

# Interazioni micro-ambientali e comportamento clinico in leucemia linfatica cronica: la lezione del CD49d

D. Benedetti<sup>a</sup>, A. Zucchetto<sup>a</sup>, P. Bulian<sup>a</sup>, C. Tripodo<sup>b</sup>, R. Bomben<sup>a</sup>, M. Dal Bo<sup>a</sup>, G. Del Poeta<sup>c</sup>, F.M. Rossi<sup>a</sup>, M. Degan<sup>a</sup>, F. Tedesco<sup>d</sup>, S. Deaglio<sup>e</sup>, F. Malavasi<sup>e</sup>, V. Gattei<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unità di Onco-Ematologia Clinica e Sperimentale, Centro di Riferimento Oncologico, I.R.C.C.S., Aviano (PN)

<sup>b</sup>Dipartimento di Patologia Umana, Università di Palermo

<sup>c</sup>Divisione di Ematologia, Ospedale "S. Eugenio" e Università di Tor Vergata, Roma

<sup>d</sup>Dipartimento delle Scienze della Vita, Università di Trieste

<sup>e</sup>Laboratorio di Immunogenetica, Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica, Università di Torino

## Riassunto

Gli studi che saranno presentati hanno preso le mosse da osservazioni precedenti di "gene expression" e "surface antigen expression" "profiles", i quali hanno permesso di identificare l'espressione di CD49d come un marcatore prognostico per LLC, spesso in associazione con l'espressione di CD38, altro marcatore prognostico in LLC e con uno stato mutazionale "non mutato" dei geni IGHV. Gli aspetti che saranno discussi porteranno a definire un modello di interazione microambientale secondo il quale cellule di LLC CD38+ quando stimulate dal loro contro-recettore CD31 producono elevati livelli di due chemochine (CCL3 e CCL4) le quali sono in grado di attivare cellule monocito-macrofagiche, a loro volta esprimono i recettori specifici per CCL3 e CCL4 (CCR1 e CCR5), stimolandole a produrre TNF- $\alpha$  ed altre citochine, le quali a loro volta sono in grado di regolare positivamente l'espressione di VCAM-1/CD106 su cellule micro-ambientali stromali/endoteliali. La interazione di VCAM-1 con il suo contro-recettore fisiologico CD49d, usualmente espresso ad elevate livelli da cellule di LLC CD38+, è in grado di trasmettere alle cellule di LLC stesse segnali di sopravvivenza od anti-apoptotici. Alcune delle molecole coinvolte nel summenzionato "network" possono essere di interesse come marcatori prognostici aggiuntivi e/o putativi bersagli terapeutici (es. CD49d). Dando seguito ad indicazioni preliminari, parte della discussione avrà come obiettivo quello di definire la distribuzione in membrana in cellule di LLC delle molecole di CD38 e CD49d le quali appaiono essere fisicamente associate nel contesto di specifiche aree di "signalling" della membrana cellulare (c.d. "raft domains"). Le ricadute funzionali di tale organizzazione sovramolecolare sarà infine discussa presentando risultati di saggi funzionali di ingaggio di CD49d mediante VCAM-1.

## Summary

**Microenvironmental interactions and clinical behaviour in chronic lymphocytic leukemia: the CD49d lesson**

The results that will be presented take advantage of previous studies of gene expression and surface antigen expression profiles, identifying CD49d expression as a negative prognosticator for CLL patients, often in association with CD38 expression and an unmutated mutational status of IGHV genes, both negative prognostic markers in CLL. Altogether, the results that will be discussed contribute to define a model of interaction between CLL cells and the microenvironment.

According to this model, CD38/CD49d-expressing CLL cells release two specific chemokines (CCL3 and CCL4) upon CD38 triggering by its natural counter-receptor CD31. CCL3 and CCL4 are eventually capable to recruit TNF $\alpha$ -producing macrophages, which in turn are responsible for VCAM-1 upregulation by stromal/endothelial cells. VCAM-1/CD49d interactions result in an increased survival of CD49d-expressing CLL cells.

