

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE 'A. AVOGADRO'
XVII CICLO-DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

Dottoranda: Eva BERRA
Relazione del terzo anno

**ANALISI DEL MECCANISMO DI IPERMUTAZIONE
SOMATICA NELLA PATOGENESI DELLE NEOPLASIE
LINFOIDI B ASSOCIATE AD AIDS**

Tutore: Prof. Gianluca GAIDANO

Introduzione

I B-LNH associati ad AIDS (AIDS-LNH)

I linfomi non-Hodgkin (LNH) rappresentano una delle più frequenti categorie di neoplasie B associate all'infezione da HIV ¹. Anche se, grazie all'introduzione di terapie appropriate, l'incidenza dei LNH in individui affetti da HIV è diminuita, questa neoplasia rimane una delle più importanti cause di mortalità in questi pazienti ². Il termine *linfoma* identifica un gruppo di neoplasie che derivano dall'espansione clonale di cellule B o T a diversi stadi di differenziazione e caratterizzate da traslocazioni cromosomiche specifiche e lesioni genetiche selettivamente associate alle diverse categorie della malattia ³. La grande maggioranza dei LNH associati ad AIDS (AIDS-LNH) sono clinicamente molto aggressivi, caratterizzati da una prognosi sfavorevole e dal frequente coinvolgimento di siti extranodali ⁴. I AIDS-LNH rappresentano un gruppo eterogeneo e includono gli AIDS-LNH sistemici, i linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (AIDS-LPSNC), i linfomi primitivi delle cavità sierose (AIDS-PEL) caratterizzati dall'infezione da parte di HHV-8 ^{4,5}, e i linfomi plasmoblastici AIDS-correlati (AIDS-PBL) ⁴. Gli AIDS-LNH sistemici sono istologicamente classificati in: linfoma di Burkitt AIDS correlato (AIDS-LB) caratterizzato dalla traslocazione cromosomica che coinvolge il gene c-MYC e i geni immunoglobulinici, da mutazioni in p53 e BCL-6, e nel 30% dei casi, dall'infezione da parte di EBV ⁶; e in linfoma diffuso a grandi cellule AIDS-correlato (AIDS-LDGC) caratterizzato da mutazioni in BCL-6 e dall'infezione di EBV ^{3,4}. Tutti gli AIDS-LPSNC sono istologicamente rappresentati dai LDGC ⁴. Questa eterogeneità clinico-biologica riflette una eterogeneità patogenetica che è stata solo parzialmente spiegata. Infatti si ipotizza che siano molti i fattori che contribuiscono alla patogenesi di questi linfomi come, ad esempio, la ridotta immunosorveglianza e la deregolazione del pattern citochinico dovuti ad infezione da HIV, la stimolazione cronica delle cellule B che può favorire l'accumulo di lesioni genetiche e le infezioni opportunistiche da parte di altri virus e di batteri ⁷.

Istogenesi dei B-LNH

L'istogenesi dei B-LNH può essere studiata grazie alla caratterizzazione di due marcatori molecolari: i geni delle regioni variabili delle immunoglobuline (IgV) e il gene BCL-6, che acquisiscono fisiologicamente mutazioni durante il transito della cellula B attraverso il centro germinativo (CG). In base all'assenza o alla presenza di ipermutazione somatica dei geni IgV e BCL-6, i B-LNH possono essere distinti in due categorie istogenetiche: (1) i B-LNH che derivano da cellule B pre-CG prive delle mutazioni nei geni IgV e BCL-6 e rappresentati dal linfoma mantellare (LM) e da una frazione di leucemie linfatiche croniche (LLC); e (2) i B-LNH che derivano da cellule B-CG caratterizzate dalla presenza di mutazioni in BCL-6 e IgV e rappresentati dal linfoma follicolare (LF), dal linfoma linfoplasmocitoide (LLP), dal linfoma di Burkitt (LB), dal linfoma diffuso a grandi cellule (LDGC) e dal linfoma associato alle mucose (MALT)³. La natura delle mutazioni dei geni IgV può suggerire a quale stadio differenziativo si trovi la cellula B che ha dato origine al tumore⁸. Infatti i linfomi che derivano da cellule B tipicamente centro-germinative sono caratterizzati da mutazioni IgV "ongoing" che indicano una continua esposizione della cellula B al processo di ipermutazione somatica; i linfomi che derivano da cellule B post-CG, che si trovano quindi ad uno stadio differenziativo più avanzato, sono caratterizzati da mutazioni IgV stabili che indicano quindi il termine della reazione CG⁹.

