

Perfil mutacional de pacientes con leucemia linfocítica crónica que expresan IGHV4-34 estereotipado

Mutational profile of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34

Stanganelli C¹, Coe Torres D², Ortega C³, Márquez ME⁴, Cabrera J¹, Galvano C⁵, Krzywinski A⁵, Lang C⁶, Zanella L⁶, Agriello E⁶, Oppenzzo P³, Hassan R², Slavutsky I⁵

¹División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina (ANM),

²Instituto Nacional del Cáncer, Río de Janeiro, Brasil,

³Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay,

⁴Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela,

⁵Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-ANM,

⁶Laboratorio de Especialidades Bioquímicas, Bahía Blanca.

medicinanuclear270@gmail.com

Fecha recepción: 03/11/2019

Fecha aprobación: 07/11/2019

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN PLENARIA EN MARCO DEL XXIV CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA.



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 23 n° 3: 10-15

Septiembre - Diciembre 2019

Palabras claves: IGHV4-34, perfil mutacional, LLC.

Keywords: IGHV4-34, mutational profile, CLL.

Resumen

IGHV4-34 es el gen más utilizado en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) mutada (M). Una proporción significativa de casos con IGHV4-34 mutado se asigna a diferentes subtipos estereotipados, definidos por presentar BCRs (*B cell receptors*) casi idénticos. En este trabajo analizamos el perfil mutacional de pacientes con LLC que expresan IGHV4-34 tendiente a refinar la caracterización molecular de nuestra cohorte. Los resultados se correlacionaron con datos citogenéticos y FISH. Un total de 946 pacientes de Argentina (393), Brasil

(358), Uruguay (116) y Venezuela (79) (558 hombres; edad media: 65,6 años) fueron evaluados. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética Institucionales. Todos los individuos proporcionaron su consentimiento informado. Se obtuvieron un total de 964 reordenamientos productivos (15 casos presentaron dos reordenamientos y 1 caso, tres). De ellos, 125 (13%) expresaron el gen IGHV4-34, 21 (16,8%) exhibieron IGHV no mutada (NM) ($\geq 98\%$ de identidad con la línea germinal; LG), mientras que 104 (86.4%) pertenecían al subgrupo M ($<98\%$ LG). Veintisiete casos con IGHV4-34 M presenta-

ron BCRs estereotipados, de los cuales 21 correspondieron al subtipo #4, 5 al subtipo #16 y 1 al subtipo #201. Los fragmentos JH6, DH2 y DH5 fueron predominantes en la LLC estereotipada, mientras que JH4, DH2 y DH3 en los casos no estereotipados. La distribución de las mutaciones de reemplazo/silente (R/S) mostró mayor frecuencia R/S dentro de VH CDR2 y VH FR2 en el subtipo #4, en VH CDR2 en el subtipo #16, mientras que VH FR3 fue predominante en reordenamientos no estereotipados. Se observó ausencia de mutación del codón 36 (G36D) en el subtipo #16, de S64I en los subtipos #4 y #16, alta frecuencia de E55Q en el subtipo #16 y baja frecuencia de P45S en el grupo heterogéneo. El análisis citogenético mostró que todos los pacientes incluidos en subtipos de homología tenían cariotipos normales, en comparación con el 50% en los casos heterogéneos. Estos hallazgos sugieren una historia particular de exposición antigénica y/o respuesta inmune en estos pacientes, e indican la importancia de continuar estos estudios, tendiente a una mejor delineación molecular de los pacientes con LLC.

Abstract

IGHV4-34 is the most frequently used gene in patients with mutated (M) chronic lymphocytic leukemia (CLL). A significant proportion of cases with mutated IGHV4-34 is assigned to different stereotyped subsets, defined by distinctive quasi-identical BCRs (B-cell receptors). We analyzed the mutational profile of patients with CLL expressing IGHV4-34 in order to refine the molecular characterization of our cohort. Results were correlated with cytogenetic and FISH data. A total of 946 patients from Argentina (393), Brazil (358), Uruguay (116) and Venezuela (79) (558 men; mean age: 65.6 years) were evaluated. The study was approved by the Institutional Ethics Committees. All individuals provided their informed consent. A total of 964 productive rearrangements were obtained (15 cases carried two rearrangements and 1 case, three). Of them, 125 (13%) expressed the IGHV4-34 gene, 21 (16.8%) exhibited unmutated (UM) IGHV ($\geq 98\%$ germline identity; GI), while 104 (86.4%) belonged to the M subgroup (< 98 GI). Twenty one IGHV4-34 M gene rearrangements belonged to subset #4, 5 to subset #16 and 1 to subset #201. Fragments JH6, DH2 and DH5 were predominant in stereotyped CLL while JH4, DH2 and

