

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA
Direttore: Prof. Roberto Vettor
EMATOLOGIA ED IMMUNOLOGIA CLINICA
Direttore: Prof. Livio Trentin

TESI DI LAUREA
**LA CHINASI DI ADESIONE FOCALE FAK
COME NUOVO TARGET TERAPEUTICO
NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

Relatore: Prof. Livio **TRENTIN**

Dipartimento di Medicina

Correlatore: Dott.ssa Federica **FREZZATO**

Dipartimento di Medicina

Laureando: Alessandro **MARTELLA**

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABBREVIAZIONI	1
RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE	7
1.1 LEUCEMIA LINFATICA CRONICA	7
1.1.1 DEFINIZIONE.....	7
1.1.2 CENNI EPIDEMIOLOGICI.....	7
1.1.3 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO.....	8
1.1.4 BIOLOGIA E PATOGENESI.....	9
1.1.4.1 Funzione ed attivazione dei linfociti B	9
1.1.4.2 La cellula d'origine.....	10
1.1.4.3 Anomalie genetiche	12
1.1.4.4 Controllo dell'apoptosi	16
1.1.4.5 Trasduzione del segnale mediata dal BCR.....	17
1.1.4.6 Microambiente.....	20
1.1.5 PRESENTAZIONE CLINICA.....	22
1.1.6 DIAGNOSI	23
1.1.6.1 Esame morfologico su sangue periferico	24
1.1.6.2 Valutazione citofluorimetrica	25
1.1.6.3 Ulteriori esami	26
1.1.7 COMPLICANZE ED EVOLUZIONE CLINICA	27
1.1.7.1 Complicanze.....	27
1.1.7.2 Trasformazione istologica	29
1.1.8 FATTORI PROGNOSTICI.....	30
1.1.9 TRATTAMENTO	34
1.1.9.1 Progresso nel trattamento della LLC	34
1.1.9.2 I nuovi agenti a bersaglio molecolare	35
1.1.9.3 Opzioni terapeutiche alternative	39
1.1.9.4 Indicazioni al trattamento.....	39
1.1.9.5 Terapia: considerazioni generali.....	41
1.1.9.6 Linee guida per il trattamento di prima e seconda linea.....	43
1.2 CHINASI DI ADESIONE FOCALE FAK.....	49
1.2.1 STRUTTURA	49

1.2.2	ATTIVAZIONE.....	51
1.2.3	RUOLO NEL NUCLEO.....	52
1.2.4	RUOLO NEL PROCESSO NEOPLASTICO.....	52
1.2.5	INIBITORI DI FAK.....	54
2	SCOPO DELLA TESI.....	55
3	MATERIALI E METODI.....	57
3.1	PAZIENTI.....	57
3.2	ANALISI IMMUNOFENOTIPICA AL CITOFUORIMETRO.....	57
3.3	ISOLAMENTO DEI LINFOCITI B DAL SANGUE PERIFERICO.....	58
3.3.1	PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI B MEDIANTE STRATIFICAZIONE CON FICOLL/HYPAQUE.....	59
3.3.2	PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI B MEDIANTE <i>KIT ROSETTESEP</i>	60
3.4	COLTURE CELLULARI.....	61
3.5	VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE <i>WESTERN BLOTTING</i>.....	61
3.5.1	PREPARAZIONE DEI LISATI CELLULARI.....	62
3.5.2	ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS.....	62
3.5.3	<i>WESTERN BLOTTING</i>	63
3.6	VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI.....	64
3.6.1	TEST CITOFUORIMETRICO DELL'ANNESSINA V/ IODURO DI PROPIDIO.....	64
3.6.2	VALUTAZIONE DELLA PROTEINA APOPTOTICA PARP.....	65
3.7	ANALISI STATISTICA.....	65
4	RISULTATI.....	67
4.1	L'INIBITORE DI FAK (DEFACTINIB) INDUCE APOPTOSI NELLE CELLULE B DI LLC.....	67
4.2	DEFACTINIB È PIÙ EFFICACE NEI PAZIENTI A PROGNOSI SFAVOREVOLE.....	69
4.3	DEFACTINIB INIBISCE LA MIGRAZIONE MEDIATA DA CXCL12.....	71
4.4	DEFACTINIB AUMENTA L'EFFICACIA DEGLI INIBITORI DI BTK.....	72
4.5	IL MICROAMBIENTE STROMALE NON PROTEGGE LE CELLULE DI LLC DALL'APOPTOSI INDOTTA DA DEFACTINIB.....	74
5	DISCUSSIONE.....	77
	BIBLIOGRAFIA.....	81

ABBREVIAZIONI

Ag	Antigene	DLBCL	Linfoma Diffuso a Grandi Cellule
APC	Antigen Presenting Cell	ECL	Enhanced ChemiLuminescence
APRIL	Proliferation-inducing ligand	EDTA	Acido Etilendiamminotetracetico
ATM	Ataxia Teleangectasia Mutated	ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
β2-M	β2-microglobulina	FAK	Focal Adhesion Kinase
BAFF	B-cell activating factor	FAT	Focal Adhesion Targeting
Bcl-2	B Cell Lymphoma 2	FBS	Foetal Bovine Serum
BCR	B Cell Receptor	FC	Fludarabina + Ciclofosfamide
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	FCR	Fludarabina + Ciclofosfamide + Rituximab
BMSCs	Bone Marrow Stromal Cells	FERM	Band 4.1 (F), Ezrin (E), Radixin (R) and Moesin (M)
BR	Bendamustina + Rituximab	FDC	Follicular Dendritic Cell
BSA	Albumina di Siero Bovino	FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
Btk	Bruton's tyrosine kinase	FITC	Fluoresceina Isotiocianato
CD	Cluster of Differentiation	FRNK	FAK-Related-Non-Kinase
CDR	Complementarity Determining Region	FSC	Forward Scatter
CFD	Cellule Follicolari Dendritiche	GAPDh	Gliceraldeide-3-fosfato Deidrogenasi
CG	Centro Germinativo	HLA	Human Leucocyte Antigen
CIRS	Cumulative Illness Rating Scale	HSC	Hematopoietic Stem Cell
CK	Complex Karyotype	HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
CXCL	C-X-C motif Ligand Chemokine	HS1	Hematopoietic Lineage Cell Specific Protein-1
CXCR	C-X-C Chemokine Receptor	HS-5	Human Stromal Cell Line

IAP	Inhibitor of Apoptosis	PBMCs	Periferal Blood Mononuclear Cells
Ig	Immunoglobuline	PBS	Phosphate Buffered Saline
IGHV	Immunoglobulin Variable Heavy chain region	PE	Ficoeritrina
IPI	International Prognostic Index	PFS	Progression Free Survival
LDh	Lattico Deidrogenasi	PI	Ioduro di Propidio
LLC	Leucemia Linfatica Cronica	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Lyn	Lck/Yes-related novel protein Tyrosine kinase	PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue	PS	Performance Status
MAP	Mitogen-Activated Protein	PTP	Proteine Tirosin-Fosfatasi
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	RS	Sindrome di Richter
MBL	Monoclonal B-cell Lymphocytosis	SDS	Sodio Dodecil Solfato
MDM2	Murine Double Minute 2	SMH	Somatic Hypermutation
MHC	Major Histocompatibility Complex	SNP	Single Nucletide Polymorphism
MRD	Minimal Residual Disease	SSC	Side scatter
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	SYK	Spleen Tyrosine Kinase
MYD88	Myeloid Dyfferentiation Primary Response	TBS	Tris Buffered Saline
NES	Nuclear Export Signal	TCR	T-Cell Receptor
NF-kB	Nuclear Factor kB	TLR	Toll-like receptor
NK	Natural Killer	TNF	Tumor Necrosis Factor
NLC	Nurse-Like Cell	Th	Linfocita T helper
NLS	Nuclear Localization Signal	TTFT	Time To First Treatment
OS	Overall Survival	TWEEN	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	ZAP-70	Zeta-Associated Protein of 70 kDa
PARP	Poli-ADP-Ribosio Polimerasi		

RIASSUNTO

PRESUPPOSTI DELLO STUDIO. La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è una malattia linfoproliferativa caratterizzata dall'accumulo clonale di linfociti B CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺ nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfoidi secondari. La patogenesi della LLC coinvolge fattori implicati nella deregolazione dell'apoptosi e nell'alterato *signalling* del recettore per l'antigene delle cellule B (*B-cell receptor*, BCR). Il decorso della malattia è molto eterogeneo e può variare da una condizione indolente ad una forma molto aggressiva; per questo motivo è fondamentale indentificare nuove caratteristiche della patologia che possano fornire indicazioni sulla prognosi dei pazienti così come nuovi bersagli per ampliare l'armamentario terapeutico contro questa malattia. Ibrutinib, inibitore della *Bruton's tyrosine kinase* (Btk), ha migliorato in modo significativo la gestione della patologia, dimostrando un'elevata efficacia anche nei pazienti ad alto rischio e chemio-refrattari. Tuttavia, lo sviluppo di resistenza a questo farmaco determina esiti clinici sfavorevoli per la mancanza di alternative terapeutiche efficaci. La ricerca di molecole coinvolte nell'aumentata sopravvivenza e nella resistenza ai farmaci delle cellule B leucemiche è, per questo, sempre più attuale.

SCOPO DELLA TESI. Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare gli effetti dell'inibizione di FAK sulle cellule di LLC utilizzando Defactinib, un inibitore di questa chinasi attualmente in fase di valutazione per potenziali terapie di combinazione per vari tumori solidi, che inibisce la fosforilazione di FAK a livello della tirosina attivatoria Y397.

METODI. Per studiare il ruolo di FAK nella sopravvivenza delle cellule leucemiche, abbiamo trattato i linfociti B ottenuti da pazienti con diagnosi di LLC con Defactinib da solo o in combinazione con gli inibitori di Btk (Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib), tutti alla concentrazione di 5 μ M. Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti utilizzando le cellule di LLC in co-coltura con cellule stromali HS-5, in rapporto 20:1. Nelle diverse condizioni sperimentali, abbiamo valutato la vitalità delle cellule mediante test citofluorimetrico dell'Annessina V/Ioduro di Propidio. Il *pattern* proteico dopo trattamento è stato valutato tramite *Western blotting* utilizzando anticorpi anti-PARP, anti-FAK, anti-FAK-Y397, anti-

actina e anti-GAPDH. La conta delle cellule migrate dopo stimolo con CXCL12 200nM e con/senza pre-trattamento con Defactinib è stata valutata al citofluorimetro

RISULTATI. Le nostre analisi hanno dimostrato che il trattamento con Defactinib è in grado di *down*-regolare sia l'espressione che l'attivazione (in termini di fosforilazione al sito Y397) nelle cellule leucemiche. È inoltre in grado di prevenire la migrazione delle cellule di LLC indotta da CXCL12. Per quanto riguarda la vitalità cellulare, l'inibizione di FAK ha indotto un'apoptosi significativa delle cellule di LLC, specialmente nei pazienti a prognosi sfavorevole (con geni IGHV non mutati). Gli esperimenti che hanno visto l'utilizzo degli inibitori di Btk in combinazione con Defactinib hanno dimostrato un maggiore effetto di induzione dell'apoptosi nelle combinazioni rispetto ai farmaci somministrati singolarmente. Dagli esperimenti di co-coltura con le cellule stromali, note per proteggere le cellule di LLC dall'apoptosi spontanea e da quella indotta da farmaci, abbiamo messo in evidenza come il microambiente stromale non sia in grado di proteggere le cellule di LLC dall'apoptosi indotta da Defactinib. Inoltre, abbiamo dimostrato che Defactinib agisce anche sull'espressione e attivazione di FAK delle cellule stromali e questo potrebbe essere evidenziato da modifiche a livello delle adesioni focali per cui verrebbe meno il contatto cellula-cellula e quindi l'effetto pro-sopravvivenza dello stroma verso la cellula B neoplastica.

CONCLUSIONI. Con i nostri risultati abbiamo dimostrato l'efficacia di Defactinib nell'inibire FAK e nell'indurre, da solo o in combinazione con gli inibitori di Btk, l'apoptosi nelle cellule B leucemiche *in vitro*, anche in condizioni che ne favorirebbero la sopravvivenza, offrendo la possibilità di considerare questa proteina un ottimo bersaglio al fine di sviluppare nuove strategie terapeutiche per la LLC.

ABSTRACT

BACKGROUND. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disorder characterized by the accumulation of CD19 + /CD5 + /CD23 + clonal B cells in peripheral blood, bone marrow and lymphoid organs. CLL pathogenesis involves factors implicated in the deregulation of apoptosis and in an impaired B-cell antigen receptor (BCR) signaling. The course of the disease is very heterogeneous and varies from indolent conditions to very aggressive forms; for this reason, the identification of new characteristics of the disease is of great importance, to provide indications on the prognosis as well as to set new therapeutic targets against this disease. The Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor, Ibrutinib, has significantly improved disease management, demonstrating high efficacy even in high-risk and chemo-refractory patients. However, the development of resistance to this drug leads to unfavorable clinical outcomes due to the lack of effective therapeutic alternatives. The search for molecules involved in the increased survival and drug resistance of leukemic B cells is, therefore, a topic of increasing relevancy.

AIM OF THE STUDY. The aim of this study was to evaluate the effects of FAK inhibition on CLL cells by using Defactinib, an inhibitor of this kinase currently under-experimentation for combination therapies in various solid tumours, which specifically inhibits FAK phosphorylation at activatory Y397.

METHODS. To study the role of FAK in leukaemia cell survival, we treated B lymphocytes obtained from CLL-diagnosed patients with Defactinib alone or in combination with Btk inhibitors (Ibrutinib, Acalabrutinib, and Zanubrutinib), all at a concentration of 5 μ M. The same experiments were performed using CLL cells co-cultured with HS-5 stromal cells, at a ratio of 20:1. Under different experimental conditions, we evaluated the viability of CLL cells using Annexin V/Propidium Iodide flow cytometric test. Proteic pattern after treatment was evaluated by Western blotting using anti-PARP, anti-FAK, anti-FAK-Y397, anti-actin and anti-GAPDH antibodies. Migrated cells after stimulation with 200nM CXCL12 and with/without pre-treatment with Defactinib have been counted by flow cytometry.

RESULTS. Our results demonstrated that Defactinib treatment can down-regulate both FAK expression and activation (in terms of phosphorylation at Y397) in leukemic cells. Defactinib is also able to prevent CLL cell migration induced by CXCL-12. In concern of cell viability is concerned, the inhibition of FAK induced significant apoptosis of CLL cells, especially in poor prognosis patients (with unmutated IGHV genes). Experiments involving the use of Btk inhibitors in combination with Defactinib demonstrated a greater apoptotic effect in the combinations compared to drugs administered alone. Co-culture experiments of CLL B cells with stromal cells, known to protect CLL from both spontaneous and drug-induced apoptosis, revealed that the stromal microenvironment failed to protect CLL cells from Defactinib-induced apoptosis. Furthermore, we demonstrated that Defactinib also affects the expression and activation of FAK in stromal cells, that could be explained by changes at the level of focal adhesions, that consequently reduce the cell-to-cell contact and therefore the pro-survival effect of stroma towards neoplastic B cells.

CONCLUSIONS. Our findings reported the efficacy of Defactinib in inhibiting FAK and in inducing, alone or in combination with Btk inhibitors, the *in vitro* apoptosis of leukemic B cells, even under conditions that would favour their survival, thus offering the possibility to consider this protein as an excellent target for developing new CLL therapeutic strategies.

1 INTRODUZIONE

1.1 LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

1.1.1 DEFINIZIONE

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è un disordine linfoproliferativo cronico acquisito che si caratterizza per la presenza di un'iperproliferazione clonale di linfociti B maturi che co-esprimono CD5 e CD23 e sono presenti nel sangue periferico con una concentrazione superiore o uguale a $5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Tali cellule, oltre che nel sangue periferico, si accumulano anche nel midollo e nei linfonodi, provocando una sintomatologia tipica caratterizzata da linfocitosi, linfadenomegalia, splenomegalia e segni di infiltrazione midollare. (1)

La classificazione della WHO (*World Health Organization*) inserisce la LLC tra le neoplasie dei linfociti B maturi e la distingue dal linfoma a piccole cellule (SLL) in quanto quest'ultimo non provoca sintomi di tipo leucemico e presenta una concentrazione di linfociti B nel sangue periferico minore di $5 \times 10^3/\mu\text{l}$. (2) È inoltre importante distinguere la LLC, che interessa esclusivamente i linfociti B maturi, dalla Leucemia Prolinfocitica a Cellule T (T-LLC), causata invece da un'iperproliferazione di linfociti T. (3)

1.1.2 CENNI EPIDEMIOLOGICI

La LLC è la leucemia con maggiore prevalenza negli adulti dei paesi Occidentali, con 4,9 nuovi casi ogni 100.000 abitanti/anno. All'interno di questa popolazione esistono delle differenze statistiche legate al sesso con un'incidenza di malati nei maschi di 6,8 casi per 100.000 abitanti/anno e nelle femmine di 3,5 casi per 100.000 abitanti/anno, risultante in un apporto M:F di 1,95.

La mediana dell'età alla diagnosi è di 72 anni: il 70% delle diagnosi riguarda pazienti di età compresa tra 65-79 anni, mentre il 15% è posto in pazienti con meno di 55 anni. Negli ultimi anni si sta assistendo ad un aumento della prevalenza nei soggetti giovani a causa della maggiore frequenza degli *screening* ematochimici. Mentre l'incidenza della patologia è rimasta stabile negli ultimi 20 anni, la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi si attesta intorno all'87,2% negli Stati Uniti

e al 74% in Italia (dati del 2021), in netto aumento rispetto al 1975, quando tale valore era del 65,1%. Allo stesso tempo, la mortalità dei pazienti affetti da LLC è in aumento come conseguenza dell'invecchiamento generale della popolazione globale. (4)

La LLC ha un andamento interindividuale molto eterogeneo e pur presentando un'evoluzione indolente e stabile, non è infrequente un suo comportamento sintomatico ed aggressivo con il potenziale rischio di trasformazione in linfoma aggressivo, tipicamente il Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B (DLBCL), attraverso un'evoluzione nota come Sindrome di Richter (RS). (5)

1.1.3 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

La LLC è una patologia con eziologia attualmente non nota, tuttavia alcune evidenze permettono di ipotizzare che alla base del suo sviluppo ci sia un'interazione tra fattori genetici ed ambientali. Una testimonianza del ruolo eziologico dei fattori genetici può essere trovata nel fatto che la sua prevalenza è minore nella popolazione Asiatica, ad esempio in Corea e Giappone, e come tale prevalenza resti ridotta anche in soggetti Asiatici migrati in paesi Occidentali. (1)

La familiarità è un altro aspetto che permette di avvalorare il ruolo dei fattori genetici in quanto i soggetti che possiedono un familiare di primo grado affetto da LLC hanno un rischio 8,5 volte maggiore rispetto alla popolazione generale di sviluppare a loro volta la patologia. Allo stesso tempo, gli studi effettuati su gemelli monozigoti hanno dimostrato che essi hanno una maggiore concordanza rispetto ai gemelli dizigoti. (6) Dopo tali riscontri, sono stati effettuati degli studi finalizzati alla definizione di loci specifici a cui potesse essere attribuito il ruolo di *promoter* dello sviluppo della patologia, ma la mancanza di risultati significativi ha unicamente permesso di determinare che la responsabilità sia da attribuire ad una co-ereditarietà di diverse varianti genetiche a basso rischio. Studi di associazione di tipo *Genome - Wide* hanno permesso di individuare dei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) presenti nei soggetti affetti da LLC a livello di geni verosimilmente associati alla malattia, come alcuni geni coinvolti nei meccanismi di apoptosi (FAS, Bcl-2, CASP8/CASP10), nella regolazione dei telomeri (POT1, TERT e TERC) e nel processo di sviluppo, differenziazione e attivazione dei linfociti B e del BCR (IRF3 e HLA-DQA1). (6)

Per quanto riguarda i fattori ambientali, ci sono meno evidenze circa il loro ruolo patogenetico. I principali fattori per cui alcuni studi sembrano aver trovato correlazione con un rischio aumentato di sviluppo di LLC sono quelli di ambito agricolo, la ridotta esposizione solare, una storia personale di patologia atopiche e di infezioni respiratorie. (7) (8)

1.1.4 BIOLOGIA E PATOGENESI

1.1.4.1 Funzione ed attivazione dei linfociti B

Per comprendere in modo esaustivo la patogenesi della LLC è necessario prima illustrare la fisiologia e le caratteristiche del linfocita B.

Il linfocita B è una cellula che, nella specie umana, si sviluppa all'interno del midollo osseo ed esprime immunoglobuline (Ig) di superficie in grado di riconoscere e legare specificatamente gli epitopi espressi dagli antigeni. Essi sono le cellule responsabili anche della produzione degli anticorpi circolanti e, quindi, dell'immunità adattativa di tipo umorale. I linfociti B derivano dalle cellule ematopoietiche staminali (HSCs) presenti nel midollo osseo da dove vengono, in seguito, immessi in circolo: in questa fase vengono definiti linfociti B "naïve", in quanto per raggiungere lo stato di cellule immunocompetenti devono prima attraversare dei processi di maturazione e differenziazione negli organi linfoidi secondari (linfonodi, anello di Waldeyer e tessuto linfoide associato alle mucose – MALT –).

Per completare l'attivazione dei linfociti B sono necessari due *step* successivi. Il primo è rappresentato dal legame tra antigene e recettore delle cellule B (BCR, *B-cell receptor*), a cui segue l'endocitosi del complesso antigene-anticorpo, che viene poi digerito al fine di creare un complesso con le molecole di MHC (*major histocompatibility complex*) di tipo II (MHCII) a livello della superficie cellulare del linfocita B. Il secondo *step* prevede che il linfocita B "naïve" agisca come cellula APC (*antigen presenting cell*) e presenti, appunto, l'antigene grazie al suo MHCII al linfocita T *helper* (Th, CD4+), il quale mediante il suo recettore TCR (*T-cell receptor*) riconosce il complesso. Successivamente all'interazione tra TCR e MHCII, il linfocita T esprime in superficie il CD40L, che lega il suo recettore CD40 espresso dal linfocita B, dando così un segnale che permette di continuare la proliferazione e la differenziazione del linfocita B.

Oltre all'appena descritta attivazione "T-dipendente", il linfocita B può andare incontro anche ad un processo "T-indipendente": in questo caso il secondo *step* è stabilito dalla presenza di antigeni multivalenti che presentano ripetizioni di determinanti antigenici, come polisaccaridi, glicolipidi e acidi nucleici, che permettono alle cellule B di proliferare in assenza di linfociti Th.

Questi processi di attivazione e proliferazione avvengono all'interno degli organi linfoidi secondari in cui i linfociti B proseguono la loro differenziazione in centroblasti e poi in centrociti, formando il centro germinativo (GC). È in questa fase della maturazione che i geni che codificano per la porzione variabile della catena pesante delle Ig sviluppano delle mutazioni puntiformi, definite ipermutazioni somatiche, che danno origine a una popolazione di cloni caratterizzata da una diversa affinità per l'antigene. Le cellule follicolari dendritiche (CFD) hanno infine il compito di valutare tale affinità, poiché presentano sulla loro membrana l'antigene e, stabilendo un contatto con i diversi cloni, selezionano unicamente quelli che presentano maggiore affinità, favorendo l'apoptosi dei linfociti B a minore affinità. I linfociti B selezionati proseguono il loro processo di maturazione effettuando lo *switch* dell'isotipo, iniziando cioè a produrre Ig diverse dalle IgM (le prime ad essere prodotte).

Il processo evolutivo del linfocita B lo porta a differenziarsi in uno dei due seguenti tipi cellulari:

- plasmacellula: linfociti B che ritornano al midollo osseo, dove hanno il compito di produrre anticorpi fino all'esaurimento dello stimolo antigenico (risposta primaria);
- cellula della memoria: linfociti B che permangono nel sangue periferico a lungo termine e che sono in grado di produrre anticorpi nel caso in cui entrassero nuovamente in contatto con l'antigene, permettendo una risposta immunitaria più veloce e adeguata (risposta secondaria). (9)

1.1.4.2 La cellula d'origine

L'origine cellulare della LLC non è stata ancora stabilita con certezza, tuttavia le ipotesi più accreditate individuano le prime alterazioni genetiche ed epigenetiche, che favoriscono lo sviluppo della patologia, già a livello della cellula staminale ematopoietica multipotente ed autorinnovantesi, la HSC. (10) Secondo questa teoria, al principio delle mutazioni vi sono probabilmente delle aggiunte o

perdite di materiale genetico (*early drivers*) a carico della HSC, a cui possono seguire ulteriori alterazioni (*intermediate* e *late drivers*) che sembra abbiano l'effetto di definire l'entità dell'aggressività della LLC.

Le mutazioni *early drivers* indirizzano le cellule d'origine verso *pathway* di differenziazione linfocitaria di tipo B, provocando un'iperproliferazione policlonale di progenitori precoci B. Il *pathway* di maturazione e differenziazione di questi cloni procede con l'esposizione antigenica, che permette la selezione e l'ampliamento di un *pool* oligoclonale di cellule mature. Infine, nuove mutazioni genetiche ed epigenetiche, la stimolazione del BCR e i segnali prodotti dal microambiente portano inizialmente allo sviluppo di una linfocitosi B monoclonale (MBL, *Monoclonal B-cell Lymphocytosis*), che può evolvere in LLC. (11)

In base alla presenza o assenza di mutazioni nei geni codificanti per la regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) si possono distinguere due tipi di pazienti affetti da LLC:

- sottotipo “*mutated*” (M-LLC): le sequenze codificanti dei geni IGHV presentano delle ipermutazioni somatiche (SMH+), sviluppatasi in cellule che sono già transitate nel CG di un organo linfoide secondario e hanno quindi già completato la maturazione T-dipendente, la selezione per affinità e lo *switch* isotipico, similmente a ciò che avviene per i linfociti B non patologici; rappresenta il 60-65% delle diagnosi;
- sottotipo “*unmutated*” (U-LLC): sono assenti le ipermutazioni somatiche (SMH-), trattandosi in questo caso di cellule che non sono maturate nel CG e che hanno seguito un *pathway* di attivazione T-indipendente, in cui il segnale antigenico (prodotto probabilmente da un autoantigene, da un antigene polisaccardico o da un superantigene) non è in grado di stimolare lo *switch* isotipico; rappresenta il 35-40% delle diagnosi.

