAX5, RhoH/TTF PIM1, e c-MYC attraverso due modalità. Le mutazioni possono colpire sia regioni regolatorie sia regioni codificanti. Questo comporta la potenziale deregolazione della trascrizione (PAX5, RhoH/TTF e cMYC) o l'alterazione biochimica e strutturale della proteina codificata (PIM1 e cMYC). In particolare, studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che le mutazioni che colpiscono il dominio di trans-attivazione di cMYC possono deregolarne la funzione interferendo sulla fosforilazione, la stabilità proteica o la repressione dell'attività trans-attivante attraverso la proteina p107 (Yano *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1994; Hoang *et al.*, 1997). Questi risultati suggeriscono che, nei PTLD, come nel caso dei LB dove cMYC è traslocato, almeno alcune mutazioni possono essere state selezionate per la loro abilità nell'alterare la funzione di cMYC.

Il profilo molecolare dell'IMS aberrante trovato nei PTLD è simile a quello osservato nei LDGC-B dell'immunocompetente, e presenta alcune similitudini con lo spettro mutazionale dei geni IGV (Pasqualucci *et al.*, 1998; Capello *et al.*, 2000): *i*) le mutazioni si concentrano in regioni vicine ai siti d'inizio della trascrizione; *ii*) la maggior parte delle mutazioni interessa sostituzioni di singoli nucleotidi mentre le delezioni o inserzioni sono rare o assenti; *iii*) le transizioni prevalgono rispetto alle transversioni; *vi*) si osserva un "bias" per i motivi RGYW/WRCY ed una prevalenza di sostituzioni G+C rispetto ad A+T.

In contrasto, tuttavia, con l'IMS fisiologica, il meccanismo di IMS aberrante è limitato ai linfomi aggressivi in quanto le mutazioni in questi geni sono assenti nelle cellule B normali e sono rare o assenti nei linfomi indolenti (Pasqualucci *et al.*, 2001). 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 diversi proto-oncogeni al momento è sconosciuto ma, come suggerito per i LDGC-B dell'immunocompetente, può riflettere un malfunzionamento del meccanismo di IMS fisiologicamente attivo nelle cellule B del centro germinativo.

I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono due scenari per la patogenesi dei D-PTLD. Un primo scenario prevede lo sviluppo di un linfoma da cellule B pre-neoplastiche, EBV-positive, già presenti nel tessuto epatico del donatore. Questa ipotesi è suffragata dalla brevità dell'intervallo di tempo che intercorre tra il momento del trapianto e la diagnosi del linfoma e dal fatto che le cellule neoplastiche abbiano acquisito, in breve tempo, un fenotipo pre-terminalmente differenziato e un numero elevato di alterazioni molecolari fisiologiche e aberranti. Il rapido sviluppo della neoplasia sarebbe favorito dalla profonda immunodepressione del ricevente. Un secondo scenario suggerisce lo sviluppo di un linfoma da cellule B normalmente presenti nei tessuti annessi all'organo trapiantato. Queste cellule, in un contesto

immune autologo in parte integro, sarebbero in grado di sviluppare una risposta immune verso i determinanti antigenici dello stesso ospite o verso stimoli infettivi ricorrenti. Lo stimolo antigenico continuo, in associazione al profondo stato di immunosoppressione del ricevente, condurrebbe ad una condizione infiammatoria cronica con possibilità di sviluppo di disordini linfoproliferativi policlonali che potrebbero evolvere in linfoma.

La definizione dell'istogenesi molecolare dei PTLD può costituire uno strumento classificativo utile a raffinare la distinzione dei PTLD in categorie più omogenee e costituisce un potenziale marcatore prognostico. L'impatto della istogenesi molecolare sulla prognosi dei PTLD deve pertanto essere verificato mediante studi prospettici su popolazioni trattate in maniera omogenea. Inoltre, poiché questo studio si è focalizzato sui PTLD monoclonali, saranno utili indagini finalizzate a chiarire la istogenesi di altre categorie di PTLD, quali i PTLD policlonali e oligoclonali.