Recenti studi hanno messo in evidenza come l'identificazione di nuovi marcatori molecolari sia importante al fine di migliorare la stratificazione diagnostica e terapeutica di una neoplasia. Ad esempio nella leucemia linfatica cronica a cellule B l'identificazione di sottogruppi clinico-biologici in base allo stato mutazionale dei geni IgV_H viene affiancata all'identificazione di particolari "bias" nell'utilizzo dei geni V_H che contribuisce all'ulteriore stratificazione prognostica dei pazienti¹⁰.

I AIDS-LNH sono un modello adatto allo studio della linfomagenesi in un contesto di ridotta immunosorveglianza e l'analisi strutturale delle regioni variabili dei geni IgV espresse da questi linfomi possono fornire chiarimenti riguardo al meccanismo di trasformazione neoplastica

della cellula B. L'utilizzo preferenziale di particolari famiglie e/o geni delle catene pesanti e leggere delle Ig può fornire informazioni riguardo la struttura del recettore B, il suo legame con l'antigene e, di conseguenza, sull'antigene stesso. Inoltre, l'analisi del profilo mutazionale V_H e V_L può suggerire una eventuale pressione antigenica nel processo di trasformazione neoplastica.

Numerose osservazioni cliniche e sperimentali suggeriscono una stimolazione antigenica nella patogenesi dei AIDS-LNH. Per esempio, l'iperplasia follicolare e l'ipergammaglobulinemia oligoclonale sierica sono state osservate in pazienti affetti da HIV e, in aggiunta, sono state isolate in alcuni casi immunoglobuline sieriche con caratteristiche specifiche per proteine HIV-associate e per determinanti non-virali compresi autoantigeni. Inoltre, la proteina HIV gp120 viene riconosciuta come ligando naturale da un sottogruppo di geni appartenenti alla famiglia V_H3 agendo quindi come superantigene per le cellule B esprimenti recettori codificati da questi geni ¹¹.

Progetto di ricerca

La finalità del progetto di ricerca del primo anno di Dottorato è stata triplice:

- 1) Valutare il coinvolgimento del meccanismo di ipermutazione somatica nello spettro clinico patologico di linfomi non-Hodgkin associati ad AIDS (AIDS-LNH), tramite l'analisi dei geni immunoglobulinici al fine di rifinirne l'istogenesi molecolare
- 2) Valutare l'utilizzo e il profilo mutazionale dei geni IgV al fine di individuare eventuali bias all'interno delle diverse categorie clinico patologiche di AIDS-LNH e di valutare una eventuale pressione antigenica sull'espansione del clone tumorale
- 3) Identificazione di possibili marcatori molecolari nei AIDS-LNH

Materiali e metodi

Pannello tumorale ed estrazione del DNA

Per questo studio sono stati selezionati 58 campioni di AIDS-LNH rappresentativi delle diverse categorie tumorali. In particolare sono stati studiati 34 AIDS-LNH sistemici, 10 linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (AIDS-LPSNC), 10 linfomi plasmoblastici della cavità orale (AIDS-PBL), e 4 linfomi primitivi delle cavità sierose (AIDS-PEL). A questo pannello sono state aggiunte 6 linee cellulari di linfoma di Burkitt (AIDS-BL) e 3 linee cellulari di AIDS-PEL. In accordo con la classificazione WHO (World Health Organization), gli AIDS-LNH sistemici includono i linfomi diffusi a grandi cellule (AIDS-LDGC n=20) e gli AIDS-LB (n=14). Tutti i campioni sono stati raccolti prima della terapia. In base alle analisi morfologiche ed immunofenotipiche la frazione di cellule tumorali, in tutti i preparati, era maggiore o uguale al 70%. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il metodo “salting-out” con lisi cellulare seguita da digestione con Pronase E e precipitazione con etanolo. Per i casi in cui era disponibile solo il materiale incluso in paraffina, il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale (QIAamp DNA mini kit, QUIGEN, Milano).

