



Università degli Studi di Udine

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE

CICLO XXVIII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

L'ESPRESSIONE ABERRANTE DELLA PROTEINA CD200 NELLA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE: IMPATTO SULL'OUTCOME DEI PAZIENTI

Dottoranda:
Dott.ssa Alessia Meneghel

Tutor:
Ch.mo Prof. Renato Fanin

Coordinatore:
Ch.mo Prof. Giuseppe Damante

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Sommario

1.SINOPSI.....	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 Leucemie – generalità.....	3
2.2 La Leucemia Acuta Mieloide.....	4
2.2.1 Classificazione della Leucemia Acuta Mieloide.....	5
2.2.2 Eziopatogenesi	8
2.2.3 I fattori prognostici.....	12
2.2.4 La Clinica	15
2.2.5 La Diagnosi	16
2.2.6 La terapia.....	17
2.3 La Proteina CD200	19
2.3.1 L’interazione CD200R-CD200	21
2.3.2 Espressione del CD200 nelle cellule normali e tumorali.....	24
2.2.3 Il ruolo del CD200 nella risposta anti-tumorale.....	25
3.OBIETTIVI DELLO STUDIO	29
4.MATERIALI E METODI.....	30
4.1 Pazienti.....	30
4.2 Preparazione dei campioni	30
4.3 Analisi citofluorimetrica	31
4.4 Analisi statistica	35
4.5 Cariotipo	35
4.6 Valutazione delle mutazioni di FLT3 e NPM1	36

4.6.1 NPM1	36
4.6.2 Stato mutazionale di FLT3.....	36
5.RISULTATI.....	38
5.1 Espressione del CD200 e parametri clinici e biologici.....	38
5.2 Espressione di CD200, risposta alla terapia di induzione e sopravvivenza globale.....	40
5.3 Associazione tra CD200 e diverse classi di fattori prognostici in relazione all'andamento della malattia.....	44
6.DISCUSSIONE.....	50
7.BIBLIOGRAFIA	54

1.SINOPSI

La leucemia acuta mieloide (LAM) è un disordine clonale della cellule progenitrici emopoietiche delle linea mieloide (blasti), che perdono la loro capacità di differenziare e proliferare in maniera normale con conseguente incapacità di dare origine a cellule mature (Castoldi e Liso, 2007; Tura, 2003; Estey e Döhner, 2006). Le LAM sono caratterizzate da una prognosi severa, ma variabile in base alle caratteristiche cliniche, morfologiche, e fenotipiche della malattia. Assieme all'analisi cariotipica, che costituisce il più importante fattore prognostico, la diagnostica moderna si avvale dell'analisi di biologia molecolare e di quella fenotipica per definire il rischio della malattia. Studi recenti hanno analizzato nelle neoplasie ematologiche l'espressione dell'antigene CD200, un antigene riscontrabile sulle cellule di varie neoplasie, che attraverso l'interazione con il proprio recettore, il CD200R, sembra svolgere un'attività immunosoppressiva inducendo inibizione dei macrofagi, induzione dei linfociti T regolatori, "switching" del profilo citochinico da Th1a Th2, inibizione dell'immunità T cellulare tumore specifica, svolgendo, in definitiva, un ruolo chiave nei meccanismi di progressione tumorale (Siva et al., 2007; Wang et al., 2010; Coles et al., 2011). Nelle LAM, alcune recenti pubblicazioni hanno analizzato l'effetto dell'espressione di CD 200 sulle cellule leucemiche nei confronti del sistema immunitario documentando che nei casi in cui era espresso con elevata intensità era in grado di sopprimere l'attività dei linfociti NK e la loro risposta antitumore (Coles et al., 2011). L'iperespressione di CD200 nei pazienti affetti da LAM sembra aver effetto anche sui linfociti T, poiché è stato dimostrato che è in grado di indurre un aumento di linfociti T regolatori e di sopprimere la funzione dei linfociti T memoria (Whang et al., 2010). Sulla base di queste evidenze è stato ipotizzato che l'iperespressione del CD200 sia uno dei meccanismi utilizzato dalle cellule leucemiche per sfuggire al controllo del sistema immunitario. L'obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di analizzare l'incidenza dell'espressione dell'antigene CD200 nelle cellule leucemiche delle

LAM e valutarne l'eventuale ruolo prognostico associandolo a quello di altre molecole a carattere prognostico noto. Inoltre abbiamo voluto valutare l'eventuale impatto che può avere sull'esito dell'evoluzione della patologia. Lo studio ha riguardato 244 pazienti con una diagnosi di LAM all'esordio. L'antigene CD200 è risultato positivo su una percentuale variabile di cellule in 136/244 (56%) con una media di fluorescenza MFI di 11 (range 2-100). Al fine di stabilire se la presenza del CD200 nei blasti fosse in grado di identificare uno specifico sottogruppo di pazienti con determinate caratteristiche a significato prognostico è stata studiata la prevalenza dei casi CD200+ in relazione alle caratteristiche cliniche e biologiche. Non è emersa alcuna associazione con parametri clinico/biologici quali età, conta dei WBC all'esordio e i sottotipi FAB; l'espressione di CD200 è invece più frequente nei casi di LAM secondaria rispetto ai casi di LAM de novo. La presenza di questo antigene è significativamente associata all'espressione dell'antigene CD34 ed alla presenza di anomalie cromosomiche a significato prognostico favorevole, come anche ad anomalie cromosomiche a significato prognostico sfavorevole. È stato invece possibile documentare una correlazione inversa con la presenza dell'antigene CD56 con la presenza di mutazioni dei geni FLT3 e di NPM1. L'impatto negativo di CD200 è stato riscontrato anche sulla sopravvivenza globale dei pazienti con un cariotipo sfavorevole ($p=0.046$) e nei casi di LAM secondaria ($p=0,05$). Tra i casi CD56- ($p=0.04$) e i casi CD34- ($p=0.03$) l'alta intensità di espressione di CD200 peggiora la sopravvivenza globale dei pazienti e lo stesso vale per i casi con mutazioni a carico di NPM1 ($p=0.02$) e per i casi FLT3 ($p=0.034$). I nostri dati perciò non solo consentono di stabilire e confermare in generale il ruolo prognostico negativo dell'espressione aberrante di CD200 ma soprattutto consentono di concludere che l'analisi dell'espressione di CD200 permette di ridefinire in modo più preciso l'andamento della malattia in categorie di pazienti normalmente considerati a basso rischio e che CD200 rappresenta un fattore prognostico ulteriormente negativo in pazienti già caratterizzati da alcuni fattori biologici non favorevoli.

2. INTRODUZIONE

2.1 Leucemie – generalità

Il termine leucemia significa letteralmente “sangue bianco” (dal greco leukos λευκός, "bianco" e aima αίμα, "sangue"). Questa dizione nacque dall'osservazione del sangue prelevato ad un paziente che aveva una elevata concentrazione di globuli bianchi al punto che lo strato di queste cellule, solitamente quasi impercettibile, uguagliava quello dei globuli rossi (Tura, 2007).

Quando si parla di leucemie si fa riferimento d un gruppo di patologie neoplastiche monoclonali del sistema emopoietico originatesi da una singola cellula staminale pluripotente o multipotente mutata. La trasformazione neoplastica altera i meccanismi di proliferazione e di differenziazione della cellula staminale. Ne consegue una mancata maturazione della sua progenie e una proliferazione autonoma, da cui deriva l'accumulo di elementi immaturi definiti blasti, principalmente nel midollo osseo, nel sangue periferico e, talvolta in altri organi e tessuti. Vi e dunque una immissione in circolo di cellule mature o immature, appartenenti alla linea mieloide, linfoide ed entrambe (Tura, 2007, Castoldi e Liso, 2007).

Quando le cellule neoplastiche hanno caratteristiche fenotipiche (morfologiche, immunologiche e molecolari) linfoidi si parla di leucemie linfoidi o sindromi linfoproliferative. Quando le cellule neoplastiche hanno caratteristiche fenotipiche mieloidi si parla di leucemie mieloidi.

A loro volta le leucemie si distinguono in acute e croniche. Le acute si caratterizzano per l'infiltrazione dei tessuti emopoietici ed extraemopoietici da parte di linee cellulari monomorfe, senza chiaro orientamento maturativo, ad esordio improvviso e con decorso aggressivo, invasione del midollo osseo (dolori ossei, sindrome anemica, infettiva, emorragica). Le forme croniche hanno un decorso lento e si caratterizzano per la proliferazione di cellule più differenziate, molto simili ai normali costituenti.

2.2 La Leucemia Acuta Mieloide

La leucemia acuta mieloide (LAM) è un disordine clonale della cellule progenitrici emopoietiche delle linea mieloide (blasti), che perdono la loro capacità di differenziare e proliferare in maniera normale con conseguente incapacità di dare origine a cellule mature come granulociti, monociti, piastrine ed eritrociti. I blasti conservano alcune caratteristiche morfologiche, citochimiche e immunofenotipiche normalmente espresse dai precursori della linea mieloide, e ciò permette nella maggioranza dei casi di individuare la linea mielopoietica di appartenenza del clone leucemico, potendo quindi stabilire se la patologia produca una popolazione di tipo mieloblastica, monoblastica, eritroblastica o megacarioblastica (Castoldi e Liso, 2007; Tura, 2007; Estey e Döhner, 2006).

Le cellule leucemiche si accumulano nel midollo osseo determinando un'alterazione o una soppressione della differenziazione e proliferazione delle normali cellule emopoietiche, successivamente i blasti invadono il sangue periferico infiltrando i diversi organi.

La LAM è una forma di leucemia che rappresenta il 75% di tutte le leucemie acute, e la sua incidenza è stimata attorno ai 3,5 casi per 100000 abitanti per anno. Si può presentare a qualsiasi età anche se interessa prevalentemente gli adulti con un'età mediana alla diagnosi stimata circa attorno ai 68 anni. Costituisce infatti la quasi totalità delle leucemie acute dell'anziano (Castoldi e Liso, 2007; Estey e Döhner, 2006). Il tasso di mortalità è strettamente correlato all'età, con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 50% dei bambini, e del 20% circa degli adulti con meno di 60 anni, e meno del 5% di quelli con età maggiore di 60 anni. La distribuzione nelle diverse aree geografiche e nelle differenti popolazioni risulta essere dipendente, oltre che da fattori genetici, anche da fattori ambientali. L'esposizione professionale o iatrogena a diversi agenti chimici (derivati dal petrolio, pesticidi, solventi, farmaci citotossici) e alle radiazioni ionizzanti, sono tra i fattori più importanti in grado di aumentare significativamente il rischio di leucemia, anche se, a tutt'oggi per la maggior parte di

queste patologie, le cause e i meccanismi di leucemogenesi restano ancora non completamente chiariti.

Le leucemie acute sono definite (Castoldi e Liso, 2007; Tura, 2007):

- De novo: quando insorgono come prima malattia in pazienti senza importanti precedenti anamnestici e si caratterizzano per una prognosi migliore rispetto alle LAM secondarie;
- Secondarie ad esposizione nota ad agenti leucemogeni: quando insorgono in pazienti con pregressa esposizione a sostanze chimiche (pesticidi), farmaci o radiazioni e/o come complicanza tardiva di trattamento con chemioterapia e/o radioterapia per altra neoplasia
- Secondaria a una precedente sindrome mielodisplastica, la secondarietà della malattia è indice di prognosi negativa

2.2.1 Classificazione della Leucemia Acuta Mieloide

Nel tempo le leucemie sono state classificate in diversi modi, tuttavia le due classificazioni che vengono più comunemente utilizzate sono le seguenti:

- FAB (French-American-British) (Bennet et al.,1991)
- WHO (World Health Organization) (Swerdlow et al., 2008; Vardiman et al., 2009)

I criteri ad oggi utilizzati per la classificazione delle LAM sono (Castoldi e Liso, 2007):

- Criteri morfologici: colorazioni panottiche di strisci di sangue periferico e di midollo osseo;
- Criteri citochimici: evidenza di attività enzimatiche e/o presenza di particolari sostanze ritenute specifiche per alcuni tipi cellulari;
- Criteri immunofenotipici: evidenza di markers di superficie e/o citoplasmatici più o meno specifici per un lineage e/o per alcuni stadi di differenziazione cellulare mediante impiego di anticorpi monoclonali;

- Criteri citogenetici e/o molecolari: dimostrazione di alcune anomalie citogenetiche e/o molecolari.

Secondo lo schema FAB le LAM vengono classificate secondo criteri morfologici, citochimici e immunofenotipici (Tabella1, Figura 1).

Tabella1- *Classificazione FAB delle LAM*

Tipo FAB	Nome comune	Criteri per la diagnosi	Isto-chimica	Note
M0	LA indifferenziata			Cellule senza maturazione citologica, con antigeni mieloidi (CD13, 33) e mieloperossidasi negative.
M1	LA mieloblastica senza maturazione	Blasti >90% cellule non-eritroidi, 10% di cellule in maturazione a granulociti o monociti.	MP+	Facilmente confusa con M7 o L2 su base morfologica
M2	LA mieloblastica con maturazione	Blasti 30-89% cell. non-eritroidi, >10% granulociti in maturazione, <20% cellule monocitiche.	MP+	La popolazione cellulare è costituita prevalentemente da blasti e promielociti immaturi
M3	LA Promielocitica (variante ipergranulare)	<20% promielociti ipergranulari anormali. Corpi di Auer presenti.	MP+	Associata a CID (coagulazione intravascolare disseminata).
M3v	LA Promielocitica (variante microgranul.)	Promielociti con piccoli granuli citoplasmatici.	MP+	Vedi sopra.
M4	LA mielo-monocitica	Blasti >30% cellule non-eritroidi, >20 ma <80% di cellule sono del lineage monocitico.	MP+ NSE+	Richiede la valutazione sia del sangue periferico sia del midollo osseo.
M4Eo	LA mielo-monocitica con eosinofilia	Eosinofili anormali con grandi granuli basofili e nucleo monolobato. Positivi alla cloroacetatoesterasi.	MP+ NSE+ Eos-PAS+	Negli eosinofili normali tali reazioni sono negative.
M5	LA monocitica poco (M5a) o ben (M5b) differenziata.	>80% cellule non-eritroidi sono monoblasti, promonociti, o monociti. M5a >80% delle cellule monocitiche sono monoblasti. M5b <80% delle cellule monocitiche sono monoblasti.	NSE+	È necessaria la conferma della diagnosi mediante la reazione esterasica inibita dai fluoruri (NaF).
M6	Eritroleucemia (spesso evolve a M1, M2 o M4)	>30% cellule non-eritroidi sono blasti, ma >50% delle cellule del midollo sono eritroblasti.	Eritroblasti PAS+	Iperplasia eritroide megaloblastoide; eritroblasti bizzarri multinucleati.
M7	LA megacariocitica	>30% cellule non-eritroidi sono megacarioblasti. Mielofibrosi.	piastrine perox +	La diagnosi è confermata dalla reazione perossidasiica piastrinica con la microscopia elettronica o con anticorpi monoclonali anti-glicoproteine piastriniche.

Note: MP: mieloperossidasi; NSE: esterasi non specifica; PAS: Periodic acid-Schiff. Corpi di Auer: derivano dalla condensazione anomala di granuli citoplasmatici; la loro presenza nelle cellule immature consente di distinguere la LAM dalle Leucemie Acute Linfoidi (LAL), mentre la loro assenza non ha valore diagnostico.