L'evidenza del diverso meccanismo di origine delle due tipologie di cellule patologiche si riscontra anche nell'espressione antigenica, in quanto le popolazioni SMH+, post-CG, sono CD5+/CD27+ (paragonabili ad un linfocita B della memoria sano), mentre le cellule SMH- sono CD5+/CD27-, *pattern* tipico di cellule pre-CG, come i linfociti B naïve (Figura 1). Questa distinzione al momento della diagnosi si rivela molto importante in quanto la presenza o l'assenza delle mutazioni si riflette in maniera determinante sulla prognosi (cfr. 1.1.8). (12) (13) (14)

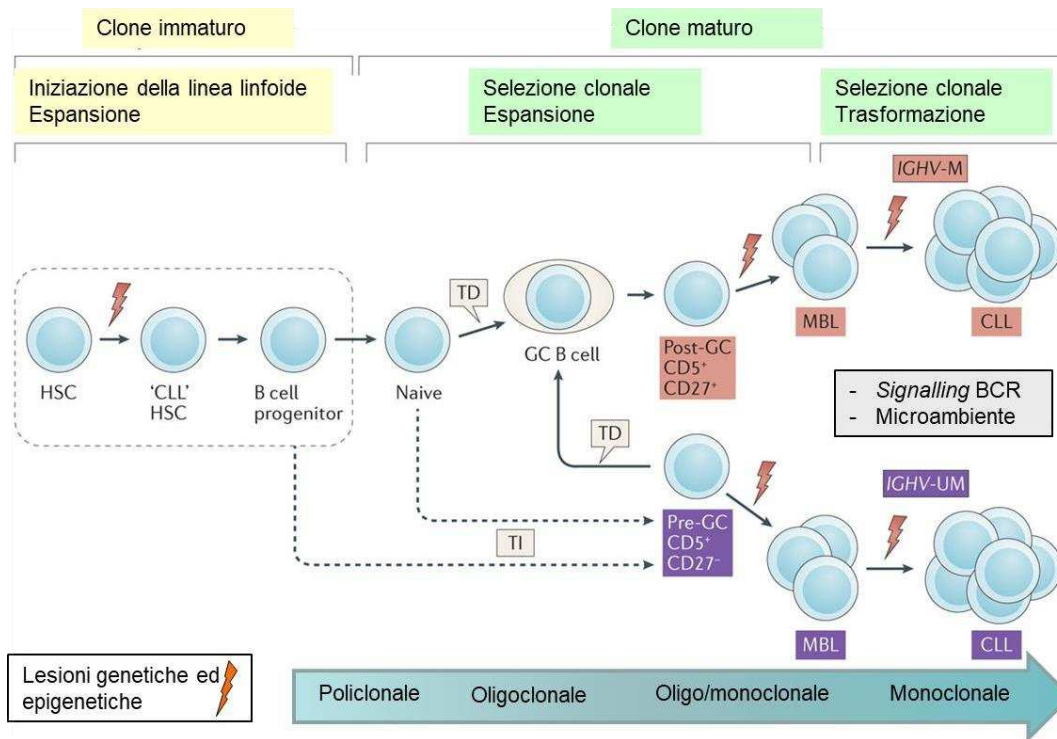


Figura 1. L'origine cellulare della Leucemia Linfatica Cronica. Le cellule di LLC potrebbero originare dallo stadio di cellula staminale, come dimostrato dalla capacità delle cellule staminali ematopoietiche derivate da LLC di impiantarsi, in seguito a xenotrapianto, in topi immunodeficienti. Le HSC di LLC potrebbero seguire la linea maturativa di tipo B acquisendo lesioni genetiche ed epigenetiche, di natura tuttora ignota, e giungere alla generazione di una popolazione oligoclonale in seguito a stimolazione antigenica; la cellula M-LLC sembra originare, quindi, da una cellula $CD5^+/CD27^+$, antigeni caratteristicamente espressi da una cellula post-centro germinativo (GC). La cellula U-LLC, invece, sembra derivare da una cellula pre-GC di tipo $CD5^+/CD27^-$, che potrebbe derivare da una cellula B naïve o da una diversa linea di precursori di cellule B. (CG: centro germinativo, HSC: hematopoietic stem cell, IGHV-M: geni IGHV mutati, IGHV-UM: geni IGHV non mutati, MBL: monoclonal B lymphocytosis, TD: antigene T-dipendente, TI: antigene T-indipendente (adattato da Fabbri, Dalla Favera et al., 2016). (15)

1.1.4.3 Anomalie genetiche

Tra i diversi processi biologici che portano allo sviluppo della LLC, un ruolo decisivo è ricoperto dalle anomalie cromosomiche ricorrenti, che vengono riscontrate nell'80% dei pazienti e sono fondamentali per definire sia la patogenesi che la prognosi.

Le attuali informazioni sono state ottenute con indagini di tipo *Genome-wide-sequencing* e riguardano le alterazioni del cariotipo, in particolare traslocazioni cromosomiche bilanciate o non bilanciate, che causano perdite o acquisizioni di materiale. Questi modelli sottolineano come inizialmente avvengano delle mutazioni specifiche che promuovono l'insorgenza della patologia, a cui poi seguono nuove alterazioni che segnano il decorso della malattia, determinando l'aggressività e/o la resistenza alle terapie. (14) (16).

Le principali anomalie cromosomiche riscontrate nella LLC sono (Figura 2):

- Delezione del braccio lungo del cromosoma 13 (del(13q14)): è presente in circa il 55% dei pazienti, nell'80% dei casi è monoallelica e frequentemente è l'unica aberrazione cariotipica riscontrata. L'effetto associato è la mancata trascrizione dei microRNA miR-15a e miR-16-1, condizione definita come driver precoce per lo sviluppo della patologia. L'importanza di questi microRNA nell'omeostasi cellulare è sottolineata dalla loro elevata espressione nelle cellule B wild-type, ovvero linfociti B non patologici, e dal fatto che la stessa delezione è presente in percentuali simili anche in altre neoplasie, tra tutte il tumore alla prostata e il linfoma mantellare. miR-15a e miR-16-1 hanno principalmente il ruolo di inibitori di Bcl-2, un oncogene che stimola la proliferazione ed inibisce la morte cellulare, perciò una loro ridotta o assente attività implica direttamente una minore apoptosi. Un ulteriore compito svolto da questi microRNA è quello di sfavorire il passaggio dallo stato G0 allo stato G1 del ciclo cellulare, altro meccanismo che risulta deregolato e che correla con un'umentata proliferazione quando è presente questo tipo di delezione. (16) (17) (18) I pazienti che presentano unicamente questo tipo di mutazione hanno una prognosi migliore rispetto a tutti gli altri, anche a quelli con cariotipo inalterato. (19)
- Trisomia 12 (12+): viene riscontrata nel 20% dei casi di LLC e rappresenta la più frequente acquisizione di materiale cromosomico. Questa mutazione provoca una iperespressione del gene MDM2, codificato nella regione 12q13-15, il cui prodotto lega TP53 e ne aumenta la degradazione attraverso un maggiore segnale pro-ubiquitinazione. (20) Inoltre, questa aberrazione è associata a mutazioni di NOTCH1 (20%), soprattutto nei pazienti SMH- (41,9%). (21)
- Delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (del(11q22-23)): rilevata nel 10-20% dei pazienti con LLC, questa mutazione cromosomica provoca un'alterazione a carico del gene dell'ataxia teleangectasia (ATM), un importante regolatore dei meccanismi di riparazione del DNA. (22)
- Delezione del braccio corto del cromosoma 17 (del(17p13)): nonostante sia presente al momento della diagnosi in meno del 10% dei pazienti, la sua importanza prognostica è tuttavia particolarmente rilevante, soprattutto perché

solitamente si presenta durante il decorso della patologia, in particolare nei pazienti refrattari alla chemioterapia (in cui compare nel 50% dei casi), e perché riduce notevolmente la sopravvivenza. Questa alterazione interessa direttamente il gene TP53, che non è più in grado di codificare correttamente la propria proteina p53, un fondamentale oncosoppressore. I pazienti che presentano questa delezione sono quelli a prognosi peggiore. (23)

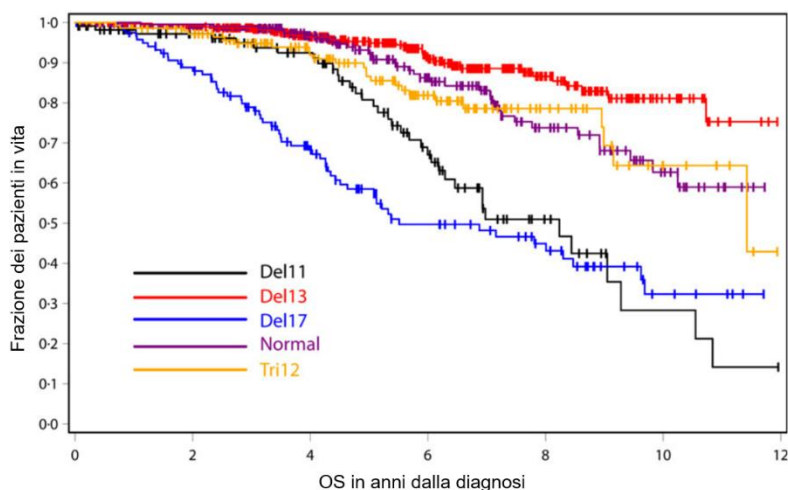


Figura 2. Probabilità di sopravvivenza dal momento della diagnosi nei pazienti facenti parte delle cinque categorie genetiche. La sopravvivenza è maggiore nei pazienti con del(13) e nei pazienti con cariotipo normale. I pazienti con del(11) hanno una sopravvivenza media di 8 anni, mentre nei pazienti con del(17) è di 6 anni. I pazienti inseriti nello studio sono stati sottoposti ad analisi FISH entro 4 anni dal momento della diagnosi (adattato da Van Dyke et al, 2016). (24)

Oltre alle finora citate alterazioni cromosomiche, nella patogenesi della LLC ricoprono un ruolo importante anche le mutazioni somatiche, tra cui le più ricorrenti sono:

- Mutazione di NOTCH1: presente nel 12% dei pazienti affetti da LLC, provoca la comparsa di un codone di stop prematuro nel gene di NOTCH1 che impedisce la corretta trascrizione del dominio C-terminale della proteina. La proteina tronca non viene riconosciuta dal proteasoma e conseguentemente non viene degradata, accumulandosi nella cellula. (25) NOTCH1 mutata è costitutivamente attiva e, tra i diversi effetti, aumenta la sintesi di c-MYC, oncogene con funzioni proliferative e anti-apoptotiche. (26)
- Mutazione di XPO1: è un gene codificante per *exportin-1*, una proteina coinvolta nell'*export* proteico e di varie tipologie di RNA attraverso la membrana nucleare. La mutazione colpisce il 5% dei pazienti, provocando un'aumentata espressione di XPO-1, che correla con un'alterazione dell'omeostasi nucleare, poiché aumenta l'estrusione degli oncosoppressori dal

nucleo e altera i processi mitotici. (27)

- Mutazione di MYD88: si riscontra in meno del 10% dei casi di LLC, soprattutto nelle M-LLC (SMH+) e se è contemporaneamente presente anche la delezione del cromosoma 13. Il ruolo di questa proteina è di modulare le vie di *signalling* del recettore di IL1 (IL1R), dei *Toll-Like Receptor* (TLR), del *Nuclear Factor κ chain transcription in B cells* (NF- κ B). Gli effetti della mutazione riguardano un aumento della produzione di citochine (IL6, IL10, CCL2, CCL3 e CCL4), dei segnali pro-sopravvivenza e del reclutamento di cellule infiammatorie (principalmente macrofagi e linfociti T), tutti meccanismi sinergici in grado di creare una nicchia favorevole a ridurre l'apoptosi delle cellule neoplastiche. In generale, la sopravvivenza dei pazienti SMH+ che presentano una mutazione di MYD88 è minore rispetto ai pazienti privi della mutazione. (25) (28)
- Mutazione di BIRC3 (*baculoviral IAP repeat containing 3*): si tratta di un *down*-regolatore di NF- κ B ed è alterato in meno del 5% dei pazienti. Tale mutazione si associa ad una perdita di funzione della proteina, con conseguente aumento di *signalling* di NF- κ B, associato ad aumentata velocità di progressione della LLC. (29)
- Mutazione di SF3B1 (*splicing factor 3b subunit 1*): si tratta di una subunità catalitica dello spliceosoma che risulta mutata in circa il 10% dei pazienti, in cui compromette l'attività di *splicing* e altera quindi molti meccanismi cellulari. In particolare sembra associarsi specificatamente a variazioni dell'attività di p27, STK6 e MDM2, tutti fattori associati alla regolazione del passaggio dalla fase G0 alla fase G1. (30)

Infine, in aggiunta alle aberrazioni cromosomiche e alle mutazioni somatiche, anche le variazioni epigenetiche, ovvero alterazioni dei sistemi che comprendono diverse molecole in grado di rendere accessibili o meno specifiche porzioni del DNA, ricoprono un importante ruolo nella patogenesi della LLC, in particolare a livello della regolazione applicata dai microRNA. Oltre ai già citati miR-15a e miR-16-1, durante il decorso della malattia è stata misurata anche una ridotta espressione di miR-29c e miR-223 (31), mentre una prognosi peggiore è stata riscontrata in pazienti con aumentato miR-21 e diminuito miR-181b. (32)

1.1.4.4 Controllo dell'apoptosi

Per apoptosi si intende un meccanismo di morte cellulare programmata avviato dall'integrazione di segnali intra- ed extra-cellulari e portato avanti da una cascata di vie di segnalazione cellulare. Si distingue dalla necrosi in quanto l'apoptosi è un processo attivo e controllato, utilizzato dalle cellule nel momento in cui il DNA risulta eccessivamente danneggiato dall'accumulo di mutazioni. Questi meccanismi sono perciò considerati fondamentali per il mantenimento della corretta struttura genetica e per la prevenzione della proliferazione neoplastica. È da tempo noto come eventuali alterazioni del processo apoptotico siano direttamente responsabili dello sviluppo tumorale, anche nel caso della LLC. (33)

Il processo apoptotico comprende due vie principali di attivazione che si congiungono in una via terminale comune. La via estrinseca è avviata dal legame tra ligandi di morte extracellulari (TNF, Fas-L, TRAIL) e i loro recettori di membrana (TNF-R, Fas, DR-4), a cui fa seguito il reclutamento di molecole adattatrici che trasmetteranno il segnale di apoptosi all'interno della cellula. La via intrinseca è invece iniziata da diversi segnali di stress intracellulare, come l'eccessivo danneggiamento del DNA, l'aumento della concentrazione dei ROS e danni mitocondriali, che si integrano a livello della membrana mitocondriale, dove si instaura un processo regolato dalle proteine della famiglia di Bcl-2, composta sia da fattori pro-apoptotici (come Bax, Bak, Bim, Puma, Bid, Bad, Noxa) sia anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1), e che ha come punto cardine la formazione di un poro (il poro di transizione della permeabilità, PTP) sulla membrana mitocondriale, attraverso il quale il citocromo C accede al citoplasma e permette l'attivazione delle pro-caspasi. A questo punto comincia un processo a cascata in cui le due vie apoptotiche si uniscono e che permette di mantenere una corretta omeostasi cellulare e tissutale.

La LLC è causata da un accumulo nel sangue periferico e nel midollo di linfociti B quiescenti non in grado di attuare l'apoptosi, poiché sono presenti sia mutazioni a livello dei meccanismi appena descritti sia un microambiente pro-neoplastico che fornisce costitutivamente dei segnali di proliferazione. In particolare, si riscontra una maggiore espressione delle proteine pro-apoptotiche Bcl-2 e Mcl-1 associata ad alterazioni dei fattori di regolazione della sopravvivenza cellulare come p53, NF-kB, IAPs e PI3K (Figura 3). (34)

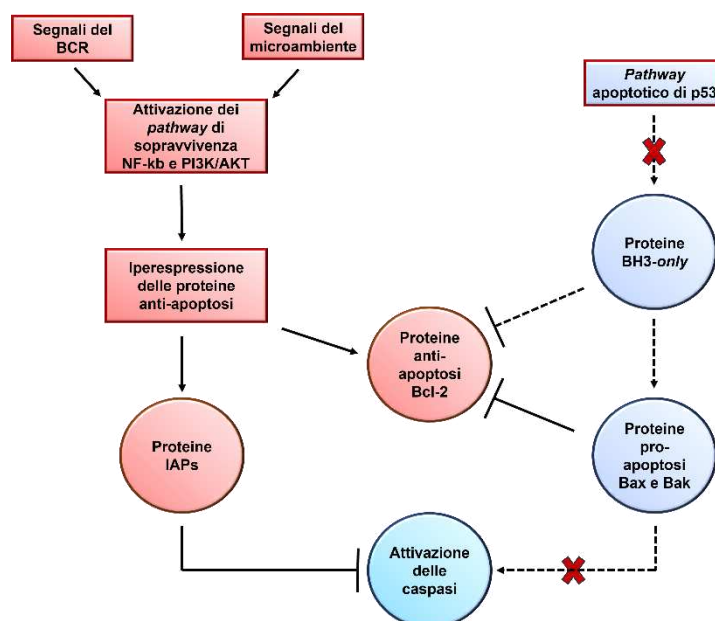


Figura 3. Rappresentazione schematica della compromissione dell'apoptosi caspasi-dipendente nelle cellule della LLC. I fattori anti-apoptotici sono colorati in rosso e le componenti pro-apoptotiche sono colorate in blu. L'attivazione costitutiva delle vie di sopravvivenza da parte degli stimoli del microambiente e delle vie di signaling del BCR portano all'attivazione della trascrizione dei fattori pro-sopravvivenza appartenenti alle famiglie di Bcl-2 e IAP, che risultano quindi iperespresse nelle cellule di LLC. L'aumento dell'attività antiapoptotica favorita da questi fattori porta a (i) sequestro delle proteine proapoptotiche Bax e Bak (cioè impedisce la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e la conseguente attivazione della cascata delle caspasi) e (ii) inibizione diretta dell'attività caspasi da parte delle proteine IAP. Inoltre, i deficit di p53 (frequentemente osservati nella LLC) riducono l'espressione delle proteine della famiglia BH3-only come Puma e Noxa (in grado di bloccare l'attività antiapoptotica delle proteine pro-sopravvivenza della famiglia Bcl2 e di promuovere l'attivazione di Bax e Bak) (adattato da Billard, 2013). (34)

Oltre al ruolo nella patogenesi, queste alterazioni sembrano giocare un ruolo anche nella prognosi della LLC. È stato osservato che un maggiore rapporto Bcl-2/Bax (segno di maggiore espressione di Bcl-2) nelle cellule patologiche rispetto ai valori fisiologici è un segno di resistenza all'apoptosi, mentre la sovraespressione di Mcl-1 si associa a una neoplasia più aggressiva e meno suscettibile alle terapie. (35)

1.1.4.5 Trasduzione del segnale mediata dal BCR

Il processo di attivazione, maturazione e proliferazione del linfocita B attraversa una tappa fondamentale nel momento in cui il BCR riconosce e lega un determinato antigene: questo legame è altamente specifico, in quanto ogni linfocita B presenta sulla propria superficie cellulare un elevatissimo numero di BCR differenti, caratteristica che permette al sistema immunitario (SI) di poter riconoscere velocemente un elevato numero di antigeni *non-self*. (9)

La struttura del BCR è composta da un complesso transmembrana rappresentato da un'immunoglobulina (può essere di una qualsiasi classe: M, D, G, E e A, in ordine di frequenza) che si associa in modo non covalente all'eterodimero $Ig\alpha-Ig\beta$ (conosciuto anche come CD79a-CD79b), il quale presenta una porzione intracitoplasmatica che contiene dei domini di attivazione tirosinici. (36)

Il legame BCR-antigene attiva delle vie di *signalling* che portano alla fosforilazione dei sopracitati domini tirosinici, i quali si trasformano in un sito di ancoraggio per una serie di chinasi (tra cui Btk, *Bruton tyrosine kinase*, Lyn, *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*, e SYK, *spleen tyrosine kinase*) e proteine adattatrici: si forma così il “segnalasma”. Questa struttura intracellulare permette di amplificare, attraverso fosforilazioni reciproche tra le diverse componenti, le cascate trasduzionali avviate dal legame BCR-antigene, favorendo la migrazione nel nucleo di importanti fattori di proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare come AKT/mTOR (*mammalian target of Rapamycin*), NF- κ B e ERK (*extracellular signal regulated kinase*) (Figura 4). (37)

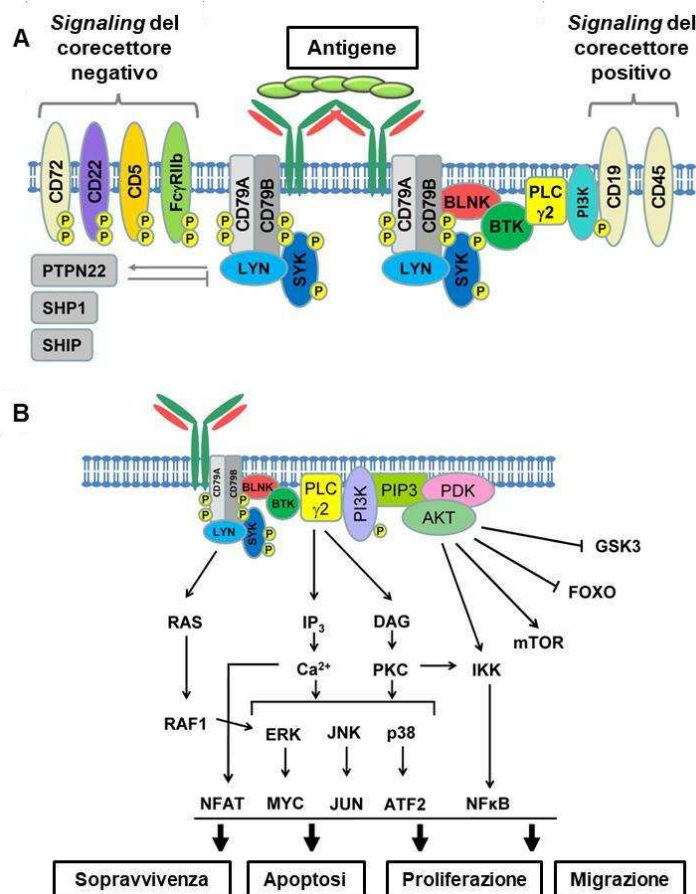


Figura 4. Il signaling del BCR nella LLC. L'immagine mostra le principali vie del segnale attivate a valle del BCR. **A.** BCR con il complesso di attivazione intracitoplasmatico e i regolatori negativi. **B.** Tappe successive della cascata di segnale tramite le vie di Btk, AKT, NF- κ B e ERK e connesse risposte biologiche (adattato da Stevenson et al. 2011). (38)

Nei pazienti affetti da LLC questo sistema altamente controllato risulta deregolato, poiché è alterata la risposta alla stimolazione antigenica e numerose proteine a valle del BCR risultano costitutivamente attive, con conseguente sbilanciamento dell'omeostasi cellulare dei linfociti patologici verso la resistenza apoptotica e l'iperproliferazione.

Questo concetto è testimoniato dalla stereotipizzazione dei BCR dei linfociti neoplastici, ovvero la presenza di più linfociti accomunati dalla stessa *complementary determining region* (CDR, generata durante il processo dello *switch* isotipico), la sequenza del BCR che riconosce e lega l'antigene. Fisiologicamente la probabilità che due linfociti diversi abbiano la stessa CDR si aggira oltre l' $1/10^{10}$, mentre in caso di LLC il 30% dei linfociti ha un BCR stereotipato: ciò significa che alcune tipologie di antigeni (la cui origine non è tuttora chiarita completamente) sono in grado di selezionare una popolazione clonale linfocitaria, facendola iperproliferare e favorendone la trasformazione neoplastica. (39) Allo stesso tempo le medesime cellule leucemiche sono in grado di by-passare il *signalling* antigenico e attivare reciprocamente le cascate trasduzionali a valle del BCR, attraverso il contatto tra le porzioni del CDR del BCR di linfociti adiacenti. (40)

Il ruolo del BCR nella patogenesi della LLC si basa quindi sia su una sua eccessiva attivazione antigenica che su una deregolata e costitutiva attivazione vicendevole tra cellule vicine. Il risultato è la selezione clonale di una popolazione linfocitaria in cui prevalgono i segnali di proliferazione e resistenza apoptotica. (41)

In questo contesto oncogenetico, l'alterazione della tirosin-chinasi Lyn gioca un'importante funzione nei processi di sopravvivenza e proliferazione. Tale enzima si attiva in seguito al legame tra BCR e antigene ed è fisiologicamente presente nei *rafts* lipidici della membrana cellulare; nelle cellule di LLC si trova invece in uno stato costitutivamente attivo e risulta espresso non solo in tutta la membrana, ma anche nel citosol. Ciò si traduce in una sovraespressione di Lyn, che si ripercuote direttamente sui suoi substrati, tra cui HS1 (*Hematopoietic lineage cell-Specific protein-1*) e la sua proteina omologa Cortactina, a loro volta sovraespressi rispetto alle cellule B sane. L'effetto complessivo dell'iperattività di Lyn e dell'overespressione delle proteine a valle provoca un blocco delle vie apoptotiche cellulari. (42) (43) (44)

1.1.4.6 Microambiente

Nell'ambito della LLC, con il termine microambiente ci si riferisce alle cellule stromali e alle cellule del SI presenti nel midollo osseo e negli organi linfoidi secondari che interagiscono con le cellule leucemiche, favorendone la proliferazione e la resistenza ai trattamenti. I meccanismi con cui il microambiente interagisce con i linfociti B neoplastici si basano sul *signalling* antigenico, chemochinico, citochinico e di adesione cellula-cellula. (44) Questo sistema è fondamentale per la sopravvivenza della cellula maligna, in quanto esperimenti *in vitro* hanno evidenziato come l'assenza di un impianto stromale provochi una rapida apoptosi delle cellule di LLC. (46)

La comunicazione tra microambiente e linfociti patologici avviene principalmente negli pseudofollicoli, zone degli organi linfoidi secondari in cui la popolazione clonale aumenta giornalmente dell'1-2%. È a questo livello che si verifica la maggior parte delle interazioni con le principali cellule del microambiente implicate nella patogenesi della LLC, attraverso chemochine, citochine, i rispettivi recettori e molecole di adesione. (47)

Le principali tipologie cellulari che fanno parte del microambiente della LLC sono (Figura 5):

- Cellule *nurse-like* (NLCs): cellule di origine monocitica che risiedono nei tessuti linfoidi. Intervengono nella patogenesi sia secernendo chemochine (ed esempio CXCL12), favorendo quindi la chemiotassi dei linfociti, sia rilasciando fattori anti-apoptotici, tra cui BAFF (*B-cell activating factor*) e APRIL (*proliferation-inducing ligand*). (48)
- Cellule stromali midollari (*bone marrow stromal cells* – BMSCs): a livello midollare hanno fisiologicamente il ruolo di nutrimento e sostegno strutturale per il comparto cellulare ematopoietico. Nel corso della patologia intervengono secernendo chemochine (come CXCL12), favorendo l'espressione di ZAP70 (*zeta-associated protein of 70kDa*) e CD38 e riducendo il *signalling* apoptotico attraverso il contatto con i linfociti leucemici. (49) (50)
- Cellule endoteliali: si tratta delle cellule che rivestono i vasi del microcircolo, le quali esprimono il recettore di tipo A dell'endotelina (ETAR) che riconosce il proprio ligando, l'endotelina 1 (ET1) rilasciato dai linfociti patologici: questa interazione ha un effetto sulla sopravvivenza e sulla farmacoresistenza. (51)

- Cellule follicolari dendritiche (FDCs): sono situate nei follicoli linfoidi e favoriscono la migrazione dei linfociti neoplastici verso di essi attraverso il segnale chemochinico (principalmente attraverso CXCL13), oltre ad avere un ruolo anti-apoptotico dovuto ai contatti cellula-cellula. (52)
- Cellule T: come brevemente illustrato nel paragrafo 1.4.1.1, è necessario che i linfociti B e T interagiscano attraverso il legame tra CD40 e CD40L affinché le cellule B possano progredire nel loro processo di maturazione e attivazione. Lo stesso legame, nel contesto della LLC, è invece implicato nel *signalling* anti-apoptotico. (53)
- Cellule NK (*natural killer*): si tratta di cellule coinvolte nella sorveglianza immunitaria, che tra i vari ruoli hanno anche quello di riconoscere ed eliminare le cellule neoplastiche presenti nell'organismo. Nel plasma dei pazienti affetti da LLC si rileva una maggiore quota di antigene leucocitario umano G (HLA-G), un mediatore in grado di ridurre l'attività citotossica delle cellule NK inducendone l'apoptosi, facendo sì che diminuisca il loro contributo anti-tumorale. (54)

Nel microambiente leucemico coesistono quindi diverse popolazioni cellulari che, per trasmettere le informazioni tra esse stesse e i linfociti B patologici, utilizzano vari mediatori, tra cui i principali sono le chemochine. In particolare, il *signalling* mediato dalla chemochina CXCL12 (secreta da diverse cellule del microambiente, ma principalmente dalle NCLs) attraverso il suo recettore CXCR4 (espresso dalle cellule di LLC) attiva, tra le altre, la via delle chinasi MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK, che a loro volta favoriscono l'espressione del fattore di trascrizione CREB, che *up*-regola il gene anti-apoptotico Bcl-2, e inattivano le proteine della famiglia Bad, che ricoprono un ruolo pro-apoptotico, avendo quindi un effetto generale pro-sopravvivenza. (55)

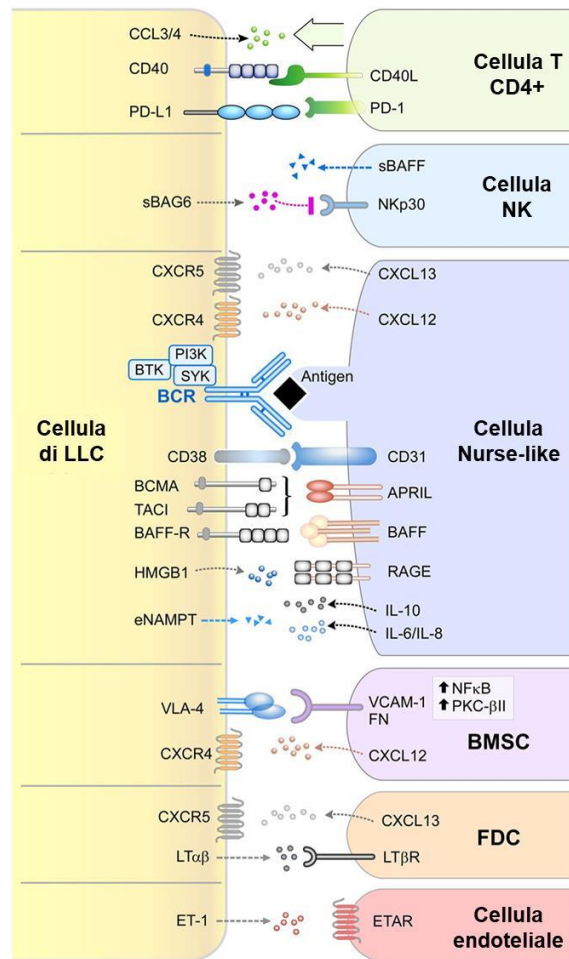


Figura 5. Componenti cellulari e molecolari del microambiente della LLC. Il contatto tra le cellule di LLC e le cellule “nurse-like” (NLC) è stabilito e mantenuto dai recettori delle chemiochine e da molecole di adesione espresse dalle cellule di LLC e dai rispettivi ligandi sulle NLC. L’asse CD38-CD31 e l’interazione di APRIL-BAFF (membri della famiglia del Tumor Necrosis Factor-TNF) con i corrispondenti recettori, assicura alla cellula la sopravvivenza. Le NLC attraggono le cellule di LLC secernendo CXCL12 e CXCL13, che interagiscono con i corrispondenti recettori CXCR4 and CXCR5, espressi ad alti livelli nelle cellule di LLC. La stimolazione del BCR induce la secrezione di CCL3 and CCL4, i quali richiamano le cellule T e monociti dal microambiente tumorale. L’asse CD40/CD40L favorisce la sopravvivenza e la proliferazione delle LLC e l’interazione PD-1 con PD-1L, espresso ad alti livelli sulla superficie delle cellule T dei pazienti con LLC, favorisce l’elusione delle cellule di LLC dalla citotossicità delle cellule T. Numerosi fattori riducono la citotossicità delle cellule NK, tra i quali la bassa espressione di recettori attivanti, come NKp30, BAFF solubile e BAG6 solubile, rilasciati dalla cellula B. L’adesione alle cellule midollari stromali (BMSC) è mediata dall’interazione con VCAM-1 o FN (fibronectina) sull’integrina VLA-4, espressa dalla cellula tumorale. La chemiotassi è attivata tramite l’asse CXCL12-CXCR4. Vi è inoltre l’interazione con le cellule follicolari dendritiche (FDC) attraverso gli assi CXCL13-CXCR5 e LTαβ-LTβR. Le cellule di LLC secernono ET-1, che interagisce con ETAR sulle cellule endoteliali e promuove sopravvivenza e farmaco-resistenza (adattato da Ten Hacken et al., 2015). (47)

1.1.5 PRESENTAZIONE CLINICA

La LLC nel 70% dei casi viene diagnosticata in pazienti asintomatici privi di obiettività che si sono sottoposti a *screening* ematochimici di *routine* dove è stata rilevata una linfocitosi. In altre situazioni, le indagini diagnostiche partono in seguito alla rilevazione da parte del medico di adenomegalie, ovvero ingrossamenti

dei linfonodi superficiali (tipicamente a livello cervicale, ascellare e inguinale) non dolenti, e/o epatosplenomegalia, presente nel 20% dei casi e associata a senso di sazietà precoce e algie addominali. Se non sono presenti all'esordio della patologia, solitamente insorgono negli stadi intermedi della progressione clinica.

