Stato mutazionale del gene IgVH nella leucemia linfatica cronica: valutazione dei "database" di riferimento*

Flavia Sciarini[1], Chiara Parma[1], Francesca Maria Biella[1], Adele Cappellani[1], Manuela Beretta[1], Andrea Soccodato[2], Daniele Perego[3], Stefano Signorini[1], Mara Piatti[1], Paolo Mocarelli[1], Paolo Brambilla[4]

[1]Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio

[2]Divisione di Ematologia, Ospedale San Gerardo dei Tintori, Monza

[3]Divisione di Medicina, Ospedale di Desio

[4]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Medicina e Chirurgia, Università Milano-Bicocca, Milano

ABSTRACT

IgVH mutational status in chronic lymphocytic leukemia: evalutaion of reference databases. An important prognostic factor in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the mutational status of immunoglobulin heavy chain variable region genes (IgVH), whose determination depends on the comparison between the nucleotide sequence of IgVH expressed by the leukemic clone of the patient and the germ line of the concerned family. If the calculated homology is >98%, the patient is deemed unmutated and the clinical course is unfavorable. Two reference database custodians of nucleotide sequences of the germ line [GenBank/IgBlast and Immunogenetics Information System (IMGT)] are the most accessed for the comparison. The aim of this work was to evaluate what database provides a more accurate assessment of the IgVH mutational status. The latter was examined by automated sequencing in patients with CLL (n = 204) and the percentage of homology was assessed by both databases. The analysis revealed that in six patients the two databases assigned a different family, because some alleles or families are present only in IgVH dataset of IMGT. When IgVH family was the same in both databases, the percentage of homology showed a difference in 50% of the subjects. Depending on the database used for comparison, six subjects, with homology close to 98%, have a different mutational status with associated different prognosis estimate. In conclusion, the IMGT database is more comprehensive and updated allowing to define the percentage of homology, and therefore the prognostic value, more accurately.

INTRODUZIONE

La leucemia linfatica cronica (LLC) è la più frequente leucemia dell'adulto nei paesi occidentali, rappresentando il 25-30% di tutte le leucemie; predilige i soggetti con età >60 anni e di sesso maschile. Si tratta di una malattia linfoproliferativa a decorso cronico, caratterizzata dalla proliferazione midollare e periferica di linfociti B monoclonali, di piccola taglia e di aspetto maturo. I criteri diagnostici della LLC attualmente in uso sono quelli formulati nel 1996 dal "National Cancer Institute Working-Group" (NCI-WG). La diagnosi richiede la presenza di almeno 5 x 10^9/L linfociti B nel sangue periferico; alla tipizzazione immunofenotipica tali linfociti coesprimono gli antigeni CD5, CD19 e CD23, e devono presentare restrizione monoclonale delle catene leggere (1).

Relativamente al decorso clinico, alcuni soggetti mostrano un andamento estremamente indolente, con una malattia stabile che non richiede terapia per più di 10 anni, mentre altri soggetti possono andare incontro ad una crescita del clone leucemico relativamente rapida, con una sopravvivenza di pochi anni. La variabilità del decorso clinico rende necessario lo studio alla diagnosi di parametri di significato prognostico, al fine di adeguare il trattamento alla severità della malattia. I fattori prognostici tradizionali comprendono sia quelli di natura clinica, quali la stadiazione di Rai e Binet, il tempo di raddoppio linfocitario e l'infiltrato linfatico alla biopsia osteomidollare, che quelli di natura biologica, come i valori di β_2-microglobulina, di timidinkinasi (TK) e dell'antigene CD23 solubile. Ai fattori prognostici tradizionali si sono aggiunti nuovi parametri di laboratorio per la stratificazione dei pazienti affetti da LLC in diverse categorie di rischio e di progressione di malattia. Tra questi fattori ha assunto notevole importanza la valutazione delle mutazioni somatiche a carico dei geni che codificano per la regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline delle cellule leucemiche (IgVH): l'assenza di mutazioni somatiche risulta infatti essere associata ad una prognosi sfavorevole (2).