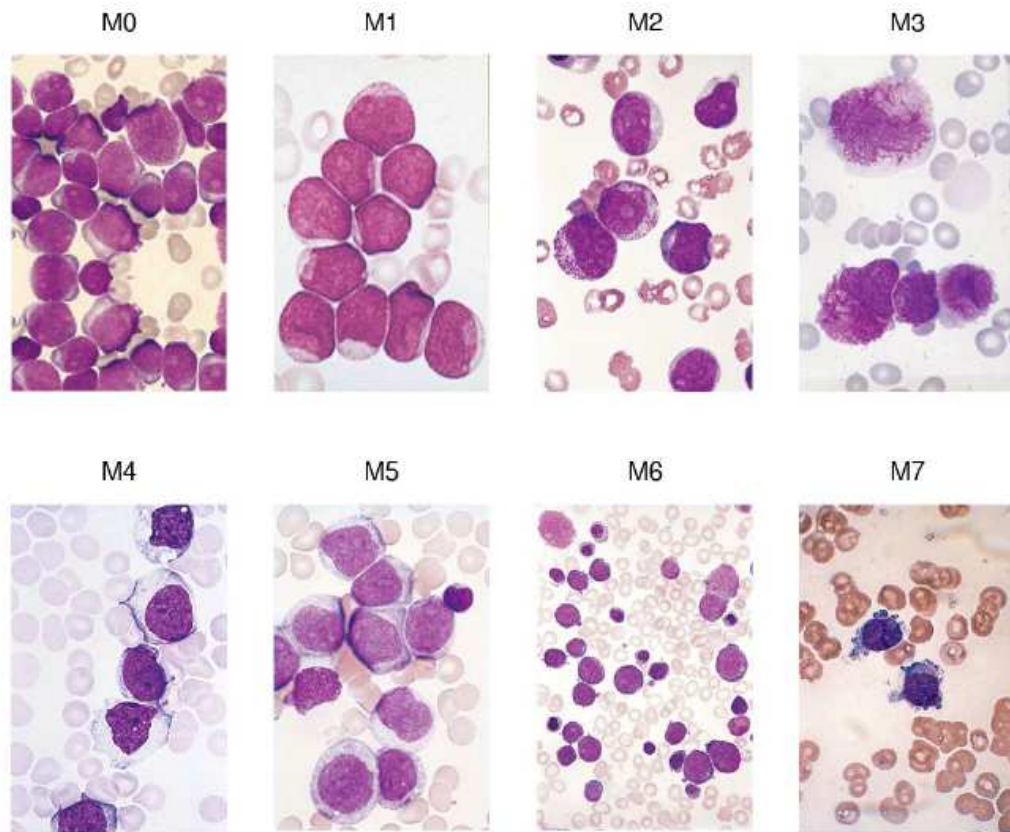


Figura 1 - Citotipi di LAM secondo la classificazione FAB

Attualmente viene utilizzata la classificazione pubblicata nel 2001 e ulteriormente revisionata nel 2008 da parte della WHO (World Health Organization) che implementa la pregressa valutazione morfologica con i nuovi aspetti citogenetici/molecolari classificando le LAM come segue: (Swerdlow et al., 2008; Castoldi e Liso, 2007; Estey e Döhner, 2006; Vardiman et al., 2009):

- **LAM con ricorrenti anomalie genetiche**

- t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
- t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
- t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
- t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
- inv(3)(q21q26.2)

- t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
(leucemia acuta megacarioblastica)
- LAM con mutazione di NPM1 (provvisoria)
- LAM con mutazione di CEBPA (provvisoria);
- **LAM secondarie a sindromi mielodisplastiche;**
- **LAM secondarie a chemioterapia/radioterapia;**
- **LAM non altrimenti specificata (NOS)**
 - senza maturazione (FAB-M0)
 - con minima maturazione mieloide (FAB-M1)
 - con maturazione mieloide (FAB-M2)
 - mielo-monocitica (FAB-M4 e M4Eo)
 - monoblastica/monocitica (FAB-M5a e M5b)
 - eritroleucemia e leucemia eritroide acuta pura (FAB-M6)
 - megacarioblastica (FAB-M7)
 - leucemia acuta basofila
 - panmielosi acuta con mielofibrosi
- **Sarcoma mieloide**
- **LAM associata a Sindrome di Down**
- **Leucemie acute di “lineage” ambiguo**

2.2.2 Eziopatogenesi

Le cause dello sviluppo delle LAM non sono ancora note: è probabile che per lo sviluppo di una leucemia acuta sia necessario il concorso di vari fattori.

In assenza di una chiara eziopatogenesi, l'insorgenza delle LAM è stata associata a numerosi fattori di rischio, in particolare all'esposizione a radiazioni ionizzanti e ad agenti chimici che danneggiano il DNA. In realtà, una storia chiara di contatto con una riconosciuta sostanza cancerogena è inusuale nei pazienti con LAM (Deschler e Lubbert , 2006). Al contrario, due forme distinte di LAM sono state descritte dopo

esposizione a chemioterapici. I pazienti esposti ad agenti che bloccano le topoisomerasi II, come le antracicline e le epipodofillotossine, sviluppano in genere una malattia rapidamente proliferativa spesso a carico della serie monocitaria e con alterazioni citogenetiche che coinvolgono il gene MLL al cromosoma 11q23, con intervallo di tempo che varia da alcuni mesi ad 1-2 anni dal trattamento con questi agenti (Deschler e Lubbert, 2006).

Più comune è il sottotipo che insorge dopo trattamento con agenti alchilanti e/o radioterapia, la cui incidenza ha un picco 5-6-anni dopo l'esposizione ed è caratterizzato da precessione mielodisplastica con cariotipo complesso e delezione di tutto o parte dei cromosomi 5 e 7 (Godley e Larson, 2008). E' da rilevare che queste stesse alterazioni e un simile andamento clinico si osservano più spesso nei pazienti anziani, probabilmente in seguito ad ancora non quantificabili ripetute esposizioni a cancerogeni inquinanti che contribuiscono allo sviluppo di LAM in età avanzata. In età pediatrica, disordini genetici costituzionali sono importanti fattori di rischio associati allo sviluppo di LAM.

I bambini affetti da sindrome di Down hanno un rischio 10-20 volte superiore di sviluppare una leucemia acuta. Altre malattie ereditarie associate alla LAM includono la sindrome di Klinefelter, la sindrome di Li-Fraumeni, l'anemia di Fanconi e la neurofibromatosi multipla (Deschler e Lubbert, 2006).

A livello molecolare la malattia può originare da un'alterazione genetica che interviene in una singola cellula del midollo osseo. Da tale singola cellula, attraverso divisioni mitotiche, provengono generazioni successive di cellule, espressione di una proliferazione clonale (Castoldi e Liso, 2007).

Usando vari modelli in vitro e preclinici è stato dimostrato che una serie di mutazioni multistep sono necessarie per generare una LAM (Figura 2), con evidenze che suggeriscono che per la leucemogenesi sono necessarie mutazioni attivanti geni di classe I che attivano il meccanismo di trasduzione del segnale e inducono la proliferazione cellulare in cooperazione con mutazione di geni di classe II, che alterano fattori di trascrizione e compromettono la normale differenziazione

(Welch et al., 2012; Marcucci et al., 2011). Mutazioni che portano all'attivazione di recettori di tirosina chinasi quali FLT3, c-kit e al meccanismo di signaling di RAS fanno parte di mutazioni di classe I, mentre RUNX1/ETO, CBFbeta/MYH11 e PML/RAR alpha, che sono trascritti ibridi di fusione generati da ben note anomalie cromosomiche ricorrenti quali t(8;21), inv(16) e t(15;17) rispettivamente, rappresentano esempi di mutazione di classe II (Gilliland et al, 2004). Anche mutazioni dei fattori di trascrizione RUNX1, C/EBP alpha e MLL ricadono in questo gruppo. Una terza classe di geni che codificano modificatori epigenetici, che include DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, ASXL1 e EZH2, sembra a sua volta giocare un ruolo preminente nella patogenesi della LAM, sebbene il meccanismo con cui queste aberrazioni contribuiscono al fenotipo leucemico è scarsamente conosciuto. E' da notare che diverse di queste anomalie sono associate a prognosi peggiore e sono maggiormente frequenti nei pazienti più anziani (Shen et al, 2011). Mentre molte mutazioni che contribuiscono alla patogenesi della LAM sono ancora non definite e la relazione tra meccanismo di mutazione e fenotipo epigenetico è tutt'altro che chiara, è stato di recente dimostrato che in quasi tutti i tipi di LAM esiste almeno una mutazione potenzialmente driver e che un complesso network di eventi genetici contribuisce alla patogenesi della malattia nel singolo paziente. Il genoma della LAM ha meno mutazioni di quello di molti altri tumori dell'adulto, con una media di solo 13 mutazioni e 5 mutazioni per gene. Modelli di cooperazione e mutua esclusività suggeriscono una forte relazione biologica tra disregolazione di specifici geni e distinte categorie di LAM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

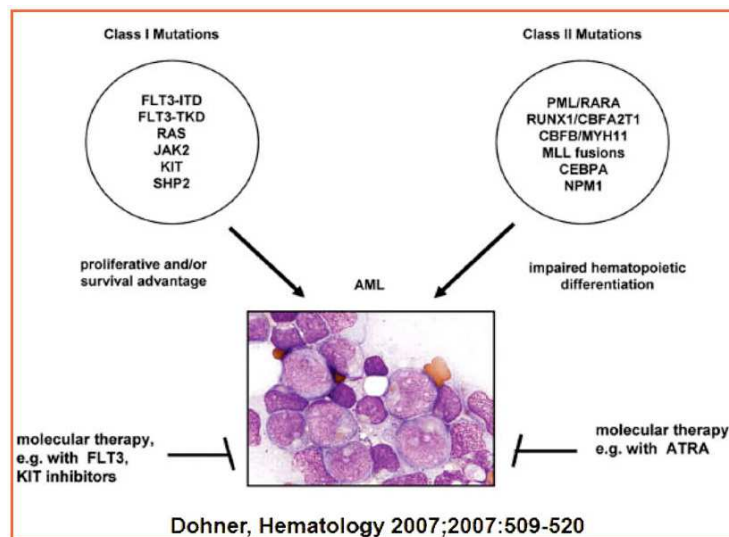


Figura 2: Modello di leucemogenesi “two hits”, basato sulla cooperazione di due differenti classi di mutazioni

È noto che la LAM è sia dal punto di vista clinico che bio-molecolare una malattia molto eterogenea con esordio e outcome clinico differente nei vari sottotipi morfologici e citogenetici. Recenti analisi molecolari hanno ampliato le capacità di comprendere questa eterogeneità con potenziale applicazione verso nuove possibilità terapeutiche. E' interessante che sebbene molti blasti leucemici nel singolo paziente mostrino simili aspetti morfologici, solo lo 0,5 % circa di queste cellule con un fenotipo immaturo CD34+/CD38- hanno la capacità di formare colonie in vitro e generare leucemia in topi con immunodeficienza. Queste cellule, definite clonogeniche, mostrano molti aspetti comuni alle normali cellule staminali ematopoietiche, inclusa la presenza di meccanismi di resistenza a una varietà di farmaci citotossici (Hoang et al, 2012; Pandolfi et al, 2013). Di recente, sulla base di sofisticate analisi molecolari, è stato dimostrato che alla diagnosi sono presenti multipli sottocloni con differenti patterns di anomalie molecolari, con la successiva eventuale espansione, sotto la spinta selettiva di cicli di trattamento chemioterapico, di differenti subcloni (Walter et al, 2012; Ding et al, 2012). La eterogeneità delle cellule leucemiche di un singolo paziente ha ovvie implicazioni sull'uso e lo sviluppo di terapie “targeted” verso i prodotti di queste mutazioni genetiche; inoltre

l'eterogeneità delle cellule staminali leucemiche può anche vanificare l'efficacia di specifici anticorpi e agenti farmacologici.

2.2.3 I fattori prognostici

Le LAM sono caratterizzate da una prognosi severa, ma variabile in base alle caratteristiche cliniche, morfologiche, e fenotipiche della malattia. Non vi è al momento possibile stabilire criteri prognostici assoluti, numerosi e continui sono infatti i tentativi di formulare valide correlazioni tra la risposta alla terapia e i reperti clinici, morfologici, citogenetici. L'identificazione di entità cliniche e prognostiche differenti dovrebbe essere il presupposto perché vi possa essere in futuro un trattamento specifico per ogni tipo di leucemia. Nella Tabella 2 sono riportati alcuni fattori prognostici frequentemente considerati validi nelle LAM (Castoldi e Liso, 2007). Tra i fattori biologici quello che rappresenta il più importante e indipendente fattore prognostico è sicuramente il cariotipo dei blasti leucemici, infatti è possibile identificare tre gruppi di rischio: favorevole, sfavorevole e intermedio, in rapporto alla presenza e al tipo di anomalia cariotipica (Tabella 3) (Castoldi e Liso, 2007). L'andamento della malattia nei casi con cariotipo normale, che costituiscono circa il 50% dei casi, è molto eterogeneo, pertanto è estremamente importante identificare marcatori prognostici che predicano l'outcome in modo più preciso per permettere di avviare il paziente all'approccio terapeutico più adatto al rischio (Damiani et al., 2007; Castoldi e Liso, 2007).