DH3 in non-stereotyped cases. The distribution of replacement/silent (R/S) mutations showed higher R/S ratios within VH CDR2 and VH FR2 in stereotyped subset #4, in VH CDR2 in subset #16 while VH FR3 was predominant in non-stereotyped rearrangements. Absence of codon 36 (G36D) mutation in subset #16, of S64I in subsets #4 and #16, high frequency of E55Q in subset #16 and low frequency of P45S in the heterogeneous group were found. Cytogenetic analysis showed that all patients included in homology subsets had normal karyotypes, compared to 50% in the heterogeneous cases. These findings suggest a particular history of antigen exposure and/or immune response in these patients, and indicate the importance of continuing these studies to get a better molecular delineation of patients with CLL.

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es la neoplasia de células B maduras más común en Occidente, representando aproximadamente el 30-40% de las leucemias del adulto. Presenta alta variabilidad clínica y se asocia a numerosas alteraciones genéticas con valor pronóstico e impacto en las decisiones terapéuticas. Entre ellas encontramos el estado mutacional de IGHV (*immunoglobulin heavy chain variable region*) que constituye uno de los factores pronóstico más importantes, permitiendo dividir a los pacientes en mutados (M), asociados a buena evolución clínica, y no mutados (NM), relacionados a pronóstico adverso^(1,2). Asimismo, alrededor del 30% de los pacientes con LLC presentan BCRs (*B-cell receptors*) casi idénticos, con secuencias de aminoácidos (aa) muy similares en la región VH CDR3 (*variable heavy chain complementarity-determining region 3*) y el uso de rearreglos IGHV-D-J similares, denominados estereotipados. Este tipo de BCRs se pueden asignar a subtipos de homología particulares definidos por una configuración molecular distinta⁽³⁻⁵⁾, algunos de los cuales se asocian con la evolución clínica de la enfermedad⁽⁶⁾.

Diferentes publicaciones demostraron la presencia de un repertorio sesgado de genes IGHV en LLC, entre los cuales IGHV4-34 es el más frecuente en pacientes con LLC-M⁽⁷⁾. El estudio de este gen resulta de interés dada su habilidad para codificar anticuerpos autorreactivos⁽⁸⁾. Asimismo, se sabe que las células B con BCRs IGHV4-34 se expanden frente

a infecciones virales como citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV)⁽⁹⁾, bacterianas (*Mycoplasma pneumoniae*) y en ciertos desórdenes autoinmunes (lupus eritematoso sistémico)⁽¹⁰⁾.

Una proporción significativa de LLC-M con el rearrreglo IGHV4-34 se asigna a BCRs estereotipados distintivos: subtipos #4, #16, #29 y #201, de los cuales los dos primeros se asocian a enfermedad indolente, cambio de isotipo a IgG y alta carga de hipermutación somática (HMS), en tanto que los subtipos #29 y #201, presentan un curso clínico más agresivo y expresan los isotipos IgM/D⁽¹¹⁾. Además, tienen una región VH CDR3 larga enriquecida en residuos cargados positivamente, similar a los anticuerpos autorreactivos anti-DNA patogénicos, y presentan un patrón de HMS que lleva a cambios de aa con la introducción de residuos con cargas negativas. Sin embargo, ciertas posiciones que constituyen motivos de unión a epítopes de N-acetilactosamina permanecen sin cambios y retienen la habilidad del subtipo #4 para unirse a antígenos presentes en infecciones como CMV y EBV⁽⁷⁾. Este patrón de mutaciones asume un rol en la especificidad del antígeno^(11,12). En este contexto, nuestro objetivo fue analizar el perfil mutacional de los pacientes con LLC que expresan IGHV4-34 a fin de refinar la caracterización molecular de nuestra cohorte. Los resultados se correlacionaron con los datos citogenéticos y de FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

Material y métodos

Pacientes:

Se estudiaron 946 pacientes con LLC no seleccionados de Argentina (393), Brasil (358), Uruguay (116) y Venezuela (79) (558 hombres; edad media: 65,6 años, rango: 27-105 años; estadios Rai: 0: 38,7%, I-II: 42,4%, III-IV: 18,9%). El diagnóstico se estableció de acuerdo con el *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia Criteria*⁽¹³⁾. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de cada institución. Todos los individuos dieron su consentimiento informado.