Analisi molecolare dei geni V_H e V_L

I riarrangiamenti dei geni immunoglobulinici per le catene pesanti (IgV_H) e leggere (IgV_L) sono stati amplificati utilizzando un set di primers V_H e V_L specifici per ogni famiglia complementari alla sequenza della regione leader o FR1 o FR2 al 5', abbinati ai rispettivi J_H , J_λ o J_K in reazioni separate per ogni famiglia V_H o V_L .

I prodotti di PCR ottenuti sono stati separati su un gel di agarosio al 2% e purificati utilizzando un kit in commercio (Eppendorf Perfectprep Gel Cleanup Kit, Eppendorf, Germany). Gli ampimeri così purificati sono stati sequenziati mediante il sequenziatore automatico ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) utilizzando il kit di sequenza ABI Prism Big Dye Terminator Kit version 2.0 (Applied Biosystem). Per la sequenza, è stato usato

il primer situato nella regione 5' (quindi il primer leader o FR1 o FR2) specifico per l'amplimero ottenuto. Il protocollo di sequenza è il seguente: 98°C per 3' (1 ciclo), 96°C per 10'' seguiti da uno step a 60°C per 4' (25 cicli).

Le sequenze dei geni V_H e V_L sono state analizzate ed inizialmente allineate con un database interno al laboratorio per escludere possibili contaminazioni. In seguito le sequenze sono state allineate utilizzando il programma V-BASE sequence directory (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) ed analizzate con i seguenti programmi: MacVector 6.0.1 (Oxford Molecular Group PLC, Oxford, UK), DNA Plot (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/DNAPLOT.html>) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Le sequenze V_H e V_L sono state considerate mutate nel caso in cui la frequenza di mutazione fosse risultata uguale o superiore al 2% rispetto alla "germline" V_H e/o V_L trovata. Le mutazioni che colpiscono l'ultimo nucleotide sono state escluse dall'analisi mutazionale in quanto possono essere il risultato di una delezione al sito di "joining". I criteri per l'identificazione del segmento D nella regione CDR3 sono i seguenti: (a) 100% di omologia con un elemento D di almeno 7 bp o (b) una differenza di una singola base su un frammento D di almeno 8 bp¹². La lunghezza del V_H CDR3 è stata determinata conteggiando il numero di aminoacidi (aa) tra la posizione 94 alla fine della regione FR3 (normalmente 2 aa a valle della cisteina conservata) e la posizione 102 all'inizio della regione FR4 (corrispondente al triptofano conservato in tutti i segmenti J_H). La lunghezza del V_L CDR3 è stata determinata conteggiando il numero degli aa tra la posizione 88 alla fine della regione FR3 e la posizione 97 all'inizio della regione FR4 (normalmente la fenilalanina conservata in tutti i segmenti J_L).

Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni V_H

La presenza di eterogeneità intraclonale, indicativa di ipermutazione somatica "ongoing", è stata valutata in 15 casi di AIDS-LNH. Il riarrangiamento clonale V_H è stato amplificato utilizzando la Taq DNA polimerasi "high-fidelity" Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e clonato con il

vettore plasmidico pCR4-TOPO (Invitrogen, Ltd, Paisley, UK). Sono stati “piccati” ed analizzati almeno 20 cloni per paziente. Le sequenze sono state analizzate ed allineate utilizzando i programmi Mac Vector 6.0.1 e Multiple Sequence Alignment. Per la valutazione dell’attività ongoing sono stati considerati solo i cloni con identico CDR3. Sono state utilizzate le seguenti definizioni: mutazione non confermata (la mutazione è stata osservata solo in un clone), mutazione confermata (la mutazione è stata osservata in più di un clone). Solo i casi che presentavano più di una mutazione confermata e/o più di due mutazioni non confermate sono stati considerati “ongoing”. Nel nostro laboratorio, l’errore stimato per la Taq DNA polimerasi è dello 0.01% (0.04 mutazioni/ V_H clone)¹³.

Analisi statistiche

Per la valutazione statistica comparativa tra l’utilizzo dei geni IgV negli AIDS-LNH e nei corrispondenti LNH dell’immunocompetente, sono stati creati 2 database comprensivi dei dati V_H e V_L di 190 LDGC e 70 LB dell’immunocompetente. Le sequenze utilizzate sono depositate in GenBank o sono state pubblicate in letteratura.