Tabella 2: *Fattori prognostici nelle LAM (Castoldi e Liso. 2007)*

	Favorevole	Sfavorevole
Clinica		
Età	< 45 anni	> 60 anni
Insorgenza	<i>De novo</i>	Dopo mielodisplasia, dopo chemioterapie, malattie ematologiche precedenti
Leucocitosi	< 25 x 10 ⁹ /l	> 100 x 10 ⁹ /l
Interess. SNC	Assente	Presente
Morfologia		
Corpi di Auer	Presenti	Assenti
Eosinofili	Presenti	Assenti
Citotipo FAB	M3, M4Eo	M0, M5, M6, M7
Displasia	Assente	Presente
Fibrosi	Assente	Presente
Fenotipo		
	Ridotta positività per il CD13, CD14, CD34	Elevata positività per il CD13, CD14, CD34, fenotipo MDR, CD7
Citogenetica		
	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13;q22)	-5, -7 5q-, 7q-
	t(15;17) Cariotipo normale	11q- +8 Anomalie 11q23 Anomalie 3q21 Anomalie 3q26

Tabella 3: *Gruppi di rischio in relazione alla valutazione citogenetica (Castoldi e Liso. 2007)*

Favorevole	Intermedio	Sfavorevole
t(8;21)	Normale	del(5q)/-5
inv16	+8	del(7q)/-7
del(16q)	+6	t(9;22)
t(15, 17)	11q23	3q, 9q, 11q, 20q, 21q, 17p
	+21	t(6;9)
	+22	Cariotipo complesso (≥3 anomalie non correlate)
	del(12p)	
	-Y	

La biologia molecolare ad oggi è un importante strumento per la stratificazione prognostica delle LAM a cariotipo normale. Le mutazioni o l'iperespressione di specifici geni tra i quali: FLT3, CEBP α , BAALC, MN1, NPM1, ERG (Gregory et al., 2009) sono altri fattori prognostici di LAM, non associati a specifiche alterazioni del cariotipo. Tra questi ormai è noto il ruolo delle mutazioni del gene FLT3 (FMS-like tyrosine 3), codificante per un recettore che stimola la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione di cellule emopoietiche progenitrici primitive (Gilliland e Griffin, 2002). Le mutazioni attivanti il gene FLT3, comprese le mutazioni puntiformi all'interno del dominio tirosin-kinasi e le duplicazioni ITD (internal tandem duplication), sembrano favorire la proliferazione dei blasti dando un significato prognostico negativo alla loro presenza (Castoldi e Liso, 2007; Gilliland e Griffin, 2002). Al contrario, nei casi con cariotipo normale, hanno significato prognostico positivo le mutazioni a carico del gene della nucleofosmina (NPM1), una proteina di trasporto nucleo-citoplasma coinvolta in numerosi processi tra cui la riparazione del DNA e la duplicazione del centrosoma nella mitosi (Chen et al., 2006). Nelle LAM si rinvencono circa nel 35% dei casi e tale percentuale sale a 50-60% in quelle a cariotipo normale. Solitamente sono mutazioni eterozigoti che coinvolgono l'esone 12 causando la perdita del segnale di localizzazione nucleolare, con accumulo della proteina nel citoplasma (Fallini et al., 2005; Fallini et al., 2007). Nel corso degli anni lo studio sistematico dell'assetto antigenico della cellula leucemica ha portato ad identificare vari antigeni tra i quali CD56 e CD34 la cui espressione sulla cellula leucemica sarebbe in grado di influenzare l'andamento della malattia in senso negativo (Murray et al., 1999; Raspadori et al., 2002; Myint et al., 1992). E' stato dimostrato che la presenza dell'antigene CD56 a livello delle cellule blastiche è un fattore prognostico negativo per quel che riguarda il raggiungimento e la durata della remissione completa (Murray et al., 1999; Raspadori et al., 2002). Esattamente come il CD34 e il CD56, anche all'iperespressione della proteina CD200 sulle cellule neoplastiche è stata data una

valenza con significato prognostico negativo, influenzando quella che è la patogenesi e la progressione tumorale (Tonks et al., 2007; Moreaux et al., 2008). Della proteina CD200 parleremo in maniera più approfondita nei paragrafi seguenti. Bisogna tenere presente che nelle malattie ematologiche molti pazienti sono refrattari alla terapia poiché sviluppano una resistenza verso i farmaci antitumorali impiegati, definita “Multidrug Resistace”, che è la maggior causa del fallimento del trattamento delle LAM. Uno dei maggiori meccanismi di resistenza, è il rapido efflusso dei farmaci dalla cellula, mediato da vari membri di una superfamiglia di proteine trasportatrici di membrana (ATP-binding cassette) (Funato et al., 2004). E’ quindi molto importante valutare l’eventuale iperespressione di queste proteine come ad esempio la proteina PGP (Glicoproteina-P), presente sulla membrana plasmatica e avente la funzione di trasportare all’esterno della cellula gli xenobiotici. La sua iperespressione conferisce alla cellula la capacità di essere resistente a vari farmaci antitumorali come antracicline, mitoxantrone, alcaloidi della vinca, determinando quindi un’influenza negativa sull’outcome del paziente (Damiani et al., 1998; Zöchbauer et al., 1994; Raspadori et al., 2002).

2.2.4 La Clinica

La clinica è caratterizzata dalla presenza di sintomi e segni che sono una conseguenza dell’insufficienza midollare. I blasti, accumulandosi in maniera abnorme nel midollo osseo, determinano un’alterazione o una soppressione della differenziazione e proliferazione delle normali cellule emopoietiche e quindi una mancata produzione di cellule ematiche mature: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine (Castoldi e Liso, 2007).

I sintomi quindi sono strettamente connessi al coinvolgimento delle diverse linee cellulari (eritrociti, granulociti e piastrine). L’ incapacità di produrre eritrociti si manifesta con i sintomi tipici dell’anemia: pallore, astenia, affaticabilità fino ad arrivare alla dispnea. La febbre e le infezioni di organi e apparati, compresa la setticemia, sono da mettersi in relazione con la compromessa produzione dei

granulociti (neutropenia), mentre le manifestazioni emorragiche sono principalmente dovute alla insufficiente produzione di piastrine (trombocitopenia). Per quanto riguarda i sintomi secondari all'interessamento di organi, possono comparire: epatomegalia, splenomegalia, insufficienza renale da infiltrazione di blasti, più raramente si riscontra un interessamento cutaneo e del sistema nervoso centrale. Il quadro clinico può essere completato da sintomi sistemici quali febbre, dolori muscolari, calo ponderale e sudorazioni profuse, legate alla liberazione di citochine da parte dei blasti (Castoldi e Liso, 2007).

2.2.5 La Diagnosi

La diagnosi di leucemia acuta mieloide si basa sul riscontro di cellule blastiche nel midollo osseo e nel periferico. Dal punto di vista laboratoristico l'emocromo evidenzia abitualmente un'anemia, quasi sempre normocitica e normocromica; la conta reticolocitaria è in genere compresa tra lo 0,5 e il 2% con un numero di reticolociti estremamente basso. Il numero di globuli bianchi nel sangue periferico può essere diminuito, normale o aumenta fino a $100-200 \times 10^9 / l$ o più; il numero assoluto dei granulociti neutrofili al momento della diagnosi è in genere estremamente ridotto (al di sotto di $1 \times 10^9/l$). La trombocitopenia è di solito marcata nella maggior parte dei casi. L'esame dello striscio di sangue periferico al microscopio ottico consente di evidenziare la presenza dei blasti circolanti (Castoldi e Liso, 2007).

L'esame del midollo osseo con relativo mielogramma, è indispensabile per valutare la percentuale delle varie cellule. Per effettuare la diagnosi di leucemia acuta è necessaria la presenza nel midollo osseo di almeno il 30% di cellule blastiche secondo la classificazione FAB, e del 20% secondo la classificazione WHO, presentanti caratteristiche morfologiche di tipo mieloide (riscontro di granulazioni citoplasmatiche). Nelle LAM la cellularità del midollo è quasi sempre aumentata con infiltrazione di grado variabile del tessuto emopoietico da parte delle cellule blastiche; la base per la diagnosi è costituita dal riconoscimento di caratteristiche

fenotipiche mieloidi nei blasti leucemici. La diagnosi differenziale con una leucemia acuta linfoide viene eseguita nel 90% dei casi su base morfologica (Tura, 2007; Castoldi e Liso, 2007), grazie ad una somma di criteri cui fa capo la presenza di granulazioni citoplasmatiche, presenti nelle LAM ed assenti nelle LAL. Un importante contributo alla definizione diagnostica viene dalla caratterizzazione immunofenotipica delle cellule neoplastiche mediante la citofluorimetria multiparametrica. Questa tecnica permette di evidenziare simultaneamente diversi antigeni espressi sulla superficie o nel citoplasma della cellula leucemica ed è utile per il successivo monitoraggio della malattia minima residua. Assieme all'analisi immunofenotipica, la diagnostica moderna si avvale dell'analisi citogenetica e di biologia molecolare effettuate su midollo per definire il rischio della malattia e la prognosi (Castoldi e Liso, 2007).

2.2.6 La terapia

La terapia si basa principalmente sulla chemioterapia citotossica e sul possibile trapianto di midollo osseo dopo chemioterapia. Lo scopo della terapia citotossica è quello di ridurre e, possibilmente, eradicare la popolazione blastica consentendo alle cellule staminali emopoietiche residue di ripopolare il midollo, ottenendo una remissione completa (RC). Si definisce la RC come la normalizzazione del quadro ematologico periferico ed una quota di cellule blastiche midollari inferiore al 5% nell'aspirato midollare (Talman, 2005; Castoldi e Liso, 2007).

Le fasi peculiari della terapia possono essere schematizzate in una prima fase di induzione della remissione, e successivamente in una terapia post remissionale che comprende il consolidamento, il mantenimento ed eventuale intensificazione (Castoldi e Liso, 2007):

- *Induzione*: trattamento con schemi terapeutici per indurre la RC. Ha lo scopo di provocare un effetto citotossico su quasi tutte le cellule leucemiche per la formazione di un midollo osseo normale;

- *Consolidamento*: trattamento con farmaci simili e non cross-resistenti a quelli utilizzati nel periodo di induzione. Lo scopo è quello di eliminare le cellule leucemiche residue;
- *Mantenimento*: uso continuo di farmaci citostatici a dosi meno elevate e meno mielosoppressive per impedire l'insorgenza e/o la crescita di cellule neoplastiche;
- *Intensificazione*: impiego di farmaci a dosi più elevate di quelle adoperate durante l'induzione, dopo un certo periodo dalla RC, per eradicare lo sviluppo di un eventuale clone leucemico sviluppatosi e non ancora rilevabile durante il follow-up.

La possibilità di “guarigione” di una LAM con la chemioterapia è stimata attorno al 10-25% e dipende da una serie di fattori tra cui il più importante è l'età. Al di sotto dei 45 anni, ai pazienti in prima o seconda remissione, viene effettuato il trapianto allogenico con cellule staminali emopoietiche (CSE) con lo scopo di sostituire completamente il patrimonio staminale del paziente con cellule ottenute da un idoneo donatore sano, familiare o da registro, HLA (Human Leukocytes Antigens) compatibile (Castoldi e Liso, 2007; Stone et al., 2004). Nei pazienti in cui non si dispone di un donatore compatibile si tenta di effettuare il trapianto di CSE autologhe. Quando il paziente è in RC, le CSE prelevate dallo stesso vengono reinfuse dopo un trattamento chemioterapico intensivo. Il trapianto con CSE allogeniche sembra attualmente superiore alla chemioterapia per quanto riguarda l'insorgenza delle recidive. La guarigione post trapianto però non è del 100%, ma è stimata attorno al 45-60% a causa della morbilità e della mortalità per infezioni e per la malattia trapianto contro ospite (GvHD) (Castoldi e Liso, 2007).

2.3 La Proteina CD200

La proteina CD200 viene codificata dal gene CD200 (OX-2) lungo 29744 bp, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q13.2). Si possono distinguere tre isoforme di trascritti da esso derivanti:

- mRNA variante 1 (isoforma a): trascritto predominante lungo 2226 bp contenente 7 esoni;
- mRNA variante 2 (isoforma b): lungo 2301 bp contenente 7 esoni;
- mRNA variante 3 (isoforma c): lungo 2085 bp, mancante di un esone nella regione codificante, ciò si traduce in un frameshift e un codone di stop prematuro rispetto la variante 1.

(www.genecards.org ; <http://atlasgeneticsoncology.org>)

CD200 è una glicoproteina transmembrana appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF) di tipo1. Geni codificanti proteine di membrana con domini immunoglobulinici sono particolarmente numerosi nei genomi di tutti i mammiferi. I membri della IgSF codificati dal genoma umano sono moltissimi, frequentemente mediano interazioni cellula-cellula e la maggior parte gioca un ruolo critico nella regolazione delle risposte immunitarie sia innate che adattative; circa un terzo delle proteine di membrana delle cellule del sistema immunitario contiene domini immunoglobulinici, in numero variabile da uno a diciassette, e circa la metà di queste possiede solo due di questi domini ed è strutturalmente simile all'OX2 (Barclay, 2003). La proteina CD200 presenta due domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare, uno variabile (V) ed uno costante (C2), una sequenza idrofobica transmembrana ed una piccola coda citoplasmatica di soli 19 residui incapace di trasdurre un segnale (Clark et al., 1985). Ciascun dominio immunoglobulinico ha una struttura tridimensionale predetta a barile β , costituito da due foglietti β affacciati formati da nove filamenti β antiparalleli (A, B, C, C', C'', D, E, F e G) (Prota et al., 2003). Il profilo d'espressione della proteina CD200 risulta

molto conservato fra specie diverse, essendo praticamente identico nel topo, nel ratto e nell'uomo.

La proteina OX-2 del ratto è stata per la prima volta purificata e caratterizzata nel 1982 come una glicoproteina di membrana di circa 41- 47KDa (Barclay e Ward, 1982), negli anni successivi è stato scoperto che veniva espressa da una grande varietà di tipi cellulari del ratto: timociti, cellule B, cellule T attivate, cellule dendritiche, cellule endoteliali e nei neuroni del sistema nervoso centrale (Barclay e Ward, 1982; Webb et al., 1984; Bukovsky et al., 1984). Questa distribuzione è stata riscontrata e confermata nell'uomo conferendo alla proteina una notevole importanza biologica e funzionale, essendo assente in molti altri tipi cellulari, questo indicava che non era il prodotto di un gene housekeeping (Barclay, 1981; Wright et al., 2001).

CD200 è in grado di interagire con il recettore CD200R che inizialmente è stato descritto come un recettore esclusivo delle cellule mieloidi (monociti-macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, basofili-mastociti ed eosinofili), che sono le cellule effettrici delle risposte infiammatorie ed immunitarie, successivamente è stato descritto anche sulle cellule T, B e NK (Figura 3B) (Wright et al., 2001; Wright G. et al., 2003). Il CD200R è una glicoproteina di 348 aminoacidi appartenente all'IgSF ed è intimamente correlata all'OX2 dal punto di vista strutturale; anch'essa presenta due domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare (V e C2) ma in più possiede un dominio citoplasmatico di 67 aminoacidi contenente tre residui di tirosina fosforilabili (Y286, Y289 e T297), uno dei quali (Y297) si trova all'interno di un motivo conservato NPxY che è potenzialmente implicato in interazioni proteina proteina e nella trasduzione del segnale (Vieites et al., 2003). Il gene codificante il CD200R mappa sul cromosoma 3 in prossimità del gene del CD200, suggerendo che entrambi si siano evoluti a partire da un gene ancestrale attraverso fenomeni di duplicazione genica (Wright et al., 2003). L'interazione fra le due proteine è molto debole ed è caratterizzata da una rapida cinetica di dissociazione ($KD = 0.5 \mu M$). Studi di mutagenesi hanno dimostrato che il legame CD200-

CD200R coinvolge i domini immunoglobulinici V delle due glicoproteine ed, in particolare, le mutazioni del recettore che ne compromettono la capacità di legare la proteina CD200 mappano nei filamenti C ed F del foglietto β GFCC'; questo tipo di interazione proteina-proteina è molto comune nell'ambito dell'IgSF (Preston et al., 1997; Hatherley et al., 2004).