I classici sintomi B (ovvero febbre, sudorazione notturna, calo ponderale del 10% in meno di 6 mesi non altrimenti spiegato, prurito, mialgie) sono presenti precocemente solo nel 10% dei pazienti, mentre è frequente la loro comparsa durante il decorso della neoplasia. Altri riscontri clinici da citare sono l'ipogammaglobulinemia, la maggiore predisposizione ad infezioni, l'anemia e la trombocitopenia: queste ultime due condizioni sono particolarmente preoccupanti, in quanto sono causate o da processi autoimmuni provocati dalla deregolazione del SI, o dall'infiltrazione neoplastica midollare, segno di LLC avanzata. (56)

1.1.6 DIAGNOSI

Le condizioni *sine qua non* per stabilire una diagnosi di LLC sono una concentrazione di linfociti B nel sangue periferico >5.000 cellule/ μl per più di 3 mesi e la dimostrazione che questa popolazione linfocitaria sia clonale e abbia uno specifico immunofenotipo. Nel caso in cui la concentrazione dei linfociti B sia minore di 5.000 cellule/ μl nel sangue periferico, si parla di linfocitosi B monoclonale (MBL), una condizione definita come precorritrice della LLC: è presente una popolazione clonale di linfociti B immunofenotipicamente paragonabile alla LLC ma sono assenti i sintomi tipici della LLC (adenomegalia, epatosplenomegalia, citopenie e sintomi sistemici). A sua volta la MBL può essere distinta in:

- MBL a basso numero di linfociti: i linfociti B clonali sono <500 cellule/ μl e viene solitamente riscontrata in soggetti arruolati in studi di popolazione, il rischio di evoluzione in LLC è minimo;
- MBL ad alto numero di linfociti: i linfociti B clonali sono >500 cellule/ μl e si rileva in seguito ad approfondimenti svolti su pazienti con lieve linfocitosi, ha un rischio annuo dell'1-2% di evoluzione in LLC. (57)

Uno studio effettuato con analisi citofluorimetriche e molecolari in pazienti con diagnosi di LLC ha dimostrato che nel 98% dei casi la patologia è anticipata dalla MBL, già presente fino a 6 anni prima della diagnosi. (58)

Prima di poter certificare la diagnosi di LLC, bisogna effettuare una diagnosi differenziale per escludere altre frequenti cause di linfocitosi, ovvero le infezioni, la gravidanza e altre patologie linfoproliferative che si presentano similmente alla LLC, come la leucemia a cellule capellute, il linfoma mantellare, il linfoma della zona marginale o il linfoma follicolare. Per giungere ad una corretta diagnosi sono quindi necessari un'anamnesi approfondita, un attento esame obiettivo del paziente e, soprattutto, gli esami clinici appropriati, ovvero l'esame morfologico su sangue periferico e midollare, l'immunofenotipo e, se ciò non fosse ancora dirimente, la ricerca delle caratteristiche genetiche delle cellule linfoidi circolanti. (59)

1.1.6.1 Esame morfologico su sangue periferico

Tipicamente, le cellule leucemiche rilevabili nello striscio periferico sono linfociti piccoli, maturi, con citoplasma scarso, nucleoli non distinguibili e cromatina parzialmente addensata (Figura 6). (4) Alla preparazione di uno striscio periferico, la rottura meccanica dei linfociti provoca la formazione di detriti cellulari che vengono definiti ombre di Gumprecht che, se riscontrate, indirizzano la diagnosi verso la LLC. Questo evento è associato alla fragilità propria dei linfociti leucemici, caratterizzata da una minore sintesi di vimentina, una proteina citoscheletrica che, in condizioni fisiologiche, stabilizza il doppio strato lipidico della membrana cellulare. (60)

In caso di LLC, nello striscio periferico si può ricercare anche la presenza di prolinfociti, ovvero cellule di dimensioni superiori rispetto ai linfociti patologici, che presentano cromatina meno addensata e in cui si riconosce un singolo ed evidente nucleolo. Se presenti in percentuale maggiore del 10% (ma minore del 55% del totale dei linfociti presenti, poiché in tal caso si porrebbe la diagnosi di leucemia prolinfocitica) si parla di LLC "atipica", contraddistinta da una superiore aggressività clinica.

La prognosi risulta particolarmente infausta qualora la LLC atipica si presenti con una quota di prolinfociti superiore a 15.000/ μ l, poiché valori superiori a tale soglia si associano a ridotta *overall survival* (OS, sopravvivenza globale, intervallo di tempo che va dal momento della diagnosi della patologia e al decesso del paziente), ridotta *progression free survival* (PFS, sopravvivenza senza progressione di malattia, periodo di tempo in cui il paziente è malato ma in cui la patologia non progredisce) e maggiore probabilità di dover ricorrere a terapie

di seconda o terza linea rispetto ai pazienti con conta prolinfocitaria minore di 15.000/ μ l. (61)

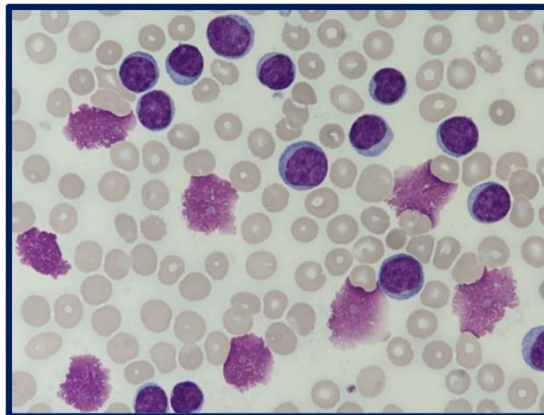


Figura 6. Striscio periferico di LLC. Lo striscio di sangue periferico colorato con Giemsa-Wright mostra un quadro tipico di Leucemia Linfatica Cronica di tipo B, con la presenza delle ombre di Gumprecht.

1.1.6.2 Valutazione citofluorimetrica

L'esame morfologico non è di per sé sufficiente per porre diagnosi di LLC, poiché è limitato dall'elevato numero di falsi positivi e falsi negativi. Si rivela perciò fondamentale l'utilizzo della citofluorimetria per determinare l'immunofenotipo delle cellule presenti nel campione prelevato dal paziente, individuando così i marcatori di superficie patognomonic della LLC. Questi marcatori sono i *clusters* di differenziazione (CD) CD19 e CD20 (antigeni dei linfociti B), CD23 e CD5, i quali devono essere tutti rilevati simultaneamente all'esame citofluorimetrico per stabilire definitivamente la diagnosi di LLC. (59) La singola positività del CD5 non permette una diagnosi certa, in quanto questo marcatore si può riscontrare anche in altre tumori linfoidei, come il linfoma mantellare (caratterizzato da CD19 e CD5 positivi, ma CD23 negativo). (62) Altri due marcatori utilizzati per distinguere i linfociti B sani da quelli neoplastici sono le IgM e IgD, meno espresse sulla membrana di quest'ultimi.

Oltre all'immunofenotipo, le analisi citofluorimetriche permettono di individuare l'ulteriore tratto distintivo dei linfociti neoplastici: la clonalità. Per determinarla si indaga l'espressione ristretta delle catene leggere κ o λ delle Ig. (63) (64).

Una volta ottenute tutte le informazioni ematochimiche ed immunofenotipiche, si può stabilire la diagnosi di LLC se i linfociti sono ≥ 5.000 cellule/ μ l e si riscontra una popolazione clonale definita dalla contemporanea

positività per CD19, CD5 e CD23 e che presenta un'espressione ristretta delle catene leggere κ o λ delle Ig (Figura 7). (65) Qualora permanga ancora dell'incertezza, è possibile valutare altri *marker*, come CD43, CD79b, CD10, CD52 o FMC7. Ad esempio, una debole o assente espressione di CD79b differenzia il linfocita neoplastico dal linfocita sano, in cui tale *marker* ha invece una forte espressione. (66)

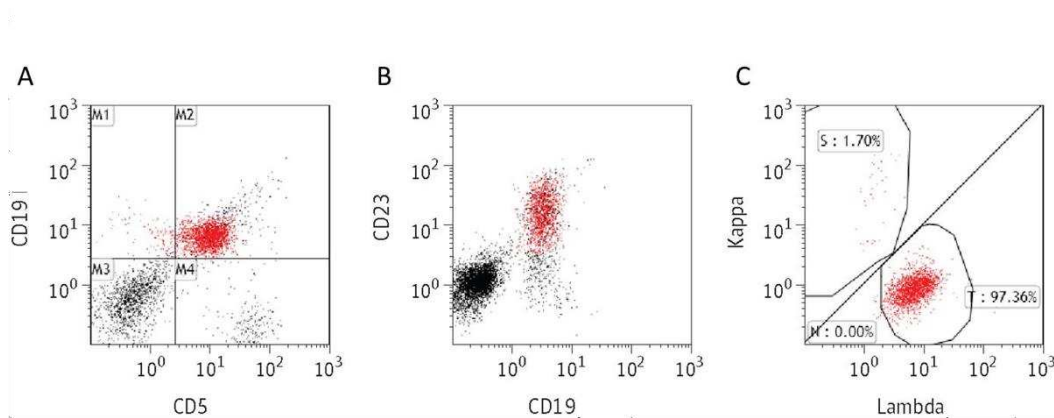


Figura 7. Pannelli citofluorimetrici. Questi plots evidenziano in rosso la popolazione leucemica. **A.** Espressione di CD5 e CD19. **B.** Espressione di CD23 e CD19. **C.** Restrizione della catena leggera λ (adattato da Nabhan et al., 2014). (67)

1.1.6.3 Ulteriori esami

L'esame morfologico del campione ematico e l'analisi immunofenotipica sono solitamente sufficienti per individuare la LLC, ma possono essere effettuati altri test per definire la diagnosi, approfondire ulteriormente la prognosi o indicare specifici trattamenti.

La biopsia midollare viene effettuata al momento del processo diagnostico solo nei pazienti citopenici, per stabilire se la citopenia è dovuta ad infiltrazione midollare neoplastica o a processi autoimmuni. (68) In caso di infiltrazione midollare, la biopsia mostra un'iper cellularità causata dai linfociti patologici, i quali possono assumere 4 diversi *pattern* di distribuzione: nodulare, interstiziale, misto (nodulare ed interstiziale, è il più frequente) e diffuso (associato ad una neoplasia particolarmente avanzata). La definizione della tipologia di *pattern* può quindi dare un'indicazione prognostica. (69)

Le analisi per rilevare le alterazioni cromosomiche, come ad esempio la FISH (*fluorescence in situ hybridization*), si dimostrano utili per la diagnosi differenziale nel caso persistano delle incertezze: se, ad esempio, venisse riscontrata

la traslocazione t(11;14), il processo diagnostico si concentrerebbe sul linfoma mantellare e non più sulla Leucemia Linfatica Cronica. (66)

1.1.7 COMPLICANZE ED EVOLUZIONE CLINICA

1.1.7.1 Complicanze

La Leucemia Linfatica Cronica espone circa un paziente su tre ad un maggiore rischio di sviluppo di patologia infettive, autoimmuni o tumorali. In maggior dettaglio:

- il 20% dei pazienti va incontro all'insorgenza di una neoplasia secondaria, principalmente a livello cutaneo, colon-rettale ed ematologico;
- nel 12% di pazienti si sviluppano infezioni gravi, come polmoniti, urosepsi, shock settico e ascessi nei tessuti profondi;
- nel 10% dei casi compaiono patologie autoimmuni che colpiscono il sistema immunitario-ematologico e la tiroide.

Solo lo 0,9% dei malati di LLC sviluppa simultaneamente queste 3 tipologie di complicanze, indicando come si tratti di problematiche che si manifestano in modo vicendevolmente esclusivo. (70)

Le neoplasie secondarie sono le complicanze più tipicamente associate alla LLC: un paziente leucemico ha un rischio maggiore di svilupparle rispetto ad un soggetto sano e tipicamente hanno un decorso altamente aggressivo, con frequente evoluzione metastatica. Si tratta soprattutto di tumori cutanei, del sistema respiratorio, delle cavità orale e delle alte vie respiratorie, del colon-retto, della prostata, del rene e il linfoma. Pur non essendo stati completamente chiariti, i principali meccanismi alla base di questa maggiore predisposizione alle neoplasie comprendono l'immunosoppressione causata dalla LLC e la chemioterapia. In particolare, gli agenti alchilanti e gli analoghi purinici (entrambi sono oggi poco utilizzati) aumentano direttamente il rischio, mentre il Rituximab (un anticorpo monoclonale anti-CD20) ha un importante effetto immunosoppressore. Oltre alla terapia farmacologica, altri fattori di rischio per lo sviluppo di neoplasie secondarie sono l'età, il sesso maschile e livelli elevati di lattico deidrogenasi (LDH), β 2-microglobulina (β 2-M) e creatinina. (71) (72)

La complicanza più temibile riguarda gli eventi infettivi, in quanto rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da LLC, i quali nel 50-60% dei casi decedono proprio a causa di un'infezione: ciò è

dovuto in parte alla riduzione dell'efficienza dell'immunità umorale associata alle alterazioni ematologiche provocate dalla malattia, in parte è conseguenza dei trattamenti chemioterapici ad alto effetto immunosoppressivo. Il principale fattore legato al maggior rischio di insorgenza di infezioni gravi è l'ipogammaglobulinemia, una condizione che insorge in circa il 50% dei pazienti in qualsiasi momento del decorso della patologia e che solitamente si aggrava con il progredire della malattia, associandosi ad alterazioni della funzionalità leucocitaria globale. La presenza di questo segno clinico si correla, a livello del sistema respiratorio, con una minore presenza di IgA e una ridotta attività mucosale, fattori che abbassano la capacità di *clearance* dell'epitelio e quindi un maggior rischio di infezioni, soprattutto batteriche. Parlando invece dell'immunosoppressione indotta dai chemioterapici, esistono dei *pattern* farmacopatogeno abbastanza tipici: ad esempio i pazienti che utilizzano gli anticorpi monoclonali (come Rituximab e Alemtuzumab) sono solitamente colpiti da *Pneumocystis jirovecii*, Herpes virus e Candida, mentre i pazienti a cui si somministra Ibrutinib sono particolarmente suscettibili alle infezioni polmonari fungine da Aspergillo e *Pneumocystis jirovecii*. In seguito alla diagnosi di LLC è quindi necessario monitorare periodicamente il paziente ed eventualmente intervenire preventivamente con profilassi antibiotica, vaccinazioni e somministrazioni sostitutive di immunoglobuline. (73) (74)

Infine, le complicanze autoimmuni sono rappresentate soprattutto dalle citopenie, che possono insorgere in qualsiasi momento e che non hanno peso nella prognosi. La citopenia più frequente è l'anemia emolitica, mentre altri riscontri più sporadici sono la trombocitopenia autoimmune, l'aplasia eritroide pura e la granulocitopenia autoimmune (molto rara). In caso di riscontro di citopenia in un paziente affetto da LLC, bisogna porre nella diagnosi differenziale, insieme all'insufficienza midollare, proprio l'eziologia autoimmune, che potrebbe provocare una contemporanea carenza di diverse tipologie cellulari ematiche. La diagnosi deve essere accurata e rapida per permettere di instaurare una terapia corretta e personalizzata in base alla gravità della citopenia e della LLC stessa. Gli interventi terapeutici possono basarsi nei casi più semplici sui corticosteroidi e trattamenti sostitutivi, mentre nei pazienti più complicati si ricorre ad un'immunosoppressione più aggressiva, ricorrendo anche alla splenectomia. Le terapie si rivelano efficaci ma spesso non curative. (75)

1.1.7.2 Trasformazione istologica

Con trasformazione istologica si intende l'evoluzione in fenotipi particolarmente aggressivi di LLC in nuove malattie oncoematologiche, tra cui quella maggiormente riscontrata è la Sindrome di Richter (RS). Il passaggio da LLC a RS implica la trasformazione della leucemia in linfoma aggressivo, che nel 90-95% dei casi è un linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) e nel 5-10% un linfoma di Hodgkin. Si tratta in ogni caso di un evento relativamente raro, in quanto meno del 10% dei pazienti andrà in contro alla RS, con un'incidenza annuale dello 0,5%. (76)

L'eziologia è altamente influenzata da mutazioni ricorrenti, presenti nel 90% dei pazienti, che riguardano geni oncosoppressori (come TP53 e CDKN2A) e geni regolatori della proliferazione cellulare (come NOTCH1 e MYC): queste alterazioni determinano l'aggressività e la chemioresistenza della RS. (77)

Dal punto di vista clinico, la RS causa un repentino peggioramento della condizione del paziente, accentuando i tipici sintomi della LLC (sudorazione notturna, calo ponderale e notevole linfadenomegalia asimmetrica e/o epato-splenomegalia). Gli esami ematochimici mostrano inoltre un netto aumento della lattico deidrogenasi (LDH). La diagnosi si basa quindi sui rilievi clinici, di laboratorio e radiologici, ma per la conferma definitiva va svolto l'esame istologico di una biopsia linfonodale. (78)

Il trattamento standard prevede il programma polichemioterapico di induzione R-CHOP (Rituximab + Ciclofosfamida + Doxorubicina + Vincristina + Prednisone), caratterizzato dal miglior equilibrio possibile tra efficacia e tossicità ematologica. Se un paziente giovane migliora in seguito alla terapia di induzione, può essere preso in considerazione il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, in grado di aumentare l'aspettativa di vita. (77)

La prognosi è negativa e la speranza di vita è di 8-12 mesi, tuttavia è presente variabilità inter-individuale: la classificazione *Richter's transformation score* inserisce i pazienti in quattro categorie prognostiche che differiscono per la durata dell'aspettativa di vita (rischio basso: 13 mesi; rischio medio basso: 11 mesi; rischio medio-alto: 4 mesi; rischio alto: 2 mesi e mezzo) in base *performance status* (PS), bassa conta piastrinica, alti livelli di LDH, diametro linfonodale >5 cm, precedente fallimento di almeno 2 linee terapeutiche. (79)

1.1.8 FATTORI PROGNOSTICI

Al momento della diagnosi non è semplice prevedere il decorso della patologia, in quanto esiste una notevole variabilità inter-individuale. In alcuni pazienti ci può essere assenza di sintomi per più di dieci anni, in altri ci può essere un'evoluzione così rapida da richiedere trattamenti immediati, con un elevato rischio di *exitus*. Normalmente, il paziente tipo si trova nel medio di questi due scenari. Vista l'elevata eterogeneità, in seguito alla diagnosi, per ogni paziente viene stratificato il rischio, cioè vengono valutati tutti i fattori che possono determinare una maggiore probabilità di progressione della LLC.

Negli ultimi quarant'anni, i cardini della stratificazione del rischio sono state le classificazioni di Rai (80) e Binet (81). Questi due sistemi stabiliscono gli anni di aspettativa di sopravvivenza del paziente utilizzando dei parametri clinici, diversi a seconda della classificazione, con previsioni finali quantitativamente sovrapponibili. Si tratta di strumenti prognostici semplici da applicare ed universali (Tabella I).

Tabella I. Stadiazione di Rai e Binet.

	Stadio	Caratteristiche cliniche	Sopravvivenza (anni)*
Stadiazione di RAI**			
Rischio basso	0	Linfocitosi periferica > 15.000/ μ l Infiltrazione midollare > 40%	14,5
Rischio medio	I	0 e linfadenopatie	7,5
	II	I e splenomegalia	
Rischio alto	III	II ed emoglobina < 11g/dl	2,5
	IV	III e piastrine < 100.000/ μ l	
Sistema BINET***			
	A	< 3 aree linfonodali No anemia, no piastrinopenia	14
	B	> 3 aree linfonodali No anemia, no piastrinopenia	5
	C	(Hb) < 10g/dl o piastrine < 100.000/ μ l	2,5

*Con l'avvento delle nuove terapie le aspettative di vita sono in aumento.

** La prima stadiazione RAI si sviluppava in 5 stadi che poi sono stati raggruppati in 3 livelli di rischio.

*** La classificazione di BINET considera 5 aree linfonodali: linfonodi cervicali, ascellari, inguinali, milza e fegato.

Con l'introduzione di nuove tecniche nel processo diagnostico, le sopracitate classificazioni si sono evolute con l'aggiunta di parametri sierici, cellulari e genetici, che forniscono informazioni prognostiche indipendenti dallo stato clinico del paziente. (82) I parametri sierici introdotti sono:

- conta linfocitaria: il *cut-off* è posto a 50.000 cellule/ μ l, poiché i pazienti con concentrazione linfocitaria periferica superiore a questo valore hanno prognosi peggiore;
- tempo di raddoppiamento dei leucociti: se in meno di sei mesi la concentrazione ematica dei globuli bianchi raddoppia, il paziente subirà una sensibile diminuzione della sopravvivenza; (1)
- quota di prolinfociti nel sangue periferico >10%: in questo caso si parla di LLC atipica, caratterizzata da elevata aggressività (cfr. 1.6.1.1);
- concentrazione sierica di β 2-microglobulina (β 2-M) >3,5mg/l: indice prognostico precoce che indica probabile evoluzione aggressiva della patologia. È un *marker* indipendente, ovvero capace di fornire un'ipotesi prognostica anche in assenza di altri dati clinici e strumentali; (83)
- concentrazione sierica di timidina chinasi >8,5U/l: analogamente a β 2-M, è un indice precoce indipendente di prognosi negativa, in quanto si associa ad un accelerato tempo di raddoppiamento leucocitario; (83) (84)
- concentrazione sierica di CD23 solubile (sCD23): il CD23 (recettore a bassa affinità delle IgE) è un antigene di superficie specifico dei linfociti leucemici che può essere clivato, diventando appunto sCD23, e rilasciato in circolo, dove ricopre diversi ruoli. Ha un precoce significato prognostico negativo sia se presente in elevate quantità sia se dimostra un veloce aumento progressivo del suo valore sierico. (85)

I fattori prognostici biologici sono:

- caratteristiche mutazionali della IGHV: si è già parlato di come l'assenza o presenza di immunoglobuline mutate permetta di classificare la LLC in M-LLC o U-LLC (cfr. 1.4.1.2). Ci si limita quindi a ricordare che i pazienti U-LLC hanno un OS ridotta rispetto ai pazienti M-LLC, in quanto il fenotipo SMH- indica che i linfociti neoplastici non sono transitati per il CG e presentano un'elevata instabilità genetica, essendo quindi suscettibili all'accumulo di alterazioni del DNA; (12) (86)

- livelli di espressione di CD38: si tratta di una glicoproteina transmembrana espressa dai linfociti B nel processo di maturazione e proliferazione, in quanto è necessaria per la comunicazione con il microambiente e l'adesione cellula-cellula. Allo stesso tempo una sua elevata espressione si associa ad invasione tissutale diffusa, con conseguente maggior velocità di progressione della LLC, maggiore linfocitosi e riduzione della OS. I suoi valori variano ampiamente durante il decorso della neoplasia, perciò non viene solitamente utilizzata per valutare lo stato del paziente; (87)
- livelli di espressione di ZAP70 (*zeta-chain associated protein of 70kDa*): questa tirosin chinasi è inserita all'interno del sistema trasduzionale del TCR e nel contesto della LLC ha un ruolo patologico si accompagna solitamente al fenotipo SMH-; (88)
- livelli di espressione di CD49d: marcatore di superficie che fa parte di un complesso integrinico della membrana cellulare. Interviene nei meccanismi di comunicazione con gli altri linfociti B patologici e con il microambiente, favorendo la proliferazione neoplastica. L'importanza di CD49d risiede nel fatto di essere l'unico *marker* valutabile con la citofluorimetria ed utile per definire l'OS del paziente. (89)

I principali fattori genetici utilizzabili per stratificare il rischio sono già stati descritti (cfr. 1.1.4.3): delezione del braccio lungo del cromosoma 13, trisomia 12, delezione del braccio lungo del cromosoma 11, delezione del braccio corto del cromosoma 17, mutazioni di NOTCH1, mutazioni di XPO1, mutazioni di MYD88, mutazioni di BIRC3, mutazioni di SF3B1.

Avendo a disposizione diversi fattori prognostici, è stato possibile ideare numerosi *score* e scale di stratificazione del rischio, tra cui il più utilizzato è il *Chronic Lymphocytic Leukemia International Prognostic Index* (CLL-IPI), che classifica i pazienti in base a:

- delezione del cromosoma 17 o mutazione di TP53 o entrambe;
- presenza o assenza dei geni IGHV mutati;
- concentrazione sierica di β 2-M;
- stadio clinico;
- età.

Ad ogni fattore prognostico è assegnato un valore direttamente proporzionale all'influenza del fattore sulla OS, permettendo così di ottenere un punteggio totale che classifica i pazienti in 4 gruppi in base alla OS a 5 anni:

- rischio basso: 93% di sopravvivenza;
- rischio intermedio: 79% di sopravvivenza
- rischio alto: 63% di sopravvivenza;
- rischio molto alto: 23% di sopravvivenza. (90)

Essendosi rilevato altamente valido ed attendibile, lo score CLL-IPI è attualmente utilizzato per stabilire il *Time To First Treatment* (TTFT, il tempo che separa il momento della diagnosi dall'inizio della prima terapia), aiutando il medico nel decidere quando e in quali pazienti applicare un trattamento (Tabelle II e III). (91) (92)

Tabella II. Fattori prognostici che costituiscono lo score CLL-IPI e relativo.