I geni per le immunoglobuline sono organizzati in tre loci separati: uno per le catene leggere kappa (κ), uno per le catene leggere lambda (λ) e uno per le catene pesanti. La regione variabile delle catene pesanti è codificata dalla combinazione di un segmento genico VH, un segmento genico JH e un segmento genico DH, ciascu-

**Questo lavoro è stato in parte presentato al 41° Congresso Nazionale SIBioC, 27-30 ottobre 2009, Napoli, sotto forma di poster (Biochim Clin 2009;33:377), ricevendo, nella persona del suo primo autore (F. Sciarini), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.*

no selezionato tra molti segmenti genici ripetuti. La formazione della catena pesante deriva da due eventi successivi di ricombinazione somatica, che portano dapprima alla giunzione DH-JH e successivamente alla giunzione VH-DH-JH. Se al primo tentativo su uno dei due cromosomi il riarrangiamento VDJ non è produttivo, la cellula può effettuare un secondo tentativo utilizzando il secondo cromosoma (3). Il riarrangiamento dei geni che codificano per la regione variabile delle catene leggere κ e λ segue le stesse regole utilizzate per le catene pesanti, con la sola differenza che un segmento genico VL si ricombina direttamente con un segmento genico JL, per l'assenza del segmento D. Un riarrangiamento produttivo VJκ porta ad un adeguato trascritto e alla successiva traduzione di una catena leggera κ. Nel caso in cui il riarrangiamento VJκ sia improduttivo su entrambi i cromosomi il processo prosegue con il riarrangiamento della catena leggera λ.

Lo stato mutazionale del gene IgVH, calcolato in percentuale di omologia, viene determinato mediante confronto tra la sequenza nucleotidica del gene IgVH espresso dal clone leucemico del paziente e la sequenza della linea germinale IgVH della famiglia corrispondente. La percentuale di omologia è data da 100 meno il rapporto tra il numero di nucleotidi diversi nella regione IgVH del clone leucemico rispetto alla regione IgVH della linea germinale omologa e il numero totale dei nucleotidi della sequenza IgHV-D-J (4). Se l'omologia calcolata è superiore al 98%, il gene IgVH espresso dal clone leucemico è considerato non mutato e il decorso clinico risulta sfavorevole. Il cut-off del 98% è stato scelto presupponendo che la presenza di polimorfismi, relativamente comuni nei geni VH, possa giustificare un grado di differenza rispetto alla linea germinale fino al 2% (5).

Esistono diversi "database" di riferimento depositari delle sequenze nucleotidiche delle linee germinali, che permettono di identificare la famiglia e la percentuale di omologia del gene IgVH. Tra i "database" disponibili sono inclusi GenBank/IgBlast e ImMunoGeneTics information system (IMGT), che differiscono tra loro per il tipo di "software", i criteri utilizzati, i polimorfismi e le sequenze germinali depositate (6). Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dall'uso dei due "database" al fine di stabilire quale permetta una migliore stratificazione prognostica dei pazienti.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Lo studio è stato condotto su un totale di 204 pazienti (131 maschi e 73 femmine, di età compresa tra 41 e 94 anni, media 67,5 anni) affetti da LLC e in cura presso le Divisioni di Medicina dell'Ospedale di Desio e dell'Ospedale San Gerardo dei Tintori di Monza.

Analisi dello stato mutazionale del gene IgVH

Ai pazienti sottoposti all'analisi dello stato mutazionale del gene IgVH venivano prelevati circa 10 mL di sangue intero in provette contenenti EDTA. A partire dal campione ematico vengono separati i linfociti mediante gradiente di densità (Histopaque-1077, Sigma Aldrich). Il RNA totale è quindi estratto dai linfociti con TriReagent (Sigma Aldrich). La concentrazione del RNA era valutata mediante spettrofotometro, misurando la densità ottica del campione a 260 nm, mentre la purezza era valutata sulla base del rapporto della densità ottiche a 260 nm e 280 nm. Il RNA è sottoposto a elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% per verificarne l'integrità (7). Successivamente, 2 μg di RNA sono retrotrascritti a DNA complementare (cDNA) (First-Strand cDNA Synthesis kit, Amersham Biosciences). Per la successiva amplificazione mediante "polymerase chain reaction" (PCR) la concentrazione del cDNA viene portata per tutti i campioni a 0,1 g/L mediante aggiunta di acqua.