2.3.1 L'interazione CD200R-CD200

Attraverso il legame al CD200R, la proteina CD200 trasduce un segnale inibitorio nelle cellule mieloidi, soprattutto nei monociti-macrofagi e nei basofili-mastociti (Hoek et al., 2000; Zhang et al., 2004). Le prime conoscenze sulla funzione di questa interazione derivano da modelli murini che sono stati ingegnerizzati per non esprimere il gene dell'OX2; in questi topi si osserva un massiccio aumento nel numero e nello stato d'attivazione dei macrofagi in diversi tessuti ed un notevole incremento della suscettibilità verso patologie autoimmuni a livello del sistema nervoso centrale e delle articolazioni (Hoek et al., 2000). Questo fenotipo immunoattivatorio può essere facilmente contrastato dalla somministrazione di una forma solubile dell'OX2 (Gorczyński et al., 2001). L'ampio spettro d'espressione dell'OX2 *in vivo* ed i cambiamenti nei suoi livelli di produzione suggeriscono che essa svolga un ruolo fondamentale nel controllare localmente l'attivazione delle cellule mieloidi in diversi distretti dell'organismo, specialmente nei tessuti infiammati; in tal modo l'OX2 previene il danno tissutale e lo sviluppo di malattie autoimmuni provocate da un'eccessiva stimolazione e da una prolungata attivazione delle cellule mieloidi stesse (Barclay et al., 2002; Jenmalm et al., 2006).

Le cellule mieloidi esprimono diversi recettori inibitori sulla loro superficie, incluso il CD200R, come meccanismo di controllo per prevenire danni provocati da risposte immunitarie inappropriate dirette contro il "self". La maggior parte dei recettori inibitori espressi sulle cellule mieloidi contiene una sequenza ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) nella porzione citoplasmatica. L'oligomerizzazione di tali recettori indotta dal legame del ligando induce la

fosforilazione delle tirosine dell'ITIM, ad opera della famiglia delle kinasi Src, con conseguente reclutamento della tirosin-fosfatasi SHP1 e dell'inositol-fosfatasi SHIP che sopprimono l'attivazione cellulare promuovendo reazioni di defosforilazione a cascata. Al contrario, nella porzione citoplasmatica del CD200R non è presente un motivo ITIM; l'interazione dell'OX2 con il CD200R induce la dimerizzazione del recettore e la fosforilazione delle tirosine citoplasmatiche che vengono così riconosciute dalle proteine adattatrici Dok1 e Dok2 che possono associarsi e venire anch'esse attivate attraverso fosforilazione (Zhang et al., 2004). Attraverso studi di mutagenesi condotti sulla forma murina del recettore, si è dimostrato che la Y289 non è indispensabile per l'attivazione del CD200R e degli adattatori Dok1 e Dok2 e, quindi, per la conseguente inibizione cellulare mentre le altre due tirosine, Y286 ed Y297, agiscono in maniera sinergica promuovendo la fosforilazione l'una dell'altra (Zhang et al., 2006). Dok1 e Dok2 fosforilate reclutano ed attivano gli effettori SHIP e Ras-GAP che, inibendo Ras, bloccano la cascata della MAP kinasi ERK che porta alla produzione ed al rilascio di citochine. E' probabile che siano coinvolte anche altri effettori nella cascata inibitoria innescata dall'OX2 in quanto vengono bloccate anche le MAP kinasi p38 e JNK che non dipendono da Ras (Figure 3A; Figura 3B) (Zhang et al., 2004). Interferendo con le vie di segnalazione di queste MAP kinasi, l'OX2 reprime l'espressione di varie citochine e di molecole infiammatorie e riduce la degranolazione dei basofili-mastociti ed il rilascio di istamina sopprimendo così l'attivazione delle cellule mieloidi (Cherwinski et al., 2005; Jenmalm et al., 2006).

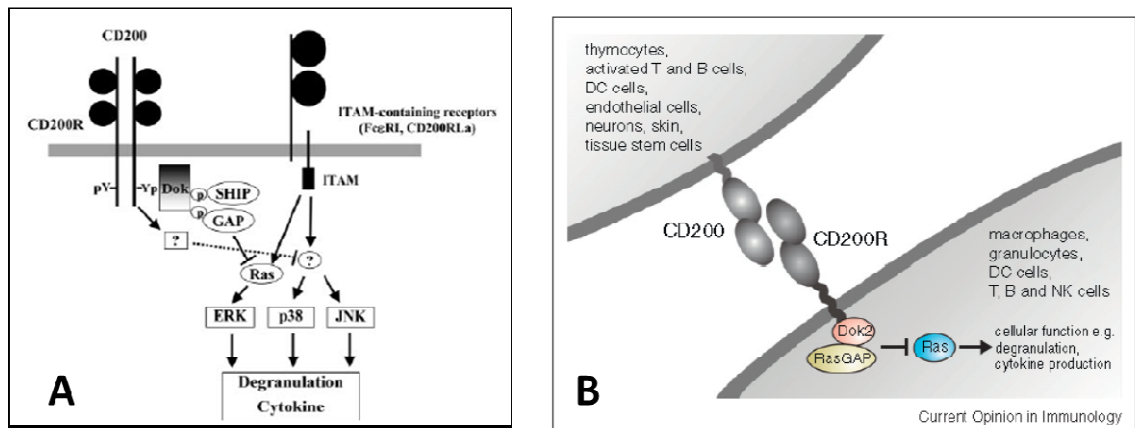


Figura 3 A: Rappresentazione della cascata di segnalazione innescata dall'interazione dell'OX2 con il recettore di membrana CD200R che porta all'inibizione delle MAP kinasi ERK, p38 e JNK (coinvolte nell'induzione dei geni di numerose citochine) (Zhang S. et al., 2004).

Figura 3 B: Pattern di espressione di CD200 e CD200R, e l'effetto inibente del legame sull'attivazione di Ras (Rygiel e Meyaard, 2012).

L'effetto immunomodulatorio risultante dall'interazione del CD200 con il suo recettore rappresenta un bersaglio interessante per la messa a punto di nuovi approcci terapeutici dal momento che la sua manipolazione può indurre tolleranza immunologica da un lato ed autoimmunità dall'altro. Effetti positivi sono stati ottenuti in modelli murini di artrite e di rigetto al trapianto grazie all'impiego di forme ricombinanti dell'OX2 (Gorczyński et al., 1999; Gorczyński, 2005). Nel genoma umano ed in quello murino sono stati recentemente identificati rispettivamente uno e quattro omologhi del CD200R che mancano del dominio citoplasmatico e quindi sono apparentemente incapaci di trasdurre un segnale (CD200RL) (Wright et al., 2003). Tuttavia, alcuni residui carichi positivamente nella regione transmembrana di questi omologhi recettoriali possono interagire con residui carichi negativamente presenti nella porzione transmembrana dell'omodimero DAP12. Questa proteina di membrana possiede un motivo ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nella sua porzione intracellulare che può essere fosforilato e, quindi, può reclutare ed attivare delle tirosin-kinasi.

L'accoppiamento fra il CD200RL e la proteina DAP12 risulta così nella trasduzione di un segnale attivatorio all'interno della cellula bersaglio. Attraverso l'utilizzo di una forma ricombinante della glicoproteina, si è dimostrato che l'OX2 non interagisce con i recettori CD200RL (Hatherley et al., 2004). In conclusione, a differenza del CD200R inibitorio originariamente caratterizzato nel topo e nell'uomo, questi omologhi CD200RL funzionano da recettori attivatori; purtroppo quali siano i ligandi di queste proteine in vivo e quale sia il significato funzionale e biologico di questi recettori restano ancora da chiarire. E' possibile che questi CD200RL si siano evoluti per riconoscere alcune componenti virali o batteriche ed attivare, attraverso DAP12, le cellule effettrici del sistema immunitario, analogamente a quanto è stato descritto per il recettore attivatorio Ly49 espresso sulle cellule NK che riconosce la proteina m157 del CMV murino (Smith et al., 2002; French et al., 2006).

2.3.2 Espressione del CD200 nelle cellule normali e tumorali

Oltre ad essere espresso sulle normali cellule del sistema immunitario, è stato visto che il CD200 è un marker di staminalità delle cellule staminali normali come quelle a livello del follicolo pilifero, delle cellule staminali pluripotenti embrionali e delle cellule pluripotenti pancreatiche (Tang et al., 2011; Kelly et al., 2011; Garza et al., 2011). Inoltre è stato evidenziato che la proteina CD200 è co-espressa assieme a marker di staminalità in diverse cellule tumorali come nel melanoma, tumore ovarico, mesotelioma, neuroblastoma, leucemia linfatica cronica, tumore al colon, prostata e seno (Siva et al., 2007; Kawasaki et al., 2007). Queste evidenze hanno portati i vari gruppi a ipotizzare che le cellule staminali tumorali possano essere in grado di evadere il sistema immunitario generando una risposta tollerogena facilitata dal CD200. Ad oggi però non sono ancora state prodotte evidenze che il tumore generato da cellule staminali esprimenti il CD200 siano in grado di indurre una tolleranza immunologica portando ad un vantaggio del tumore stesso (Rygiel et al., 2012). Però ci sono evidenze per quanto riguarda il ruolo del CD200 nella

progressione tumorale, L'espressione del CD200 è un fattore prognostico negativo di sopravvivenza per i pazienti con il mieloma multiplo o con leucemie mieloide acuta (Moreaux et al., 2006; Tonks et al., 2007). Sono state eseguite infatti analisi mediante cDNA microarrays su campioni di pazienti con mieloma multiplo e leucemia acuta mieloide ed il CD200 è risultato essere espresso rispettivamente nel 78% dei MM e 43% delle LAM, determinando una significativa diminuzione della sopravvivenza di questa pazienti (Moreaux et al., 2008).

La proteina CD200 è overespressa sulle cellule della leucemie linfatica cronica, della leucemia a cellule capellute, del cancro ovarico e melanoma (McWhirter et al., 2006, Brunetti et al., 2009; Siva et al., 2008). CD200 è anche correlata con la progressione tumorale (metastasi) nei tumori del polmone, vescica, prostata, leucemia mieloide cronica (Moreaux et al.,2008). Sono stati condotti studi di espressione di CD200 su linee cellulari di tumore alla mammella, trapiantate in modelli murini immunodeficienti e non. L'espressione sembra aumentare nella linea tumorale del topo immunocompetente, e questo suggerisce che la proteina CD200 possa avere un ruolo nei meccanismi di evasione della risposta immunitaria (Gorczynski et al.,2010) .

Quindi l'identificazione di CD200 come un marker di staminalità, un fattore prognostico tumorale, e un attenuatore della risposta anti-tumorale suggerisce che questa proteina possa avere un importante ruolo nella funzione delle cellule staminali cancerogene, favorendone la capacità di sfuggire al sistema immunitario.

2.2.3 Il ruolo del CD200 nella risposta anti-tumorale

Il ruolo del CD200 nell'immunità tumorale è stata dimostrata per la prima volta usando due modelli murini: un primo modello consisteva nell'utilizzo di topi C57BL/6 a cui è stato fatto un trapianto allogenico di midollo seguito da una somministrazione di cellule leucemiche, con risultato di una graft versus leukaemia (GVL). Il secondo modello utilizzava topi C57BL/6 preimmunizzati con cellule leucemiche esprimenti una molecola T costimolatoria (CD80), tanto da mostrare un

efficiente rigetto nei confronti della malattia. Ad entrambi i modelli è stata data una proteina di fusione CD200-Fc che provocava una inibizione dell'immunità verso le cellule leucemiche con un aumento della mortalità animale e un aumento della crescita tumorale. Effettuando poi una coinfusione di CD200-Fc e macrofagi esprimenti CD200R è stata osservata un'ulteriore attenuazione della risposta immune, ipotizzando un probabile effetto inibente del CD200-Fc verso la risposta immune antitumorale (Gorczyński et al., 2001). Il meccanismo che sta alla base di tutto ciò è stato ricercato mediante l'utilizzo di linee cellulari di melanoma e tumore ovarico esprimenti il CD200 in reazione linfocitaria allogenica mista di cellule T e cellule dendritiche. E' stato osservato una diminuzione della produzione di IL-2 e INF γ le citochine prodotte dai Th1 (Figura 4), importanti mediatori della risposta antitumorale (Siva et al., 2007). Aggiungendo poi un anti-CD200 la loro produzione veniva ripristinata confermando quindi la capacità modulatrice della proteina verso la risposta immunitaria antitumorale (Siva et al., 2007), ciò ha suggerito l'importanza che potrebbe avere il CD200 come un possibile target terapeutico (Kawasaki et Farrar, 2008).

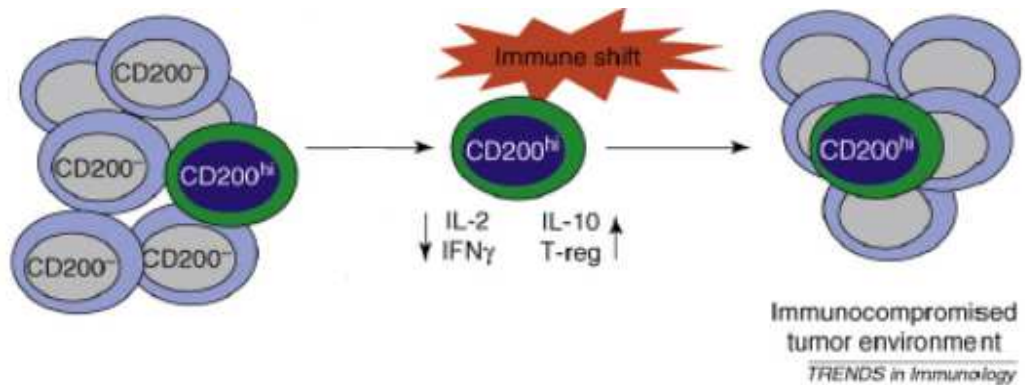


Figura 4: L'espressione di CD200 induce una downregolazione della risposta Th1 e una induzione delle cellule T regolatorie creando un microambiente tumorale immunocompromesso, favorente la proliferazione tumorale (Kawasaki e Farrar, 2008).

Questi studi però sono basati su colture linfocitarie miste, e risulta difficoltoso comprendere se l'inibizione avvenga in maniera diretta, oppure attraverso il coinvolgimento delle cellule APC (cellule presentanti l'antigene) (Rygiel e Meyaard, 2012). Uno studio su un modello tumorale di plasmocitoma esprimente CD200 ha mostrato da una parte l'incapacità di inibire direttamente i linfociti T citotossici ma dall'altra l'abilità di influenzare la funzione delle cellule T cambiando quello che è il profilo citochinico dei macrofagi (Wang et al., 2010). Da questi studi emerge che il CD200 espresso sulla cellula tumorale può innescare due meccanismi di inibizione della risposta antitumorale:

- Meccanismo diretto: il CD200 espresso sulla cellula tumorale o sulla cellule stromali o sulla cellula T attivata lega il CD200R presente sulla cellula effettrice della risposta immunitaria determinando il blocco della risposta antitumorale (Figura 3a);
- Meccanismo indiretto: l'interazione del CD200 espresso sulla cellula tumorale, stromale o sulla cellula immunitaria attivata lega il CD200R sulla cellula presentante l'antigene determinandone una regolazione delle cellule attivate o effettrici della risposta (Figura 3b) (Rygiel et Meyaard, 2012).