Fattori prognostici	Fattore avverso	Punteggio di rischio assegnato
Stato mutazionale o delezione di TP53	Deleto o mutato	4
Stato mutazionale dei geni IGHV (β2-microglobulina)	Non mutato > 3,5mg/l	2
Stadio clinico	Binet B–C or Rai I–IV	1
Età	> 65	1

Tabella III. Categorie CLL-IPI punteggio di rischio.

Categoria di rischio CLL-IPI (punteggio)	OS a 5 anni (%)	Potenziale conseguenza clinica
Rischio basso (0-1)	93	Approccio <i>watch-and-wait</i>
Rischio intermedio (2-3)	79	Trattamento non indicato a meno che i sintomi siano severi
Rischio alto (4-6)	63	Trattamento indicato a meno che la malattia sia totalmente asintomatica
Rischio molto alto (7-10)	23	Se il trattamento è necessario, evitare la chemioimmunoterapia convenzionale, somministrare i nuovifarmaci o inserire il paziente in un trial clinico

Un ulteriore fattore prognostico negativo è noto come *complex karyotype* (CK), termine che descrive una situazione in cui nel paziente coesistono tre o più aberrazioni cromosomiche. È tipicamente associato a:

- ulteriori fattori prognostici negativi, come U-IGHV e del(17p13);
- riduzione della OS e della PFS;
- maggior rischio di progressione a RS;
- riduzione del TTFT.

La ricerca di un CK associata allo stato mutazionale dei geni per IGHV è consigliata al fine aumentare la precisione della prognosi e delle scelte terapeutiche. (93)

1.1.9 TRATTAMENTO

1.1.9.1 Progresso nel trattamento della LLC

I primi farmaci utilizzati nella terapia della LLC sono stati gli agenti alchilanti Clorambucil, Ciclofosfamide e Bendamustina. Inizialmente utilizzati in monoterapia, negli anni '90 si passò ad una loro combinazione con un analogo delle purine; in particolare, si adottò la combinazione Fludarabina + Ciclofosfamide (FC) in quanto risultava la più efficace, soprattutto nei pazienti giovani. (94)

Una prima svolta decisiva è rappresentata dall'introduzione nei protocolli terapeutici degli anticorpi anti-CD20 (chemio-immunoterapia), farmaci in grado di apportare un netto aumento della OS. Rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico, è stato il primo anticorpo anti-CD20 utilizzato per trattare la LLC in aggiunta alla terapia con FC (Fludarabina + Ciclofosfamide + Rituximab, FCR). Il protocollo FCR si è rivelato superiore in termini di sopravvivenza rispetto alla combinazione FC nei pazienti giovani ed in buone condizioni di salute. (95) Nei pazienti anziani, invece, è più tollerata la combinazione Bendamustina + Rituximab (BR), che dimostra un'efficacia non inferiore rispetto a FCR. (96) Esiste inoltre anche la possibilità di somministrare Rituximab insieme a Clorambucil, efficace nei pazienti con varie comorbidità. In seguito al successo dell'utilizzo di Rituximab, sono stati introdotti nei protocolli anche Obinutuzumab, anticorpo monoclonale umanizzato, e Ofatumumab, anticorpo monoclonale totalmente umano, farmaci dotati di una maggiore selettività per CD20 e, *in vitro*, in grado di generare un maggior livello di apoptosi rispetto a Rituximab. La combinazione Obinutuzumab

+ Clorambucil porta il 21% dei pazienti a rispondere completamente al trattamento, rispetto al 7% dei pazienti trattati con Rituximab + Clorambucil. (97) (98)

1.1.9.2 I nuovi agenti a bersaglio molecolare

Grazie ai molteplici studi effettuati negli ultimi decenni, la patogenesi della LLC è sempre più definita e, con essa, le diverse molecole di segnale che permettono ai linfociti B leucemici di sopravvivere e proliferare, *in primis* Btk, PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) e Bcl-2. Proprio queste molecole sono diventate i *target* di nuovi farmaci dotati di sempre maggiore precisione e in grado di diminuire gli effetti collaterali della chemioterapia (Figura 8).

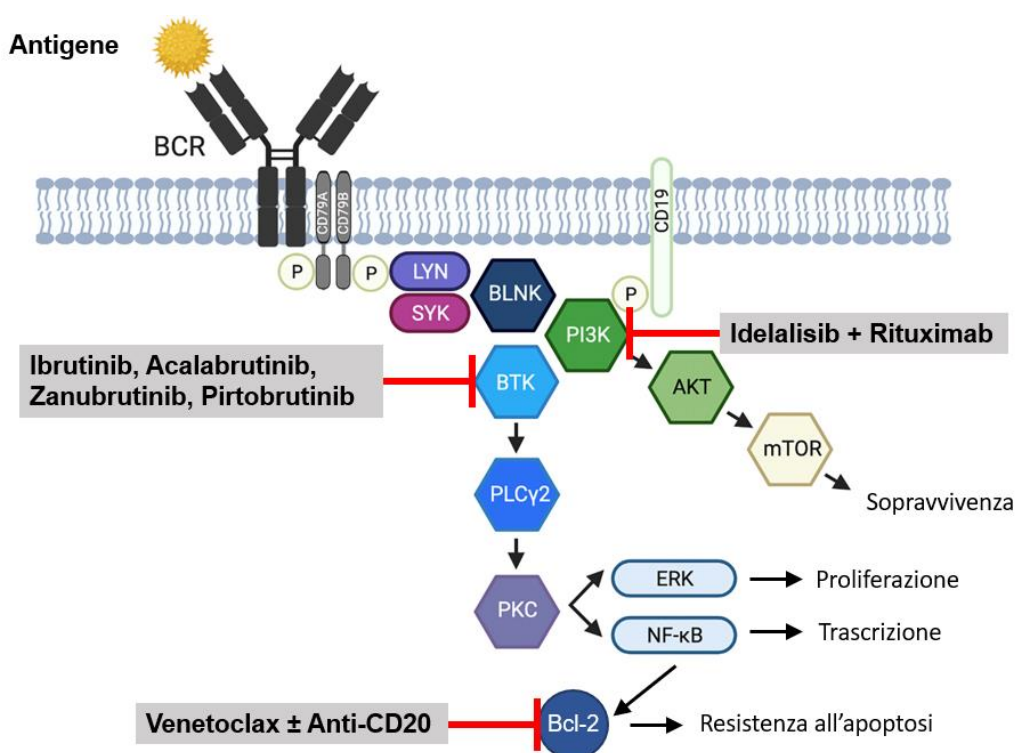


Figura 8. Farmaci attivi sul signalling di Btk, PI3K e Bcl-2. (Adattato da Ahn et al, 2021). (99)

Il capostipite della famiglia degli inibitori di Btk è Ibrutinib. Si tratta di un farmaco somministrabile oralmente in grado di riconoscere e legare Btk nel suo residuo cisteinico 481 (Cys481), localizzato nel sito attivo, inibendo in modo irreversibile la chinasi. Come già illustrato precedentemente (cfr. 1.1.4.5), Btk ricopre un ruolo fondamentale nei processi di proliferazione, differenziazione e sopravvivenza dei linfociti B: la sua inibizione aumenta quindi il tasso di apoptosi delle cellule B neoplastiche. (100) (101) Inoltre, Btk è implicato anche nelle vie di *signalling* regolate dal legame tra le chemochine e i loro recettori a livello del microambiente tumorale, inibendo i segnali di *homing* che attirano i linfociti verso

i linfonodi: ciò è testimoniato dalla “linfocitosi distributiva” che si verifica in seguito all’inizio della terapia, ovvero dal rialzo della conta linfocitaria ematica dovuto proprio alla massiva uscita dei linfociti dagli organi linfoidi secondari. Si tratta di un fenomeno transitorio, che si arresta una volta che la patologia entra in remissione, che si associa anche alla diminuzione di eventuali linfadenomegalie e/o epato-splenomegalie. (102) (103) Inoltre, il farmaco normalizza i livelli sierici delle Ig, in particolare delle IgA, riducendo la suscettibilità dei pazienti agli eventi infettivi e alle patologie autoimmuni. (104)

La terapia con Ibrutinib ha nettamente migliorato la prognosi dei pazienti, in particolare nei portatori della mutazione di TP53, nei quali è utilizzato come terapia di prima linea, in assenza di controindicazioni. (105)

Nonostante Ibrutinib sia un farmaco con *target* molecolare specifico, esso può incorrere in interazioni *off target* con altri mediatori quali EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PI3K e ITK (*interleukin-2 inducible T-cell-kinase*) che stanno alla base degli effetti collaterali provocati dal farmaco. Tra questi, il principale è la fibrillazione atriale, presente nel primo anno e mezzo nel 3-7% dei trattati, mentre la percentuale sale a circa il 15% se si considerano intervalli di tempo maggiori. La fibrillazione atriale rappresenta la principale causa di interruzione della terapia con Ibrutinib, anche se la sospensione del farmaco non è indicata in quanto è improbabile che ci sia un ritorno spontaneo al ritmo sinusale. Ulteriori effetti collaterali sono: sanguinamenti (66% dei pazienti), ipertensione arteriosa (18%), diarrea (60%), astenia, infezioni del tratto respiratorio superiore, *rash* cutanei (25%), mialgie (20%), artralgie (20%) e altri. (74) (106) (107)

Un altro aspetto che può limitare l’utilizzo di questo farmaco è il fatto che si tratta di una terapia continuativa, ovvero da portare avanti per tutta la vita perché non in grado di garantire una remissione completa, ovvero una *minimal residual disease* (MRD) negativa. Questo fattore, unito agli effetti collaterali sopra descritti, fa sì che la terapia singola con Ibrutinib sia costosa, scarsamente tollerata e prona allo sviluppo di resistenze: dopo tre anni dall’inizio della terapia, infatti, circa il 33% dei pazienti la abbandona a causa degli effetti collaterali, della comparsa di resistenze o della progressione a RS. (105) (108) Per riuscire a superare questo ostacolo sono in corso dei *trial* che cercano di testare l’efficacia e la sicurezza della combinazione Ibrutinib + Venetoclax (cfr. 1.1.9.6).

Gli inibitori di Btk di II generazione Acalabrutinib e Zanubrutinib sono farmaci più selettivi, potenti, sicuri e tollerati (nonostante Acalabrutinib in studi di fase III abbia provocato cefalea e tosse nel 10% dei pazienti (109)) di Ibrutinib e lo stanno progressivamente superando nelle linee guida dei protocolli terapeutici (cfr. 1.1.9.6). Sono inoltre stati conclusi degli studi di fase I e II riguardo a Pitrobrutinib, un inibitore reversibile ed altamente selettivo di Btk che si è dimostrato efficace nei pazienti intolleranti agli altri inibitori di Btk e ai pazienti resistenti a causa della mutazione di Btk in C481. In ogni caso, gli enti regolatori non lo hanno ancora approvato per la terapia della LLC. (110)

La chinasi PI3K, più specificatamente la sua isoforma δ , espressa unicamente nelle cellule di derivazione ematopoietica in cui è attiva nei processi di proliferazione e sopravvivenza delle cellule B, è costitutivamente attivata nelle cellule leucemiche. È quindi stata ritenuta un potenziale *target* terapeutico e Idelalisib è stato il primo farmaco diretto contro questa molecola incluso nei protocolli per il trattamento della LLC. Si tratta di un inibitore orale selettivo per PI3K- δ , in grado di attenuare i segnali pro-sopravvivenza del *pathway* di BCR e del *signalling* chemochinico che portano all'attivazione di AKT e ERK, favorendo così l'apoptosi. (4) Analogamente ad Ibrutinib, anche la terapia con Idelalisib è associata a linfocitosi distributiva. (111)

Gli effetti collaterali provocati da questo farmaco sono molteplici e severi: si tratta di ipertensione, brividi, astenia, nausea, diarrea e, soprattutto, alterazioni della funzionalità del SI. Si tratta sia di disturbi autoimmuni, come epatiti e coliti che sembrano essere responsive alla terapia cortico-steroidica, che maggiore suscettibilità alle infezioni opportuniste, in particolare da CMV e *Pneumocystis jirovecii*, in particolare quando il farmaco è combinato con anticorpi anti-CD20. (103) (112) Per questo motivo, visto che il profilo di sicurezza è inferiore ad Ibrutinib, le linee guida indicano Idelalisib, in combinazione con Obinutuzumab, solo per i pazienti con del(17p) e/o mutazione di TP53 non candidabili ad altre opzioni terapeutiche. (4)

Un altro inibitore di PI3K, in questo caso delle isoforme γ e δ , è Duvelisib che, *in vitro*, interviene riducendo le interazioni tra cellule neoplastiche e il microambiente, anche nel caso di linfociti che presentano la mutazione C418S di Btk, che rende il *target* non riconoscibile da parte di Ibrutinib. Come Idelalisib,

anche Duvelisib provoca numerosi effetti collaterali, soprattutto aumenta la suscettibilità alle infezioni. (113)

In ultimo, Venetoclax (ABT-199) è un farmaco a somministrazione orale, BH3-mimetico, diretto contro Bcl-2. Questa proteina è espressa a livello della membrana mitocondriale esterna e ha un ruolo anti-apoptotico: poiché nei linfociti B neoplastici risulta iperespressa, ne favorisce direttamente la resistenza ai segnali di morte cellulare programmata e la proliferazione. Venetoclax, inibendo Bcl-2, è quindi in grado di aumentare il tasso di apoptosi delle cellule leucemiche. (114)

Nella pratica clinica, il farmaco in monoterapia induce una risposta nel 71-79% dei pazienti con prognosi negativa (caratterizzati da resistenza alla Fludabarina, delezioni del cromosoma 17 o geni per IGHV non mutati), garantendo una risposta completa nel 20%, una MRD nel 5% e una PFS di 15 mesi nel 69% dei trattati. (115) Tuttavia, per aggirare lo sviluppo di resistenze e rendere la terapia maggiormente tollerabile, la somministrazione di Venetoclax avviene solitamente in combinazione con un anticorpo anti-CD20, principalmente Rituximab e Obinutuzumab. Uno dei principali vantaggi di questo protocollo è la durata definita di 12 mesi, caratteristica che lo rende, in alcuni pazienti, più desiderabile rispetto al protocollo continuativo degli inibitori di Btk. L'associazione Venetoclax + Rituximab in prima linea garantisce una PFS a 53 mesi dell'82%, mentre Venetoclax + Obinutuzumab permette di ottenere una PFS a 36 mesi del 95%. (116)

Il principale effetto collaterale riscontrato negli studi clinici è stata la sindrome da lisi tumorale che, nel caso di Venetoclax, è strettamente correlata alla dose: difatti, l'aggiustamento delle quantità somministrate permette di evitare il verificarsi della sindrome in quasi tutti i pazienti. Altri possibili effetti avversi sono disturbi gastrointestinali, infezioni respiratorie superiori e neutropenia (in particolare in caso di associazione con anticorpi anti-CD20). (117) (118)

Nelle linee guida attuali, la combinazione Venetoclax + Obinutuzumab è considerata, al pari degli inibitori di Btk, una prima scelta sia per le terapie di prima che di seconda linea: al momento della decisione del trattamento è importante il confronto con il paziente riguardo gli effetti collaterali di entrambe le famiglie di farmaci (principalmente fibrillazione atriale e sanguinamenti per gli inibitori di Btk; sindrome da lisi tumorale ed immunosoppressione per la combinazione Venetoclax

+ Obinutuzumab) e la durata della terapia stessa (continuativa per gli inibitori di Btk, fino ad 1 anno per la combinazione Venetoclax + Obinutuzumab). (4)

1.1.9.3 Opzioni terapeutiche alternative

In aggiunta ai sopracitati farmaci e protocolli terapeutici, i medici hanno a disposizione altre tecniche da applicare nei pazienti affetti da LLC.

Ad esempio, la Lenalidomide, un farmaco immunomodulatore, si è dimostrato efficace, sia in singolo che in combinazione con Rituximab, nei pazienti recidivanti/refrattari ad altre terapie. Sembra che il suo effetto terapeutico sia dovuto in parte alla modulazione delle cellule del SI che compongono il microambiente, in parte all'attività antiproliferativa diretta contro le cellule delle LLC. (119)

Il trapianto allogenico di midollo osseo (HSCT) è in grado di fornire risposte terapeutiche prolungate, garantendo una sopravvivenza del 50% a 5 anni e una *non-relapse mortality* del 20%, presentando tuttavia un elevato rischio, circa il 50%, di sviluppo di tossicità di tipo *graft versus host disease* (GHVD). Per tale motivo, è una scelta solitamente riservata a pazienti giovani, *fit*, considerati ad alto rischio (ad esempio perché portatori della del(17p) o della mutazione di TP53) e a cui la terapia farmacologica con inibitori del *signalling* del BCR o con Venetoclax non ha apportato benefici. (120) (121)

Infine, si stanno svolgendo dei *trial* il cui scopo è verificare se la terapia con CD19 CAR T-cell, linfociti T il cui TCR è stato modificato e reso in grado di riconoscere i linfociti B patologici, può essere efficace in singolo e in combinazione con Ibrutinib. (122)

1.1.9.4 Indicazioni al trattamento

Al momento della decisione riguardo al protocollo terapeutico da somministrare al paziente affetto da LLC, il medico deve valutare diversi aspetti della patologia, in particolare la stadiazione secondo le classificazioni di Rai e Binet e l'eventuale presenza di sintomatologia leucemica. Allo stesso tempo, è fondamentale includere nel processo decisionale le caratteristiche intrinseche del paziente, soprattutto età e condizioni cliniche generali, al fine di prescrivere una terapia il più possibile personalizzata.

Le linee guida iwCLL (*international workshop on chronic lymphocytic leukemia*) del 2018 indicano che i pazienti asintomatici negli stadi iniziali della

neoplasia (Rai 0, Binet A) devono essere unicamente monitorati secondo un protocollo *watch and wait* e andrebbero sottoposti a terapia in caso di progressione della patologia o comparsa di sintomatologia. (59) Diversi studi recenti hanno confermato che un trattamento precoce, rispetto ad un atteggiamento di vigilanza attiva, non offre ai pazienti dei vantaggi in termini di sopravvivenza, con il rischio di comparsa di effetti avversi dovuti ai farmaci. (123) (124)

Allo stesso tempo, i pazienti in stadi intermedi (stadio I e II di Rai, B di Binet), pur ottenendo benefici dalla terapia iniziata al momento della diagnosi, non devono essere tutti automaticamente avviati ad un trattamento farmacologico. Infatti, questi pazienti possono essere monitorati periodicamente e solo in caso di comparsa di sintomi o di progressione della patologia, condizioni note come “malattia attiva”, vengono sottoposti ad un protocollo terapeutico. La LLC si può definire attiva se presenta almeno uno dei seguenti segni e sintomi:

- progressiva insufficienza midollare, evidenziata dal riscontro o il peggioramento di anemia (*cut-off*: Hb <10g/dl) e/o trombocitopenia (*cut-off*: piastrine <100x10⁹/l);
- splenomegalia: può essere massiva (milza palpabile almeno 6cm sotto al marginale costale sinistro), progressiva o sintomatica;
- linfoadenopatia: può essere massiva (diametro maggiore dei linfonodi ≥10 cm), progressiva o sintomatica;
- linfocitosi progressiva con un aumento superiore al 50% in meno di due mesi o raddoppio del valore in meno di 6 mesi non altrimenti spiegata (ad esempio vanno escluse le infezioni);
- complicanze autoimmuni: le principali sono anemie e piastrinopenie scarsamente responsive ai corticosteroidi;
- coinvolgimento extra-nodale sintomatico o funzionale (per esempio a carico di cute, reni, polmoni)
- comparsa di sintomi B (cfr. 1.1.5)

Nei pazienti affetti da LLC si potrebbe riscontrare un'elevata conta leucocitaria, ma la leucostasi raramente si verifica in questi pazienti. Perciò, la conta leucocitaria assoluta non andrebbe utilizzata singolarmente come indicatore di trattamento, allo stesso modo del riscontro di ipogammaglobulinemia e paraproteinemia mono- o oligo-clonale. (59)

1.1.9.5 Terapia: considerazioni generali

Ogni paziente, al momento della diagnosi, va sottoposto a stratificazione del rischio per valutare la prognosi ed eventualmente per stabilire il TTFT (cfr. 1.1.8). Secondo la classificazione CLL-IPI, il 75% dei pazienti appartiene alle classi di rischio basso ed intermedio, con un TTFT di circa 7 anni: per loro è prevista una visita di controllo ogni 6-12 mesi. I pazienti inseriti nelle classi di rischio alto e molto alto, il 25% del totale, vanno monitorati ogni 3-6 mesi. (125)

A prescindere dalla classificazione CLL-IPI, tutti i pazienti, in base a quanto descritto nel paragrafo 1.1.7.1, devono accedere ad un programma di prevenzione delle infezioni, attraverso valutazioni periodiche, e vaccinazioni, evitando l'inoculazione di virus attenuati, e a *screening* oncologici, soprattutto dovrebbero effettuare visite dermatologiche annuali. (126)

Prima di intraprendere un protocollo terapeutico, i pazienti candidabili a trattamento vanno attentamente analizzati per determinare le caratteristiche intrinseche sia loro che della patologia, valutando:

- età e condizioni cliniche: al momento della diagnosi, il paziente è solitamente anziano e affetto da comorbidità provocate da patologie pregresse, non riconducibili alla LLC. Per evitare di peggiorare ulteriormente lo stato di salute del paziente, è necessario stabilirne il *performance status* (PS) per poter applicare il protocollo terapeutico maggiormente sopportabile. Attraverso il *Cumulative Illness Rating Scale* (CIRS), uno strumento oggettivo utilizzato negli studi clinici che permette di determinare il numero e la gravità delle comorbidità del paziente, il PS e la creatinemia si può calcolare la fitness del paziente. (127) Inoltre, vanno ricercate ed evitate potenziali interazioni farmacologiche, in quanto diversi farmaci utilizzati per patologie comuni (come gli anticoagulanti) possono interferire con i chemioterapici. Infine, va monitorata la funzionalità degli organi potenzialmente esposti al danno farmaco-indotto, soprattutto cuore (per il rischio di cardiomiopatie e aritmie) e reni (vanno periodicamente misurate creatinemia ed azotemia).
- profilo genetico della neoplasia: va determinato in quanto rappresenta un fattore prognostico determinante sia perché influenza l'OS del paziente sia perché permette di adottare tecniche terapeutiche mirate. Al momento del trattamento di prima linea o alla ricaduta, la determinazione della delezione 17p e delle

mutazioni di TP53 sono oggi assolutamente necessarie per programmare una terapia diversificata. È anche necessario determinare lo stato mutazionale dei geni per IGHV in quanto nei pazienti U-LLC la chemio-immunoterapia è meno efficace. (128)

In Tabella IV è riportato un riepilogo degli esami a cui sottoporre un paziente affetto da LLC prima di iniziare un protocollo terapeutico, al fine di renderlo il più personalizzato possibile. (59)

Tabella IV. Esami indispensabili o raccomandati in pazienti con LLC.

Esame	Indicazione
Emocromo con formula leucocitaria	Sempre: alla diagnosi, prima del trattamento e in <i>follow-up</i>
Immunofenotipo dei linfociti periferici	Sempre per la diagnosi
Anamnesi, esame obiettivo, valutazione del <i>Performance Status</i> (ECOG scale)	Sempre: alla diagnosi, prima del trattamento e in <i>follow-up</i>
Valutazione geriatrica (CIRS)	Raccomandato
Esami sierologici: lattico deidrogenasi, elettroforesi proteica, immunoglobuline, creatinina (eGFR), bilirubina, aptoglobina, transaminasi, fosfatasi alcalina, test di Coombs	Sempre: alla diagnosi, prima del trattamento e nel <i>follow-up</i>
Biopsia o aspirato midollare	Quando clinicamente indicato (citopenia o diagnosi dubbia) o per l'arruolamento in un trial clinico
Rx torace e ecografia addome	Quando clinicamente indicato
Storia e stato di infezioni rilevanti (HBV, HCV, HIV, CMV)	Prima di un trattamento chemioimmunoterapico o di trapianto allogenico, per evitare una riattivazione virale
β2-microglobulina	Raccomandato pre-trattamento
FISH per la valutazione delle alterazioni geniche rilevanti: trisomia 12, del(13q), del(11q), del(17p13), analisi per la mutazione di TP53	Indispensabili prima di iniziare un trattamento
Analisi molecolare per la valutazione dello stato mutazionale dei geni IGHV	Indispensabile prima di iniziare un trattamento
Cariotipo	Raccomandato, soprattutto per l'arruolamento in <i>trial</i> clinici
TC torace-addome-pelvi con o senza mezzo di contrasto	Per stimare il carico tumorale quando richiesto e prima dell'inserimento del paziente in un <i>trial</i> clinico
Mutazioni NOTCH1	Raccomandato
Espressione CD49d	Suggerito ma non obbligatorio
Valutazione MRD	Suggerito ma non obbligatorio

1.1.9.6 Linee guida per il trattamento di prima e seconda linea

Terapia di prima linea. In base a quanto già riportato, nei pazienti con malattia inattiva o agli stadi iniziali (Binet A-B e Rai 0-III) non è indicata nessuna terapia.