Per l'amplificazione del frammento di interesse erano utilizzati "primers" specifici per la regione IgHV-D-J; si tratta di una reazione multiplex in cui vengono utilizzati un "primer reverse" (JH) e una miscela di "primer forward" famiglia-specifici per la regione leader (specifici per le diverse regioni target VH1, VH2, VH3a, VH3b, VH4, VH5 e VH6). I prodotti di amplificazione hanno una lunghezza che varia dalle 370 alle 420 bp in base alla variante genica presente (8). Nel caso in cui le sequenze nucleotidiche ottenute da queste PCR non permettano di identificare una famiglia o di valutarne lo stato mutazionale, oppure nel caso di campioni che mostrano un riarrangiamento biallelico, si sottopone il cDNA a 6 PCR singole, ognuna con il "primer reverse" JH e un solo dei "primer forward" famiglia-specifico (9, 10).

Mediante elettroforesi su gel d'agarosio "low melting" al 1,5% (80-100 V per 30 min) e colorazione con etidio bromuro si valuta l'efficienza della PCR e la specificità del risultato. Devono risultare assenti gli amplificati aspecifici nei campioni e qualsiasi tipo di amplificato nel controllo negativo. Si procede con il taglio della porzione di gel che contiene la banda d'interesse e quindi con la purificazione del prodotto di reazione mediante eluizione dal gel di agarosio, la quale ha lo scopo di estrarre e purificare il frammento di DNA amplificato dai "primer" non incorporati e da eventuali amplificati aspecifici (QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen). Il prodotto di PCR purificato viene sottoposto a reazione di sequenziamento diretto (Big Dye terminator v1.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems). Inizialmente viene utilizzato il "primer reverse" alla concentrazione di 3,2 pmol; una volta individuata la famiglia IgVH espressa dal clone leucemico, il prodotto di PCR viene sequenziato con il "primer leader" famiglia-specifico, a uguale concentrazione. Il prodotto della reazione di sequenza viene purificato per eliminare tutti i terminatori liberi dideossiribonucleotidi trifosfato, che essendo fluorescenti potrebbero interferire nella lettura dei frammenti da parte dello strumento (Centri-sep Columns, Princeton Separation), e successivamente trattato con formamide per aiutare la distensione del frammento di sequenza e il recupero dei frammenti piccoli nel capillare. I campioni da analizzare sono sequenziati tramite sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Le sequenze sono valutate utilizzando GenBank/IgBlast e IMGT. La percen-

tuale di omologia in entrambi i casi è calcolata dal codone 1 al codone 107 (CDR-IMGT) del gene IgVH.

RISULTATI

Tutti i 204 soggetti considerati nel nostro studio sono stati analizzati tramite sequenziamento; le sequenze identificate come pseudogeni o come riarrangiamenti non produttivi (rispettivamente 9 e 1) sono state escluse. Per le 194 sequenze rimanenti la percentuale di omologia è stata valutata con entrambi i "database". Alcuni alleli o famiglie IgVH sono presenti solo nel dataset di riferimento di IMGT e non in quello di GenBank/IgBlast; per questo motivo i due "database" assegnavano una famiglia o un allele differente in 6 dei soggetti studiati. In particolare, a due soggetti veniva attribuita la famiglia IgVH3-53 da GenBank/IgBlast e l'allele 3-66 da IMGT; a due pazienti era attribuita la famiglia 5-51 o uno pseudogene da GenBank/IgBlast, mentre IMGT attribuiva la famiglia 5a-03; infine, a due soggetti veniva attribuita la famiglia 4-31 da GenBank/IgBlast e la famiglia 4-30-4* da IMGT. Considerando i 188 soggetti per i quali i due "database" assegnavano la medesima famiglia, si è visto che la percentuale di omologia calcolata risultava identica in 94 casi (50%), mentre nei restanti 94 si rilevava una differenza compresa tra 0,15% e 6,37%. I geni per i quali più spesso si è evidenziata una differenza di percentuale di omologia tra i due "database" appartengono alle famiglie IgVH3-23 (6 soggetti), 3-53 (4 soggetti), 4-39 (4 soggetti) e 4-4 (4 soggetti) (Figura 1).