Análisis del estado mutacional de IGHV y de la presencia de receptores estereotipados:

Se evaluó el estado mutacional de IGHV mediante PCR y secuenciación bidireccional acorde a lo previamente descrito⁽¹⁴⁾. Para el análisis de secuencias y la evaluación de la distribución de mutaciones a

lo largo de IGHV se usaron las bases de datos Ig-BLAST e IMGT/V-Quest. Las secuencias de IGHV con <98% de homología respecto de la línea germinal (LG) se consideraron M mientras que aquellas con homología $\geq 98\%$ fueron NM. El análisis de la presencia de receptores estereotipados en VH CDR3 se efectuó utilizando la herramienta bioinformática ARResT/AssignSubtipos, según criterios establecidos por Darzetas y col.⁽¹⁵⁾.

Análisis citogenético y FISH:

Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica estimulada con Pokeweed Mitogen y Oligo DSP30. El estudio citogenético se efectuó con técnica de bandeado G acorde a lo previamente descrito⁽¹⁶⁾. Para el análisis de FISH se utilizaron las sondas SE12, OLE13q14 D13S319, OLE11q22.3 ATM y OLE17p13.1 TP53 (LIVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina), acorde a los protocolos indicados por el fabricante.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó usando IBM SPSS Statistics 24. Para la comparación de la distribución clínica y de variables de laboratorio se utilizó el test t' de Student (para variables cuantitativas) y las pruebas de χ^2 o el test de Fisher (para variables categóricas). Para todas las pruebas, un $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados y discusión

El análisis de 946 pacientes permitió detectar un total de 964 rearrreglos productivos (15 casos presentaron dos rearrreglos y un caso tres); 54,1% de los pacientes fueron M. Del total de rearrreglos, 125 (13%) expresaron IGHV4-34 (66 varones; edad media 66,5 años, rango: 35-84 años; estadios clínicos Rai: 0: 53,7%, I-II: 31,5%, III-IV: 14,8%) representando el gen usado con mayor frecuencia (Figura 1).

La distribución según el estado mutacional, el gen involucrado y la presencia de receptores estereotipados o de rearrreglos heterogéneos (no estereotipados) se detallan en la Tabla 1. Entre los rearrreglos IGHV4-34 M estereotipados se observó mayor frecuencia del subtipo #4 (21/104; 20,2%), seguido del subtipo #16 (5/104; 4,8%) y el subtipo #201 (1/104; 0,96%). Dentro de los rearrreglos IGHV4-34 NM, 17 casos (81%) fueron verdaderos NM con 100%

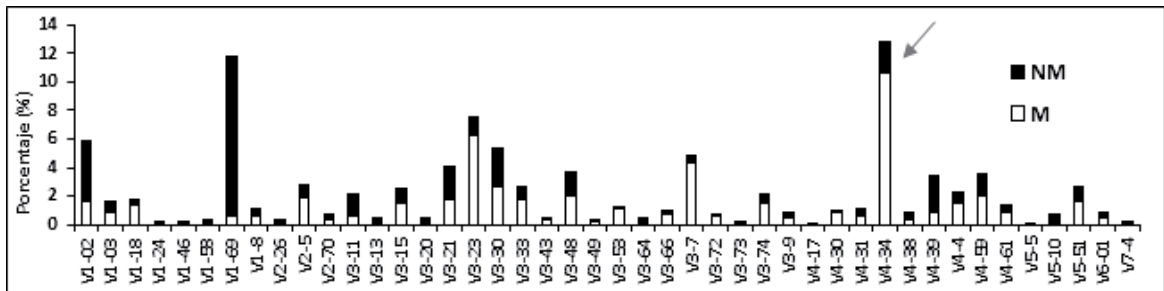


Figura 1. Gráfico mostrando el uso de genes IGHV según su estado mutacional en nuestra cohorte de pacientes con LLC

Tabla 1. Distribución de los rearrreglos IGHV

| | Nº de rearrreglos n (%) |
|------------------------|-------------------------|
| Total | 964 (100) |
| IGHV-M | 518 (54,15)* |
| IGHV-NM | 440 (45,9) |
| <u>IGHV4-34</u> | 125 (13,0) |
| <u>Mutado</u> | 104 (83,2) |
| Subtipo #4 | 21 |
| Subtipo #16 | 5 |
| Subtipo #201 | 1 |
| Heterogéneos | 77 |
| <u>NM</u> | |
| Heterogéneos | 21 (16,8) |