I database Ig V_H e Ig V_L con le informazioni concernenti l’utilizzo di V, D e J, le frequenze di mutazione e la lunghezza del CDR3 sono stati costruiti usando Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA). Per l’elaborazione statistica è stato utilizzato il programma Statistical Product and Service Solutions (SPSS). La significatività delle differenze nell’utilizzo dei V_H , V_L , D e J_H tra i vari gruppi di AIDS-LNH studiati, è stata determinata usando il test di Fisher a 2 code p , e il test χ^2 con l’adattamento di Bonferroni per i confronti multipli. Per calcolare la significatività delle differenze nella lunghezza del CDR3 e nella frequenza delle mutazioni tra i gruppi diversi di AIDS-LNH analizzati, sono stati utilizzati il test parametrico t e il test nonparametrico di Mann-Whitney. Per valutare la distribuzione delle mutazioni nel CDR3 e nel FR sono stati usati 2 metodi statistici: il modello di distribuzione binomiale di Chang-Casali e il modello di distribuzione multinomiale^{14,15}. In tutti i casi le differenze sono state considerate significative quando il valore di $p < .05$.

Analisi dell'infezione virale

L'analisi dell'infezione da parte di EBV è stata valutata tramite l'analisi in PCR dei frammenti EBNA-1 ed EBNA-3.

Risultati

Utilizzo dei geni V_H negli AIDS-LNH

E' stato amplificato un riarrangiamento IgV_H clonale in 65/67 (97%) AIDS-LNH, di questi 58/65 (89.2%) funzionali. In 3 casi è stato trovato un codone di stop all'interno dell'originale sequenza V_H produttiva (mutazione crippling), in 4 casi è stato amplificato solo il riarrangiamento non produttivo. I casi con solo il riarrangiamento non produttivo sono stati esclusi dall'analisi. Nei rimanenti 2 casi non è stato trovato nessun riarrangiamento. La distribuzione delle famiglie V_H nei AIDS-LNH non rispecchia la complessità del repertorio V_H germinale: la famiglia V_H usata più frequentemente è la V_H4 (26/61; 42.6%), seguita dalla famiglia V_H3 (20/61; 32.8%) e V_H1 (7/61; 11.4%). L'analisi statistica ha evidenziato una selezione positiva e negativa legata ad alcune famiglie. In particolare la famiglia V_H4 è positivamente selezionata negli AIDS-LDGC e AIDS-LB (23/45; 51.1%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (83/260; 31.9% $p=0.02$) e alle cellule B normali (24.8%; $p<0.001$)¹⁶ al contrario della famiglia V_H3 che risulta negativamente selezionata nei AIDS-LDGC e AIDS-BL (14/45; 31.1%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (141/260; 54.2%; $p<0.01$) e alle cellule B normali (53.9%; $p<0.01$)¹⁶. Analizzando la distribuzione dei singoli geni V_H, il gene riarrangiato con maggiore frequenza è V_H4-34 sia nei AIDS-LDGC (9/29; 31%) che nei AIDS-LB (4/16; 25%). L'utilizzo di questo gene è significativamente alto negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (3.9%; $p<0.001$)¹⁶.