Le linee guida indicano che nei pazienti che devono iniziare un protocollo terapeutico è necessario valutare il *performance status* (PS), lo stato mutazionale dei geni IGHV, la presenza della delezione del(17p) e/o della mutazione di TP53. L'analisi combinata di questi fattori permette di definire gli scenari riportati nella Tabella V:

- Assenza di delezione 17p e/o mutazione di TP53 in paziente *fit*: la miglior scelta terapeutica è rappresentata dalle nuove terapie biologiche, ovvero gli inibitori di Btk, per cui si applicano protocolli continuativi che si interrompono in caso di eccessiva tossicità o progressione della malattia, e gli inibitori di Bcl-2 associati ad Obinutuzumab, utilizzati solitamente per 1 anno. In caso di paziente M-LLC, si può ancora optare per la combinazione FCR, limitatamente a pazienti giovani (minori di 65 anni) che vanno sottoposti a periodici controlli ematologici e a profilassi antinfettiva. (95) (129) Se il paziente ha più di 65 anni, è indicata, in quanto più maneggevole, la combinazione BR. (130) In ogni caso, i protocolli che prevedono l'utilizzo di Ibrutinib (o il più recente Acalabrutinib) o Venetoclax + Obinutuzumab hanno dimostrato un netto vantaggio in termini di PFS rispetto alla chemio-immunoterapia. Pertanto, sono ritenuti i farmaci di prima scelta sia in caso di paziente M-LLC che U-LLC. (131) (132)
- Assenza di delezione 17p e/o mutazione di TP53 in paziente *unfit*: nei pazienti con comorbidità, spesso anziani, Ibrutinib rimane l'opzione raccomandata, ma Acalabrutinib ha mostrato di aver un profilo di tollerabilità superiore. Entrambi si sono dimostrati superiori in termini di PFS rispetto alla chemio-immunoterapia, analogamente alla combinazione Venetoclax + Obinutuzumab. (133) (134). La chemio-immunoterapia, rappresentata dalla combinazione Clorambucil + Obinutuzumab, è utilizzabile in caso di paziente M-LLC. È più efficace della combinazione Clorambucil + Rituximab per quanto riguarda la PFS e permette di ottenere risposte complete nel 20% dei pazienti. (135)
- Presenza di delezione 17p e/o mutazione di TP53: si tratta di un profilo patologico molto aggressivo con scarsa risposta alla chemio-immunoterapia,

che non risulta indicata in questi pazienti. (95) Al contrario, Ibrutinib (o Acalabrutinib, eventualmente associato a Obinutuzumab), Venetoclax + Obinutuzumab e Idelalisib + Rituximab (solo se le precedenti terapie risultano contraindicate) offrono un buono, ma non definitivo, controllo della malattia. (4) In questi pazienti bisogna quindi utilizzare Ibrutinib in prima linea, in grado di arrestare la progressione della malattia per 24 mesi, o Acalabrutinib, con una PFS a 48 mesi del 76%. (133) (136) Venetoclax, in combinazione con Obinutuzumab, è invece consigliato in caso di fallimento degli inibitori di Btk o se quest'ultimi risultano controindicati, garantendo una risposta profonda con malattia residua minima non rilevabile. (111) (137) Infine, è stato recentemente approvato anche Zanubrutinib, inibitore di Btk di II generazione, in grado di garantire un'assenza di progressione della malattia a 30,5 mesi nell' 86% dei pazienti. (138)

Prima di iniziare qualsiasi protocollo, è importante confrontarsi con il paziente per comprendere le sue esigenze (ad esempio, un paziente potrebbe preferire una terapia a durata definita rispetto ad una continuativa), per rilevare eventuali controindicazioni e per illustrare i possibili effetti collaterali (cfr. 1.9.2). (4)

Tabella V. Terapia di prima linea della LLC, dall'ultimo update delle linee guida (2022). (4)

Stadio	Del(17p) e/o TP53mut	Fitness	IGHV	Terapia
Binet A-B, Rai 0-II, malattia inattiva	Irrilevante	Irrilevante	Irrilevante	Nessuna terapia indicata
Malattia attiva o Binet C o Rai III-IV	Presente	Irrilevante	Irrilevante	Ibrutinib/Acalabrutinib o Venetoclax+Obinutuzumab o Idelalisib+Rituximab (se le altre opzioni non sono indicate)
				Assente
	Non mutato	Ibrutinib/Acalabrutinib o Venetoclax+Obinutuzumab.o FCR (o BR se età>65 anni)		
	Assente	<i>Physically unfit</i>	Mutato	Venetoclax+Obinutuzumab o Ibrutinib/Acalabrutinib o Clorambucil+Obinutuzumab
			Non mutato	Venetoclax+Obinutuzumab o Ibrutinib/Acalabrutinib o Clorambucil+Obinutuzumab

Terapia di seconda linea. La LLC refrattaria o recidiva va trattata solo in caso di “malattia attiva” (cfr. 1.1.9.4), ovvero nel caso in cui il paziente sia sintomatico. Nel caso in cui il paziente fosse asintomatico ma presentasse una linfocitosi senza altri segni di progressione non c'è indicazione ad iniziare un protocollo terapeutico: questa situazione può prolungarsi per anni, ma in assenza di sintomi non è necessario alcun trattamento. (59)

Prima di sottoporre il paziente ad una terapia di seconda linea è necessario svolgere alcuni approfondimenti:

- valutare la risposta alle precedenti terapie: gravità degli effetti collaterali, periodo di assenza di progressione della LLC, rivalutazione dei parametri di stratificazione del rischio già presi in considerazione prima dell'inizio della terapia di prima linea;

- nuovo studio del profilo mutazionale: le alterazioni genetiche presenti al momento della diagnosi possono evolvere, mentre durante il decorso della patologia possono svilupparsi ulteriori aberrazioni, soprattutto a carico di TP53;
- esclusione della trasformazione in Sindrome di Richter: il paziente va sottoposto ad agoaspirato e biopsia midollare, TC torace-addome-pelvi e PET. (126)

Un'analisi fondamentale da effettuare prima di iniziare il trattamento di seconda linea riguarda il tempo trascorso tra la fine del precedente trattamento e il momento della ricaduta (PFS):

- PFS superiore a 24-36 mesi: va ripetuto il trattamento di prima linea se TP53 non è mai risultato mutato durante tutto il decorso della malattia; in caso contrario va iniziata una terapia differente;
- PFS inferiore a 24-36 mesi: indipendentemente dal profilo mutazionale del paziente, va intrapreso un protocollo terapeutico diverso rispetto a quello della prima linea, da scegliere in base agli stessi parametri indicati in precedenza (PS, del(17p), stato mutazionale di TP53 e dei geni per IGHV), oltre a vagliare i possibili effetti collaterali dei farmaci a disposizione.

Per la terapia di seconda linea della LLC sono indicati;

- Inibitori di Btk: diversi studi ne hanno rimarcato l'elevata capacità di prolungare la PFS indipendentemente dal profilo mutazionale del paziente. Nel caso di Ibrutinib, a 5 anni la PFS media nella popolazione generale di pazienti è di 51 mesi, 43 mesi nella popolazione U-LLC, 26 mesi nella popolazione che presentava del(17p). (139) Si è inoltre dimostrato superiore a Ofatumumab nel prolungare la OS nei pazienti recidivi o refrattari. (140) Acalabrutinib, rispetto ad Ibrutinib, è altrettanto efficace ed è meglio tollerato. (109) Zanubrutinib, invece, oltre ad essere più tollerato, aumenta anche la PFS rispetto ad Ibrutinib. (141)
- Venetoclax ± Rituximab: nei *trial* clinici Venetoclax si è dimostrato altamente efficace nei pazienti con del(17p), inducendo una risposta alla terapia nel 77% dei casi e garantendo una PFS di 24 mesi nel 54% dei trattati. (142) In combinazione con Rituximab, si è dimostrato superiore al protocollo BR fornendo una PFS di 24 mesi nel 68% e di 36 mesi nel 51% dei pazienti. (143)
- Idelalisib + Rituximab: pur essendosi rivelato efficace in pazienti complicati

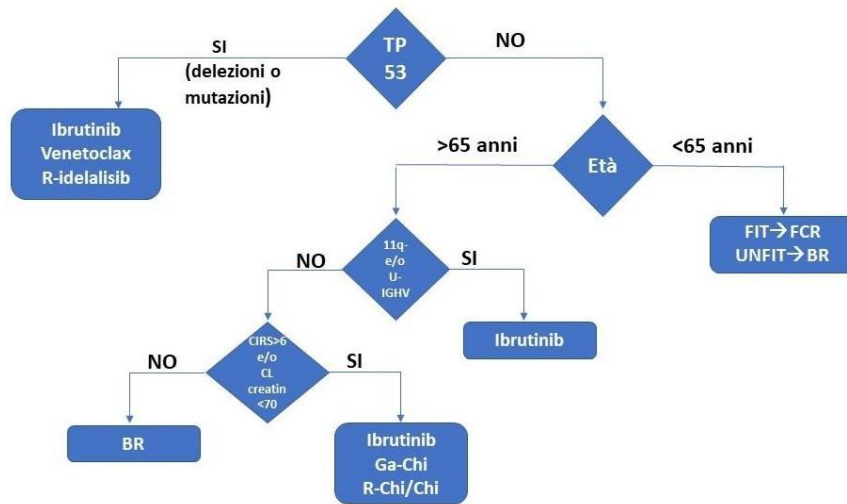
(anziani, con comorbidità, refrattari a più linee terapeutiche, con profilo mutazionale sfavorevole) nell'aumentare la durata della PFS e della OS rispetto al solo Rituximab, a causa della sua immuno-tossicità è un protocollo indicato solo a pazienti che non possono assumere inibitori di Btk e Venetoclax. (126) (144)

Inoltre, negli ultimi anni sono stati avviati diversi studi allo scopo di valutare la sicurezza e l'efficacia della combinazione tra inibitori di Btk e di Bcl2, in particolare la combinazione Ibrutinib + Venetoclax. Alla base di questa associazione c'è la complementarità dell'azione dei due farmaci, ovvero Ibrutinib favorisce l'uscita dagli organi linfoidi secondari delle cellule B leucemiche, le quali una volta lontane dalla loro nicchia neoplastica sono maggiormente suscettibili all'apoptosi, favorita anche dall'effetto di Venetoclax, in grado di inibire direttamente il fattore anti-apoptotico Bcl-2. (145) Il protocollo terapeutico utilizzato nei *trial* prevede una prima fase in cui il paziente assume unicamente Ibrutinib per 3 cicli, per poi affrontare 12 o 24 cicli di terapia combinata. I vari studi, in cui sono state arruolate diverse tipologie di pazienti, sono concordi nel definire che questa nuova associazione può garantire una PFS di almeno 24 mesi in più del 90% dei trattati. (146) (147) La combinazione Ibrutinib + Venetoclax è stata approvata dall'EMA (*European Medicines Agency*), ma non è ancora stata inserita negli algoritmi terapeutici. (148)

In ultimo, è doveroso ricordare che i pazienti affetti da LLC recidivi o refrattari alle terapie a cui sono stati sottoposti dovrebbero, quando possibile, essere arruolati in uno studio clinico. (4)

PDTA di Regione. La Rete Ematologica Veneta (REV), che gestisce nel proprio territorio l'assistenza ai pazienti adulti affetti da patologie del sangue, nel 2019 ha pubblicato i percorsi diagnostico-terapeutici-assistenziale (PDTA) sia per la terapia di prima linea (Figura 9A) che di seconda linea (Figura 9B) per la LLC.

A



B

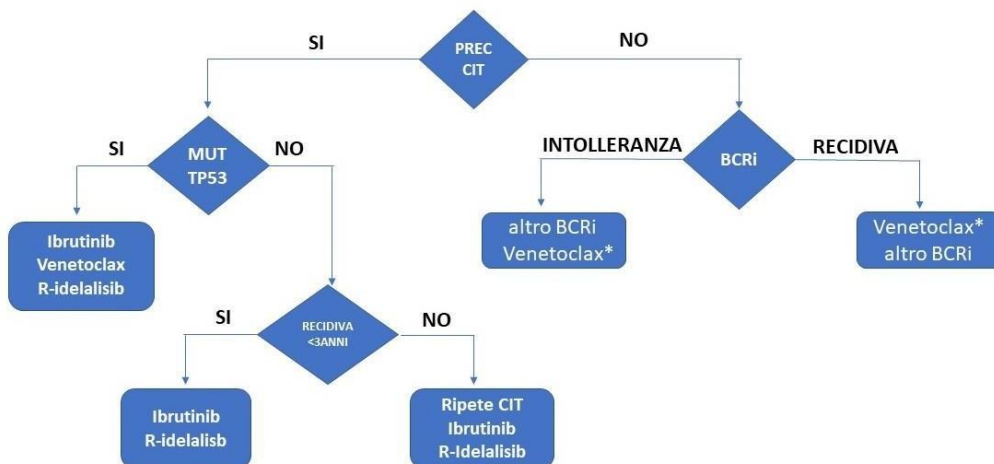


Figura 9. A. Algoritmo terapeutico dei pazienti con LLC attiva, prima linea. B. Algoritmo terapeutico dei pazienti con LLC recidivata/refrattaria. PDTA stilati dalla Rete Ematologica Veneta (REV). R-Idelalisib: Rituximab-Idelalisib; FCR: Fludarabina-Ciclofosfamide-Rituximab; BR: Bendamustina-Rituximab; Benda-Ofa: Bendamustina-Ofatumumab; Ga-Chl: Obinotuzumab-Clorambucil; Chl-Ofa: Clorambucil-Ofatumumab; R-Chl: Rituximab-Clorambucil; CIRS: cumulative illness rating scale; Cl. Creatin: clearance della creatinina; U- IGHV: geni IGHV non mutati.

1.2 CHINASI DI ADESIONE FOCALE FAK

La chinasi di adesione focale FAK è una tirosin-chinasi intracitoplasmatica non recettoriale codificata dal gene PTK2, che si trova nella regione cromosomiale 8q24.3. (149) Si tratta di una proteina di 125kDa con espressione ubiquitaria nei tessuti adulti ed embrionali, dove ricopre diversi ruoli nella regolazione dei processi di diffusione, migrazione, progressione del ciclo cellulare e sopravvivenza (Figura 10). (150)

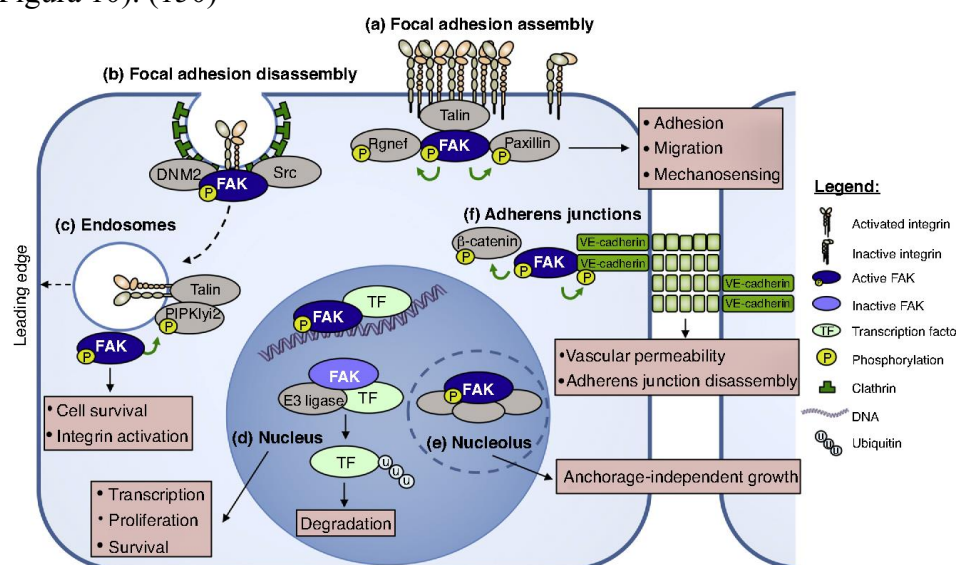


Figura 10. Funzioni cellulari di FAK. FAK promuove la formazione di adesioni focali a livello dei siti di aggregazione integrinica (A), dove può anche permettere l'endocitosi dell'integrina favorendo lo smontaggio delle adesioni focali stesse (B). FAK lega e si attiva a livello degli endosomi, facilitando l'attivazione delle integrine e la sopravvivenza cellulare (C). Nel nucleo, FAK nello stato inattivo agisce come scaffold per fattori di trascrizione, mentre in forma attiva modula l'espressione genica analogamente ad un fattore di trascrizione (D). Nei nucleoli, FAK in forma attiva crea dei complessi con altre proteine, favorendo la sopravvivenza e la proliferazione cellulare (E). A livello delle giunzioni aderenti, FAK in forma attiva interagisce con i fattori di crescita endoteliali (F) (adattato da Kleinschmidt et al., 2017). (149)

1.2.1 STRUTTURA

FAK è composta da un dominio N-terminale di tipo FERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin) un dominio centrale chinamico e un dominio C-terminale di tipo FAT (focal adhesion targeting) (Figura 11). Sono poi presenti tre regioni ad elevata espressione di prolina, che permettono sia di connettere tra loro i tre domini principali (chinamico, FERM e FAT) sia il legame con il dominio SH3 di altre proteine e siti di fosforilazione tirosinica, che permettono il legame con il dominio SH2 di altre molecole. (149)

Il dominio FERM è a sua volta composto da tre subunità, denominate F1, F2, F3, ed è responsabile della capacità di FAK di stabilire dei legami proteina-

proteina, in particolare con quelle presenti nelle adesioni focali, e di trasferire informazioni dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare fino al nucleo della cellula. Nella regione di legame tra FERM ed il dominio chinasi è inoltre presente la tirosina (Y) 397, un importante sito di autofosforilazione ed autoregolazione. Nel dominio FERM è infine presente una sequenza di localizzazione nucleare (NLS). (151)

Il dominio FAT è ricco di proline e consente di interagire e creare legami con altre proteine presenti nelle adesioni focali, principalmente paxillina e talina. In questo modo, FAK è in grado di interagire con le integrine di superficie pur non avendo legami diretti con esse. Il dominio centrale chinasi presenta almeno 6 domini di fosforilazione della tirosina, una *ATP binding cassette* e l'ansa di attivazione, contenente le tirosine Y576 e Y577. (152)

Nello stato inattivo, FAK assume una conformazione chiusa ed auto-inibita, in cui il dominio FERM blocca il dominio chinasi. Il legame di FAK con membrane ricche di PIP2 (fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato) provoca la dissociazione di FERM dal dominio centrale, con conseguente esposizione e autofosforilazione della tirosina Y397, la quale assume la sua conformazione attiva. (153)

In caso di *splicing* alternativo, dal gene PTK2 può avvenire la trascrizione della proteina *FAK-related-non-kinase* (FRNK), che è priva di attività chinasi e la cui struttura di 41kDa contiene unicamente il dominio C-terminale di FAK. (154) Il ruolo di FRNK e il suo rapporto con FAK non sono stati ancora completamente definiti, ma sembra che FRNK regoli negativamente l'attività di FAK a livello delle adesioni focali e ne riduca l'autofosforilazione al residuo Y397. All'interno della sequenza intronica di FAK è presente un *promoter* per la trascrizione di FRNK. (155)

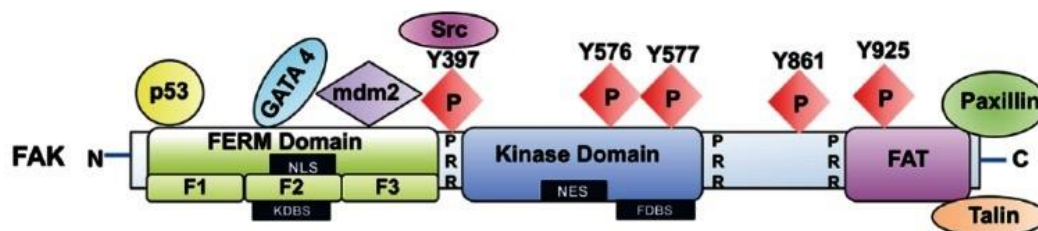


Figura 11. Struttura di FAK. FAK è composta da un dominio N-terminale di tipo FERM (band 4.1, ezrin, radixin, moesin), un dominio centrale chinasi ed un dominio C-terminale di tipo FAT (focal adhesion targeting). Diverse proteine regolatorie, come p53, MDM2 e recettori per fattori di crescita, stabiliscono dei legami con il dominio FERM. Il dominio FAT è in grado di associarsi indirettamente, attraverso le proteine delle adesioni focali come paxillina e talina, con i recettori integrinici. Per quanto riguarda l'autofosforilazione di Y397, la tirosin chinasi SRC lega questo sito e in seguito il complesso FAK-SRC fosforila l'ansa di attivazione Y576/Y577, che ricopre un ruolo importante per l'attività catalitica di FAK. Inoltre, nella struttura è presente anche la sequenza NLS (adattato da Yoon et al., 2015). (156)

1.2.2 ATTIVAZIONE

L'attivazione di FAK avviene tipicamente in seguito alla formazione di *cluster* di recettori integrinici susseguente al legame della cellula con la matrice extracellulare (ECM). Il dominio FAT permette, indirettamente, lo stabilirsi di un contatto tra FAK e questi *cluster*, il che provoca la dimerizzazione di FAK e la conseguente autofosforilazione al sito Y397. Questa tirosina fosforilata assume la funzione di *scaffold* molecolare per il legame di FAK con proteine che presentano il dominio SH2, come le chinasi della famiglia SRC, PLC γ , GRB7 e PI3K. Il legame con queste proteine provoca a sua volta la fosforilazione di altre tirosine, come Y576 e Y577 dell'ansa di attivazione del dominio chinasi, e Y861 e Y925. L'effetto comune di queste modifiche è la massimizzazione dell'attività catalitica di FAK, che, tra gli altri effetti, porta all'attivazione della cascata di trasduzione del segnale mediata da RAS/MAPK e al potenziale distacco di FAK dai complessi delle adesioni focali. (157) (158)

L'attività di FAK può inoltre essere regolata dalle proteine tirosin-fosfatasi (PTPs), altamente espresse a livello delle adesioni focali, in particolare da parte di PTP α , la cui ridotta attività si traduce in una minore fosforilazione di FAK. (159)

Un'ulteriore regolazione di FAK viene svolta dalla famiglia delle calpaine, composta da proteasi che si attivano in seguito all'aumento della concentrazione di calcio intra-citoplasmatica. A questa famiglia appartengono più di 1000 calpaine differenti, accomunate dalla capacità di riconoscere e clivare specifici *target*. (160) Nel caso di FAK, una calpaina taglia la chinasi nella zona C-terminale, provocando la formazione di due frammenti: il frammento N-terminale, che contiene la Y397 ma non il dominio FAT e non è quindi in grado di interagire con le adesioni focali,

e il frammento C-terminale, simile a FRNK. Il risultato dell'attività della calpaina è quindi la dissociazione di FAK dalle adesioni focali, con conseguente traslocazione nucleare della porzione N-terminale. (161)

Analogamente alla famiglia delle calpaine, anche alcune componenti della famiglia delle caspasi, di cui fanno parte diverse proteine regolatrici dei processi apoptotici, sono in grado di riconoscere FAK e modificarne la struttura. In particolare, si verifica un processo di *cleavage* definito gerarchico: il primo taglio (*cleavage I*) viene effettuato dalla caspasi-3 e genera la formazione di 2 frammenti, uno N-terminale, di maggiore lunghezza, e uno C-terminale; in seguito la caspasi-6 esegue il secondo taglio (*cleavage II*) unicamente a livello del frammento N-terminale, riducendone ulteriormente la dimensione. Questo meccanismo riduce il livello di fosforilazione delle diverse tirosine presenti nella struttura di FAK, portando quindi ad una minore funzione della chinasi e favorendo la progressione del processo apoptotico. (162)

1.2.3 RUOLO NEL NUCLEO

L'attività chinastica derivata dalle interazioni a livello delle adesioni focali non è l'unica modalità con cui FAK interviene nell'omeostasi cellulare, in quanto mediante la sequenza NLS del dominio FERM, in condizioni di stress ossidativo, può intervenire come co-recettore di fattori di trascrizione nella regolazione dell'attività nucleare. (163). Oltre alle sequenze NLS, all'interno della struttura di FAK sono presenti anche le sequenze *Nuclear Export Signal* (NES), queste ultime presenti nella subunità F2 di FERM (NES1) e nel dominio chinastico. (164)

Lo sviluppo dell'attività non chinastica di FAK avviene attraverso il suo rapporto sia con alcuni fattori di trascrizione, come NANOG, TAF9 e la RNA polimerasi di tipo II, sia con modulatori epigenetici, come MBD2 e HDAC1. (165) (166) Alcuni studi hanno determinato come tra i principali *target* dell'attività di FAK come regolatore dell'attività nucleare ci siano p53, che viene avviata da FAK al processo di ubiquitinazione effettuato da MDM2 e conseguentemente degradata, V-CAM, GATA4 e IL-33. Allo stesso tempo, p53 lega ed inibisce il promotore di FAK. (163) (167)

1.2.4 RUOLO NEL PROCESSO NEOPLASTICO

La localizzazione a livello dei complessi di adesione focale, il ruolo di *scaffold* molecolare e la capacità di regolare l'attività nucleare mettono FAK in

relazione con un gran numero di mediatori. Nelle cellule tumorali, FAK e alcuni di questi mediatori risultano spesso *up*-regolati, assumendo quindi un importante ruolo nello sviluppo della neoplasia.

Diversi studi hanno ricercato l'aumento dell'espressione del mRNA di FAK in varie tipologie di tumore maligno, quantificando un aumento del 37% nel carcinoma sieroso ovarico, del 30% nel carcinoma a cellule squamose di testa e collo, del 26% nel tumore invasivo del seno, del 25% nel cancro del colon-retto; in generale si riscontrano valori notevolmente aumentati in molteplici neoplasie, associati generalmente ad una ridotta sopravvivenza del paziente. (149) Non è ancora completamente acclarato il motivo per cui FAK risulti iperespresso nelle cellule tumorali e, inoltre, gli studi circa il suo ruolo nelle patologie oncoematologiche sono meno numerosi rispetto a quelli effettuati sui tumori solidi. Alcune evidenze immunohistochimiche hanno dimostrato che FAK è notevolmente aumentato nella maggior parte dei linfomi a cellule B, mentre non risulta alterato nelle leucemie e nei linfomi a cellule T. (168)

Un aspetto non del tutto chiarito riguarda il rapporto tra FAK e p53: sembrerebbe che quest'ultimo, in condizioni fisiologiche, sia in grado di legare il *promoter* di FAK, sopprimendone l'espressione. È ancora da stabilire se le alterazioni di p53, riscontrate in numerose neoplasie, tra cui anche la LLC, abbiano un ruolo nell'iperpressione di FAK. (169)

FAK favorisce il processo neoplastico aumentando la proliferazione cellulare, favorendo i segnali di sopravvivenza, potenziando la motilità cellulare e guidando l'angiogenesi. Le cellule in cui è presente un'aumentata attività di FAK sono resistenti all'*anoikis*, ovvero la morte cellulare causata dal distacco, a causa dell'interazione tra la chinasi e TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*). Allo stesso tempo, la caratteristica capacità di FAK di interagire indirettamente con i *cluster* integrinici permette alla chinasi di attivare la via di segnale ERK, la quale porta ad una *up*-regolazione della ciclina D1, che a sua volta favorisce la progressione del ciclo cellulare e quindi ad una maggiore proliferazione. Per quanto riguarda la motilità cellulare, FAK favorisce il processo di transizione mesenchimale delle cellule epiteliali: in questo meccanismo è necessario alterare le adesioni focali e le caratteristiche del citoscheletro attraverso l'espressione delle metalloproteinasi, le quali permettono di modellare la matrice extracellulare e permettere alle cellule neoplastiche di invadere e migrare

nell'organismo. FAK agisce, in seguito al legame con SRC, come uno *scaffold* per numerose proteine in grado di rimodellare le adesioni focali e riorganizzare la struttura del citoscheletro. Infine, a livello nucleare, FAK promuove l'espressione di VEGFR2 (*vascular endothelium grow factor receptor 2*), aumentando quindi il *signalling* pro-angiogenico a livello del microambiente tumorale. (170)

1.2.5 INIBITORI DI FAK

La chinasi FAK ricopre molteplici ruoli nel processo neoplastico ed è quindi oggi riconosciuta come un promettente *target* per la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali, rappresentati soprattutto da piccole molecole in grado di bloccare la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di FAK.

La principale classe di inibitori di FAK è composta da molecole dirette contro il sito di legame per l'ATP nel dominio chinasi in grado di generare un blocco nella fosforilazione della chinasi, soprattutto a livello dell'ansa di attivazione. La struttura di questi farmaci, definiti inibitori del sito di legame per l'ATP, presenta infatti un dominio simile al nucleo pirimidinico dell'ATP, riconosciuto e legato dai domini chinasi. Sono stati effettuati dei *trial* pre-clinici che hanno dimostrato una loro buona efficacia contro diverse tipologie di tumori, tra cui glioma, tumori ovarici, carcinomi gastrointestinali e neoplasie mammarie. (171)

In questa classe di molecole è presente Defactinib (VS-6063), un inibitore di FAK di II generazione in grado di sopprimere la fosforilazione di Y397. Questo farmaco è già stato utilizzato in studi clinici di fase 1, rivelando un buon profilo di sicurezza anche in pazienti con tumori solidi in stadi avanzati, e di fase 2 in pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule con mutazione di KRAS, in cui è stato evidenziato come i principali effetti collaterali siano nausea, vomito, diarrea, iperbilirubinemia, astenia e cefalea. (172)

Un'altra classe di inibitori di FAK è rappresentata dagli inibitori allosterici, i quali legano con alta selettività alcuni domini di FAK distanti dai siti di legame per ATP. Si tratta di molecole in grado di inserirsi nei domini FERM e FAT, ostacolando la funzione di *scaffold* di FAK, impedendo così che la chinasi interagisca e attivi altre proteine spesso implicate in processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare. Inoltre, queste molecole riconoscono con elevata specificità i domini chinasi, bloccando l'autofosforilazione di Y397. (173)

2 SCOPO DELLA TESI

Defactinib, inibitore di II generazione della chinasi di adesione focale FAK, è un farmaco in grado di inibire l'auto-fosforilazione di FAK al sito Y397, bloccando in questo modo l'attività della chinasi. Il farmaco è in valutazione in *trial* clinici di fase II per il trattamento di neoplasie solide ed è in fase di studio il suo potenziale ruolo nella terapia delle patologie oncoematologiche, tra cui la Leucemia Linfatica Cronica

Per questa patologia sono già a disposizione diverse categorie di farmaci chemioterapici, immunoterapici e a bersaglio molecolare, ma nessuno di essi è attualmente in grado di garantire una completa guarigione dalla LLC. Per questo motivo, la ricerca in questo campo è focalizzata su nuove molecole e *pathway*, comprese le interazioni che intercorrono tra il microambiente neoplastico e i linfociti B leucemici dove FAK, una molecola implicata in numerose vie di segnale e cascate trasduzionali cellulari, ha un ruolo chiave nella mediazione dei segnali extra- e intra- cellulari.