Nella nostra casistica, 6 pazienti con percentuale di omologia vicina al 98%, presentavano un differente stato mutazionale e quindi una diversa valutazione prognostica a seconda del "database" utilizzato; per uno di questi, l'omologia era del 100% secondo IMGT, mentre GenBank/IgBlast calcolava una percentuale di omologia <98%. Inoltre, per 14 soggetti studiati, IMGT assegnava un'omologia del 100% al gene VH espresso dal clone leucemico, mentre GenBank/IgBlast assegnava un'omologia compresa tra 99,9% e 98% (Figura 2).

DISCUSSIONE

Data l'importanza della percentuale di omologia tra la sequenza nucleotidica del clone leucemico e quella della linea germinale omologa nella stratificazione prognostica dei pazienti con LLC, è fondamentale valutare con accuratezza questo parametro. Il fatto che alcuni alleli o famiglie IgVH siano presenti solo nel dataset di riferimento di IMGT e non in quello di GenBank/IgBlast aumenta la probabilità che quest'ultimo assegni una percentuale di omologia inferiore per tutti quegli alleli o famiglie che non riconosce come tali. Nella nostra casistica, IMGT assegnava uno stato mutazionale sopra al cut-off in 6 pazienti per i quali GenBank/IgBlast assegnava uno stato mutazionale al di sotto del cut-off.

Studi recenti hanno rilevato che un'omologia del 100% è di per sè associata a un decorso clinico peggiore rispetto a percentuali di omologia comunque superiori al 98% ma inferiori al 100% (11). Nella nostra casistica, IMGT assegnava una percentuale di omologia del 100% a 15 pazienti per i quali GenBank/IgBlast assegnava una percentuale di omologia inferiore.

I risultati ottenuti nel nostro studio dimostrano, quindi, che IMGT è un "database" più comprensivo e aggiornato, permettendo una più accurata definizione della percentuale di omologia e una migliore stratificazione dei pazienti nelle categorie di rischio e di progressione di malattia. Studi recenti hanno evidenziato come soggetti la cui "heavy-chain complementarity determining region-3" (HCDR3) è riconducibile ad un medesimo stereotipo hanno uguali caratteristiche e somiglianza in termini di "outcome", indipendentemente dallo stato mutazionale (12). Dato che IMGT permette di riconoscere anche i segmenti D e J, indispensabili per identificare l'eventuale stereotipo della regione HCDR3, ciò può ulteriormente contribuire ad una classificazione prognostica più accurata dei pazienti affetti da LLC.

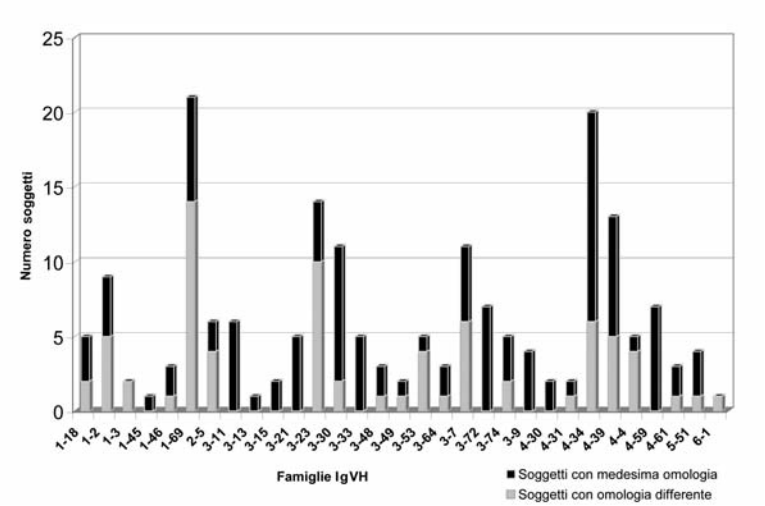


Figura 1

Proporzione tra soggetti a cui viene assegnata la medesima percentuale di omologia e soggetti a cui viene assegnata percentuale di omologia differente in relazione alla famiglia IgVH espressa dal clone leucemico nell'impiego dei due "database" valutati.