Some of the molecules involved in the afore-mentioned network could be of interest as putative therapeutic targets (e.g. CD49d). Given these preliminary results, the following discussion will focus on the CD38 and CD49d surface distribution in CLL cells, and in particular on their association in the context of specific signaling areas of cell membranes (raft domains). Finally, the functional meaning beyond this supramolecular complex will be discussed introducing results of adhesion assays performed with CD49d engagement by VCAM-1 on CLL cells.

*Key-words:* CLL, CD38, CD49d, VCAM-1.

La leucemia linfatica cronica (LLC) è caratterizzata da un progressivo accumulo di piccoli linfociti B maturi monoclonali nel midollo osseo, nel sangue periferico e negli organi linfoidi secondari.

I pazienti affetti da LLC presentano un decorso clinico estremamente variabile che può essere previsto grazie alla presenza/assenza di alcuni marcatori prognostici tra i quali lo stato mutazionale della regione variabile delle immunoglobuline (IGHV) e l'espressione di CD38<sup>1,2</sup>. I pazienti che presentano un IGHV "non mutato" hanno un'evoluzione molto più aggressiva della patologia rispetto ai pazienti aventi uno stato "mutato" e analogamente l'espressione di CD38 in più del 30% delle cellule neoplastiche correla con una prognosi sfavorevole. Recenti studi hanno evidenziato la concomitante espressione del CD38 e del CD49d nel gruppo di pazienti a prognosi infausta ed hanno inoltre dimostrato il potere prognostico negativo di CD49d sia in termini di tempo al primo trattamento sia in termini di sopravvivenza<sup>3,4</sup>.

Lo studio che è stato condotto dal nostro gruppo in collaborazione con il gruppo dell'Università Tor Vergata di Roma<sup>3</sup>, ha evidenziato un comportamento clinico particolare dei pazienti affetti da LLC la cui componente neoplastica esprimeva o meno elevati livelli di CD49d. In particolare, andando a studiare il comportamento clinico dei casi di LLC esprimenti fattori prognostici negativi come ZAP-70, CD38 od uno stato mutazionale dei geni IGHV "non mutato" in associazione con CD49d, è emerso come la presenza di quest'ultimo marcatore fosse necessaria per definire il peso prognostico negativo degli altri fattori prognostici. In altri termini i casi di LLC che esprimevano alti livelli di ZAP-70 e/o CD38 od avevano uno stato mutazionale dei geni IGHV "non mutato" in assenza della co-espressione di CD49d, avevano un comportamento clinico non dissimile dai casi in cui ZAP-70 e/o CD38 non erano espressi, o lo stato mutazionale dei geni IGHV era del tutto "mutato". Questo comportamento clinico peculiare legato all'espressione di CD49d da parte della componente neoplastica ci ha spinto a cercare a livello cellulare e molecolare alcune indicazioni che potessero spiegare tale fenomeno.

Le interazioni delle cellule di LLC con l'ambiente circostante è di fondamentale importanza per la sopravvivenza delle cellule e l'espansione della patologia. Le cellule di LLC in coltura vanno infatti incontro ad apoptosi, ciò ad indicazione del fatto che la proliferazione e l'accumulo delle cellule leucemiche sono favoriti da interazioni con il micro-ambiente che le circonda.

Il CD38 è una glicoproteina di membrana che svolge funzioni sia enzimatiche, regolando la concentrazione di calcio intracellulare, sia recettoriali, legandosi al CD31/ "platelet endothelial cell adhesion molecule-1" (PECAM-1). Il legame CD38-CD31 dà origine a segnali di crescita e di sopravvivenza nella cellula di LLC e questa interazione avviene verosimilmente negli organi linfoidi periferici e nel midollo osseo dove sono presenti cellule endoteliali, stromali e "nurse-like cells" (NLC) esprimenti il CD31<sup>5</sup>.