*3 casos con rearrreglos dobles presentaron estado mutacional discordante y fueron eliminados del análisis de estado mutacional.

de homología con la LG, mientras que 4 pacientes (19%) presentaron entre 98 y 99,9% de homología. Los genes JH6, DH2 y DH5 fueron predominantes en los rearrreglos estereotipados, mientras que JH4, DH2 y DH3 en los heterogéneos. El subtipo #16 sólo se encontró en los pacientes argentinos, en tanto que el subtipo #201, presente en muy baja frecuencia, correspondió a un paciente uruguayo. El subtipo #29 no se evidenció en nuestra serie. La Figura 2 muestra la estructura de la región VH CDR3 y la secuencia de aa de los subtipos encontrados.

Al efectuar el análisis del perfil mutacional de los rearrreglos IGHV4-34 en nuestra serie, se observa ausencia de la mutación el G36D en el subtipo #16, de S64I en los subtipos #4 y #16, alta frecuencia de E55Q en el subtipo #16, baja proporción de P45S

en el grupo heterogéneo y de la mutación S40T en el subtipo #4, observada en el 100% de los casos del subtipo #16. La disrupción del motivo de glicosilación en VH CDR2 mostró frecuencia muy alta en los subtipos #4 y #16, a diferencia de lo observado en la literatura ⁽¹¹⁾, que muestra una frecuencia de mutación de S40T de alrededor del 50% en ambos subtipos, así como bajos niveles de disrupción del motivo de glicosilación en VH CDR2 en el subtipo #16. Por otra parte, el análisis molecular de este rearrreglo mostró una distribución asimétrica de las mutaciones R/S entre las diferentes subregiones VH (CDR1, CDR2, FR2, FR3). La relación de mutaciones R/S (reemplazo/silente) en los rearrreglos estereotipados fue mayor en VH FR2 en el subtipo #4 y VH CDR2 en los subtipos #4 y #16, mientras que

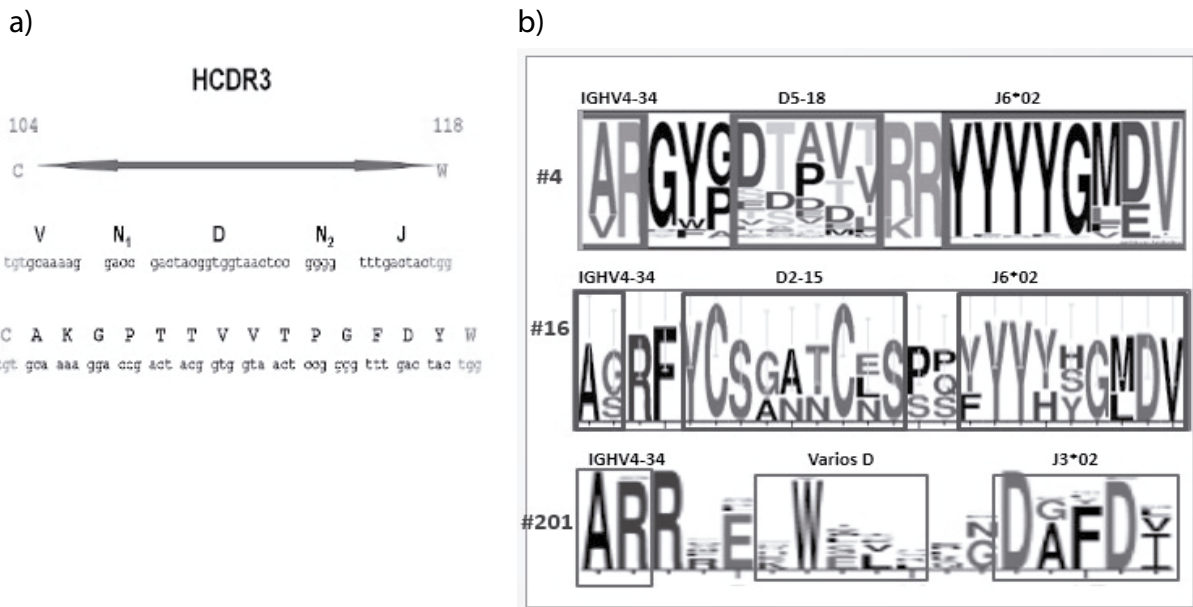


Figura 2. a) Estructura de la región VH CDR3. **b)** Composición en fragmentos V-D-J y secuencia de aa de la región VH CDR3 de los subtipos #4, #16 y #201.