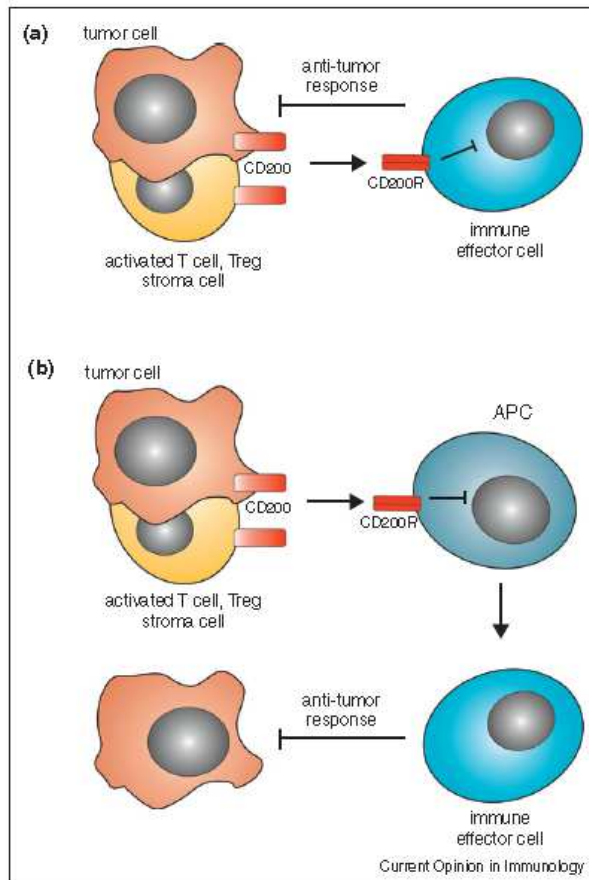


Figura 5: Modello di meccanismo diretto e indiretto di inibizione delle risposta antitumorale, innescata dall'interazione del CD200 con il CD200R (Rygiel et Meyaard, 2012).

3.OBIETTIVI DELLO STUDIO

La proteina CD200, sulla base delle evidenze riportate dagli studi precedentemente esposti, sembra avere un ruolo prognostico negativo nell'outcome dei pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide, anche se le conoscenze attualmente a disposizione non sono del tutto conclusive.

L'obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di analizzare l'espressione dell'antigene CD200 nelle cellule leucemiche dei pazienti affetti da LAM e il suo impatto sulla risposta alla terapia. Inoltre abbiamo voluto valutare l'impatto che ha rispetto all'andamento della malattia non solo all'interno della popolazione totale dei pazienti, ma anche all'interno di sottogruppi di pazienti con caratteristiche prognostiche già note.

4.MATERIALI E METODI

4.1 Pazienti

L'espressione dell'antigene CD200 è stata valutata sulle cellule leucemiche di 244 pazienti con diagnosi di LAM non promielocitica afferenti alla Clinica Ematologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine e Siena, 173 erano maschi e 71 femmine con un età mediana di 59 anni (range 18-84). 173 erano LAM "de novo" e 71 secondarie. La classificazione secondo il sistema del gruppo cooperativo Franco-Americano –Britannico (FAB) ha evidenziato che la coorte di pazienti con LAM de novo aveva citotipo M0 nel 6% dei casi, M1 nel 18% dei casi, M2 nel 16% dei casi, M4 nel 20% dei casi, M5 nel 38% dei casi e M6 nel 4% dei casi.

Nella maggioranza dei casi lo studio della molecola CD200 è stato effettuato su cellule fresche di aspirato midollare e/o del sangue periferico prelevato al momento della diagnosi nel corso della determinazione dell'immunofenotipo dei blasti leucemici. In un numero minore di casi lo studio è stato effettuato sulle cellule leucemiche della frazione mononucleata ottenute mediante separazione su gradiente di ficoll al momento della diagnosi e successivamente congelate a -80 °C in una soluzione di terreno completo più DMSO 10%.

Lo scongelamento è stato eseguito nel minor tempo possibile per ridurre al minimo la morte cellulare. La criovial contenente le cellule congelate in acqua viene messa a 37°C fino a scongelamento, poi lavata per 2 volte in modo da eliminare completamente il DMSO, e portata con terreno o tampone PBS al volume desiderato.

4.2 Preparazione dei campioni

Viene eseguita una conta dell'aspirato midollare con l'analizzatore ematologico, successivamente con la soluzione fisiologica viene diluito in modo che la

concentrazione leucocitaria risulti non superiore a 10.000/ μ l. Sono state preparate poi 2 provette con 100 μ l di campione rispettivamente con:

- 10 μ l di anticorpo anti CD45 (antigene comune leucocitario) coniugato con PerCP e 10 μ l di un controllo isotipico coniugato con PE;
- 10 μ l di anticorpo anti CD45 (antigene comune leucocitario) coniugato con PerCP e 10 μ l anti CD200 coniugato con PE.

Dopo averle vortexate delicatamente sono state incubate per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di soluzione lisante (FACSLysing solution Becton Dickinson) e dopo 10 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 1700 rpm. Dopo aver eliminato il sovrantante per capovolgimento è stato effettuato un lavaggio con 3 ml di soluzione fisiologica centrifugando nuovamente i campioni a 1700 rpm per 5 minuti. Al termine del lavaggio il sovrantante è stato eliminato e il pellet risospeso in 500 μ l di soluzione fisiologica prima della lettura al citofluorimetro.

4.3 Analisi citofluorimetrica

I campioni risospesi in PBS sono stati acquisiti e analizzati con il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson), equipaggiato di un laser a ioni di Argon che emette ad una lunghezza d'onda di 488 nm (laser blu) e di uno che emette a 635nm (laser rosso). Questa particolare lunghezza d'onda consente una efficiente misura dei parametri fisici e può eccitare contemporaneamente diversi fluorocromi. Con lo strumento si possono leggere contemporaneamente fino a quattro fluorescenze:

- FITC: eccitazione 488 nm - emissione 519 nm;
- PE: eccitazione 488 nm - emissione 578 nm;
- PerCP: eccitazione 488 nm - emissione 675 nm;
- APC: eccitazione 635 nm - emissione 660 nm (Figura 6).

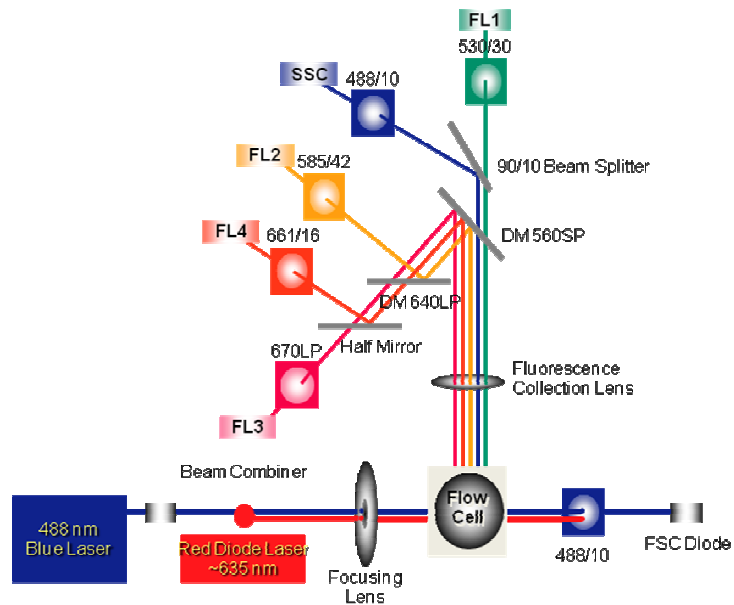


Figura 6: *Ottica FACSCalibur a 4 colori (Becton Dickinson).*

In tutti i casi del nostro studio è stata impiegata la tecnica di immunofluorescenza diretta con marcature multiple e per ogni campione sono state acquisite almeno 20000 cellule. La positività di CD200 è stata analizzata selettivamente sulla popolazione leucemica, individuata mediante una strategia di gating immunologico, combinando il parametro fisico di Side Scatter (SSC) contro l'espressione del CD45, antigene comune leucocitario (Figura 7).

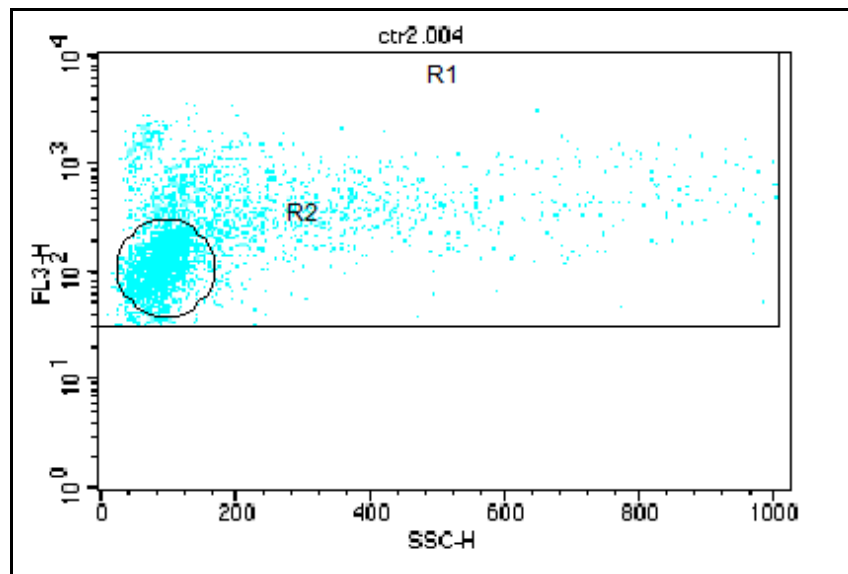


Figura 7: Identificazione della popolazione blastica mediante strategia di gating. La popolazione leucemica è identificabile poiché forma un cluster ben visibile e con una diversa intensità di espressione del CD45/SSC rispetto alle normali cellule leucocitarie.

Una volta identificata la popolazione leucemica viene valutata la positività dei suoi blasti al CD200. L'espressione del CD200 è stata considerata sia come percentuale di cellule positive che come MFI (Mean Fluorescence Index), definito come il rapporto tra l'Intensità media di Fluorescenza del campione (marcato con CD200) e l'Intensità media di Fluorescenza del controllo isotipico coniugato con PE (Figura 8 A e B).

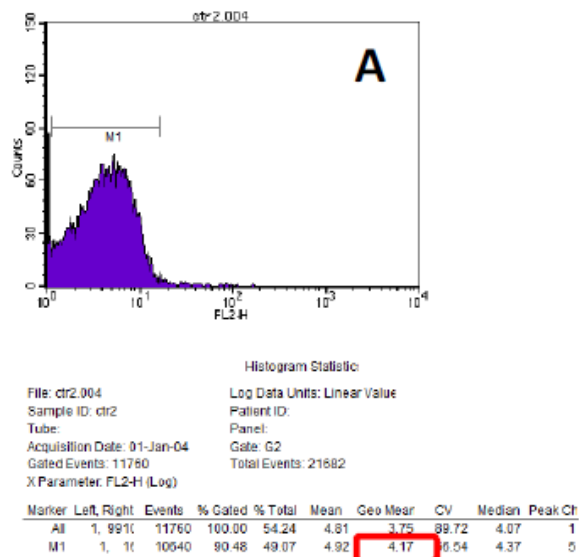


Figura 8 A: Valore dell'intensità media di fluorescenza del controllo isotipico coniugato con PE (evidenziata dal riquadro rosso).

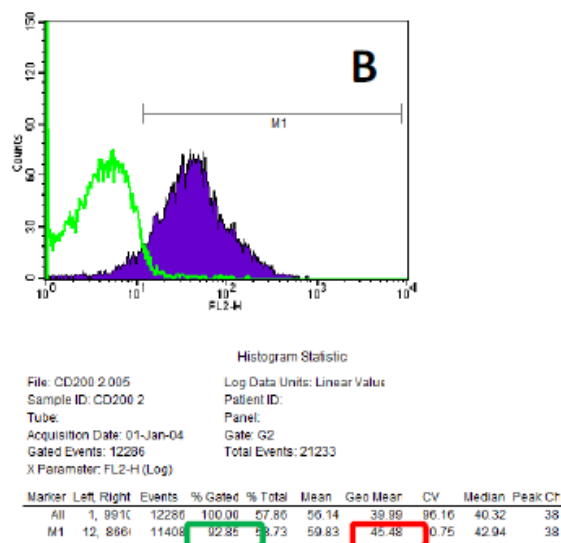


Figura 8 B: Sovrapposizione del picco generato dal controllo isotipico (verde) con quello determinato dall'espressione del CD200 (viola). Questo permette di ricavare il valore dell'intensità media di fluorescenza del campione marcato con CD200 (evidenziato dal riquadro rosso) e inoltre di estrapolare la percentuale di cellule positive (evidenziato dal riquadro verde).

4.4 Analisi statistica

La *remissione completa* (CR) è stata definita come il completo recupero a livello periferico e l'assenza della malattia dal midollo valutata a livello morfologico e fenotipico o molecolare. Il *disease free survival* (DFS) è stato definito come il periodo di tempo dalla remissione completa alla ricaduta. L'*overall survival* (OS) è stato identificato come l'intervallo dal momento della diagnosi alla morte del paziente, indipendente dalla causa del decesso. Le variabili categoriche (qualitative) sono state analizzate con il test esatto di Fisher (o test di Fisher-Yates, test di Fisher-Irwin, test esatto del χ^2).

Le variabili quantitative continue sono state valutate con il test T di Student o quando indicato con il test di Kruskal Wallis. I fattori influenzanti la remissione completa sono stati valutati con la regressione logistica univariata e multivariata, espressa come Hazard Ratio (HR) (95% CI).

Le curve dell'*overall survival* (OS) sono state costruite con il metodo di Kaplan Meyer e le differenze tra i gruppi sono state calcolate mediante test dei ranghi logaritmici (logrank test). La correlazione tra le diverse variabili capaci di influenzare la sopravvivenza è stata valutata con la regressione Cox multivariata (Cox, 1972). La significatività statistica è stata considerata per P values < 0.10.

L'analisi statistica è stata eseguita con il software (NCSS) (NCSS, Kaysville, Utah, USA).

4.5 Cariotipo

Su tutti i pazienti è stata eseguita l'analisi citogenetica su campioni di midollo osseo, dopo aver ottenuto il consenso informato, con la tecnica convenzionale di bandeggio dopo 24-48 ore di incubazione le metafasi sono state valutate in accordo con il Sistema Internazionale per la nomenclatura della citogenetica umana.

L'assegnazioni della classi di rischio è stata fatta secondo i criteri MRC (Grimwade D et al.,1997). La presenza di t(8;21) o di inv(16)/t(16,16) è stata fatta corrispondere

al cariotipo favorevole, mentre le alterazioni cromosomiche 3 e 5, la monosomia del cromosoma 7 e il cariotipo complesso (≥ 5 alterazioni) sono state classificate come anomalie associate ad alto rischio. I casi con cariotipo normale o alterazioni non classificabili nè come favorevoli né come sfavorevoli sono state fatte rientrare nella categoria a rischio intermedio.

4.6 Valutazione delle mutazioni di FLT3 e NPM1

L'RNA cellulare è stato estratto con la centrifugazione Ficoll a gradiente di densità da cellule mononucleate arricchite usando il QIAmp RNA Blood Mini Kit (Quiagen, Chasworth, CA). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale applicando il sistema MMLV e usando primers esamerici random (Invitrogen).

4.6.1 NPM1

Il cDNA è stato sintetizzato con tecniche standard e amplificato con la PCR (polymerase chain reaction) per ottenere copie del gene NPM1. Gli esoni 11 e 12 sono stati amplificati assieme utilizzando i seguenti primers:

Forward: 5'-GGTGGTTCTCTTCCCAAAGT-3'

Reverse: 3'-ATGGCACAAACTATTTACAA-5'.