La migrazione delle cellule di LLC attraverso il sangue periferico, l'adesione selettiva alle cellule endoteliali e il flusso attraverso gli organi linfoidi è determinato da specifiche proteine di adesione; il CD49d è un'integrina che re-

gola l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare legandosi alla fibronectina e ad altre cellule mediante l'interazione con il CD106/ "vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1)<sup>6</sup>.

Sebbene sia il CD38 che il CD49d siano molecole profondamente coinvolte nelle interazioni che avvengono tra le cellule di LLC e il micro-ambiente, e nonostante l'elevata correlazione in termini di espressione, l'associazione funzionale tra questi marcatori non è ancora stata del tutto chiarita. Il confronto del profilo di espressione genica condotto su 26 pazienti di LLC, suddivisi sulla base dell'espressione concordante di CD38 e di CD49d, ha permesso di individuare l'up-regolazione di CCL3/ "macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$ " (MIP1- $\alpha$ ) e CCL4/ MIP1- $\beta$  nel gruppo di pazienti CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> rispetto al gruppo CD38<sup>-</sup>/CD49d<sup>-</sup>. CCL3 e CCL4 sono due chemochine di notevole interesse il cui coinvolgimento in questa patologia non era ancora stato descritto<sup>7</sup>. Essendo nota la capacità del CD38, in altri sistemi cellulari, di mediare segnali proliferativi e anti-apoptotici attraverso la secrezione di citochine, è stato ipotizzato che *in vivo* le cellule di LLC CD38<sup>+</sup> venissero continuamente stimulate dal loro contro-recettore, il CD31, e producessero elevati livelli di CCL3 e CCL4. Questa prima ipotesi è stata confermata da studi di attivazione *in vitro* su cellule di LLC CD38<sup>+</sup> purificate: ingaggiando il CD38 infatti è stata rilevata una significativa up-regolazione delle due chemochine, sia a livello di trascritto che di proteina<sup>7</sup>. L'analisi di biopsie midollari di pazienti di LLC ha evidenziato inoltre una maggior presenza di CCL3 nel contesto delle aree midollari infiltrate da cellule di LLC nei casi CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> rispetto ai casi CD38<sup>-</sup>/CD49d<sup>-</sup>, a conferma che il midollo rappresenta il microambiente ottimale per il legame CD38-CD31 tra le cellule di LLC e le cellule endoteliali/stromali. L'espressione di CCR1 e CCR5, recettori specifici rispettivamente di CCL3 e CCL4, è stata analizzata in citofluorimetria nelle diverse popolazioni cellulari presenti nel sangue periferico di 39 pazienti di LLC e 9 donatori sani. I monociti sono risultate le cellule con maggior espressione dei recettori, in particolare CCR1, al contrario delle cellule di LLC e delle cellule T residue che ne hanno evidenziato livelli trascurabili, indipendentemente dall'espressione di CD38 e di CD49d da parte delle cellule di LLC. Esperimenti di migrazione condotti con monociti purificati da campioni di sangue periferico di 9 pazienti di LLC con espressione variabile di CD38 e CD49d, ha permesso di rilevare il potere chemoattraente di CCL3 e CCL4 nei confronti delle cellule di LLC. Questa capacità chemoattraente è risultata in particolare significativa nel caso del CCL3, in concordanza con l'alta espressione monocitaria del recettore specifico CCR1. La capacità di CCL3 di richiamare *in vitro* i monociti di LLC si è dimostrata in linea con il maggior numero di cellule CD68<sup>+</sup> nel contesto delle aree midollari infiltrate da cellule di LLC di pazienti CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>/CCL3<sup>+</sup>. Il CD68 è un marcatore della linea mieloide e la contemporanea espressione da parte di queste cellule del CD14, del CCR1 e l'assenza di VCAM-1, ha permesso di identificare queste cellule come appartenenti alla linea monocito-macrofagica, confermando *in vivo* la capacità chemoattraente di CCL3. Per chiarire il ruolo delle cellule CD68<sup>+</sup> richiamate nel contesto degli aggregati midollari dal CCL3 rila-