BIBLIOGRAFIA

- Ariatti C, Vivenza D, Capello D, Migliazza A, Parvis G, Fassone L, Buonaiuto D, Savinelli F, Rossi D, Saglio G, Gaidano G. Common-variable immunodeficiency-related lymphomas associate with mutations and rearrangements of BCL-6: pathogenetic and histogenetic implications. *Hum Pathol.* 2000; **31**: 871-873.
- Armitage JM, Kormos RL, Stuart RS, Fricker FJ, Griffith BP, Nalesnik M, Hardesty RL, Dummer JS. Post-transplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression. *J Heart Lung Transplant* 1991; **10**: 877-887.
- Brezinschek H-P, Foster SJ, Brezinschek RI, Dörner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2488-2501.
- Boxer L, Dang CV. Translocations involving c-MYC and c-MYC function. *Oncogene* 2001; **20**: 5595
- Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998; **9**: 405-411.
- 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.
- Capello D, Cerri M, Muti G, Berra E, Oreste P, Deambrogi C, Rossi D, Dotti G, Conconi A, Vigano 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
- Capello D, Cerri M, Muti G, Lucioni M, Oreste P, Gloghini A, Berra E, Deambrogi C, Franceschetti S, Rossi D, Alabiso O, Morra E, Rambaldi A, Carbone A, Palli M, Gaidano G. Analysis of immunoglobulin heavy and light chain variable genes in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Hematol Oncol* 2006; **24**: 212-219.
- Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, Capello D, Pierconti F, Canzonieri V, Tirelli U, Dalla-Favera R, Gaidano G. Expression profile of MUM1/IRF-4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 2001; **97**: 744-751.
- Carbone A, Gloghini A, Capello D, Gaidano G. Genetic pathways and histogenetic models of AIDS-related lymphomas. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 1270-1275.
- Cattoretti G, Chang C-C, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995; **86**: 45-53.
- Cesarman E, Chadburn A, Liu YF, Migliazza A, Dalla-Favera R, Knowles DM. BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood* 1998; **92**: 2294-2302.

- Chadburn A, Chen JM, Hsu DT, Frizzera G, Cesarman E, Garrett TJ, Mears JG, Zangwill SD, Addonizio LJ, Michler RE, Knowles DM. The morphologic and molecular genetic categories of posttransplant lymphoproliferative disorders are clinically relevant. *Cancer* 1998; 82: 1978-1987.
- Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 1994; 15: 367-373.
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 219-229.
- Delecluse HJ, Rouault JP, French M, Dureau G. Post-transplant lymphoproliferative disorders with genetic abnormalities commonly found in malignant tumours. *Br J Haematol* 1995; 89:90-97.
- De Re V, De Vita S, Marzotto A, Rupolo M, Gloghini A, Pivetta B, Gasparotto D, Carbine A, Boiocchi M. Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non Hodgkin lymphomas suggest that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood* 2000; 96: 3578-3584
- Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye KM, Kleijnen MF, Kieff E, Mosialos G. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 7098-7108.
- Dotti G, Fiocchi R, Motta T, Gamba A, Gotti E, Gridelli B, Borleri G, Manzoni C, Viero P, Remuzzi G, Barbui T, Rambaldi A. Epstein-Barr virus negative lymphoproliferative disorders in long-term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation* 2000; 69: 827-833.
- 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.
- Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, Pacini R, Alunni C, Natali-Tanci L, Ugolini B, Sebastiani C, Cattoretti G, Pileri S, Dalla-Favera R, Stein H. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000; 95: 2084-2092.
- Farner NL, Dörner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V α J α repertoire. *J Immunol* 1999; 162: 2137-2145.
- Finberg RW. Epstein-Barr virus-specific T cells for the management of Epstein-Barr virus lymphomas. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 349-353.

- Flenghi L, Ye BH, Fizzotti M, Bigerna B, Cattoretti G, Venturi S, Pacini R, Pileri S, Lo Coco F, Pescarmona E. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am J Pathol* 1995; 147: 405-411.
- Foster SJ, Brezinschek H-P, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanism and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM B cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 1614-1627.
- Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, Canzonieri V, Capello D, Franceschi S, Saglio G, Carbone A. Genetic heterogeneity of AIDS-related small non cleaved cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997; 98, 726-732.
- Gaidano G, Capello D, Gloghini A, Pastore C, Migliazza A, Quattrone S, Savinelli F, Buonaiuto D, Cilia AM, Perin T, Pasqualucci L, Canzonieri V, Saglio G, Dalla-Favera G, Carbone A. BCL-6 in AIDS-related lymphomas: pathogenetic and histogenetic implications. *Leukemia and Lymphoma* 1998; 31: 39-46.
- Gaidano G, Carbone A, Dalla-Favera R. Pathogenesis of AIDS-related lymphomas. *Am J Pathol* 1998; 152: 623-630.
- Gaidano G, Dalla-Favera R. Pathobiology of non-Hodgkin lymphomas. In: Hoffman R, Benz ES, Shattil SJ, Furie B, Choen HJ, Silberstein LE, McGlave P, ed. Hematology. Basic principles and practice. New York: Churchill Livingstone, 2000: 1213-1229.
- 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 Haematol* 2002; 119: 622-628.
- Gaidano G, Pasqualucci L, Capello D, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Maria Larocca L, Gloghini A, Carbone A, Dalla-Favera R. Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102: 1833-1841.
- Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 1997; 16: 6131-6140.
- Greiner T, Armitage JO, Gross TG. Atypical lymphoproliferative diseases. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000: 133-146.
- 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.
- Harris N, Swerdlow S, Frizzera G, Knowles D, eds. Post-transplant lymphoproliferative disorders. Lyon: IARC Press 2001.
- 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* 1997; 15: 4031-4042.
- Hoover D, Friedmann M, Reeves R., Magnuson NS. Recombinant human pim-1 protein exhibits serine/threonine kinase activity. *J Biol Chem* 2001; 266: 14018-14023