I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati mediante la tecnica del sequenziamento diretto del DNA, tramite procedure standard.

4.6.2 Stato mutazionale di FLT3

Tutto l'RNA è stato analizzato per l'identificazione delle mutazioni ITD e D835 del gene FLT3, come descritto da Noguera (Noguera et al., 2002). L'RNA è stato estratto dai blasti leucemici isolati Ficoll-Hypaque utilizzando un kit Quiagen. Per ottenere il cDNA, tutto l'RNA è stato retrotrascritto usando primers esamerici random e MMLV (Invitrogen). 2 µl di CDNA sono stati amplificati in un volume totale di 50 µl di miscela di reazione contenente 200 µM di ciascun dNTP, 1.5 U di Taq-Gold DNA polimerasi (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 30 pmol di

ciascun primer e PCR buffer. Il pre-riscaldamento della miscela a 94°C per 5 minuti è stato seguito da 35 cicli di 45 secondi a 56°C, 30 secondi a 72°C e 30 secondi a 94°C. Al termine dei 35 cicli è seguita una fase finale di 10 minuti a 72°C. I primers oligonucleotidici utilizzati:

- ITD R5 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3'
R6 5'-ATCCTTAGTACCTTCCCAAACCTC -3'
- D835 17F 5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG -3'
17R 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3'

Per l'identificazione di ITD i prodotti amplificati sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio al 3%, che evidenzia nei campioni mutati la comparsa di una banda supplementare di dimensioni superiori all'amplificato wild-type. Per quanto riguarda la mutazione D835, i prodotti dell'amplificazione sono stati incubati con l'enzima di restrizione EcoRV (Amersham International, UK). I campioni wild-type vengono completamente digeriti dall'enzima con la presenza di due bande a 68 bp e 46 bp, mentre i campioni mutati vengono digeriti solo parzialmente con la persistenza di una banda di 114 bp non digerita. Questo è possibile individuarlo mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%.

5.RISULTATI

5.1 Espressione del CD200 e parametri clinici e biologici

Complessivamente lo studio ha riguardato 173 pazienti con LAM de novo e 71 pazienti con LAM secondaria, con un'età mediana di 59 anni (range 18-84). L'antigene CD200 è risultato positivo su una percentuale variabile di cellule in 136/244 (56%) con una media di fluorescenza MFI di 11 (range 2-100). Tra questi pazienti, 41 overesprimevano la molecola (MFI= 23.5 ± 10). Al fine di stabilire se la presenza del CD200 nei blasti fosse in grado di identificare uno specifico sottogruppo di pazienti con determinate caratteristiche a significato prognostico è stata studiata la prevalenza dei casi CD200 + in relazione alle caratteristiche cliniche e biologiche.

Come riportato in tabella 4 l'espressione del CD200 non è associata in modo statisticamente significativo né con l'età, né con i valori della conta leucocitaria dei pazienti; l'antigene invece, è più frequentemente espresso in casi di LAM secondaria (73%) che in casi di LAM de novo (49%) ($p=0.0006$), come anche in pazienti CD34 positivi rispetto ai pazienti CD34 negativi ($p<0.0001$). CD200 è poi presente preferenzialmente sui blasti leucemici di casi con elevati livelli di Bcl2 ($p=0.01$) e con bassi livelli di CD56 ($p=0.015$). Inoltre, poiché le anomalie citogenetiche e molecolari presenti all'esordio sono tra i fattori prognostici più importanti per quanto riguarda l'esito della malattia, abbiamo valutato l'espressione di CD200 nelle diverse classi di anomalie genetiche ricorrenti ed in particolare per quanto riguarda le anomalie citogenetiche a rischio intermedio è stata evidenziata una bassa frequenza di casi CD200 positivi (47%), rispetto quelli a rischio favorevole (93%) e a rischio sfavorevole (66%, $p=0.0003$).

L'analisi dei dati molecolari ha mostrato che il 62% dei casi FLT3 wild type sono CD200 positivi rispetto al 29% rispetto al 37% di pazienti con mutazioni FLT3

(p=0.004), così come il 68% di casi NPM1 wild type rispetto al 29% dei pazienti con mutazioni a carico della nucleofosmina (p=0.0013)

Tabella 4: *Espressione di CD200 e caratteristiche clinico/biologiche alla diagnosi*

RISULTATI			
	CD200+	P	
Età ≥ 55	84/147 (57%)	0.79	
Età < 55	53/97 (55%)		
LAM “de novo”	84/172 (49%)	0.0006	
LAM secondarie	52/71 (73%)		
WBC ≥ 30 *10⁹/L	48/99 (48%)	0.08	
WBC < 30 *10⁹/L	87/145 (60)		
FLT3		0.004	
Positivo	17/46 (37%)		
Negativo	105/170 (62%)		
* 28 casi non sono stati valutati per mutazioni a carico di FLT3			
NPM1		0.0013	
Wild type	99/145 (68%)		
Mutato	19/65(29%)		
* 34 casi non sono stati valutati per mutazioni a carico di NPM1			
RISCHIO ASSOCIATO A CARATTERISTICHE CITOGENETICHE	Intermedio	13/14 (93%)	0.0003
	Sfavorevole	63/139 (47%)	
	Favorevole	44/67 (66%)	
* 24 casi non sono stati valutati per il rischio citotipico			
CD34		< 0.00001	
Positivo	99/129 (77%)		
Negativo	36/113 (32%)		
CD56		0.015	
Positivo	39/87 (45%)		
Negativo	95/154 (62%)		
* 3 casi non sono stati valutati per l'espressione di CD56			
Bcl2-MFI: ≥ 17	65/101 (64%)	0.01	
< 17	66/136 (48%)		
* 7 casi non sono stati valutati per l'espressione di Bcl2			

5.2 Espressione di CD200, risposta alla terapia di induzione e sopravvivenza globale

Ai fini di valutare la risposta alla terapia di induzione sono stati considerati solo 149(66%) casi dei 244 considerati nello studio, poiché alcuni sono deceduti durante la fase di induzione e gli altri sono risultati essere resistenti alla terapia. La ricaduta è avvenuta nel 36% dei casi (54/149) a una mediana di 30 mesi.

Attraverso un'analisi univariata e multivariata sono stati valutati i fattori che possono influenzare l'ottenimento della remissione completa (Tabella 5). Dalla tabella si evince che dall'analisi univariata la probabilità raggiungere la remissione completa risulta sensibilmente diminuita nei pazienti con CD34 positivo, con cariotipo sfavorevole, con età superiore a 55 anni e con una LAM secondaria. Questi fattori, che convenzionalmente vengono considerati sfavorevoli per il raggiungimento e il mantenimento della remissione completa, conservano la loro influenza negativa rispetto al raggiungimento della RC dopo la terapia di induzione anche in analisi multivariata.

Per il CD200 il risultato dell'analisi è simile in quanto si evidenzia come l'espressione delle molecola abbia un'influenza negativa sulla risposta alla terapia di induzione anche dopo l'analisi multivariata (p=0.04).

Tabella 5: *Analisi dei fattori che potrebbero influenzare la remissione completa*

	ANALISI UNIVARIATA		ANALISI MULTIVARIATA	
	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
Età ≥ 55	0.23(0.12-0.43)	<0,00001	0.40(0.19-0.87)	0.0019
WBC≥ 30*10 ⁹	0.6(0.36-1.11)	0.1		
LAM secondaria	0.19(0.10-0.35)	<0,00001	0.31(0.15-0.65)	0.0019
Cariotipo sfavorevole	0.08(0.005-0.61)	0.01		
CD34 positivo	0.27(0.12-0.55)	0.0004	0.36(0.17-0.77)	0.008
CD56 positivo	0.74(0.42-1.30)	0.27		
CD200 positivo	0.52(0.29-0.91)	0.02		
CD200 MFI≥11	0.41(0.19-0.92)	0.03	0.49(0.20-0.95)	0.040

Quindi si è voluto studiare se in qualche modo la presenza del CD200 sui blasti potesse influenzare anche la sopravvivenza globale (OS) dei pazienti.

Nel momento in cui è stata effettuata l'analisi 101 pazienti su 244 erano vivi liberi da malattia.

Esaminando nella nostra intera coorte di casi LAM la percentuale di pazienti che a tre anni dalla diagnosi sono ancora in vita in relazione a i fattori a significato prognostico già noto si evidenzia come tre anni di OS sia significativamente ridotta per pazienti con un'età maggiore di 55 anni (21% rispetto a 60% di pazienti con età < 55anni, $p < 0.0001$), per pazienti con LAM secondaria (20% rispetto a 43% di pazienti con LAM de novo, $p = 0.0004$) e per pazienti CD34 positivi (23% rispetto a 53% pazienti CD34 negativi, $p < 0.0001$). Anche nel caso di pazienti a cariotipo sfavorevole vi è una significativa riduzione della sopravvivenza globale se comparati con i casi a cariotipo normale o favorevole (22% rispetto a 40% di pazienti cariotipo normale/intermedio e a 60% di pazienti a cariotipo favorevole, $p = 0.0003$).

Abbiamo quindi voluto studiare se anche il CD200 potesse in qualche modo influenzare l'OS come i fattori precedentemente presi in considerazione: a 36 mesi l'espressione aberrante di CD200 ha un impatto negativo sulla sopravvivenza globale dei pazienti ($p = 0.02$), il 31% dei pazienti CD200 positivi sono ancora vivi rispetto a 45% di pazienti CD200 negativi (Figura 9).

Avendo stabilito che l'espressione di CD200, come gli altri fattori prognostici già noti, ha un impatto negativo sulla sopravvivenza globale, abbiamo poi analizzato se anche l'intensità di espressione della molecola fosse in relazione ad un diverso andamento della malattia. Come evidenziato la curva di sopravvivenza nella popolazione totale solo il 17% dei pazienti con alta intensità di espressione di CD200 sono ancora in vita a 3 anni dalla diagnosi, in confronto al 36% dei pazienti con bassa espressione della proteina ($p = 0.024$) (Figura 10).

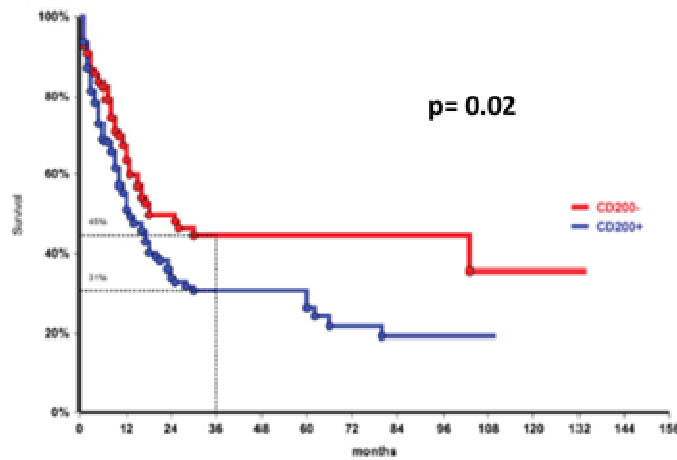


Figura 9: Sopravvivenza globale nella coorte totale di pazienti con LAM in relazione all'espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200.

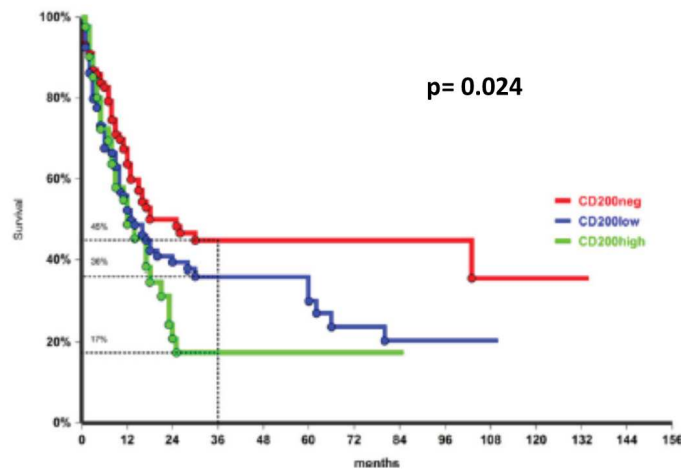


Figura 10: Sopravvivenza globale nella coorte totale di pazienti con LAM in relazione all'intensità di espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200 ($MFI=1$), la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che hanno una bassa intensità di espressione di CD200 ($MFI<11$), la curva verde indica l'andamento dei pazienti che hanno alte intensità di espressione di CD200 ($MFI\geq 11$).

L'alta intensità di espressione di CD200 (MFI \geq 11) mantiene il valore prognostico negativo sulla sopravvivenza globale anche dopo l'analisi multivariata, assieme a età superiore ai 55 anni, cariotipo sfavorevole e positività per il CD34 (Tabella 6).

Tabella 6: Analisi multivariata di fattori biologici e clinici dei pazienti in relazione alla sopravvivenza globale.

ANALISI MULTIVARIATA		
	HR (95%CI)	P-value
Età \geq 55	0.46(0.30-0.69)	0.0002
LAM secondaria	0,92(0.61-1.39)	0.78
Cariotipo sfavorevole	0.33(0.13-0.79)	0.01
CD34 positivo	0.44(0.29-6.67)	0.0002
CD200 MFI \geq 11	0,59(0.32-0.97)	0.04

5.3 Associazione tra CD200 e diverse classi di fattori prognostici in relazione all'andamento della malattia

Avendo stabilito la valenza prognostica di CD200 a livello della popolazione generale dei pazienti, abbiamo poi valutato se l'espressione di CD200 fosse in grado di modificare l'andamento della malattia all'interno di diversi gruppi di pazienti identificati da marcatori clinici/biologici già noti per la loro valenza prognostica.

Per quel che riguarda la coespressione con molecole a significato noto come il CD56 e il CD34, non è risultata esserci una differenza statisticamente significativa di sopravvivenza globale da malattia tra pazienti CD56+ e i pazienti CD34+ che esprimono la molecola CD200. Come mostrano invece le curve di sopravvivenza in figura 11 e 12 e vi è invece una differenza significativa nei pazienti CD56- e CD34-. In particolare tra i casi CD56-, la percentuale di pazienti ancora in vita a 3 anni dalla diagnosi è del 57% quando CD200 non è espresso, del 35% quando CD200 è espresso ad una bassa intensità e dello 0% quando CD200 è espresso ad intensità alta. Nello stesso modo, tra i pazienti CD34-, l'espressione ad alta intensità di CD200 è associata ad una probabilità di sopravvivenza globale, a 3 anni dalla diagnosi, peggiore: 0% rispetto a 59% in pazienti con espressione di CD200 a bassa intensità e 57% in pazienti CD200 negativi.