Considerate queste premesse, in questa Tesi abbiamo valutato:

- l'effetto di Defactinib, sulla vitalità dei linfociti B leucemici, compresa la valutazione del *pattern* proteico dopo trattamento;
- l'effetto di Defactinib, sulla vitalità dei linfociti B leucemici in co-coltura con cellule stromali a rappresentare il microambiente leucemico;
- l'effetto di Defactinib in combinazione con gli inibitori di Btk (Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib) sulla vitalità dei linfociti B leucemici, compresa la valutazione del *pattern proteico* dopo trattamento.

Per questo studio abbiamo utilizzato metodiche biochimiche, di biologia cellulare e di citofluorimetria.

3 MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

In questa Tesi sono stati analizzati pazienti con diagnosi di Leucemia Linfatica Cronica, seguiti periodicamente dall'Unità Operativa Complessa di Ematologia e Immunologia Clinica (Dir. Prof. L. Trentin) del Dipartimento di Medicina dell'Università degli Studi di Padova. Al momento del prelievo nessun paziente era sottoposto a trattamento. Ad ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue venoso periferico, su cui è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica che ha accertato come i linfociti B neoplastici fossero positivi per i marcatori CD5, CD19 e CD23, tipici della LLC.

3.2 ANALISI DELL'IMMUNOFENOTIPO MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA

Per l'analisi dell'immunofenotipo sul sangue periferico dei pazienti con diagnosi di LLC inseriti nello studio abbiamo utilizzato la citofluorimetria, una metodologia rapida e automatizzata che verrà brevemente descritta.

La citometria a flusso consente di valutare i diversi parametri che definiscono le caratteristiche fisiche e biochimiche di singole cellule in sospensione e la loro firma antigenica, attraverso la valutazione della luce visibile e fluorescente che queste emettono, dopo essere state legate da anticorpi associati a fluorocromi, mentre fluiscono attraverso un mezzo liquido. L'analisi si basa sui segnali di fluorescenza rilevati dai sensori presenti nel sistema, il fotodiodo per *forward scatter* (FSC o diffusione frontale della luce, proporzionale alle dimensioni cellulari) e i fotomoltiplicatori per *side scatter* (SSC o diffusione a 90° della luce, che è proporzionale alla granulosità e complessità cellulare, compreso il rapporto nucleo/citoplasma). I valori riportati da FSC e SSC vengono utilizzati per creare un diagramma di dispersione a punti (*dot plot*) che permette di definire, in base alla dimensione e alla granulosità, le popolazioni cellulari presenti nel campione. A questo punto, si possono creare delle regioni di analisi che vengono definite *gate* morfologico, se si decide di concentrarsi su un'unica popolazione per poi valutarne la fluorescenza, e *gate* immunologico, se si analizza un marcatore che accomuna più popolazioni differenti.

La quantificazione del livello di fluorescenza dei *target* di interesse si ottiene utilizzando degli anticorpi monoclonali specifici diretti contro antigeni espressi sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo delle cellule presenti nel campione analizzato. Questi anticorpi sono legati a dei fluorocromi che, se eccitati da un laser con un determinata lunghezza d'onda, emettono una fluorescenza, di intensità proporzionale al numero di eventi verificatisi, che viene percepita e analizzata dallo strumento, con cui i dati vengono poi processati e organizzati in grafici. Si può costruire un istogramma, in cui le ordinate sono rappresentate dal numero di cellule che presentano o meno la molecola di interesse e le ascisse esprimono l'intensità della fluorescenza emessa, o un citogramma, che permette di analizzare contemporaneamente più marcatori, dove le coordinate cartesiane si riferiscono ciascuna ad un unico marcatore e il piano viene diviso in 4 regioni (una negativa per entrambi i marcatori, due positive rispettivamente per l'uno o per l'altro marcatore e una positiva per entrambi i marcatori). La citofluorimetria permette quindi di ottenere, utilizzando determinati anticorpi, l'immunofenotipo del campione, ovvero rende possibile classificare le diverse popolazioni leucocitarie in base alla loro espressione antigenica, che varia a seconda della linea cellulare di origine e dello stato maturativo.

Per questo studio abbiamo analizzato i marcatori CD3, CD5, CD16, CD19, CD49d, IgM e IgD, per caratterizzare i linfociti B neoplastici dei casi presi in esame. I fluorocromi usati sono stati: fluoresceina isotiocianato (FITC, per CD5 e IgM), ficoeritrina (PE, per CD49d e IgD), peridinin-clorofilla protein cianina-5,5 (PerCP-Cy5,5, per CD16), ficoeritrina-cianina-7 (PE-Cy7, per CD3) e allofocianina (APC, per CD19). Lo strumento utilizzato è stato il citofluorimetro FACS CANTO II (Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA) e i dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando il programma Diva 7. Per ogni analisi sono stati acquisiti 15.000 eventi.

3.3 ISOLAMENTO DEI LINFOCTI B DAL SANGUE PERIFERICO

In base alla frazione della popolazione linfocitaria patologica sul totale delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs, *periferal blood mononuclear cells*), abbiamo utilizzato due diversi processi di isolamento delle cellule B patologiche. Se i linfociti B leucemici (CD 19⁺/5⁺) rappresentavano più del 90% del totale dei PBMCs, è stata utilizzata la purificazione mediante stratificazione su

Ficoll/Hypaque (F/H) (Biowest; Nuaille, France); quando invece nel campione era presente una percentuale di linfociti T maggiore del 10%, la purificazione è stata effettuata utilizzando il *kit RosetteSep* (StemCell Technologies; Vancouver, Canada).

3.3.1 PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI B MEDIANTE STRATIFICAZIONE CON FICOLL/HYPAQUE

Dai pazienti sono stati prelevati dei campioni di sangue venoso conservati in provette contenenti EDTA. In seguito, per isolare i PBMC, il sangue è stato diluito in rapporto 1:6 con soluzione salina allo 0,9% (soluzione fisiologica). Si è proceduto effettuando una stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H), una sostanza che, se aggiunta lentamente al sangue diluito, permette di separare secondo densità la popolazione mononucleare e piastrinica dalle altre componenti cellulari del sangue periferico, in quanto quest'ultime si posizioneranno al di sotto dello strato di F/H. A questo punto, è stata effettuata una centrifugazione a 900g per 20 minuti senza freno a 20°C. Al termine della centrifugazione a livello dell'interfaccia F/H si è formato un anello composto unicamente da PBMCs, i quali sono stati aspirati per poi essere sottoposti a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti con freno a 20° C. Al termine di questo processo, il *pellet* cellulare ottenuto è stato risospeso in un'adeguata quantità di soluzione salina e le cellule contate al microscopio in una camera di Burker, per definirne la concentrazione nella soluzione finale ottenuta (Figura 12).

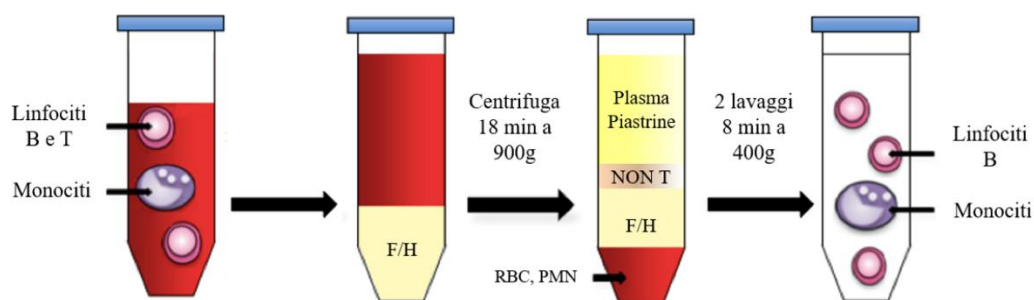


Figura 12. Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico mediante stratificazione su Ficoll/Hypaque. Le cellule mononucleate sono state isolate dal sangue periferico mediante centrifugazione su F/H. Le cellule mononucleate e le piastrine si concentrano sopra lo strato di F/H perché hanno densità minore; al contrario, i globuli rossi (RBC) ed i granulociti (PMN) hanno maggiore densità rispetto al F/H e si raccolgono sul fondo della provetta. Successivamente, l'anello di PBMC è stato raccolto e si sono eseguiti 2 lavaggi da 8 minuti a 400g. Le cellule così ottenute sono state risospese in soluzione fisiologica per la successiva conta in camera di Burker.

3.3.2 PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI B MEDIANTE *KIT ROSETTESEP*

Il *kit RosetteSep* comprende un *cocktail* di anticorpi contro gli antigeni di superficie presenti sulla membrana delle cellule ematopoietiche (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) e anti-glicoforina A, presente sugli eritrociti. Se aggiunto ad un campione ematico, il *kit* permette di selezionare negativamente i linfociti B, in quanto gli anticorpi presenti legano tutte le cellule non-B del campione, creando delle immunorosette. In seguito alla formazione delle rosette, si procede con la stratificazione su F/H per separare i linfociti B dalle altre cellule, che precipitano al di sotto dell'interfaccia in quanto coniugate agli anticorpi presenti nel *kit*.

Il procedimento di purificazione prevede che si aggiungano 25 μ l di *RosetteSep* per ogni ml di campione ematico, lasciandolo incubare per 20 minuti a temperatura ambiente, per poi diluirlo in rapporto 1:2 con soluzione fisiologica composta al 2% da FBS (*Fetal bovin serum*; Euroclone; Milano, Italia) e agitarlo delicatamente. I passaggi successivi sono identici alla purificazione precedentemente illustrata (cfr. 3.3.1), fatta eccezione per l'utilizzo della soluzione fisiologica addizionata del 2% di FBS per i due lavaggi successivi alla stratificazione con F/H (Figura 13).

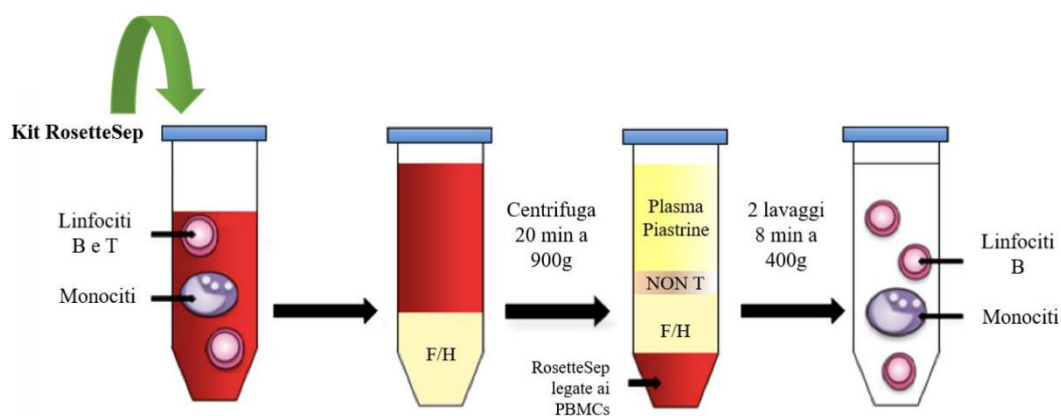


Figura 13. Purificazione dei linfociti B con Kit RosetteSep. I linfociti B CD19⁺ vengono isolati, per selezione negativa, dal sangue intero. 10ml di sangue venoso intero sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con 250 μ l di RosetteSep. A seguire, tramite stratificazione F/H, si sono ottenuti i linfociti B CD19⁺, che si concentrano sopra lo strato su F/H, mentre il resto delle cellule rappresentato da PMN e globuli rossi (RBC), legati alle rosette, si è raccolto sul fondo della provetta.

3.4 COLTURE CELLULARI

I linfociti B (CD19+/CD5+), ottenuti dai pazienti con LLC, sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 con antibiotici (Penicillina/Streptomicina al 5%; Euroclone) e 2% FBS alla concentrazione di 2×10^6 /ml in piastre da 48 pozzetti. Le cellule sono state incubate in un termostato a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5% senza alcuno stimolo (condizione definita *alone*, non trattato) o con i seguenti inibitori: Defactinib 5µM e 10µM, Ibrutinib 5µM, Acalabrutinib 5µM e Zanubrutinib 5µM (Selleckchem; Munich; Germany), per 24h e 48h a seconda dell'esperimento. Al termine dell'incubazione, per ogni condizione abbiamo valutato la vitalità cellulare mediante il test dell'Annexina V/PI (cfr. 3.6.1) e preparato i lisati cellulari da sottoporre a *western blotting* per la valutazione dell'espressione proteica e del clivaggio della proteina PARP (cfr. 3.6.2).

Per alcuni esperimenti, abbiamo utilizzato le cellule HS-5, una linea cellulare fibroblastoide umana disponibile presso l'*American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, USA), che rappresenta una componente del microambiente midollare. (174) Per ottenere la completa confluenza e, quindi, la formazione di un monostrato, 1×10^5 cellule HS-5 sono state piastrate almeno 48-72 ore prima dell'aggiunta delle cellule B leucemiche. Le cellule B di LLC appena isolate sono state coltivate in contatto diretto con le HS-5 in rapporto di 20:1.

Per gli esperimenti di migrazione è stato utilizzato CXCL12 (R&D System, Minneapolis, USA) nella concentrazione 200nM per 3 ore.

3.5 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Il *Western blotting* o *immunoblotting* è una tecnica immunochimica utilizzata per identificare e quantificare una specifica proteina (antigene). A tal scopo, sfrutta la capacità di un determinato anticorpo di riconoscere il proprio antigene tra tutti quelli presenti in un insieme di proteine separate secondo peso molecolare in un gel di poliacrilammide e in seguito fissate su una membrana di nitrocellulosa. Si tratta quindi di un test immunologico molto sensibile, poiché associa l'elevato potere risolutivo della corsa elettroforetica su gel e la specificità del legame antigene-anticorpo: questa combinazione fornisce una notevole sensibilità che permette di individuare minime entità proteiche nell'ordine dei nanogrammi. Il processo prevede quattro passaggi: I) preparazione dei lisati

cellulari, II) elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*), III) *Western blotting*, IV) analisi densitometrica delle bande.

3.5.1 PREPARAZIONE DEI LISATI CELLULARI

Dalle colture cellulari sopracitate sono state prelevate aliquote da 5×10^5 cellule. Le aliquote sono state centrifugate a 400g per 7 minuti e poi risospese in 20 μ l di PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*, Euroclone), per venire successivamente trattate con 18 μ l del seguente tampone lisante:

- 2% SDS (sodio dodecil-solfato) (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA);
- 1 % β -mercaptoetanolo (Sigma-Aldrich);
- tris (idrossimetil) amminometano cloridrato (Tris-HCl) 50mM, pH 6,8 (Sigma-Aldrich);
- acido etilendiaminotetracetico (EDTA) 5mM (Sigma-Aldrich);
- pironina (tracce);
- inibitori delle fosfatasi.

I lisati vengono infine brevemente agitati al vortex e poi esposti per 5 minuti alla temperatura di 100°C. A questo punto possono essere direttamente utilizzati per la corsa elettroforetica oppure conservati a -20°C per un futuro utilizzo.

3.5.2 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS è uno dei metodi più utilizzati per separare le proteine di una miscela in base al loro peso molecolare. L'SDS è un detergente ionico che si lega saldamente alle proteine provocandone la denaturazione e, in presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1,4gr di detergente, fornendo alla proteina stessa una quantità di carica negativa costante per unità di massa. Durante l'elettroforesi, i complessi proteina-SDS si muovono verso l'anodo e la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al loro peso molecolare a causa della proprietà di "setaccio molecolare" del gel. Per poter riconoscere il peso molecolare delle proteine da analizzare, vengono fatte migrare, contemporaneamente al campione, delle proteine *standard* di peso molecolare noto che verranno quindi confrontate con quelle di interesse.

Il gel di poliacrilamide in SDS viene preparato seguendo il metodo di Laemmli. La piastra elettroforetica è costituita da due tipi di gel:

- gel superiore o “impaccatore” (*stacking gel*) a pH 6,8, che serve a concentrare le proteine del campione in modo che siano tutte allineate all’inizio della corsa elettroforetica;
- gel inferiore o “di separazione” (*running gel*) a pH 8,8, nel quale avviene la vera e propria separazione delle proteine.

La piastra, di dimensioni di 8x10cm, viene poi fissata nell’apposito apparecchio Mighty Small-Se 250 Hoefer Scientific Instruments (Amersham Biosciences; Amersham; UK). Le proteine, nel nostro caso, sono state separate tramite corsa elettroforetica in gel di acrilamide alla concentrazione del 10%, per una durata di 2 ore circa e ad un’intensità di corrente di 25mA.

3.5.3 WESTERN BLOTTING

Il *Western blotting* o *Immunoblotting* è una metodica ad alta sensibilità in grado di rilevare quantità di proteine, nell’ordine dei nanogrammi, su una miscela eterogenea, combinando l’elevato potere risolutivo dell’elettroforesi su gel con la specificità degli anticorpi. Dopo la corsa elettroforetica su gel, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa per azione di un campo elettrico, che viene generato da un apposito apparecchio con una corrente da 350mA per 2 ore e 30 minuti. Il tampone utilizzato per l’elettro-trasferimento è costituito da: Tris 25mM, glicina 192mM, 20% metanolo e 0,1% SDS con pH finale pari a 8,0 (tampone A). Al termine del trasferimento, la membrana viene lasciata per 2 ore nel tampone di saturazione composto da Tris- HCl 50mM a pH 7,5, NaCl 150mM, 5% BSA (albumina di siero bovino) (tampone B), per saturare i siti aspecifici. Segue un’incubazione per tutta la notte a 4°C con l’anticorpo primario diluito nel seguente tampone: Tris-HCl 50mM a pH 7,5, NaCl 15mM, BSA 5% (tampone C). Per il nostro studio abbiamo impiegato i seguenti anticorpi:

- anti-PARP (Cell Signalling; Danvers, USA);
- anti- β -actina (Sigma; Milano, Italia);
- anti-FAK (Millipore; Burlington; USA);
- anti-FAK-pTyr397 (Cell Signaling);
- anti-GADPH (Abcam; Cambridge, UK).

Successivamente, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno a temperatura ambiente utilizzando il tampone di lavaggio composto da TBS al 5% e 0,1% Tween.

La membrana è stata successivamente incubata per un'ora con un anticorpo secondario anti-IgG diretto contro l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è coniugato all'enzima perossidasi e viene opportunamente diluito nel tampone C. Infine, sono stati eseguiti altri tre lavaggi in seguito ai quali la membrana è stata sottoposta alla rivelazione anticorpale con il sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL) (Pierce Biotechnology; Massachusetts; USA): la membrana è stata incubata per 1 minuto con 1mL di luminolo e 1mL di H₂O₂ che entrano in contatto con la perossidasi coniugata al complesso antigene- anticorpo. Questo contatto provoca una reazione di ossidazione alla quale segue l'emissione di luce che viene rivelata dall'apposito apparecchio ImageQuant LAS 600 (GE Healthcare; UK). L'immagine mostra delle bande in corrispondenza della proteina di interesse che sono state acquisite e quantificate mediante densitometria, utilizzando il programma ImageQuantTL (GE Healthcare; UK) fornito in dotazione con lo strumento. L'espressione delle proteine viene poi normalizzata in base all'espressione della β -actina e di GAPDH.

3.6 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

3.6.1 TEST CITOFLUORIMETRICO DELL'ANNESSINA V/IODURO DI PROPIDIO

La vitalità cellulare e il livello di apoptosi nei diversi campioni cellulari sono stati valutati mediante l' "*Annexin V-FITC, apoptosis detection kit*" (Valter Occhiena; Torino; Italia). Nei primi stadi dell'apoptosi si verificano delle profonde modificazioni della membrana plasmatica che segnalano ai macrofagi che la cellula ha iniziato il processo di morte cellulare programmata e ne stimolano la fagocitosi. Queste modificazioni consistono nell'esposizione sulla superficie esterna della membrana cellulare della fosfatidilserina (PS), un aminofosfolipide a carica negativa normalmente espresso solo sul lato citoplasmatico della membrana cellulare. L'Annessina V è una proteina che, in presenza di elevate concentrazioni di ioni calcio, riconosce e lega selettivamente la fosfatidilserina che, come illustrato in precedenza, è esposta sulla superficie esterna della membrana solo in caso di apoptosi. Questo legame specifico tra Annessina V e la fosfatidilserina può essere quindi utilizzato per distinguere le cellule ancora vitali dalle cellule in apoptosi precoce e in necrosi. Le cellule vengono marcate con Annessina V e Ioduro di Propidio (PI), il quale non è in grado di penetrare la membrana plasmatica intatta,

come nel caso di cellule vitali o in apoptosi precoce. Si avrà quindi che le cellule vitali risulteranno negative sia alla marcatura con Annexina V che al PI, le cellule in apoptosi precoce risulteranno positive all'Annexina V, ma negative al PI, le cellule in apoptosi tardiva risulteranno positive sia all'Annexina V che al PI e le cellule in necrosi risulteranno positive unicamente al PI.

3.6.2 VALUTAZIONE DELLA PROTEINA APOPTOTICA PARP

Il livello di apoptosi delle cellule nelle varie condizioni sperimentali è stato determinato anche studiando l'espressione di PARP mediante il *Western blotting*. Questa proteina di 116kDa viene clivata in 2 frammenti di 89 e 24kDa da proteasi attivate dal processo apoptotico, tra cui la caspasi-3. L'anticorpo primario è in grado di riconoscere sia la proteina intera che il frammento di 89kDa, che è indice di attività della caspasi-3 e quindi di avvio dei processi di apoptosi.

3.7 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i test *t* di Student, il test *t* di Student per dati appaiati, la correlazione di *Pearson*, il test di Wilcoxon per dati appaiati ed il test ANOVA. I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS) e sono stati considerati statisticamente significativi i valori con $p < 0,05$.

4 RISULTATI

4.1 L'INIBITORE DI FAK (DEFACTINIB) INDUCE APOPTOSI NELLE CELLULE B DI LLC

Defactinib è un farmaco in grado di inibire sensibilmente la fosforilazione della Y397 di FAK. Attualmente, viene studiato per il trattamento di neoplasie non ematologiche come l'adenocarcinoma pancreatico, il tumore polmonare non a piccole cellule, il carcinoma all'ovaio e il mesotelioma pleurico, per il quale ha già terminato gli studi clinici di fase 2. (175) Dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio ci hanno fatto formulare l'ipotesi di una possibile implicazione di FAK nell'anomala sopravvivenza delle cellule B leucemiche; per questo motivo abbiamo testato l'effetto *in vitro* di Defactinib in queste cellule.

I linfociti B di 46 pazienti affetti da LLC sono stati posti in coltura con Defactinib alla concentrazione di 5 μ M. Abbiamo osservato gli effetti sulla vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione mediante il test dell'Annessina V/Ioduro di Propidio (Figura 14A) e l'analisi dell'espressione di PARP tramite *western blotting* (cfr. 3.6.1 e 3.6.2). La vitalità delle cellule di LLC di controllo, poste in coltura senza l'inibitore e definite "alone", presentavano una vitalità del 62 \pm 17% mentre le cellule poste in coltura con Defactinib 5 μ M, mostravano una vitalità significativamente ridotta al 33 \pm 24% ($p < 0,0001$; test *t* di Student per dati appaiati; Figura 14B)

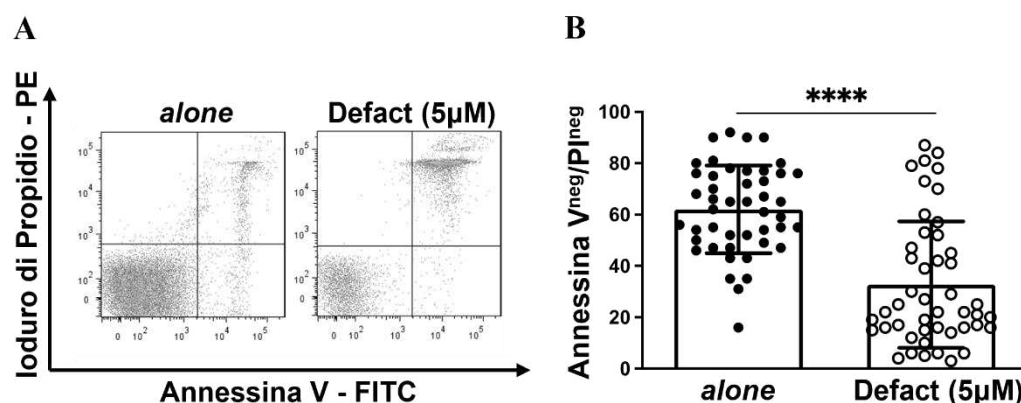


Figura 14. Grafici relativi alla percentuale di cellule B vitali dopo 24 ore di coltura con Defactinib. I linfociti B ottenuti dai pazienti affetti da LLC sono stati piastrati ad una concentrazione di 2×10^6 /ml in assenza (alone) o in presenza di Defactinib 5 μ M. **A. Citogramma rappresentativo relativo alla sopravvivenza delle cellule B leucemiche dopo il trattamento con Defactinib.** L'apoptosi è stata valutata con il test citometrico dell'Annessina V/Ioduro di Propidio. **B. Vitalità delle cellule B di LLC 24h senza trattamento (alone) o con Defactinib 5 μ M.** I dati sono espressi come media \pm DS della percentuale di cellule vive ($n = 46$; $p < 0,0001$, test *t* di Student per dati appaiati).

L'apoptosi è stata confermata anche in *Western blotting* (Figura 15) in cui è possibile osservare il clivaggio della proteina PARP nelle cellule trattate con Defactinib 5 μ M e 10 μ M.

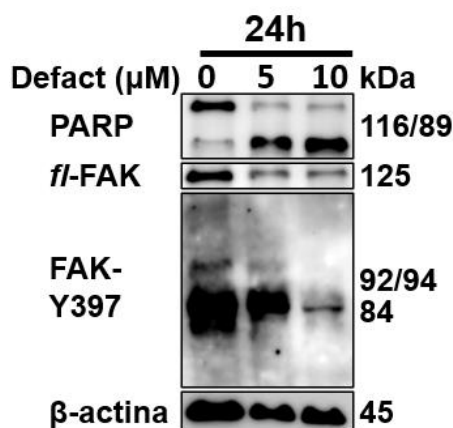


Figura 15. *Western blot rappresentativo del pattern proteico prima e dopo il trattamento delle cellule di LLC con Defactinib.* I lisati totali (5×10^5 per campione) di cellule B di LLC nella condizione alone o trattate con Defactinib 5 μ M e 10 μ M, sono stati sottoposti a SDS-PAGE al 10%, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rilevati in successione con Ac anti-FAK-Y397, anti-fl-FAK, anti-PARP e anti- β -actina (utilizzata come proteina di riferimento). fl= full length.

Dai risultati ottenuti abbiamo dimostrato che, parallelamente al calo della forma intera di PARP, si assisteva ad una diminuzione dell'espressione della forma intera di FAK a 125kDa, mentre aumentava quella dei suoi frammenti clivati da 92/94, 84 e 50kDa circa che possono essere prodotti dalla proteasi calpaina o dalle caspasi.

All'analisi densitometrica dell'espressione della forma intera di FAK (125kDa) e di FAK fosforilata in Y397, confrontando i risultati della condizione alone e con quelli ottenuti dopo trattamento con Defactinib 5 μ M di 35 pazienti analizzati, abbiamo dimostrato che il calo dell'espressione della forma intera di FAK è statisticamente significativo nelle cellule trattate con Defactinib 5 μ M ($0,47 \pm 0,39$) rispetto a quelle non trattate ($0,91 \pm 0,90$; $p < 0,001$ test t di Student per dati appaiati; figura 16A). Allo stesso modo, l'espressione della proteina FAK fosforilata in Y397 cala significativamente nelle cellule trattate ($1,16 \pm 0,80$) rispetto alle cellule poste in coltura senza l'inibitore ($1,81 \pm 0,94$; $p < 0,0001$ test t di Student per dati appaiati; Figura 16B).