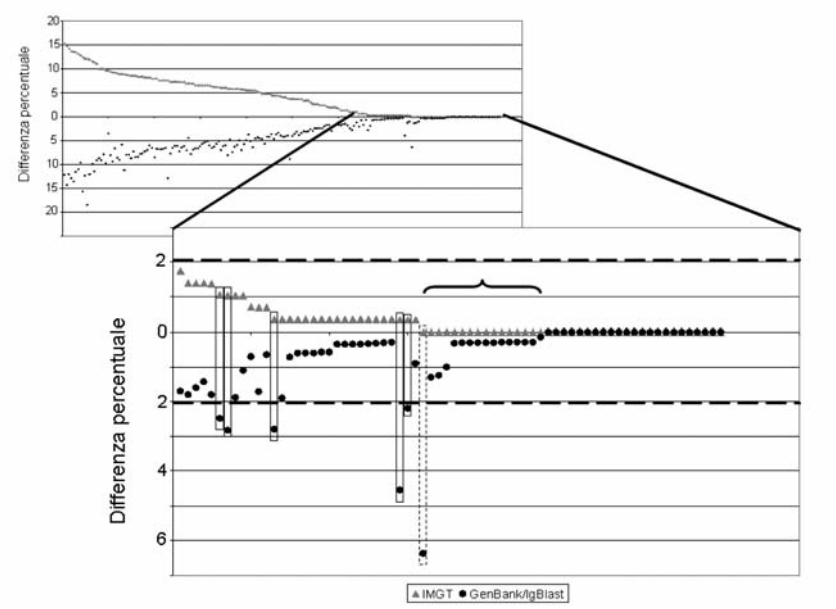


Figura 2
Differenza tra le sequenze in studio e le sequenze germinali calcolate da IMGT e GenBank/IgBlast per i 188 pazienti assegnati dai due "database" alla medesima famiglia.
Il riquadro evidenziato contiene i pazienti con una percentuale di omologia vicina al valore soglia del 98%: nei rettangoli sono indicati i pazienti per i quali i due "database" assegnano stati mutazionali differenti. La parentesi graffa identifica i pazienti per i quali IMGT assegna una omologia del 100% e GenBank/IgBlast una omologia tra 98% e 99,9%. Per uno di questi pazienti (nel rettangolo con linea tratteggiata) GenBank/IgBlast assegna una percentuale di omologia al di sotto del cut-off di 98%.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la preziosa collaborazione tecnica Raffaella Fioratto, Pierangela Molteni, Patrizia Pighi e Raffella Sala.

BIBLIOGRAFIA

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood 2008;111:5446-56.
2. Ghia P, Ferreri AJM, Calligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol 2007;64:234-46.
3. Ghia P, Rosenquist R, Davì F. Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leucemia. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
4. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2007;21:1-3.
5. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgVH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999;94:1848-54.
6. Davi F, Rosenquist R, Ghia P, et al. Determination of IgHV gene mutational status in chronic lymphocytic leukemia: bioinformatics advances meet clinical needs. Leukemia 2008;22:212-4.
7. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques 1993;15:532-7.
8. Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003;17:2257-317.
9. Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. Blood 2003;101:2049-53.
10. Marasca R, Maffei R, Morselli M, et al. Immunoglobulin mutational status detected through single-round amplification of partial V(H) region represents a good prognostic marker for clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. J Mol Diagn 2005;7:566-74.
11. Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations. Br J Haematol 2008;140:320-3.
12. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. Br J Haematol 2009;144:492-506.