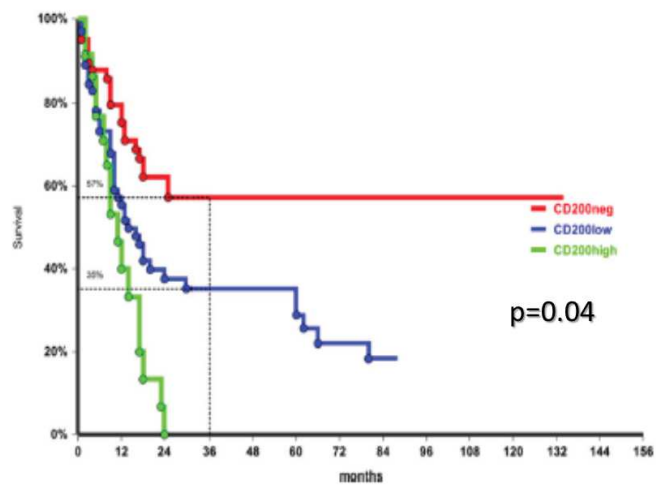


Figura 11: Sopravvivenza globale in pazienti con LAM CD56- in relazione all'intensità di espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI < 11$, la curva verde indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI \geq 11$.

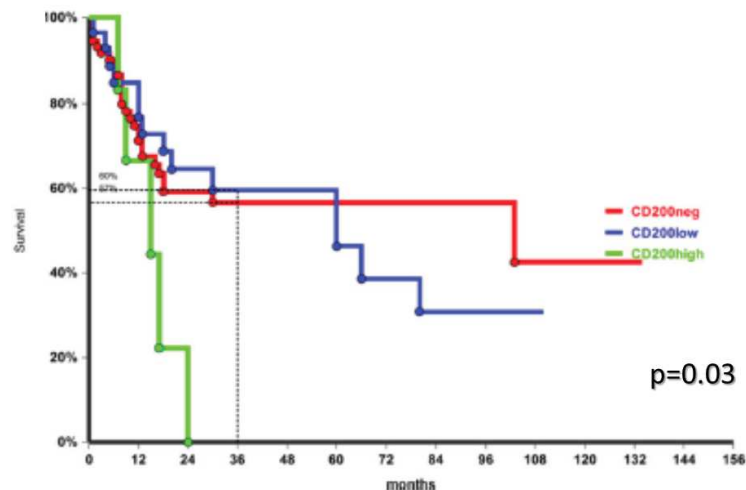


Figura 12: Sopravvivenza globale in pazienti con LAM CD34- in relazione all'intensità di espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI < 11$, la curva verde indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI \geq 11$.

Prendendo poi in considerazione due caratteristiche della malattia a forte impatto negativo, come il cariotipo sfavorevole e lo sviluppo di LAM secondaria, l'espressione del CD200 sembra favorire il trend negativo di sopravvivenza già caratteristico di questi due fattori, infatti a tre anni dalla diagnosi solo l'11% dei pazienti con cariotipo sfavorevole e che esprimono CD200 sono ancora vivi in confronto al 39% di pazienti dello stesso gruppo prognostico che non esprimono CD200 (Figura 13). Allo stesso modo l'espressione di CD200 ha impatto negativo sulla sopravvivenza globale dei pazienti con LAM secondaria, poichè a tre anni dalla diagnosi il 16% di pazienti sono vivi in confronto al 38% di pazienti CD200- (Figura 14). Inoltre CD200 è associato ad una peggiore sopravvivenza globale anche nei pazienti con LAM de novo con 49% di pazienti CD200- e 35% CD200+ che sono ancora vivi a 3 anni dalla diagnosi.

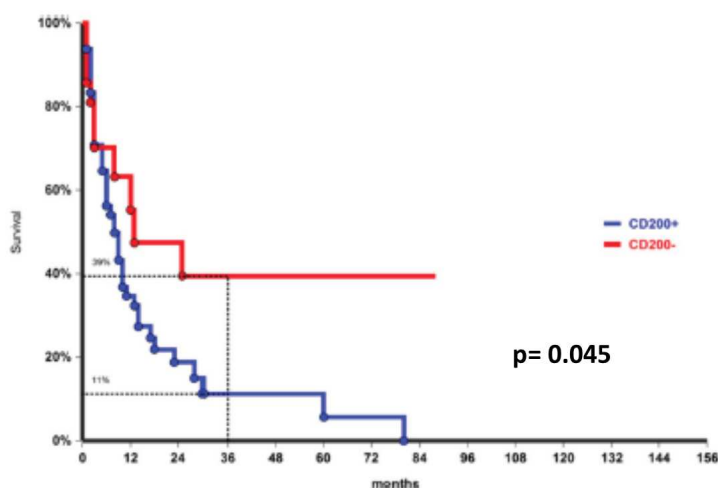


FIGURA13: Sopravvivenza globale nei pazienti con LAM con cariotipo sfavorevole in relazione all'espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200.

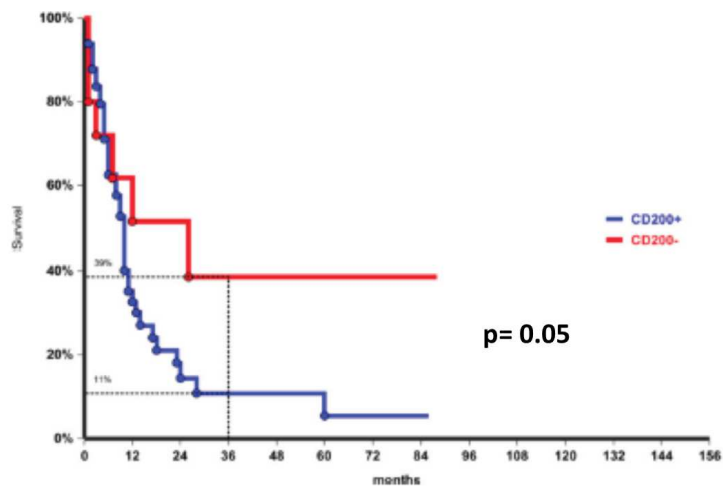


Figura 14: Sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con LAM SECONDARIA in relazione all'espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento dei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200, la curva blu indica l'andamento dei pazienti che la esprimono.

Analizzando il gruppo di pazienti che differiscono per la presenza/assenza di mutazioni a carico di FLT3, l'espressione di CD200 sui blasti non peggiora la probabilità di sopravvivenza dei casi FLT3-ITD positivi, ma ha un impatto negativo sulla sopravvivenza dei pazienti con FLT3 wild type. Si notano delle differenze in cui a 3 anni dalla diagnosi il 42% di pazienti CD200- è ancora in vita in confronto al 36% di pazienti a bassa espressione di CD200 e al 12% di pazienti ad alta espressione di CD200 (Figura 15).

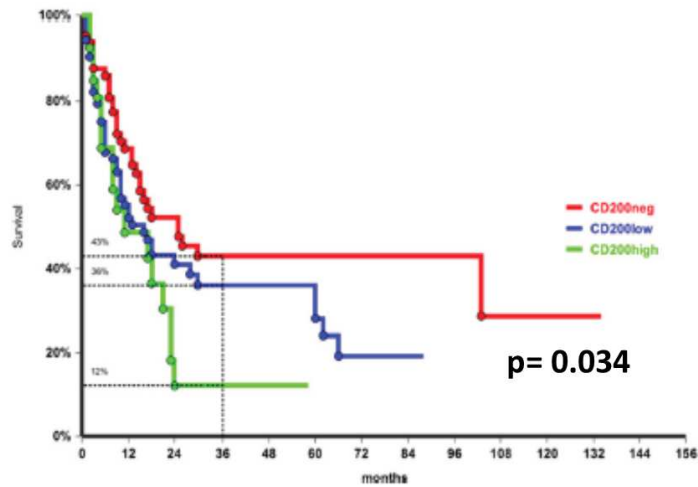


Figura15: Sopravvivenza globale nei pazienti con LAM negativi per mutazioni di FLT3 in relazione all'intensità espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI < 11$, la curva verde indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI \geq 11$.

Infine, per quanto riguarda la classe di pazienti caratterizzati da mutazioni NPM1 che di per sé conferiscono una prognosi migliore rispetto alla controparte non mutata, la espressione di CD200 peggiora la probabilità di sopravvivenza nel gruppo di casi mutati ma non in quello di casi non mutati. Se poi consideriamo l'associazione tra intensità di espressione di CD200 e sopravvivenza globale nel gruppo di pazienti mutati per NPM1, si ottengono le curve di sopravvivenza mostrate in Figura 16, dove a 3 anni dalla diagnosi il 63% di pazienti che non esprimono CD200 sono ancora in vita, contro il 25% di pazienti con bassa espressione di CD200 e lo 0% di pazienti con alta espressione di CD200.

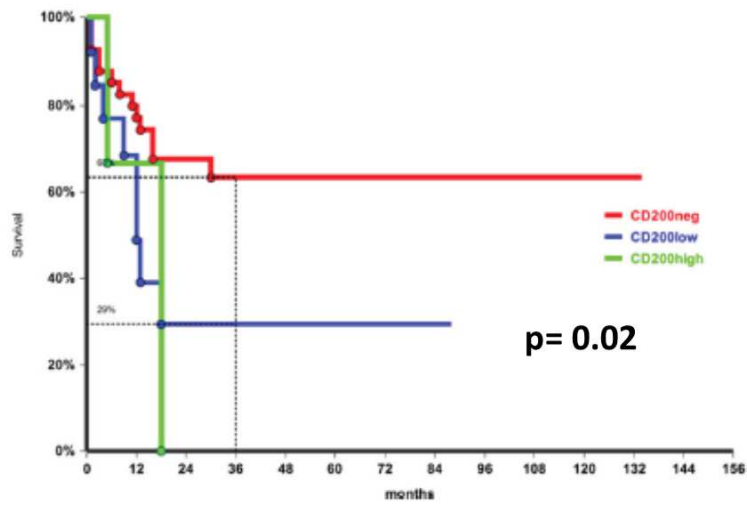


Figura 16: Sopravvivenza globale nei pazienti con LAM caratterizzati dalla mutazione a carico del gene *NPM1* in relazione all'espressione di CD200. La curva rossa indica l'andamento della malattia nei pazienti i cui blasti non esprimono la proteina CD200, la curva blu indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI < 11$, la curva verde indica l'andamento della malattia nei pazienti che esprimono CD200 con $MFI \geq 11$.

6.DISCUSSIONE

Le Leucemie Acute Mieloidi (LAM) sono un gruppo estremamente eterogeneo di neoplasie ematologiche maligne caratterizzate da una prognosi severa, ma variabile in base alle caratteristiche cliniche, morfologiche e fenotipiche della malattia. L'identificazione al momento della diagnosi di tali peculiarità che possono condizionare l'andamento della malattia costituisce ad oggi il presupposto indispensabile per definire il reale rischio della malattia e di conseguenza, ottimizzare e personalizzare le strategie terapeutiche per ogni paziente. Tra i fattori biologici, quello che svolge il ruolo più importante e rappresenta un fattore prognostico è sicuramente il cariotipo dei blasti leucemici; infatti è possibile identificare tre gruppi di rischio: favorevole, sfavorevole e intermedio, in rapporto alla presenza e al tipo di anomalia cariotipica (Castoldi e Liso, 2007). Tuttavia l'andamento della malattia nei casi con cariotipo normale, che costituiscono circa il 50% dei casi, è molto eterogeneo, inoltre anche in presenza di alterazioni citogenetiche a significato prognostico favorevole, spesso l'andamento della malattia non è quello atteso. E' pertanto estremamente importante identificare altri fattori che consentano di distinguere i pazienti in categorie prognostiche ben definite. A questo proposito sono già state identificate alcune caratteristiche biologiche come mutazioni a carico di alcuni geni coinvolti nei processi di regolazione dei meccanismi di proliferazione, e alcuni antigeni espressi sulla cellula leucemica che sono in grado di influenzare ulteriormente il decorso della malattia, interferendo in vario modo sulla risposta alla terapia, sulla durata della risposta e sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da LAM. Infatti nel corso degli anni lo studio sistematico dell'assetto antigenico dei blasti ha portato ad identificare come fattori prognostici negativi l'espressione di CD34 e di CD56, il cui effetto si può manifestare anche quando sono presenti fattori prognostici maggiori come anomalie citogenetiche ed in particolare anche quando sono presenti anomalie citogenetiche a

significato prognostico positivo (Murray et al., 1999; Raspadori et al., 2002; Myint et al., 1992).

Studi più recenti hanno poi evidenziato un altro antigene, il CD200, che sembra avere un ruolo di modulazione dell'andamento della malattia in diverse forme tumorali, tra cui le Leucemie Acute Mieloidi. Questa molecola, attraverso l'interazione con il proprio recettore, il CD200R, sembra svolgere un'attività immunosoppressiva e favorire perciò la progressione tumorale, sebbene in sistemi murini sia stato evidenziato un effetto di inibizione di CD200 sulla formazione di metastasi in tumori del polmone (Fatemeh et al., 2012). I meccanismi attraverso cui CD200 inibisce la risposta immune antitumorale non sono completamente chiariti anche se sembra coinvolgano l'inibizione dell'attività dei macrofagi, induzione di linfociti T regolatori, "switching" del profilo citochinico da Th1a Th2 ed inibizione dell'immunità tumore specifica mediata dai linfociti T.

In particolare nelle LAM, alcune recenti pubblicazioni hanno evidenziato che l'espressione ad alta intensità di CD200 è in grado di sopprimere l'attività dei linfociti NK e la loro risposta antitumorale (Coles et al., 2011). L'iperespressione di CD200 nei pazienti affetti da LAM sembra aver effetto anche sui linfociti T, poiché è stato dimostrato che è in grado di indurre un aumento di linfociti T regolatori e di sopprimere la funzione di linfociti T della memoria (Whang et al., 2010).

Sulla base di queste evidenze è stato ipotizzato che l'espressione aberrante di CD200 sia uno dei meccanismi utilizzato dalle cellule leucemiche per sfuggire al controllo del sistema immunitario. Ad oggi non sono ancora disponibili dati definitivi relativi all'eventuale ruolo prognostico svolto da questo antigene; infatti alcuni studi condotti nel campo delle Leucemie Acute Mieloidi hanno documentato una correlazione tra espressione di CD200 e la presenza di alcune anomalie citogenetiche a significato prognostico positivo quali t(8;21) e inv(16), e tra espressione di CD200 e ridotta sopravvivenza totale. Sulla base di queste evidenze è stato ipotizzato che CD200 possa rappresentare nelle LAM un fattore a significato prognostico negativo (Tonks et al., 2007).

I risultati illustrati nel presente studio, sono stati ottenuti analizzando l'espressione di CD200 e il suo impatto sull'andamento della malattia non solo all'interno della popolazione totale dei pazienti, ma anche all'interno di sottogruppi di pazienti con caratteristiche prognostiche già note.

A questo proposito sono stati esaminati 244 casi di LAM all'esordio della malattia in CD200 appare espresso nel 56% dei casi (136/244). Suddividendo i pazienti secondo l'intensità di espressione del CD200 41 casi (30%) presentano un'alta intensità ($MFI \geq 11$) e 95 casi (70%) presentano una bassa espressione ($MFI < 11$). Non è emersa alcuna associazione con parametri clinico/biologici quali età, conta dei WBC all'esordio e i sottotipi FAB; l'espressione di CD200 è invece più frequente nei casi di LAM secondaria rispetto ai casi di LAM de novo. La presenza di questo antigene è poi significativamente associata all'espressione dell'antigene CD34 ed alla presenza di anomalie cromosomiche a significato prognostico favorevole, come anche ad anomalie cromosomiche a significato prognostico sfavorevole. E' stato invece possibile documentare una correlazione inversa con la presenza dell'antigene CD56 con la presenza di mutazioni dei geni FLT3 e di NPM1.