Riarrangiamenti V_L nei AIDS-LNH

E' stato amplificato un riarrangiamento V_L clonale in 48/60 (80%) AIDS-LNH, di questi 40/48 (83.3%) funzionali. Complessivamente, 18/40 (45%) AIDS-LNH riarrangiano un gene V_K funzionale e 22/40 (55%) un gene V_λ funzionale. E' stata osservata una prevalenza di riarrangiamenti V_λ nei AIDS-LB (9/15; 60%), nei PEL (5/6; 83.3%) e nei PBL (2/3), ma non nei LDGC (6/17; 35.3%). La distribuzione delle famiglie V_K nei AIDS-LNH non riflette la complessità del repertorio germinale e non rispecchia la normale distribuzione nelle cellule B normali¹⁷. La famiglia riarrangiata più frequentemente è la V_{K1} (7/18; 38.8%) seguita da V_{K4} (6/18; 33.3%) e V_{K3} (5/18; 27.7%). In particolare la famiglia V_{K4} risulta positivamente selezionata negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (5.30%; $p < 0.001$) al contrario della famiglia V_{K2} che risulta essere sottorappresentata negli AIDS-LNH (0/19) rispetto alle cellule B normali (19%; $p = 0.03$)¹⁷. Analizzando la distribuzione dei geni V_K , il più frequentemente riarrangiato negli AIDS-NHL risulta essere V_{K4-1} (6/19; 31.6%) seguito da $V_{K1-39/1D-39}$ (5/19; 26.3%). L'utilizzo del gene V_{K4-1} è significativamente alto negli AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (5.3%; $p < 0.001$)¹⁷ ed è preferenzialmente riarrangiato negli AIDS-LDGC e negli AIDS-LB (4/17; 23.5%) rispetto ai LDGC e LB dell'immunocompetente (7/54; 12.9%). Anche il gene $V_{K1-39/1D-39}$ è particolarmente frequente negli AIDS-LDGC (4/11; 36.3%) rispetto ai LDGC dell'immunocompetente (3/28; 10.7%) e alle cellule B normali (10.6%)¹⁷.

Nei casi con un riarrangiamento V_λ , le famiglie più frequenti risultano essere $V_{\lambda 1}$ e $V_{\lambda 3}$ (8/22; 36.4%) seguite da $V_{\lambda 2}$ (3/22; 13.6%). E' stato osservato negli AIDS-LNH un utilizzo preferenziale della famiglia $V_{\lambda 9}$ (2/22; 9.1%) rispetto alle cellule B normali (0.58%; $p < 0.01$)¹⁸. Il gene riarrangiato con maggiore frequenza è $V_{\lambda 1-44}$ (4/22; 18.2%) seguito da $V_{\lambda 1-47}$ (3/22; 13.64%).

Analisi della regione CDR3 dei geni IgV nei AIDS-LNH

In base ai criteri adottati (vedi Materiali e Metodi) è stato possibile assegnare una famiglia D in 41/61 (67.2%) riarrangiamenti “in-frame”. La distribuzione delle famiglie D nel pannello di AIDS-LNH riflette quella osservata nelle cellule B normali e nei LNH aggressivi dell’immunocompetente. In particolare la famiglia D più frequentemente riarrangiata è la famiglia D3 (18/41; 43.9%) seguita dalla famiglia D2 (12/41; 29.3%) e dalla famiglia D6 (4/41; 14.6%). Quando si esamina la distribuzione dei singoli frammenti D, il segmento più frequentemente riarrangiato risulta essere il D2-2 (7/40; 17.5%), seguito dal D3-10 (6/40; 15%) e dal D3-16 (5/40; 12.5%). L’utilizzo del segmento D2-2 risulta essere significativamente alto nei AIDS-LNH rispetto alle cellule B normali (3.87%, $p < 0.01$), ed è positivamente selezionato nei AIDS-LDGC e AIDS-LB (6/31; 19.3%; $p < 0.04$) rispetto ai LDGC e LB dell’immunocompetente (3/68; 4.41%). L’analisi della distribuzione dei segmenti D all’interno del pannello studiato evidenzia che particolari frammenti D si associano a specifiche categorie di AIDS-LNH e che esistono riarrangiamenti preferenziali di frammenti D con specifici geni V_H . In particolare 4/6 (66.6%) segmenti D3-10 sono riarrangiati dai AIDS-LPSNC ($p < 0.01$), mentre 4/5 segmenti D3-16 sono preferenzialmente riarrangiati con il gene $VH4-34$. L’associazione del gene $VH4-34$ con il frammento D3-16 (4/13; 30.8%) è selettivo per gli AIDS-LNH mentre è assente nei LDGC e LB dell’immunocompetente (0/14, $p = 0.03$).

L’utilizzo delle famiglie J_H nei AIDS-LNH è del tutto sovrapponibile a quello osservato nelle cellule B normali e nell’immunocompetente. In particolare, la famiglia J_H più frequentemente riarrangiata è la J_H4 (23/61; 37.7%), seguita da J_H6 (17/61; 27.9%) e da J_H3 (8/61; 13.1%). La distribuzione delle famiglie J_H è significativamente diversa tra i casi mutati e i casi non mutati all’interno del pannello. Infatti si identifica un utilizzo virtualmente esclusivo della famiglia J_H6 nei casi non mutati vs i casi mutati (7/9; 77.7% vs 10/52; 19.23%; $p < 0.002$).