- Hsu S-M, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 734-738.
- Izumi KM, Kieff ED. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(23): 12592-12597.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press. 2001.
- Janeway CA. *Immunobiologia*, Piccin 2003; 127-160, 229-303.
- Kaye KM, Devergne O, Harada JN, Izumi KM, Yalamanchili R, Kieff E, Mosialos G. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11085-11090.
- Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Variable gene analysis of B cell subsets derived from a 4-years-old child. Somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med* 1994; 180: 1383-1393.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625-1638.
- Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 85: 552-565.
- Knowles DM. Neoplastic hemopathology. Second edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 569-622.
- Kraj P, Rao SP, Glas AM, Hardy RR, Milner ECB, Silberstein LE. The human heavy chain IgV region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J Immunol* 1997; 158: 5824-5832.
- 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.
- Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341: 1520-1529.
- Küppers R. B-cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 801-812.
- Leblond V, Davi F, Charlotte F, Dorent R, Bitker MO, Sutton L, Gandjbakhch I, Binet JL, Raphael M. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol* 1998; 16: 2052-2059.

- Liebowitz D, Mannick J, Takada K, Kieff E. Phenotypes of Epstein-Barr virus LMP1 deletion mutants indicate transmembrane and amino-terminal cytoplasmic domains necessary for effects in B-lymphoma cells. *J Virol* 1992; 66: 4612-4616.
- Ling PD, Rawlins DR, Hayward SD. The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9237-9241.
- Ling PD, Hsieh JJ, Ruf IK, Rawlins DR, Hayward SD. EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 1994; 68: 5375-5383.
- Liso A, Capello D, Marafioti T, Tiacci E, Cerri M, Distler V, Palli M, Carbone A, Del sol G, Campo E, Pileri S, Pasqualucci L, Gaidano G, Falini B. Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 108:1013-1020.
- Locker J, Nalesnik M. Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation. *Am J Pathol* 1989; 135: 977-987.
- Longnecker R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 2000; 79: 175-200.
- Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, Warnke R, Vose JM, Greiner TC, Levy R. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 95: 1797-1803.
- Lossos IS, Tibshirani N, Narasimhan B, Levy R. The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol* 2000; 165: 5122-5126.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215.
- Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood* 2004;103: 1869-1875.
- Morrison AM, Nutt SL, 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.
- Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 1995; 80: 389-399.
- 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.
- Muschen M, Re D, Jungnickel B, Diehl V, Rajewsky K, Kuppers R. Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* 2000; 192:1833-1840.

- Muti G, Cantoni S, Oreste P, Klersy C, Gini G, Rossi V, D'Avanzo G, Comoli P, Baldanti F, Montillo M, Nosari A, Morra E; Cooperative Study Group on PTLDs. Post-transplant lymphoproliferative disorders: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. *Haematologica* 2002; 87: 67-77.
- Paessler M, Kossev P, Tsai D, Raghunath P, Majewski M, Zhang Q, Ramalingam P, Schuster S, Tomaszewski J, Arber DA, Hsi E, Wasik MA. Expression of SHP-1 phosphatase indicates post-germinal center cell derivation of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest* 2002; 82: 1599-1606.
- Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K, Dalla-Favera R. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11816-11821.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RSK, Kuppers R, Dalla Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412: 341-346.
- Peng M, Lundgren E. Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* 1992; 7: 1775-1782.
- Peng HZ, Du MQ, Koulis A, et al. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood* 1999; 93:2167-2172
- Penn I, Hammon W, Brettschneider L, Starzl TE. Malignant lymphoma in transplantation patients. *Transplant Proc* 1969; 1: 106-112.
- Portis T, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol* 2003; 77: 105-114.
- 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.
- Raveh T, Drogue G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1-7.
- Roberts ML, Cooper NR. Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology* 1998; 240: 93-99.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194:1639-1647.
- Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E, Rickinson AB. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-

- cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 1994; 68: 5602-5612.
- Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutations of Ig genes. *Science* 1998; 280: 1750-1752.
- 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.
- Swinnen LJ. Transplantation-related lymphoproliferative disorder: a model for human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Semin Oncol* 2000; 27: 402-408.
- Tomkinson B, Robertson E, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1993; 67: 2014-2025.
- Wijdenes J, Voojjs WC, Clément C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; 94: 318-323.
- 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.
- Zeidler R, Eissner G, Meissner P, Uebel S, Tampe R, Lazis S, Hammerschmidt W. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 1997; 90: 2390-2397.