Nella coorte di pazienti rappresentata nello studio la remissione completa dopo terapia di induzione, come atteso viene raggiunta in una percentuale minore di pazienti qualora si tratti di casi con un cariotipo sfavorevole, di casi con una età superiore a 55 anni, di casi di LAM secondaria e di casi i cui blasti esprimono la proteina CD34. Anche l'espressione di CD200 rappresenta nello studio un fattore prognostico negativo poiché si osserva un basso tasso di remissione completa post induzione nel 56% dei casi CD200+ rispetto al 76% casi CD200- ($p=0.006$); inoltre la sopravvivenza globale a 36 mesi dalla diagnosi è risultata maggiore nei casi non esprimenti il CD200 rispetto alla controparte esprimente l'antigene, 45% dei pazienti CD200- rispetto a 31% di pazienti CD200+ sono ancora vivi a 36 mesi. Avendo stabilito il valore prognostico negativo di CD200 all'interno della nostra intera popolazione di pazienti leucemici è stato valutato l'impatto dell'espressione di

CD200 sulla prognosi di sotto classi di pazienti caratterizzati da fattori prognostici già noti. La sopravvivenza globale nei pazienti i cui blasti esprimono CD34 e CD56 non mostra differenze significative tra casi CD200+ e CD200- , mentre tra i casi CD56- l'alta intensità di espressione di CD200 peggiora la sopravvivenza globale dei pazienti. Lo stesso vale per i casi con mutazioni a carico di NPM1 e per i casi Flt3-WT, cioè per i casi tradizionalmente associati ad un migliore outcome in cui si evidenzia un peggioramento del tasso di sopravvivenza quando CD200 è espresso. Allo stesso modo lo studio presente permette poi di stabilire che l'espressione di CD200 peggiora la prognosi anche di pazienti con LAM de novo. LAM secondariee con cariotipo sfavorevole.

I nostri dati perciò non solo consentono di stabilire e confermare in generale il ruolo prognostico negativo dell'espressione aberrante di CD200 ma soprattutto consentono di concludere che l'analisi dell'espressione di CD200 permette di ridefinire in modo più preciso l'andamento della malattia in categorie di pazienti normalmente considerati a basso rischio e che CD200 rappresenta un fattore prognostico ulteriormente negativo in pazienti già caratterizzati da alcuni fattori biologici non favorevoli.

Ciò costituisce la base per promuovere uno studi più approfonditi sui meccanismi che favoriscono la risposta immune antitumorale e sui meccanismi di evasione della risposta immune da parte del tumore. In questa direzione sono già stati condotti numerosi studi che hanno messo in evidenza come un intricato network che coinvolge molteplici tipi di cellule del sistema immunitario innato ed adattativo. In particolare Coles e collaboratori recentemente hanno evidenziato che vi è un incremento di cellule T regolatorie nei pazienti leucemici i cui blasti esprimono il CD200. Seguendo queste indicazioni abbiamo iniziato a studiare questa importatnte classe di linfociti nella nostra casistica di pazienti LAM all'esordio allo scopo di chiarire ulteriormente la relazione tra CD200 e l'andamento clinico della malattia.

7.BIBLIOGRAFIA

- ✓ Barclay AN; *Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ia, Thy-1 and MRC OX2 antigens*. Immunology 1981; 44:727-736.
- ✓ Barclay AN, Ward HA; *Purification and chemical characterisation of membrane glycoproteins from rat thymocytes and brain, recognised by monoclonal antibody MRC OX 2*. Eur J Biochem. 1982; 129:447–58.
- ✓ Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH; *CD200 and membrane interaction in the control of myeloid cells*. Trend Immunol. 2002; 23:285-290.
- ✓ Barclay AN, *Membrane proteins with immunoglobulin-like domains a master superfamily of interaction molecules*. Semin. Immunol. 2003; 15:215-223.
- ✓ Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)*. Br J Haem. 1991;78(3):325-9.
- ✓ Brunetti L, Di NR, Abate G, Gorrese M, Gravetti A, Raia M, Scalia G, Pascariello C, Camera A, Del VL: *CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells*. Br J Haematol 2009, 145:665-667.
- ✓ Bukovsky A, Presl J, Zidovsky J; *Association of some cell surface antigens of lymphoid cells and cell surface differentiation antigens with early rat pregnancy*. Immunology 1984; 52:631–40.
- ✓ Cancer Genome Atlas Research Network. *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med; 2013; 368:2059-74
- ✓ Castoldi e Liso; *Malattie del sangue e degli organi ematopietici* 2007; pag. 253-279 McGRAW-HILL 5^a Edizione.

- ✓ Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. *Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia*. Arch Pathol Lab Med. 2006;130 (11):1687-92.
- ✓ Cherwinski HM, Murphy CA, Joyce BL, Bigler ME, Song YS, Zurawski SM, Moshrefi M, Gorman DM, Miller KL, Zhang S., Sedgwick JD and Phillips JH., *The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and humane mast cell function*. J. Immunol. 2005; 174: 1348-1356.
- ✓ Clark MJ, Gagnon J., Williams AF and Barclay AN, *MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain*. EMBO J; 1985; 113-118.
- ✓ Coles SJ, Wang EC, Man S, Hills RK, Burnett AK, Tonks A, Darley RL; *CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia*. Leukemia 2011, 25:792-799.
- ✓ Damiani D, Michieli M, Ermacora A, Candoni A, Raspadori D, Geromin A, Stocchi R, Grimaz S, Masolini P, Michelutti A, Scheper RJ, Baccarani M. *P-glycoprotein (PGP), and not lung resistance-related protein (LRP), is a negative prognostic factor in secondary leukemias*. Haematologica 1998;83(4):290-7.
- ✓ Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, Michelutti A, Gozzetti A, Calistri E, Candoni A, Chiarvesio A, Lenoci M, Russo D, Fanin R; *The role of MDR-related proteins in the prognosis of adult acute myeloid in acute myeloid leukaemia (AML) with normal karyotype*. Hematol Oncol 2007; 25:38-43.
- ✓ Deschler B, Lübbert M. *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer. 2006 Nov 1; 107(9):2099-107.
- ✓ Ding L, Ley TJ, Larson DE et al. *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature. 2012; 481:506-10.

- ✓ Douglass J, Albertson DG, Barclay AN, Davis M, and Rabbitts PH; *RFLP and mapping of Human MOX-1 gene on chromosome 3*. Nucleic Acid Research. 1988 ; 16(18): 906.
- ✓ Estey E, Döhner H; *Acute myeloid leukemia*. Lancet. 2006 ; 368(9550):1894-90.
- ✓ Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med. 2005; 20; 352(3):254-66. Erratum in: N Engl J Med. 2005; 17;352(7):740.
- ✓ Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood. 2007; 109(3):874-85.
- ✓ Tomasello E., Ma A., Vivier E., Karre K. and Yokoyama W.M., *DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections*. J. Immunol., 2006; 15: 4981-4990.
- ✓ French A.R., Sjolin H., Kim S., Koka R., Yang L., Young D.A., Cerboni C., Tomasello E., Ma A., Vivier E., Karre K. and Yokoyama W.M., *DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections*. J. Immunol., 2006; 15: 4981-4990.
- ✓ Funato T, Harigae H, Abe S, Sasaki T. *Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia*. Expert Rev Mol Diagn. 2004; 4(5):705-13.
- ✓ Garza LA, Yang CC, Zhao T, Blatt HB, Lee M, He H, Stanton DC, Carrasco L, Spiegel JH, Tobias JW, Cotsarelis G: *Bald scalp in men with androgenetic*

alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. J Clin Invest 2011, 121:613-622.

- ✓ Gilliland DG, Griffin JD; *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 2002 ; 100(5):1532-42.*
- ✓ Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. *The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:80-97.*
- ✓ Godley LA, Larson RA. *Therapy-related myeloid leukemia. Semin Oncol. 2008 Aug;35 (4):418-29.*
- ✓ Gorczynski RM, Cattral MS, Chen Z, Hu J, Lei J, Min WP, Yu G, Ni J; *An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. J Immunol. 1999; 163(3):1654-60.*
- ✓ Gorczynski RM; *CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. Curr Opin Investig Drugs. 2005 May; 6(5):483-8.*
- ✓ Gorczynski RM, Chen Z, Hu J, Kai Y, Lei J; *Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. Clin. Exp. Immunol. 2001; 126(2), 220–229.*
- ✓ Gorczynski RM, Chen Z, Diao J, Khatri I, Wong K, Yu K, Behnke J. *Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. Breast Cancer Res Treat. 2010 Sep;123(2):405-15.*
- ✓ Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W; *Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. J Hematol Oncol. 2009; 2; 2:23.*
- ✓ Grimwade D, Gorman P, Duprez E, Howe K, Langabeer S, Olivier F, Walker H, Culligan D, Waters J, Pomfret M, Goldstone A, Burnett A, Freemont P, Sheer D,

- Solomon E; *Characterization of cryptic rearrangements and variant translocation in acute promyelocytic leukemia*. Blood 1997; 15;90(12):4876-85.
- ✓ Hatherley D. and Barclay A.N., *The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains*. Eur. J. Immunol. 2004 .; 34: 1688-1694.
 - ✓ Hoang VT, Zepeda-Moreno A, Ho AD. *Identification of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia and their clinical relevance*. Biotechnol J. 2012;7:779-88
 - ✓ Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA , Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME , Streit WJ, Brown MH, et al.; *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)*. Science 2000; 290: 1768–1771.
 - ✓ Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD; *Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor*. J Immunol. 2006; 176(1):191-9.
 - ✓ Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL; *Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2007 ; 364(4):778-82.
 - ✓ Kawasaki BT, Farrar WL *Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion*. Trends Immunol. 2008 Oct; 29(10):464-8.
 - ✓ Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, Richardson M, Carpenter MK, D'Amour KA, Kroon E et al.: *Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol 2011, 29:750-756.

- ✓ Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications*. J Clin Oncol. 2011 Feb 10; 29(5):475-86.
- ✓ McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, Ravey EP, Qin F, Bowdish KS: *Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation*. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103:1041-1046.
- ✓ Myint H, Lucie NP. *The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia*. Leuk Lymphoma. 1992;7(5-6):425-9.
- ✓ Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J, Möhler T, De Vos J, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B; *CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma*. Blood. 2006; 108(13):4194-7.
- ✓ Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B; *CD200 a putative therapeutic target in cancer*. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 366(1):117-22.
- ✓ Murray CK, Estey E, Paietta E, Howard RS, Edenfield WJ, Pierce S, Mann KP, Bolan C, Byrd JC. *CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome?* J Clin Oncol. 1999;17(1):293-7.
- ✓ Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Avvisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F. *Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol*. Leukemia 2002; 16(11):2185-9.

- ✓ Pandolfi A, Barreyro L, Steidl U. *Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells*. Stem Cells Transl Med. 2013;2:143-50
- ✓ Preston S., Wright G.J., Starr K., Barclay A.N. and Brown M.H., 1997. *The leucocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages*. Eur. J. Immunol. 27 : 1911-1918.
- ✓ Prota A.E., Campbell J.A., Schelling P., Forrest J.C., Watson M.J., Peters T.R., Aurrand-Lions M., Imhof B.A., Dermody T.S. and Stehle T., 2003. *Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 5366-5371.
- ✓ Raspadori D, Damiani D, Michieli M, Stocchi R, Gentili S, Gozzetti A, Masolini P, Michelutti A, Geromin A, Fanin R, Lauria F. *CD56 and PGP expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome*. Haematologica. 2002;87(11):1135-40.
- ✓ Rygiel TM e Meyaard L; *CD200 signaling in tumor tolerance and inflammation: a tricky balance*. Curr Opin Immunol. 2012; 24(2):233-8.
- ✓ Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang QR, Yan XJ, Gu ZH, Wang YY, Chen B, Jiang CL, Yan H, Chen FF, Chen HM, Chen Z, Jin J, Chen SJ. *Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia*. Blood. 2011 Nov 17; 118(20):5593-603.
- ✓ Siva A, Xin H, Qin F, Oltean D, Bowdish KS, Kretz-Rommel A; *Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the immunosuppressive molecule CD200*. Cancer Immunol Immunother. 2007; 57(7):987-96.
- ✓ Siva A, Xin H, Qin F, Oltean D, Bowdish KS, Kretz-Rommel A: *Immune modulation by melanoma and ovarian tumor cells through expression of the*

- immunosuppressive molecule CD200*. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:987-996.
- ✓ Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iizuka K., Furukawa H., Beckman D.L. and Pingel J.T. *Recognition of a virusencoded ligand by a natural killer activation receptor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.2002; 99: 8826-8831.
 - ✓ Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA; *Acute myeloid leukemia*. *Hematology* 2004; 98-117.
 - ✓ Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW; *WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues*. 2008 World Health Organization, 4^a Edizione.
 - ✓ Tang C, Lee AS, Volkmer JP, Sahoo D, Nag D, Mosley AR, Inlay MA, Ardehali R, Chavez SL, Pera RR et al.: *An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells*. *Nat Biotechnol* 2011; 29:829-834.
 - ✓ Talman MS; *New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005; 143-150.
 - ✓ Tonks A, Hills R, White P, Rosie B, Mills KI, Burnett AK, Darley RL; *CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia*. *Leukemia*. 2007; 21(3):566-8.
 - ✓ Tura S, Baccarani M, et al.; *Corso delle malattie del sangue e degli organi emopoietici*. 2007 ; pag. 132-152 Società Editrice Esculapio.
 - ✓ Wang L, Liu JQ, Talebian F, El-Omrani HY, Khattabi M, Yu L, Bai XF; *Tumor expression of CD200 inhibits IL-10 production by tumor-associated myeloid cells*

and prevents tumorimmune evasion of CTL therapy. Eur J Immunol 2010; 40:2569-2579.

- ✓ Webb M, Barclay AN; *Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones.* J Neurochem. 1984; 43:1061–7.
- ✓ Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia.* Cell. 2012 Jul 20; 150(2):264-78.
- ✓ Walter MJ, Shen D, Ding L et al. *Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia.* N Engl J Med. 2012;366:1090-8
- ✓ Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN; *The unusual distribution of the neuronal/ lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans.* Immunology 2001; 102:173–9.
- ✓ Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T et al.; *Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200.* J Immunol. 2003; 171:3034-3046.
- ✓ Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid*

neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009; 114(5):937-51.

- ✓ Vieites JM, De la Torre R, Ortega MA, Montero T, Peco JM, Sanchez-Pozo A, Gil A and Suarez A, 2003. *Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13.* Gene 311: 99-104.
- ✓ Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH; *Molecular mechanism of CD200 inhibition of mast cell activation.* J Immunol. 2004;173(11):6786-93.
- ✓ Zhang S. and Phillips JH. *Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation.* J. Leukoc. Biol. 2006, 79: 363-368.
- ✓ Zöchbauer S, Gsur A, Brunner R, Kyrle PA, Lechner K, Pirker R. *P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia.* Leukemia. 1994; 8(6):974.
- ✓ *Principi di citofluorimetria a flusso,* Becton Dickinson.
- ✓ <http://www.genecards.org>
- ✓ <http://atlasgeneticsoncology.org>