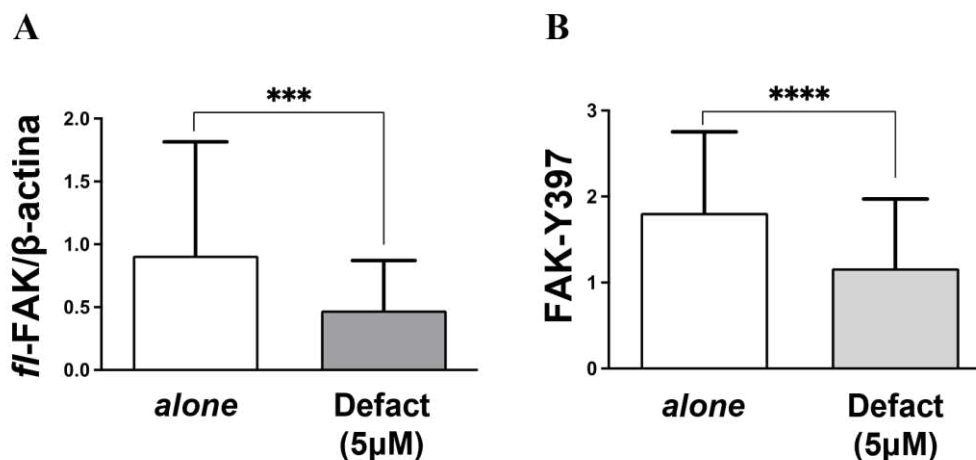


Figura 16. Effetto del Defactinib sulla proteina FAK nelle cellule B leucemiche. **A.** Analisi densitometrica della proteina FAK intera (fl-FAK, 125kDa). Gli istogrammi riportano la media \pm DS del rapporto FAK/actina ottenuto dall'analisi densitometrica dei 35 casi analizzati (***) $p < 0,001$ test t di Student per dati appaiati). **B.** Analisi densitometrica della proteina FAK fosforilata in Y397. Gli istogrammi riportano la media \pm DS dell'espressione di FAK-Y397 nei 35 pazienti analizzati (****) $p < 0,0001$ test t di Student per dati appaiati).

4.2 DEFACTINIB È PIÙ EFFICACE NEI PAZIENTI A PROGNOSI SFAVOREVOLE

In uno studio precedentemente condotto nel nostro laboratorio (Severin F. *et al.*, manoscritto in revisione alla rivista scientifica *British Journal of Haematology*) e non riportato in questa tesi, abbiamo dimostrato come la proteina FAK nelle cellule di LLC possa essere tagliata dalla proteasi calpaina con la generazione di frammenti di clivaggio a diverso peso molecolare. Abbiamo verificato che la forma totale di FAK (*full-length*, non tagliata, da 125kDa) era maggiormente presente nei pazienti affetti da LLC con i geni IGHV mutati (a prognosi favorevole) mentre i pazienti con geni IGHV non mutati (a prognosi più infausta) presentavano una minore espressione della forma intera di FAK a favore dei frammenti a più basso peso molecolare, che abbiamo dimostrato essere anche attivati.

Nel nostro contesto, i dati ottenuti per ognuna delle coppie *alone*-trattato ci dimostrano che la risposta delle cellule dei pazienti al Defactinib è disomogenea probabilmente perché nella LLC la risposta al trattamento è spesso influenzata dallo stato dei fattori prognostici. Abbiamo quindi correlato la vitalità delle cellule di LLC dopo trattamento con Defactinib, con l'espressione proteica della forma intera 125kDa-FAK, dimostrando una correlazione positiva fra l'entità dell'espressione di FAK e una maggiore vitalità cellulare ($p < 0,01$, correlazione di *Pearson*; Figura 17). In altre parole, Defactinib era meno efficace nell'indurre apoptosi in quelle

cellule con una più alta espressione di FAK totale. Al contrario, cellule con una minore espressione di FAK totale erano più prone ad essere colpite da Defactinib. In considerazione di quanto detto sopra e già dimostrato, e qui confermato, ovvero che pazienti IGHV-mutati presentavano una maggiore espressione di FAK totale a differenza dei pazienti non mutati ($p < 0,05$, test t di Student; Figura 18A), abbiamo suddiviso i pazienti sulla base della presenza, o assenza, di mutazioni ai geni IGHV verificando la risposta al trattamento con Defactinib e dimostrando che quest'ultimo era più efficace nei pazienti a prognosi sfavorevole (non mutati). Le cellule di LLC con IGHV-mutate, poste in coltura con Defactinib presentavano una vitalità del $57 \pm 26\%$ mentre le cellule dei pazienti non mutati mostravano una vitalità significativamente ridotta al $37 \pm 17\%$ ($p < 0,05$; test t di Student; Figura 18B).

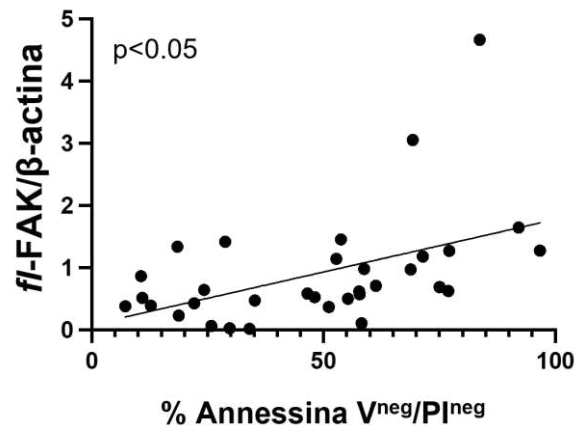


Figura 17. Correlazione tra l'espressione della forma totale di FAK (fl-FAK) e la vitalità delle cellule B di LLC dopo 24h di trattamento con Defactinib. Il farmaco è in grado di indurre maggiore apoptosi nelle cellule con minore espressione della forma totale di FAK. L'espressione di fl-FAK è stata normalizzata su β -actina e la vitalità è stata quantificata mediante il test dell'Annessina V/Ioduro di Propidio ($p < 0,05$, correlazione di Pearson). fl=full lenght.

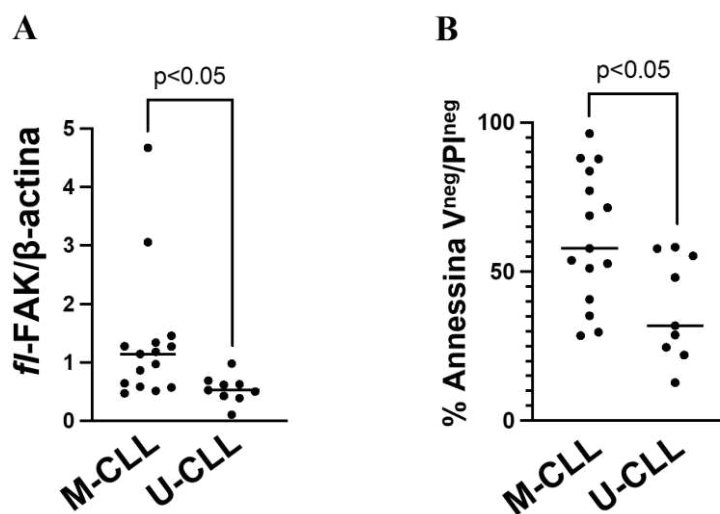


Figura 18. A. Espressione della forma totale di FAK (fl-FAK) nei pazienti M-CLL versus U-CLL. L'espressione di fl-FAK, normalizzata in base all'espressione della β -actina, è maggiore nei pazienti M-CLL ($p < 0,05$, test t di Student). **B. Vitalità delle cellule B di pazienti M-CLL e U-CLL dopo trattamento con Defactinib.** Il test con Annexina V/Ioduro di Propidio mostra come U-CLL presentino una vitalità minore rispetto alle M-LLC dopo esposizione al Defactinib ($p < 0,05$, test t di Student). M=mutated, U=unmutated.

4.3 DEFACTINIB INIBISCE LA MIGRAZIONE MEDIATA DA CXCL12

La proteina FAK è coinvolta nei processi di migrazione, invasione e chemiotassi delle cellule tumorali (cfr. 1.2.4). La chemochina CXCL12 (o SDF1 α) è in grado di indurre chemiotassi delle cellule B, indicando per l'asse CXCL12/CXCR4 un ruolo molto importante nel dirigere la migrazione dei linfociti B all'appropriato microambiente midollare (cfr. 1.1.4.6). Le cellule di LLC esprimono alti livelli di CXCR4 e migrano in modo assai efficiente in risposta al suo ligando (CXCL12). Nel nostro studio, abbiamo stimolato le cellule di 8 pazienti con LLC con CXCL12 200nM per 3 ore dimostrando, mediante analisi citofluorimetrica, un significativo aumento di cellule migrate (7083 ± 4888) rispetto alla condizione non stimolata (4714 ± 3901 ; $p < 0,01$, test di Wilcoxon per dati appaiati). Le stesse cellule, pre-trattate over-night con Defactinib $5\mu\text{M}$ e poi per 3 ore con CXCL12 200nM dimostravano una migrazione significativamente ridotta (4945 ± 4152) rispetto alle sole cellule stimulate con CXCL12 ($p < 0,01$, test di Wilcoxon per dati appaiati; Figura 19). Questi dati dimostrano che Defactinib è in grado di inibire la migrazione indotta da CXCL12 nei linfociti B neoplastici.

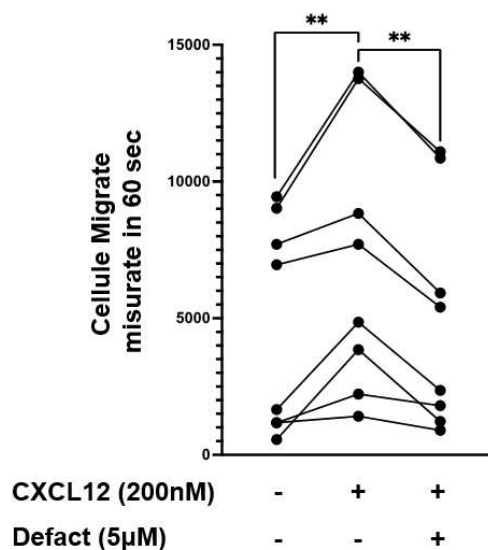


Figura 19. Quantificazione della migrazione di cellule di LLC in seguito alla stimolazione con CXCL12 200nM e pre-trattamento con Defactinib 5µM. Nel grafico, gli eventi a sinistra rappresentano la migrazione in assenza sia di CXCL12 che di Defactinib, gli eventi centrali rappresentano gli effetti sulla migrazione della stimolazione con CXCL12 200nM per 3 ore e gli eventi a destra rappresentano gli effetti sulla migrazione del pre-trattamento over-night con Defactinib 5µM seguito dalla stimolazione con CXCL12 200nM per 3 ore (** $p < 0,01$, test di Wilcoxon per dati appaiati).

4.4 DEFACTINIB AUMENTA L'EFFICACIA DEGLI INIBITORI DI BTK

Ibrutinib, inibitore della Bruton tirosin-chinasi (Btk), ha cambiato in modo significativo la gestione dei pazienti con LLC raggiungendo un'elevata efficacia anche in pazienti ad alto rischio e chemio-refrattari. Nonostante ciò, si verificano ricadute e l'esito clinico dopo l'insuccesso di Ibrutinib è sfavorevole a causa della mancanza di agenti terapeutici efficaci. Per questo motivo, abbiamo voluto osservare gli effetti di Defactinib in combinazione con Ibrutinib ed altri inibitori di Btk (Acalabrutinib e Zanubrutinib) *in vitro*. I linfociti B di 5 pazienti affetti da LLC sono stati posti in coltura con Defactinib 5µM da solo o in combinazione con Ibrutinib 5µM, Acalabrutinib 5µM o Zanubrutinib 5µM. Abbiamo osservato gli effetti sulla vitalità cellulare dopo 24 e 48 ore di incubazione mediante il test dell'Annessina V/Ioduro di Propidio (Figura 20). Alle 24 ore, le cellule di LLC trattate con Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib presentavano delle vitalità del $61 \pm 7\%$, $70 \pm 7\%$ e $71 \pm 8\%$, rispettivamente; le cellule poste in coltura con combinazioni di Defactinib e Ibrutinib, Acalabrutinib o Zanubrutinib, mostravano una vitalità significativamente ridotta al $45 \pm 6\%$, ($p < 0,05$), $47 \pm 9\%$ ($p < 0,01$) e $44 \pm 8\%$ ($p < 0,001$; test ANOVA, combinazione vs inibitore di Btk alone – Figura

20). Alle 48 ore, le vitalità delle cellule di LLC trattate con Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib erano del $55\pm 10\%$, $69\pm 8\%$ e $71\pm 5\%$, rispettivamente; le cellule poste in coltura con combinazioni di Defactinib e Ibrutinib, Acalabrutinib o Zanubrutinib, mostravano una vitalità significativamente ridotta al $36\pm 13\%$, ($p < 0.05$), $42\pm 12\%$ ($p < 0.001$) e $37\pm 11\%$ ($p < 0,0001$; test ANOVA, combinazione vs inibitore di Btk *alone* – Figura 20).

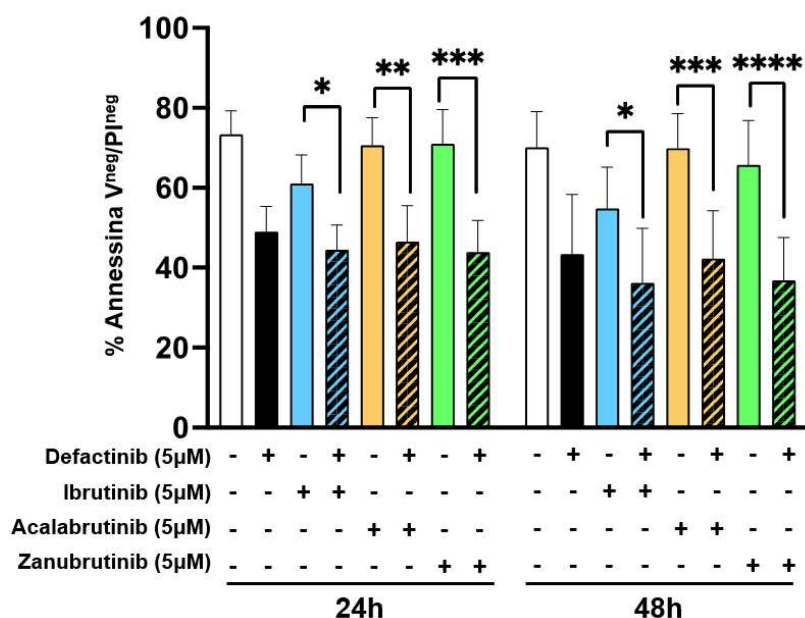


Figura 20. Effetto sulla vitalità delle cellule di LLC dopo 24h e 48h di trattamento con Defactinib 5µM, Ibrutinib 5µM, Acalabrutinib 5µM, Zanubrutinib 5µM e combinazioni. La vitalità cellulare è stata quantificata attraverso il test Annessina V/Ioduro di Propidio (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, test ANOVA). L'istogramma di colore bianco rappresenta la condizione "alone" (non trattato).

Abbiamo eseguito anche l'analisi di PARP tramite *Western blotting*, confermando un aumento della PARP clivata (indice di apoptosi) nelle condizioni di co-trattamento (Figura 21A). Dalle stesse membrane, è possibile apprezzare una diminuzione dell'espressione di FAK fosforilata alla Y397, e quindi dell'attivazione di FAK, come atteso, nelle condizioni in cui era presente il Defactinib. Nel grafico in figura 21B, che riporta l'analisi densitometrica di fosfo-FAK (P-FAK) di tutti i casi analizzati, sono riportate le differenze statisticamente significative; questo *trend* di diminuzione di fosfo-FAK è comunque osservabile in tutte le condizioni trattate con Defactinib, sia alle 24 che alle 48 ore.

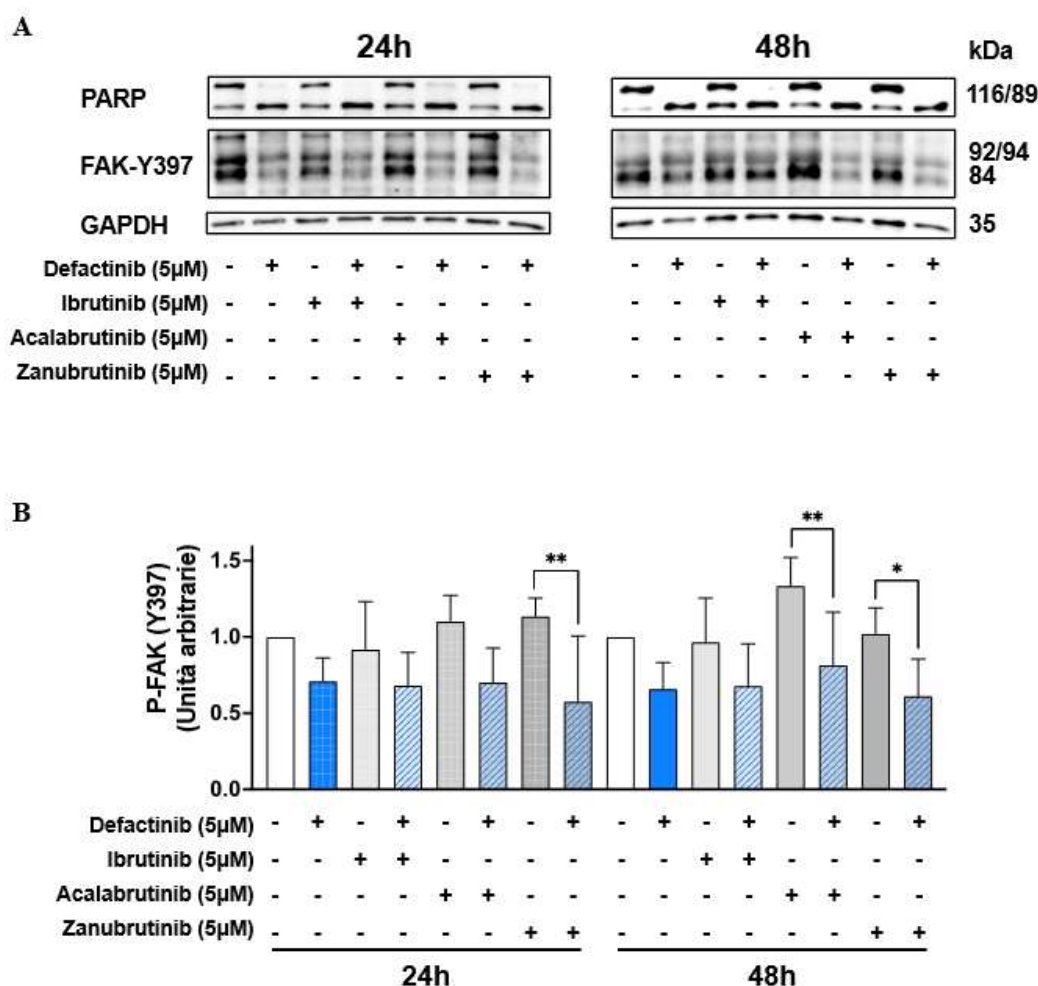


Figura 21. Pattern proteico delle cellule di LLC dopo 24h e 48h di trattamento con Defactinib 5µM, Ibrutinib 5µM, Acalabrutinib 5µM, Zanubrutinib 5µM e combinazioni. I lisati totali (5x10⁵ per campione) di cellule B di LLC alone e trattate sono state sottoposte ad SDS-PAGE al 10%, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-FAK-Y397, anti-PARP e anti-GAPDH (utilizzata come proteina di riferimento). **A.** Western blot rappresentativo. **B.** Espressione di FAK-Y397 di tutti i casi analizzati. L'espressione di P-FAK è normalizzata sulla condizione alone (istogramma bianco), a cui è stato dato il valore arbitrario di 1 (*p<0,05, **p<0,01, test ANOVA).

4.5 IL MICROAMBIENTE STROMALE NON PROTEGGE LE CELLULE DI LLC DALL'APOPTOSI INDOTTA DA DEFACTINIB

I linfociti B di LLC, apparentemente anergici e bloccati in fase G₀/G₁ del ciclo cellulare, mostrano prolungata sopravvivenza *in vivo* ma, isolati dal loro contesto fisiologico e posti *in vitro*, vanno progressivamente incontro ad apoptosi spontanea. La caratteristica resistenza all'apoptosi del clone leucemico è infatti imputabile sia ad alterazioni intrinseche al linfocita stesso che a fattori estrinseci provenienti dal microambiente in cui esso risiede. La popolazione stromale ha infatti un ruolo nella sopravvivenza dei linfociti B neoplastici ma anche nella

farmaco-resistenza. Per verificare l'efficacia di Defactinib nell'ambito di un ambiente stromale, abbiamo posto in co-coltura le cellule di LLC su uno strato di cellule HS-5 e ripetuto gli esperimenti con le combinazioni farmacologiche di cui al paragrafo 4.4. Alle 24 ore, la vitalità delle cellule di LLC, in co-coltura con le HS-5, trattate con Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib presentavano delle vitalità del $59\pm 10\%$, $73\pm 4\%$ e $71\pm 6\%$, rispettivamente; le cellule, sempre in co-coltura con le HS-5 e trattate con combinazioni di Defactinib e Ibrutinib, Acalabrutinib o Zanubrutinib, mostravano una vitalità significativamente ridotta al $45\pm 9\%$, ($p<0.05$), $39\pm 8\%$ ($p<0.001$) e $32\pm 6\%$ ($p<0,0001$; test ANOVA, combinazione *vs* inibitore di Btk *alone* - Figura 22). Alle 48 ore, nelle stesse condizioni di co-coltura, la vitalità delle cellule di LLC trattate con Ibrutinib, Acalabrutinib e Zanubrutinib presentavano delle vitalità del $55\pm 4\%$, $70\pm 8\%$ e $67\pm 8\%$, rispettivamente; le cellule trattate con combinazioni di Defactinib e Ibrutinib, Acalabrutinib o Zanubrutinib, mostravano una vitalità significativamente ridotta al $30\pm 15\%$, ($p<0.01$), $34\pm 15\%$ ($p<0.001$) e $30\pm 9\%$ ($p<0,0001$; test ANOVA, combinazione *vs* inibitore di Btk *alone* - Figura 22). In questo modo, abbiamo dimostrato che Defactinib, e le sue combinazioni con gli inibitori di Btk, è efficace anche in presenza di un microambiente stromale. Per capire quindi se Defactinib potesse influenzare le cellule stromali, abbiamo trattato le cellule HS-5 (in assenza di co-coltura con le cellule leucemiche) con le stesse combinazioni di Defactinib ed inibitori di Btk (vedi paragrafo 4.4) per 24 e 48 ore. Nonostante la vitalità delle HS-5 fosse colpita in maniera poco rilevante (dato non mostrato), i nostri dati preliminari ci dimostrano una diminuzione della fosforilazione di FAK nelle condizioni di co-trattamento a cui si associa una più apprezzabile diminuzione della forma intera di FAK da 125kDa a favore della comparsa di bande di clivaggio (Figura 23). Questi dati andranno approfonditi ma ci fanno ipotizzare che Defactinib possa agire su FAK presente nelle cellule stromali a livello delle adesioni focali distruggendo il contatto cellula-cellula ed inibendo così l'azione pro-sopravvivenza mediata da queste cellule.

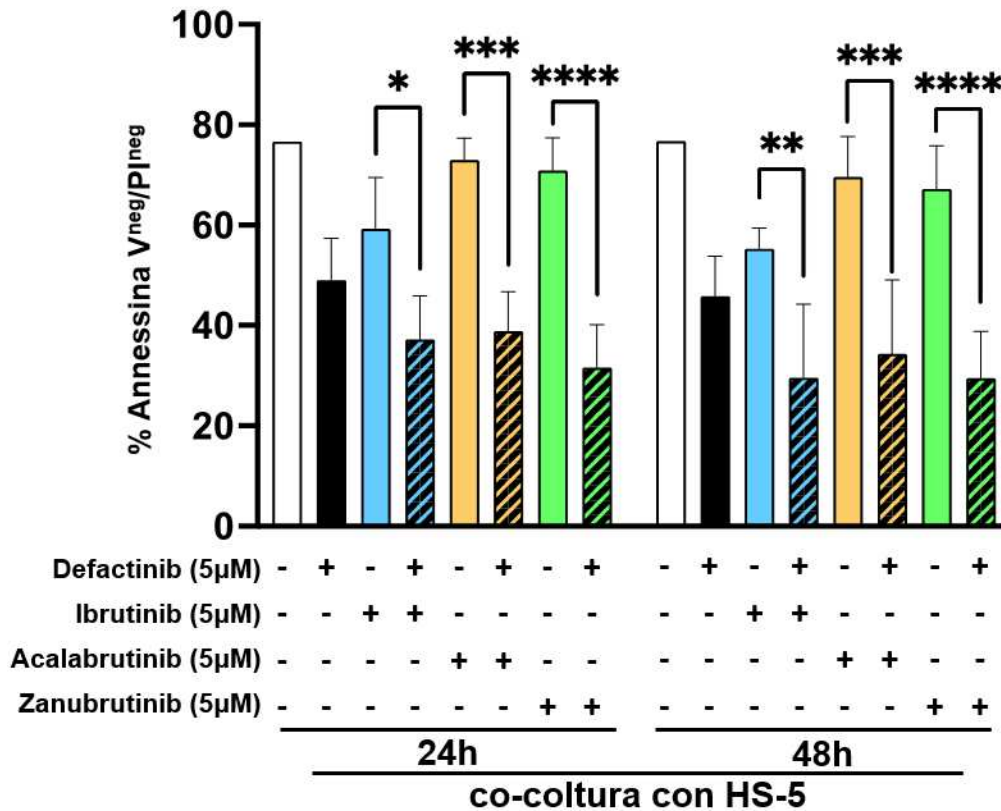


Figura 22. Effetto sulla vitalità delle cellule di LLC in co-coltura con cellule HS-5 dopo 24h e 48h di trattamento con Defactinib 5µM, Ibrutinib 5µM, Acalabrutinib 5µM, Zanutrutinib 5µM e combinazioni. La vitalità cellulare è stata quantificata attraverso il test Annexina V/Ioduro di Propidio (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, test ANOVA). L'istogramma di colore bianco rappresenta la condizione alone.

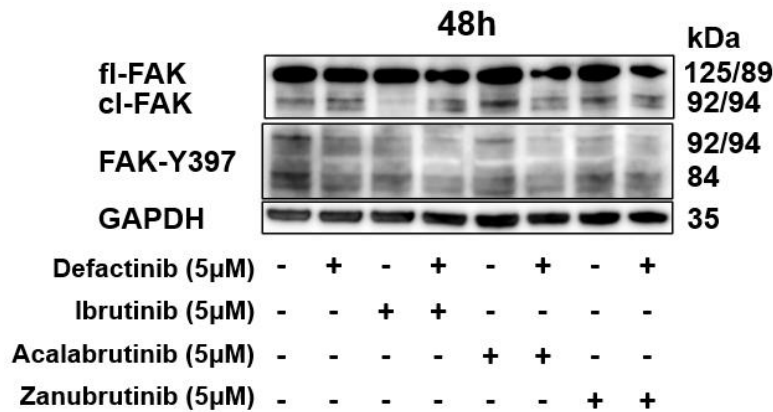


Figura 23. Pattern proteico delle cellule di LLC in co-coltura con cellule HS-5 dopo 48h di trattamento con Defactinib 5µM, inibitori di Btk 5µM e combinazioni Defactinib 5µM + inibitori di Btk 5µM. I lisati totali (5x10⁵ per campione) di cellule B di LLC in co-coltura alone e trattate con Defactinib 5µM o inibitori di Btk 5µM e Defactinib + inibitore di Btk 5µM sono stati sottoposti a SDS-PAGE al 10%, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rivelati in successione con Ac anti-FAK-Y397, anti-PARP e anti-GAPDH (utilizzata come proteina di riferimento).

5 DISCUSSIONE

In questa tesi abbiamo indagato il ruolo nella chinasi di adesione focale FAK come possibile *target* terapeutico nella Leucemia Linfatica Cronica. Abbiamo dimostrato che, l'inibitore di FAK, Defactinib, è in grado di indurre apoptosi nelle cellule B di LLC, da solo o in combinazione con gli inibitori di Btk, ponendo le basi per lo studio di FAK come bersaglio terapeutico nella LLC.

FAK è una tirosin-chinasi non recettoriale ed è una molecola cruciale al crocevia tra il microambiente extracellulare e il signalling intracellulare. Essa, infatti, può essere attivata dall'interazione con le integrine, recettori dei fattori di crescita e recettori per chemochine. Una volta fosforilata, FAK è in grado di interagire con le SRC-chinasi e controllare molte vie del segnale che portano a migrazione, proliferazione e sopravvivenza. (176) Per tutti questi motivi, FAK si è dimostrata una proteina di particolare interesse per la ricerca e la comprensione della cancerogenesi, soprattutto nei tumori solidi. La sua sovraespressione è stata collegata all'aggressività dei tumori, anche se in alcuni casi anche la sua *down*-modulazione è stata segnalata come correlata a prognosi infausta. (177)

Sebbene esistano in letteratura numerosi studi su FAK nei tumori solidi, questa proteina rimane ancora poco studiata nelle neoplasie ematologiche e, in particolare, sono quasi assenti gli studi sulla LLC.