sciato dalle cellule di LLC CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>, è stata esaminata la capacità dei macrofagi stimolati con CCL3 di indurre l'aumento di VCAM-1 sulle cellule endoteliali. L'endotelio vascolare esprime livelli basali bassi di VCAM-1, ma questa espressione può essere incrementata da diversi stimoli, tra cui fattori rilasciati da macrofagi attivati<sup>8</sup>. I macrofagi di LLC sono stati quindi stimolati per 24 ore con CCL3 e il mezzo di coltura raccolto (CM-CCL3) è stato aggiunto al terreno di coltura di due modelli di linee endoteliali, le HUVEC e le ADMEC. In entrambe le linee l'espressione di VCAM-1 è aumentata in modo significativo con l'aggiunta del mezzo di coltura dei macrofagi attivati con CCL3. La successiva analisi del CM-CCL3 ha permesso di individuare la presenza del "Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ " (TNF- $\alpha$ ) tra i fattori rilasciati dai macrofagi stimolati da CCL3 e responsabili dell'incremento di VCAM-1 sulle cellule endoteliali. La successiva analisi delle biopsie midollari dei pazienti CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> ha rivelato non solo una maggior presenza di CCL3 e di cellule CD68<sup>+</sup> infiltrate rispetto a quelle dei casi CD38<sup>-</sup>/CD49d<sup>-</sup>, ma anche una maggior quantità di cellule esprimenti VCAM-1<sup>+</sup>. Studi di apoptosi condotti su cellule di LLC CD49d<sup>+</sup> hanno dimostrato come il legame di VCAM-1 con il suo naturale contro-recettore sia in grado di trasmettere alle cellule di LLC segnali di sopravvivenza od anti-apoptotici. Il micro-ambiente ha un ruolo chiave nella crescita e nell'aggressività delle cellule neoplastiche; le cellule di LLC sopravvivono in vitro in co-cultura con cellule stromali, dendritiche o NLC grazie agli stimoli di sopravvivenza che queste cellule mediano. Nel nuovo modello di interazione micro-ambientale proposto gioca un ruolo fondamentale la produzione di CCL3 (e CCL4) da parte delle cellule di LLC con alta espressione di CD38, in seguito al legame CD38/CD31. L'elevata concentrazione di CCL3 attira cellule della linea monocito-macrofagica (CD68<sup>+</sup>) che rilasciano fattori, tra i quali il TNF- $\alpha$ , in grado di incrementare l'espressione di VCAM-1 sulle cellule endoteliali/stromali che compongono il micro-ambiente midollare, favorendo l'interazione di VCAM-1 con il CD49d, generalmente espresso ad alti livelli dalle cellule di LLC CD38<sup>+</sup>. Il legame VCAM-1/CD49d protegge le cellule neoplastiche dall'apoptosi e si crea così un circuito di sopravvivenza che può spiegare la maggior aggressività delle cellule di LLC CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup><sup>7</sup>. Nel "network" appena descritto sono coinvolte molecole che potrebbero essere putativi bersagli terapeutici, come l'interazione VCAM-1/CD49d, il cui blocco attraverso l'uso di anticorpi anti-CD49d (es. Natalizumab) potrebbe limitarne l'effetto "pro-survival".