L’uso dei segmenti J_K in AIDS-NHL riflette la rappresentazione osservata nelle cellule B normali ¹⁷, e nell’immunocompetente, mentre è stata evidenziata una selezione positiva e negativa

riguardo specifici frammenti J_λ . In particolare, la famiglia $J_{\lambda 2/3}$ risulta essere positivamente selezionata nei AIDS-LNH (20/22; 90.9%) rispetto alle cellule B normali (39%; $p < 0.02$); al contrario, la famiglia $J_{\lambda 7}$ risulta essere negativamente selezionata rispetto alle cellule B normali (54.1%; $p < 0.02$)¹⁸.

La lunghezza media del CDR3 nei AIDS-LNH è di 13.2 aa. La lunghezza più breve è stata riscontrata nei AIDS-LB (11.3aa), mentre la più lunga è stata osservata nei AIDS-PBL (15.5aa). L'analisi aminoacidica del CDR3 ha messo in evidenza che 2 casi (1 AIDS-LDGC e 1 AIDS-PBL) presentano una sequenza aminoacidica altamente omologa: entrambi i casi riarrangiano lo stesso frammento D (D3-16) e lo stesso gene J (J_H5b). Entrambi i casi riarrangiano un gene V_λ .

Analisi del profilo mutazionale dei geni IgV negli AIDS-LNH

L'analisi mutazionale ha messo in evidenza che 60/67 (89.5%) dei AIDS-LNH risulta essere mutata nei geni IgV. La frequenza media di mutazione per i geni V_H è 9.36% (mediana 7.35%, range 2.04-23.04%), per i geni V_L la frequenza media è del 5.45% (mediana 4.06%, range 2.1-13%). Analizzando i singoli gruppi clinico-patologici di AIDS-LNH, i casi non mutati sono significativamente rappresentati da AIDS-PBL (6/10; 60%; $p < 0.0001$), mentre tra i casi mutati, il profilo mutazionale risulta essere comparabile nelle diverse categorie di AIDS-LNH.

L'analisi della distribuzione delle mutazioni “replacement” (R) e “silent” (S) nei geni V_H e V_L è stata eseguita al fine di determinare la pressione dell'antigene sulla selezione delle cellule tumorali. Sono stati utilizzati due modelli statistici: la distribuzione binomiale di Chang-Casali e la distribuzione multinomiale. I risultati ottenuti sono sovrapponibili per tutti esclusi 6 casi analizzati.

L'analisi combinata delle sequenze V_H e V_L ha evidenziato la tendenza a mantenere le sequenze delle regioni FR in 41/54 (75.9%) AIDS-LNH, inclusi 18/26 (69.2%) AIDS-LDGC, 14/17 (82.3%) AIDS-LB, 7/7 (100%) AIDS-PEL e 2/4 (50%) AIDS-PBL. Un numero significativamente più alto di mutazioni R nel CDR, che suggerisce una selezione dovuta all'affinità verso l'antigene, è

stato osservato in 24/54 (44.4%) casi inclusi 7/26 (7.92%) AIDS-LDGC, 11/17 (64.7%) AIDS-BL, 4/7 (57.1%) AIDS-PEL e 1/4 (25%) AIDS-PBL.

Analisi dell'eterogeneità intraclonale dei geni V_H nei AIDS-LNH

L'analisi delle mutazioni "ongoing" nei AIDS-LNH è stata eseguita clonando 15 riarrangiamenti V_H clonali derivati da 4 AIDS-LB, 7 AIDS-LDGC e 4 AIDS-LPSNC. In tutti i casi la sequenza V_H è stata precedentemente stabilita sequenziando il frammento PCR ottenuto ed è stata dimostrata essere somaticamente mutata. In 12/15 (80%) AIDS-LNH la sequenza clonale V_H non ha mostrato eterogeneità intraclonale indicando l'assenza di mutazioni "ongoing". Una evidente attività "ongoing" è stata riscontrata in 1/7 AIDS-LDGC e 1/4 AIDS-LB, mentre una ridotta attività "ongoing" è stata riscontrata in 1/4 AIDS-LPSNC.