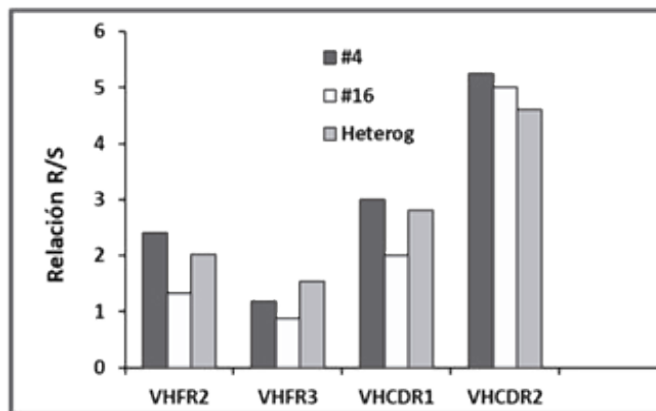


Figura 3. Distribución sesgada de la relación entre mutación de remplazo/silente (R/S) a lo largo de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas.

en los rearrreglos heterogéneos fue mayor en VH FR3 (Figura 3). Simultáneamente, y en concordancia con la literatura ⁽¹¹⁾, se evidenció que todos los pacientes con IGHV4-34 incluidos en subtipos de homología presentaban cariotipos normales, respecto del 50% de los casos con BCRs heterogéneos. Asimismo, el 33% de los pacientes con BCR estereotipado mostraron delección 13q14 por FISH. A su vez, el 85,2% de nuestros casos con IGHV4-34 tanto estereotipados como heterogéneos presentaron estadios clínicos iniciales respecto del 25% de los casos NM (p=0,0008), parámetros relacionados a buena evolución clínica y enfermedad indolente.

Simultáneamente, cabe destacar que, si bien no se observaron diferencias significativas, nuestra cohorte de pacientes con IGHV4-34 estereotipado, mostró mayor edad (66,7 años) que los casos con rearrreglos heterogéneos (61,1 años). Esto no concuerda con lo observado en la literatura ^(6,11), que muestra este rearrreglo asociado a pacientes más jóvenes que el resto de los casos con LLC-M, siendo necesarios más estudios para confirmar este hallazgo.

Si bien nuestra cohorte tiene un número limitado de casos, nuestros datos sugieren una historia particular de exposición antigénica y/o respuesta inmune en estos pacientes, e indican la importancia

de continuar estos estudios, tendiente a una mejor delineación molecular de los mismos. Asimismo, el hallazgo de cambios sesgados de aa en ciertas posiciones inducidos por hipermutación somática en la secuencia completa del gen IGHV y la ausencia

de cambios en otros codones, respalda que en estos casos las células responden de manera específica a antígenos, sustentando el probable rol de los mismos en la patogénesis de la enfermedad.

Conflictos de interés: los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Damle RN, Wasil T, Fais F y col. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;15:1840-1847.
2. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848-1854.
3. Bomben R, Dal Bo M, Capello D y col. 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.
4. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31:282-91.
5. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A y col. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119:4467-4475.
6. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA y col. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicenter study. *Lancet Haematol*. 2014;1:e74-e85.
7. Murray F, Darzetas N, Hadzidimitriou A y col. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111:1524-1533
8. Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ y col. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J Clin Invest*. 2001;108:1061-70.
9. Kostarelli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N y col. Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia*. 2009;23:919-24.
10. Sutton L, Kostarelli E, Stalika E y col. Temporal Dynamics of Clonal Evolution in Chronic Lymphocytic Leukemia with Stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 Antigen Receptors: Longitudinal Immunogenetic Evidence. *Mol Med*. 2013;19:230-236.
11. Xochelli A, Baliakas P, Kavakiotis I y col. Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated IGHV4-34 Receptors: Shared and Distinct Immunogenetic Features and Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res*. 2017;23:5292-5301.
12. Sutton LA, Agathangelidis A, Belessi C y col. Antigen selection in B-cell lymphomas-tracing the evidence. *Semin Cancer Biol*. 2013;23:399-409.
13. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D y col. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131:2745-2760
14. Stanganelli C, Travella A, Bezares R, Slavutsky I. Immunoglobulin gene rearrangements and mutational status in Argentinean patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymph Myeloma Leuk*. 2013;13:447-457.
15. Darzetas N, Hadzidimitriou A, Murray F y col. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010;24:125-132.
16. Palmitelli M, Stanganelli C, Stella F y col. Analysis of basal chromosome instability in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Mutagenesis*. 2019;34:245-52.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.