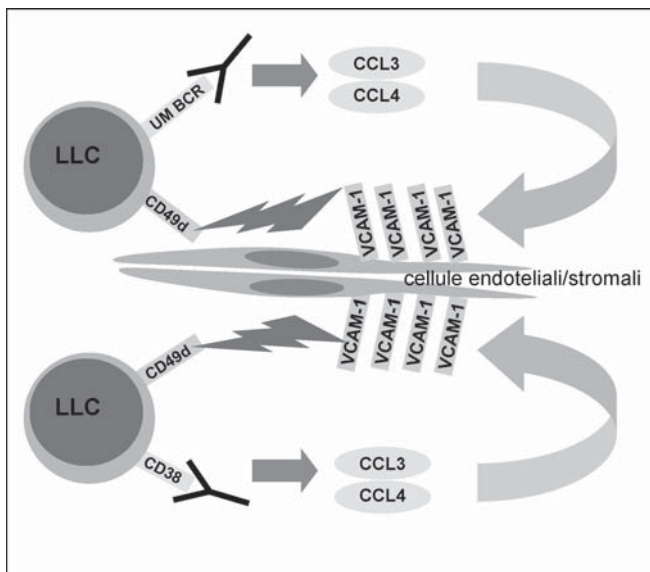
La correlazione di espressione del CD38 e del CD49d sulla superficie delle cellule di LLC e il loro coinvolgimento nelle interazioni con il micro-ambiente ha posto l'attenzione sulla distribuzione in membrana di queste proteine. Recenti studi, condotti dal nostro gruppo in collaborazione con il Laboratorio di Immunogenetica dell'Università di Torino, hanno dimostrato che il CD38 è parte di un complesso molecolare stabilizzato in aree di membrana ricche di colesterolo, i "raft-domains"<sup>9</sup>. Nei linfociti B l'attività del CD38 è regolata attraverso l'interazione con il CD19 e il CD81 e dalla localizzazione in piccole zone lipidiche della membrana<sup>9</sup>. Vista la propensione di CD38 di formare complessi con altre molecole è risultato interes-

sante verificare se specifiche interazioni in membrana potessero intercorrere anche tra il CD38 e il CD49d. Esperimenti di "co-capping" condotti su linee cellulari (Raji e RPMI-8266) e su cellule di LLC hanno confermato l'associazione laterale in membrana del CD38 e del CD49d: il "capping" mediato da anticorpi provoca una redistribuzione delle molecole riconosciute dall'anticorpo, e tutte le molecole a queste associate, ad un singolo polo della cellula. Gli esperimenti di "capping" sono stati analizzati con il microscopio a fluorescenza: l'anticorpo anti-CD49d è stato in grado di indurre il capping nel 75% delle cellule di LLC utilizzate e, tra queste, l'80% presentava anche una redistribuzione di CD38 nelle aree di "capping". Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando un anticorpo anti-CD38 per promuovere il "capping" e verificando poi la redistribuzione di CD49d. Ulteriori "staining" hanno poi evidenziato la presenza della subunità  $\beta 1$  (CD29) dell'integrina  $\alpha 4\beta 1$ , di cui il CD49d (subunità  $\alpha 4$ ) fa parte, e del CD81 nelle aree di "capping" mentre non c'è stata nessuna redistribuzione della molecola HLA-I, a conferma della specificità degli esperimenti di "co-capping". L'associazione fisica tra CD38 e CD49d è stata confermata anche a livello biochimico utilizzando tecniche di immunoprecipitazione con anti-CD49d seguite da analisi in western blot con anti-CD38: la presenza del CD38 nei lisati immunoprecipitati ne testimonia l'associazione con il CD49d. L'utilizzo di tecniche biochimiche che permettono la separazione delle diverse frazioni cellulari, hanno evidenziato che il complesso CD38/CD49d è presente sia all'interno dei "lipid-rafts" che all'esterno. Inoltre esperimenti di "co-capping" condotti su cellule di LLC trattate con "methyl- $\beta$ -cyclodextrin" (M $\beta$ CD), un composto che distrugge i "raft-domains", hanno confermato che l'associazione CD38/CD49d rimane inalterata. Dal momento che il legame delle integrine con il loro contro-recettore porta ad una riorganizzazione delle stesse sulla membrana cellulare, è stato interessante verificare se il legame CD38/CD49d fosse mantenuto anche a seguito della polarizzazione di CD49d sui suoi ligandi naturali. Le cellule di LLC sono state lasciate aderire su VCAM-1 o il frammento CS-1, specificatamente riconosciuto da CD49d, della fibronectina: l'analisi al microscopio confocale ha evidenziato una stretta co-localizzazione di CD38 e CD49d nelle zone di adesione. L'associazione laterale di CD38/CD49d appena dimostrata può implicare degli aspetti funzionali, soprattutto per quanto riguarda le attività biologiche delle molecole coinvolte ed in questo ambito si stanno indirizzando gli studi che stiamo conducendo attualmente.