Discussione

L'analisi mutazionale svolta sui geni IgV ha messo in evidenza che la maggioranza dei AIDS-LNH deriva da cellule B che hanno subito la reazione CG. L'unico sottogruppo che sembra distinguersi da questa ipotesi sono i AIDS-PBL. Infatti, questo gruppo presenta un fenotipo tipicamente post-CG (BCL-6⁻/MUM-1⁺/CD138⁺) ma, nella maggioranza dei casi, presenta IgV germinali. Questi dati potrebbero suggerire un'origine del clone neoplastico da cellule B che hanno raggiunto uno stadio differenziativo avanzato indipendente dalla reazione CG ¹⁹.

I dati molecolari ottenuti sui geni IgV suggeriscono che l'espansione del clone tumorale nei AIDS-LNH potrebbe essere guidata da un antigene o favorita da un superantigene.

La presenza di ipermutazione somatica e il significativo "clustering" di mutazioni S nelle regioni FR nella maggioranza dei AIDS-NHL e di mutazioni R nelle regioni CDR in una frazione di casi infatti, indica che l'espansione clonale potrebbe essere guidata da antigeni convenzionali. Tuttavia, l'analisi svolta sullo studio dei geni IgV ha messo in evidenza un utilizzo preferenziale di particolari geni V_H (VH4-34) e V_L (VK4-1) in una frazione di AIDS-LNH suggerendo quindi una

stimolazione del clone B pre-neoplastico dovuta ad un superantigene con attività autoreattiva e/o polireattiva ²⁰. I candidati come probabili antigeni/superantigeni implicati nella patogenesi dei AIDS-NHL non sono ancora stati identificati.

Alcuni fenomeni autoimmuni sono collegati allo sviluppo di neoplasie B ²¹. Tuttavia non è chiaro se questi fenomeni abbiano origine dalle cellule neoplastiche o dalle rimanenti cellule B ^{22,23}. In entrambi i casi, l'autoimmunità può svilupparsi insieme al tumore o seguirne lo sviluppo oppure può diventare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie linfoidi B ²⁴.

In letteratura VH4-34 e VK4-1 sono associati all'anemia emolitica autoimmune dove il recettore B codificato dai due geni riconosce autoantigeni ^{25,26}. Si può quindi ipotizzare che, nella patogenesi di una parte di AIDS-NHL, possa essere coinvolto anche un autoantigene. Infine, in contrasto con i LNH dell'immunocompetente, la bassa frequenza di attività intraclonale riscontrata nei AIDS-LNH suggerisce che la maggior parte di questi linfomi deriva da cellule B che hanno concluso la reazione CG.

Prospettive future

La caratterizzazione dell'ipermutazione somatica nelle neoplasie linfoidi B sarà proseguita nel prossimo anno di dottorato approfondendo i seguenti punti:

- 1) analisi della ipermutazione somatica ed aberrante in altre categorie di neoplasie linfoidi B
- 2) analisi della eterogeneità intraclonale della ipermutazione somatica e aberrante e definizione della natura "ongoing" delle mutazioni
- 3) identificazione di possibili marcatori molecolari nella patogenesi delle neoplasie linfoidi B

Bibliografia

1. Knowles DM. *Molecular pathology of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma*. Semin Diagn Pathol. 1997 Feb;14(1):67-82. Review.
2. Bonnet F, Lewden C, May T, Heripret L, Jouglu E, Bevilacqua S, Costagliola D, Salmon D, Chene G, Morlat P. *Malignancy-related causes of death in human immunodeficiency virus-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy*. Cancer. 2004 Jul 15;101(2):317-24.
3. Dalla Favera R., Gaidano G., *Cancer, Principles e Practice of Oncology* Lippincott Williams & Wilkins (2001)
4. Jaffe E.S., Harris N.L, Stein H., Vardiman J.V. eds. *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press (2001)
5. Tirelli U., Spina M., Gaidano G., Vaccher E., Franceschi S., Carbone A. *Epidemiological, biological and clinical features of HIV-related lymphomas in the era of highly active antiretroviral therapy*. AIDS 2000;14: 1675-1688
6. Ballerini P., Gaidano G., Gong J.Z., et al. *Multiple genetic lesions in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma*. Blood 81: 166-176 (1993)
7. Blaxhult A, Kirk O, Pedersen C, Dietrich M, Barton SE, Gatell JM, Mulcahy F, Hirschel B, Mocroft A, Lundgren JD. *Regional differences in presentation of AIDS in Europe*. Epidemiol Infect. 2000 Aug;125(1):143-51.
8. Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, Warnke R, Vose JM, Greiner TC, Levy R. *Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas*. Blood 2000 Mar 1;95(5):1797-803
9. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, Staudt LM, Levy R. *Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B-cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas*. PNAS 2000 vol 97 no. 18 10209-102013