La LLC è caratterizzata dalla proliferazione di cellule B mature CD5+ in un microambiente che ne supporta la sopravvivenza negli organi linfoidi secondari e nel midollo osseo. (46) In seguito a stimolazione del BCR, dei recettori per chemochine e delle integrine, vengono attivati *pathway* a valle che contribuiscono al fenotipo canceroso e alla resistenza alle terapie, (42) (178) il tutto mediato dall'attivazione di fattori quali Btk, PI3K/AKT ed NF-kB, proteine leganti l'actina come HS1 e cortactina, e il rilascio di calcio (Ca^{2+}) dai depositi intracellulari. In questo contesto, rientra la chinasi di adesione focale FAK che media appunto i segnali dall'esterno della cellula all'ambiente intracellulare determinando infine azioni come la migrazione, l'invasività, la sopravvivenza e la proliferazione.

Per questo motivo, il nostro gruppo di ricerca ha iniziato uno studio approfondito su tale proteina nella LLC. Dati ottenuti nel nostro laboratorio, attualmente in revisione alla rivista scientifica *British Journal of Haematology* e non mostrati in questa tesi, hanno dimostrato una *down*-modulazione della forma

intera di FAK, associata al suo clivaggio dovuto all'attività della proteasi calpaina dopo la stimolazione di BCR. Abbiamo osservato che i pazienti a prognosi sfavorevole, con i geni IGHV non mutati, le cui cellule erano in grado di rilasciare Ca^{2+} dopo la stimolazione del BCR, presentavano una minore quantità di FAK a lunghezza intera, che si traduceva in una maggiore presenza di forme clivate/attivate della proteina. Inoltre, abbiamo messo in evidenza come le proteine citoscheletriche, da noi già viste implicate nell'aggressività della LLC, cortactina ed HS1, erano sovraesprese in quegli stessi pazienti, suggerendo una possibile interazione con FAK. (43) (44)

Viste queste premesse, che indicano FAK come un'interessantissima proteina coinvolta nella patogenesi della LLC, nel contesto di questa tesi, ci siamo focalizzati sulla sua inibizione. Considerando l'importanza di FAK nelle neoplasie solide, nel corso degli anni, sono stati sviluppati nuovi farmaci biologici in grado di inibire la sua funzione. (156) Un esempio è dato da un inibitore selettivo di FAK, il Defactinib. Esso ha affrontato i *trial* clinici di fase II per la terapia di alcuni tumori solidi, tra i quali il carcinoma ovarico, il mesotelioma pleurico, il tumore polmonare non a piccole cellule e l'adenocarcinoma pancreatico, ottenendo risultati promettenti. (175) Abbiamo dimostrato che, nei linfociti B di LLC, Defactinib agisce efficacemente causando l'apoptosi delle cellule tumorali. Defactinib diminuisce l'espressione della forma intera di FAK e, come atteso, riduce la sua fosforilazione in Y397; aumenta, inoltre, il clivaggio di FAK. Abbiamo osservato che il pre-trattamento con Defactinib era in grado di inibire la migrazione delle cellule di LLC indotta da CXCL12. Analogamente ad altri tumori, infatti, i linfociti di LLC dipendono dai segnali del microambiente per migliorare le loro capacità di sopravvivenza. Essi circolano nel sangue periferico e si accumulano negli organi linfoidi secondari per interagire con altre cellule e ricevere stimoli di sopravvivenza e un'importante via di trasduzione del segnale coinvolto nella regolazione del traffico e della ritenzione delle cellule B è l'asse CXCR4/CXCL12, che consente l'*homing* dei linfociti nei tessuti solidi. (55)

Nonostante la significativa capacità di Defactinib di indurre apoptosi nelle cellule trattate, abbiamo osservato come alcuni dei campioni da noi analizzati siano risultati resistenti al trattamento *in vitro*, mantenendo una percentuale di cellule vitali simile a quelle prive di inibitore. In altre parole, la risposta a Defactinib è disomogenea probabilmente perché nella LLC la risposta al trattamento è spesso

influenzata dallo stato dei fattori prognostici. Correlando la vitalità delle cellule di LLC, dopo trattamento con Defactinib, con l'espressione proteica basale della forma intera di FAK, di 125kDa, abbiamo messo in evidenza una correlazione positiva fra l'entità dell'espressione di FAK e una maggiore vitalità cellulare; ossia, Defactinib era meno efficace nell'indurre apoptosi in quelle cellule con una più alta espressione di FAK totale. Al contrario, cellule con una minore espressione di FAK totale erano più prone ad essere colpite da Defactinib. In considerazione di quanto precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio, e qui confermato, e cioè che pazienti IGHV-mutati hanno una maggiore espressione di FAK totale a differenza dei pazienti non mutati, abbiamo suddiviso i pazienti sulla base della presenza, o assenza, di mutazioni ai geni IGHV verificando la risposta al trattamento con Defactinib e dimostrando che quest'ultimo era più efficace nei pazienti a prognosi sfavorevole (non mutati). La logica alla base di questa osservazione risiede nel fatto che i pazienti non mutati hanno anche una FAK più attiva (dimostrata in termini di fosforilazione alla Y397) e Defactinib agisce specificamente inibendo questa fosforilazione.

La gestione del paziente con LLC è cambiata significativamente con l'introduzione di Ibrutinib, inibitore della Bruton's tirosin-chinasi (Btk), nell'armamentario terapeutico contro la LLC. (100) Il suo utilizzo ha permesso, infatti, di raggiungere un'elevata efficacia anche nei pazienti chemio-refrattari ed in quelli ad alto rischio. Nonostante ciò, si verificano ricadute e l'esito clinico dopo l'insuccesso di Ibrutinib è sfavorevole a causa della mancanza di agenti terapeutici efficaci. Per questo motivo, nel nostro studio, abbiamo provato combinazioni di Defactinib ed inibitori di Btk fra cui lo stesso Ibrutinib, ma anche Acalabrutinib e Zanubrutinib. (132) (137) Tramite il test dell'Annessina V/Ioduro di Propidio e tramite l'analisi della proteina PARP clivata in *Western blotting*, abbiamo dimostrato che Defactinib aumentava l'efficacia degli inibitori di Btk. Inoltre, come atteso, solo nelle cellule trattate con Defactinib (da solo o in combinazione) si assisteva ad una diminuzione della fosforilazione, e quindi attivazione, di FAK; il che ci fa ipotizzare che sia proprio l'inibizione di FAK mediata da Defactinib a fare aumentare la quota delle cellule apoptotiche e quindi l'efficacia degli inibitori di Btk. Se questi dati dovessero confermarsi, dopo esperimenti più approfonditi su un aumentato numero di pazienti, sarebbe ipotizzabile l'utilizzo di combinazioni di Defactinib e inibitori di Btk per il trattamento dei pazienti con LLC. In particolare,

Defactinib potrebbe mostrarsi efficace anche in quei pazienti resistenti o refrattari alla terapia con Ibrutinib. Inoltre, considerando che Defactinib è già utilizzato in *trial* clinici per il tumore polmonare non a piccole cellule, il mesotelioma pleurico, il carcinoma ovarico e l'adenocarcinoma pancreatico, si ridurrebbero le eventuali tempistiche per i necessari controlli di sicurezza e tossicità del farmaco. Abbiamo dimostrato che Defactinib era in grado di bypassare gli effetti protettivi del macroambiente stromale; cellule di LLC in co-coltura su uno strato di HS-5 presentavano, infatti, un ingente tasso di cellule apoptotiche dopo trattamento con Defactinib. Non è chiaro come Defactinib possa aggirare la protezione del microambiente ma, dai nostri dati preliminari, possiamo ipotizzare, fra le altre, una sua azione a livello delle cellule stromali che, dopo trattamento, mostrano la presenza di frammenti di clivaggio di FAK. Questi frammenti N-FAT (cfr. 1.2.1 e 1.2.2), mancanti del dominio FAT che è richiesto per la localizzazione in membrana di FAK, si dissociano dalle adesioni focali. Il cambiamento di queste ultime farebbe venir meno il contatto cellula-cellula necessario a generare un segnale pro-sopravvivenza nella cellula leucemica.

Defactinib, se efficace *in vitro*, potrebbe rappresentare uno dei farmaci utilizzabili in clinica, combinato eventualmente ad altri farmaci già consolidati, come ad esempio gli inibitori di Btk, e potrebbe fornire la possibilità di avere una nuova arma terapeutica contro la LLC. Altri studi hanno dimostrato che VS-4718, un altro inibitore di FAK, era in grado di prevenire la crescita cellulare e indurre apoptosi in linee cellulari di Leucemia Acuta Mieloide, in particolar modo se combinato con ABT-199, inibitore di Bcl-2. (179) Allo stesso modo, il silenziamento di FAK era in grado di inibire la leucemogenesi in cellule di Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL) BCR/ABL+, aumentando l'apoptosi delle cellule tumorali in combinazione con Imatinib. (180) Ancora, la terapia con VS-4718 in combinazione con Dasatinib, era in grado di inibire la sopravvivenza in un modello di B-ALL. (181).

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che FAK, oltre ad essere un possibile bersaglio per il trattamento della LLC, potrebbe essere una molecola interessante da studiare per ottenere ulteriori conoscenze sulla patobiologia della LLC o, almeno, sull'instaurazione del suo fenotipo maligno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:16096.
2. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics , 2A82.0 Chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma. 2023; URL: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f1239211846>
3. Staber PB, Herling M, Bellido M, Jacobsen ED, Davids MS, Kadia TM, et al. Consensus criteria for diagnosis, staging, and treatment response assessment of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2019;134(14):1132–43.
4. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol.* 2021;96(12):1679–705.
5. Delgado J, Nadeu F, Colomer D, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica.* 2020;105(9):2205–17.
6. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood.* 2015;126(20):2265–73.
7. Slager SL, Benavente Y, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, Costantini AS, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2014;2014(48):41–51.
8. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Møller L, Gridley G, Goldin LR, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007;109(5):2198–201.
9. *Immunologia cellulare e molecolare.* S.l.: s.n.; 2015.
10. Husby S, Grønbaek K. Mature lymphoid malignancies: origin, stem cells, and chronicity. *Blood Adv.* 2017;1(25):2444–55.
11. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526(7574):525–30.
12. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840–7.
13. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(11):684–701.

14. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2012;209(12):2183–98.
15. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145–62.
16. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32(23):2805–17.
17. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. 2015;22(1):6–11.
18. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
19. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910–6.
20. Strefford JC. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *Br J Haematol*. 2015;169(1):14–31.
21. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329–31.
22. Jiang Y, Chen HC, Su X, Thompson PA, Liu X, Do KA, et al. ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood Cancer J*. 2016;6(9):e465.
23. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009;114(5):957–64.
24. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, Neuberg D, Ghia E, Heerema NA, et al. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016;173(1):105–13.
25. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–5.
26. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18261–6.

27. Walker JS, Hing ZA, Harrington B, Baumhardt J, Ozer HG, Lehman A, et al. Recurrent XPO1 mutations alter pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2021;14:17.
28. Improgo MaR, Tesar B, Klitgaard JL, Magori-Cohen R, Yu L, Kasar S, et al. MYD88 L265P mutations identify a prognostic gene expression signature and a pathway for targeted inhibition in CLL. *Br J Haematol*. 2019;184(6):925–36.
29. Asslaber D, Wacht N, Leisch M, Qi Y, Maeding N, Hufnagl C, et al. BIRC3 Expression Predicts CLL Progression and Defines Treatment Sensitivity via Enhanced NF- κ B Nuclear Translocation. *Clin Cancer Res*. 2019;25(6):1901–12.
30. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497–506.
31. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*. 2009;113(21):5237–45.
32. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010;116(6):945–52.
33. Rubin R, Strayer DS, Rubin E. *Patologia d'organo e molecolare*. Piccin-Nuova Libreria; 2014.
34. Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2013;5(2):309–25.
35. Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2004;75(1):22–33.
36. Su Q, Chen M, Shi Y, Zhang X, Huang G, Huang B, et al. Cryo-EM structure of the human IgM B cell receptor. *Science*. 2022;377(6608):875–80.
37. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. 2012;120(6):1175–84.
38. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(16):4313–20.
39. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):282–91.

40. Minden MD von, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309–12.
41. Iacovelli S, Hug E, Bennardo S, Duehren-von Minden M, Gobessi S, Rinaldi A, et al. Two types of BCR interactions are positively selected during leukemia development in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL. *Blood*. 2015;125(10):1578–88.
42. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):369–78.
43. Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Teramo A, Carraro S, et al. HS1, a Lyn Kinase Substrate, Is Abnormally Expressed in B-Chronic Lymphocytic Leukemia and Correlates with Response to Fludarabine-Based Regimen. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39902.
44. Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, Trimarco V, Tibaldi E, Castelli M, et al. Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):1069–77.
45. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367–75.
46. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563–74.
47. ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):401–13.
48. Boissard F, Tosolini M, Ligat L, Quillet-Mary A, Lopez F, Fournié JJ, et al. Nurse-like cells promote CLL survival through LFA-3/CD2 interactions. *Oncotarget*. 2016;8(32):52225–36.
49. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 2009;114(20):4441–50.
50. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Palacio C, Bosch F, et al. Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL

cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget*. 2014;6(10):7632–43.

51. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Martinelli S, Castelli I, Valenti V, et al. Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia B cells through ETA receptor. *PloS One*. 2014;9(6):e98818.

52. Heinig K, Gätjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, et al. Access to Follicular Dendritic Cells Is a Pivotal Step in Murine Chronic Lymphocytic Leukemia B-cell Activation and Proliferation. *Cancer Discov*. 2014;4(12):1448–65.

53. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;106(4):995–1004.

54. Rizzo R, Audrito V, Vacca P, Rossi D, Brusa D, Stignani M, et al. HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism. *Haematologica*. 2014;99(5):888–96.

55. Agarwal A, Cooke L, Riley C, Qi W, Mount D, Mahadevan D. Genetic and cytokine changes associated with symptomatic stages of CLL. *Leuk Res*. 2014;38(9):1097–101.

56. Cuneo A, Rigolin GM, Martinelli S, Formigaro L, Castoldi G. Leucemia linfatica cronica. *Semin Ematol Oncol Ed Ed Internazionali Edimes*. 2010;7(3):14–5.

57. Kay NE, Hampel PJ, Van Dyke DL, Parikh SA. CLL update 2022: A continuing evolution in care. *Blood Rev*. 2022;54:100930.

58. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-Cell Clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(7):659–67.

59. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745–60.

60. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, et al. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(11):1844–9.

61. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016;174(5):767–75.

62. Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED, et al. Predictive Value of Blood and Bone Marrow Flow Cytometry in B-Cell Lymphoma Classification: Comparative Analysis of Flow Cytometry and Tissue Biopsy in 252 Patients. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(7):776–85.
63. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the Chronic Lymphocytic Leukemia Scoring System With the Monoclonal Antibody SN8(CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):378–82.
64. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol.* 1998;51(5):364–9.
65. Rawstron AC, Kreuzer K, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):121–8.
66. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(3):367–84.
67. Nabhan C, Rosen ST. Chronic Lymphocytic Leukemia: A Clinical Review. *JAMA.* 2014;312(21):2265–76.
68. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood.* 2010;115(2):187–97.
69. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, et al. Bone Marrow Histologic Pattern—The Best Single Prognostic Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Survival Analysis of 329 Cases. *Blood.* 1984;64(3):642–8.
70. Visentin A, Imbergamo S, Gurrieri C, Frezzato F, Trimarco V, Martini V, et al. Major infections, secondary cancers and autoimmune diseases occur in different clinical subsets of chronic lymphocytic leukaemia patients. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2017;72:103–11.
71. Royle JA, Baade PD, Joske D, Girschik J, Fritschi L. Second cancer incidence and cancer mortality among chronic lymphocytic leukaemia patients: a population-based study. *Br J Cancer.* 2011;105(7):1076–81.
72. Tsimberidou AM, Wen S, McLaughlin P, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S, et al. Other Malignancies in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(6):904–10.
73. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(1):145–53.

74. Stephens DM, Byrd JC. How I manage ibrutinib intolerance and complications in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2019;133(12):1298–307.
75. Zent CS, Kay NE. Autoimmune Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):47–59.
76. Agbay RLMC, Jain N, Loghavi S, Medeiros LJ, Khoury JD. Histologic transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol*. 2016;91(10):1036–43.
77. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*. 2016;43(2):311–9.
78. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*. 2009;27(1):1–10.
79. Sigmund AM, Kittai AS. Richter's Transformation. *Curr Oncol Rep*. 2022;24(8):1081–90.
80. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219–34.
81. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198–206.
82. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):49–62.
83. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2016;43(2):233–40.
84. Matthews C, Catherwood MA, Morris TCM, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, et al. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol*. 2006;77(4):309–17.
85. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic Importance of Serum Soluble CD23 Level in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1996;88(11):4259–64.
86. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848–54.
87. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic

leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023–9.

88. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923–30.

89. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*. 2008;140(5):537–46.

90. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779–90.

91. Molica S, Giannarelli D, Mirabelli R, Levato L, Kay NE, Shanafelt TD. Chronic lymphocytic leukemia international prognostic index: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2018;131(3):365–8.

92. Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, Laurenti L, Mauro FR, Molica S, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*. 2016;128(16):2093–5.

93. Visentin A, Bonaldi L, Rigolin GM, Mauro FR, Martines A, Frezzato F, et al. The complex karyotype landscape in chronic lymphocytic leukemia allows the refinement of the risk of Richter syndrome transformation. *Haematologica*. 2021;107(4):868–76.

94. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJS, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2007;370(9583):230–9.

95. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2010;376(9747):1164–74.

96. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928–42.

97. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101–10.

98. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1):

a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2015;385(9980):1873–83.

99. Ahn IE, Brown JR. Targeting Bruton's Tyrosine Kinase in CLL. *Front Immunol*. 2021;12:687458.

100. Herman SEM, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014;123(21):3286–95.

101. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib–Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2019;381(5):432–43.

102. Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(12):1495–507.

103. Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(8):510–27.

104. Sun C, Tian X, Lee YS, Gunti S, Lipsky A, Herman SEM, et al. Partial reconstitution of humoral immunity and fewer infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Blood*. 2015;126(19):2213–9.

105. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, et al. BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017;35(13):1437–43.

106. Paydas S. Management of adverse effects/toxicity of ibrutinib. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;136:56–63.

107. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Burger JA, Blum KA, Coleman M, et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015;125(16):2497–506.

108. Burger JA, Wiestner A. Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(3):148–67.

109. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, Kater AP, Chanan-Khan A, Furman RR, et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2021;39(31):3441–52.

110. Mato AR, Shah NN, Jurczak W, Cheah CY, Pagel JM, Woyach JA, et al. Pirtobrutinib in relapsed or refractory B-cell malignancies (BRUIN): a phase 1/2 study. *The Lancet*. 2021;397(10277):892–901.

111. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(13):3603–12.
112. Coutré SE, Barrientos JC, Brown JR, de Vos S, Furman RR, Keating MJ, et al. Management of adverse events associated with idelalisib treatment: expert panel opinion. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(10):2779–86.
113. Brown JR. The PI3K pathway: clinical inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2016;43(2):260–4.
114. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(2):202–8.
115. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311–22.
116. Lasica M, Anderson MA. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *J Pers Med*. 2021;11(6):463.
117. Burger JA. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(5):460–73.
118. Fischer K, Al-Sawaf O, Hallek M. Preventing and monitoring for tumor lysis syndrome and other toxicities of venetoclax during treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;2020(1):357–62.
119. Seiffert M. Lenalidomide, an antiproliferative CLL drug. *Blood*. 2014;124(10):1545–6.
120. Sorrow ML, Storer BE, Sandmaier BM, Maris M, Shizuru J, Maziarz R, et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(30):4912–20.
121. Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, et al. High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies. *Blood*. 2018;132(9):892–902.
122. Gauthier J, Hirayama AV, Purushe J, Hay KA, Lymp J, Li DH, et al. Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure. *Blood*. 2020;135(19):1650–60.
123. Herling CD, Cymbalista F, Groß-Ophoff-Müller C, Bahlo J, Robrecht S, Langerbeins P, et al. Early treatment with FCR versus watch and wait in patients with stage Binet A high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL): a randomized phase 3 trial. *Leukemia*. 2020;34(8):2038–50.

124. Langerbeins P, Zhang C, Robrecht S, Cramer P, Fürstenau M, Al-Sawaf O, et al. The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2022;139(2):177–87.
125. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779–90.
126. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J*. 2018;8(10):93.
127. Parmelee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP. Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a geriatric residential population. *J Am Geriatr Soc*. 1995;43(2):130–7.
128. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019;94(11):1266–87.
129. Keating MJ, O’Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(18):4079–88.
130. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(26):3559–66.
131. Shanafelt TD, Wang V, Kay NE, Hanson CA, O’Brien SM, Barrientos JC, et al. A Randomized Phase III Study of Ibrutinib (PCI-32765)-Based Therapy Vs. Standard Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab (FCR) Chemoimmunotherapy in Untreated Younger Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): A Trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E1912). *Blood*. 2018;132(Supplement 1):LBA-4.
132. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*. 2019;380(23):2225–36.
133. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, Skarbnik A, Pagel JM, Flinn IW, et al. Efficacy and safety in a 4-year follow-up of the ELEVATE-TN study comparing acalabrutinib with or without obinutuzumab versus obinutuzumab plus chlorambucil in treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2022;36(4):1171–5.
134. Al-Sawaf O, Robrecht S, Bahlo J, Fink AM, Cramer P, V Tresckow J, et al. Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia (CLL)-a pooled analysis of German CLL Study Group (GCLLSG) front line treatment trials. *Leukemia*. 2021;35(1):169–76.
135. Goede V, Fischer K, Dyer MJS. Overall survival benefit of Obinutuzumab over Rituximab when combined with Chlorambucil in

patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidities: final survival analysis of the CLL11 study. 2018; URL: <https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/215923/>

136. Farooqui MZH, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):169–76.

137. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):768–78.

138. Tam CS, Brown JR, Kahl BS, Ghia P, Giannopoulos K, Jurczak W, et al. Zanubrutinib versus bendamustine and rituximab in untreated chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma (SEQUOIA): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(8):1031–43.

139. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K, et al. Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood.* 2018;131(17):1910–9.

140. Byrd JC, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre S, et al. Long-term follow-up of the RESONATE phase 3 trial of ibrutinib vs ofatumumab. *Blood.* 2019;133(19):2031–42.

141. Brown JR, Eichhorst B, Hillmen P, Jurczak W, Kaźmierczak M, Lamanna N, et al. Zanubrutinib or Ibrutinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2023;388(4):319–32.

142. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Hillmen P, Seymour JF, Coutre S, et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018;36(19):1973–80.

143. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst BF, D'Rozario J, Owen CJ, Assouline S, et al. Enduring undetectable MRD and updated outcomes in relapsed/refractory CLL after fixed-duration venetoclax-rituximab. *Blood.* 2022;140(8):839–50.

144. Ghia P, Pluta A, Wach M, Lysak D, Kozak T, Simkovic M, et al. ASCEND: Phase III, Randomized Trial of Acalabrutinib Versus Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2020;38(25):2849–61.

145. Deng J, Isik E, Fernandes SM, Brown JR, Letai A, Davids MS. Bruton's tyrosine kinase inhibition increases BCL-2 dependence and enhances sensitivity to venetoclax in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2017;31(10):2075–84.

146. Jain N, Keating M, Thompson P, Ferrajoli A, Burger JA, Borthakur G, et al. Ibrutinib Plus Venetoclax for First-line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Nonrandomized Phase 2 Trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(8):1213–9.
147. Tam CS, Allan JN, Siddiqi T, Kipps TJ, Jacobs R, Opat S, et al. Fixed-duration ibrutinib plus venetoclax for first-line treatment of CLL: primary analysis of the CAPTIVATE FD cohort. *Blood.* 2022;139(22):3278–89.
148. Lipsky AH, Lamanna N. Novel combination approaches with targeted agents in frontline chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2023;129(1):18–31.
149. Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. Focal Adhesion Kinase Signaling In Unexpected Places. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;45:24–30.
150. Corsi JM, Rouer E, Girault JA, Enslin H. Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics.* 2006;7:198.
151. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(11):802–14.
152. Tapial Martínez P, López Navajas P, Lietha D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules.* 2020;10(2):179.
153. Lietha D, Cai X, Ceccarelli DFJ, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell.* 2007;129(6):1177–87.
154. Nolan K, Lacoste J, Parsons JT. Regulated Expression of Focal Adhesion Kinase-Related Nonkinase, the Autonomously Expressed C-Terminal Domain of Focal Adhesion Kinase. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6120–9.
155. Nagoshi Y, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T. Expression of FAK-related non-kinase (FRNK) coincides with morphological change in the early stage of cell adhesion. *Med Mol Morphol.* 2006;39(3):154–60.
156. Yoon H, Dehart JP, Murphy JM, Lim STS. Understanding the Roles of FAK in Cancer. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(2):114–28.
157. Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2001;1540(1):1–21.
158. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2004;1692(2):77–102.

159. Zeng L, Si X, Yu WP, Le HT, Ng KP, Teng RMH, et al. PTP α regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol.* 2003;160(1):137–46.
160. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003;83(3):731–801.
161. Chan KT, Bennin DA, Huttenlocher A. Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *J Biol Chem.* 2010;285(15):11418–26.
162. Grossmann J, Artinger M, Grasso AW, Kung HJ, Schölmerich J, Fiocchi C, et al. Hierarchical cleavage of focal adhesion kinase by caspases alters signal transduction during apoptosis of intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2001;120(1):79–88.
163. Zhou J, Yi Q, Tang L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019;38:250.
164. Ossovskaya V, Lim ST, Ota N, Schlaepfer D, Ilic D. FAK nuclear export signal sequences. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2402–6.
165. Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, et al. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* 2008;29(1):9–22.
166. Lim STS. Nuclear FAK: a New Mode of Gene Regulation from Cellular Adhesions. *Mol Cells.* 2013;36(1):1–6.
167. Cance WG, Golubovskaya VM. Focal Adhesion Kinase Versus p53: Apoptosis or Survival? *Sci Signal.* 2008;1(20):pe22.
168. Ozkal S, Paterson JC, Tedoldi S, Hansmann ML, Kargi A, Manek S, et al. Focal adhesion kinase (FAK) expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Pathol - Res Pract.* 2009;205(11):781–8.
169. Golubovskaya V, Kaur A, Cance W. Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor kappa B and p53 binding sites. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr.* 2004;1678(2):111–25.
170. Chuang HH, Zhen YY, Tsai YC, Chuang CH, Hsiao M, Huang MS, et al. FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1726.
171. Spallarossa A, Tasso B, Russo E, Villa C, Brullo C. The Development of FAK Inhibitors: A Five-Year Update. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6381.
172. Wu Y, Li N, Ye C, Jiang X, Luo H, Zhang B, et al. Focal adhesion kinase inhibitors, a heavy punch to cancer. *Discov Oncol.* 2021;12:52.

173. Pomella S, Cassandri M, Braghini MR, Marampon F, Alisi A, Rota R. New Insights on the Nuclear Functions and Targeting of FAK in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):1998.
174. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally Distinct Human Marrow Stromal Cell Lines Immortalized by Transduction With the Human Papilloma Virus E6/E7 Genes. *Blood.* 1995;85(4):997–1005.
175. ClinicalTrials.gov. 2023; URL: <https://beta.clinicaltrials.gov/search?intr=Defactinib>
176. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(9):598–610.
177. Gabriel B, zur Hausen A, Stickeler E, Dietz C, Gitsch G, Fischer DC, et al. Weak expression of focal adhesion kinase (pp125FAK) in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12(8):2476–83.
178. Trentin L, Frasson M, Donella-Deana A, Frezzato F, Pagano MA, Tibaldi E, et al. Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;112(12):4665–74.
179. Carter BZ, Mak PY, Wang X, Yang H, Garcia-Manero G, Mak DH, et al. Focal Adhesion Kinase as a Potential Target in AML and MDS. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(6):1133–44.
180. Le Y, Xu L, Lu J, Fang J, Nardi V, Chai L, et al. FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. *Am J Hematol.* 2009;84(5):273–8.
181. Churchman ML, Evans K, Richmond J, Robbins A, Jones L, Shapiro IM, et al. Synergism of FAK and tyrosine kinase inhibition in Ph⁺ B-ALL. *JCI Insight.* 2016;1(4):e86082, 86082.