I meccanismi molecolari fin qui descritti possono almeno in parte contribuire a spiegare il fenomeno, descritto all'inizio del presente capitolo, secondo il quale pazienti affetti da LLC CD38<sup>+</sup> ma non CD49d<sup>+</sup> hanno di solito un comportamento clinico simile ai pazienti affetti da LLC CD38<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>.

In questo ambito, può essere di interesse ricordare alcuni studi di "gene expression profile" recentemente pubblicati dal gruppo di ricercatori dell'Università de "La Sapienza" di Roma<sup>10</sup>. Tali studi hanno dimostrato come l'ingaggio del "B cell receptor" (BCR) in LLC, da parte di anticorpi agonisti anti-IgM, moduli significativamente il profilo di espressione genica solamente quando il BCR è





**Figura 1.** Interazioni micro-ambientali nelle cellule di leucemia linfatica (LLC) esprimenti un “B-cell receptor” non-mutato (UM BCR, parte alta) e/o CD38 (parte bassa) e CD49d. Per ulteriori dettagli vedere il testo.

del tipo “non-mutato”. Inoltre, tra i geni la cui espressione era aumentata in seguito all’ingaggio del BCR, vi erano i geni relativi alle due chemochine CCL3 e CCL4. E’ perciò interessante, a chiusura della presente trattazione, proporre un modello (Fig.1) secondo il quale l’ingaggio di CD38 e/o di un BCR “non-mutato” determina un aumento della produzione da parte delle cellule di LLC delle due chemochine CCL3 e CCL4, le quali attraverso la sequenza di eventi sin qui descritta sono in grado di indurre modificazioni microambientali principalmente caratterizzate da un incremento dell’espressione del ligando di CD49d, VCAM-1. Le interazioni VCAM-1/CD49d, a loro volta, possono essere responsabili della trasmissione di segnali di sopravvivenza per le cellule di LLC. L’assenza del CD49d in qualche modo “vanifica” il “loop” paracrino CCL3/CCL4-dipendente per la mancanza delle interazioni tra VCAM-1 e CD49d che rappresentano il braccio efferente del “loop” citochimico. In tal senso, interazioni micro-ambientali specifiche possono contribuire a spiegare il comportamento clinico di sottotipi di LLC ad espressione diversa di marcatori prognostici.

## Ringraziamenti

Supportato in parte da: Ministero della Salute (Ricerca Finalizzata I.R.C.C.S., Alleanza Contro il Cancro e Rete Nazionale Bio-Informatica Oncologica/RN-BIO), Roma; Associazione Italiana contro le Leucemie, linfomi e mielomi (AIL), Sezione di Venezia, Pramaggiore (VE); Ricerca Scientifica Applicata, Regione Friuli Venezia Giulia, Trieste (Linfonet Project); Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC, Investigator Grant IG-8701).

## Bibliografia

1. 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; 94:1840-7.
2. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 2000; 95:2455-7.
3. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111:865-73.
4. 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; 140:537-46.
5. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Dührsen U, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; 102:2146-55.
6. Rose DM, Han J, Ginsberg MH. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol Rev* 2002; 186:118-24.
7. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal BM, Marconi D, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are inter-chained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009; 69:4001-9.
8. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989; 59:1203-11.
9. Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, Bergui L, Omede’ P, Genazzani AA, et al. CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood* 2007; 109:5390-8.
10. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, Citarella F, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2008; 112:782-92.