10. Capello D, Guarini A, Berra E, Mauro FR, Rossi D, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G. *Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia* 2004 (in press)
11. Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J. *Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120*. *Science*. 1993 Sep 17;261(5128):1588-91.
12. Klein U, Küppers R, Rajewsky K. *Variable gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child. Somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age*. *J Exp Med* 1994; 180: 1383-1393.
13. Capello D, Cerri M, Muti G, Berra E, Oreste P, Deambrogi C, Rossi D, Dotti G, Conconi A, Viganò M, Magrini U, Ippoliti G, Morra E, Gloghini A, Rambaldi A, Paulli M, Carbone A, Gaidano G. *Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders*. *Blood* 2003;102: 3775-3785
14. Chang B, Casali P. *The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgVH genes are inherently susceptible to amino acid replacement*. *Immunol Today*. 1994;15:367-373.
15. Lossos IS, Tibshirani N, Narasimhan B, et al. *The inference of antigen selection on Ig genes*. *J Immunol*. 2000;165:5122-5126
16. Brezinschek H-P, Foster SJ, Brezinschek RI, Dörner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. *Analysis of the human VH gene repertoire*. *J Clin Invest* 1997; 99: 2488-2501.
17. Foster SJ, Brezinschek H-P, Brezinschek RI, Lipsky PE. *Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells*. *J Clin Invest* 1997; 99: 1614-1627.
18. Farner NL, Dörner T, Lipsky PE. *Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V_λJ_λ repertoire*. *J Immunol* 1999; 162: 2137-2145.
19. Gaidano G, Cerri M, Capello D, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Larocca LM, Campo E, Gloghini A, Tirelli U, Carbone A. *Molecular histogenesis of plasmablastic lymphoma of the oral cavity*. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(3):622-8.
20. Silverman GJ, Nayak JV, La Cava A. *B-cell superantigens: molecular and cellular*

implications. Int Rev Immunol. 1997;14:259-290

21. Ruzickova S, Pruss A, Odendahl M, Wolbart K, Burmester GR, Scholze J, Dörner T, Hansen A. *Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin light-chain diversity in VH4-34 expressing single leukemic B cells*. Blood 2002 100(9); 3419-3422
22. Sthoeger ZM, Sthoeger D, Shtalrid M, Sigler E, Geltner D, Berrebi A. *Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia*. Am J Hematol. 1993;43:252-264
23. Ishida F, Saito H, Kitano K, Kiyosawa K. *Cold agglutinin disease by autoanti-i blood type antibody associated with B cell chronic lymphocytic leukemia*. Int J Hematol. 1998;67:69-73
24. Bahler DW, Swerdlow SH. *Clonal salivary gland infiltrates associated with myoepithelial sialadenitis (Sjögren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansion*. Blood 1998;91:1864-1872.
25. Leo A, Kreft H, Hack H, Kempf T, Roelcke D. *Restriction in the repertoire of the immunoglobulin light chain subgroup in pathological cold agglutinins with anti-Pr specificity*. Vox sanguinis 2004;86:141-147
26. Mockridge CI, Chapman CJ, Spellerberg MB, Sheth B, Fleming TP, Isenberg DA, Stevenson FK. *Sequence analysis of VH4-34 encoded antibodies from single B cells of two patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. Clin Exp Immunol. 1998;114:129-136

ATTIVITA' FORMATIVA

Anno 2003-2004

CORSI e SEMINARI SEGUITI DURANTE L'ANNO

- “Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy” **Prof. Magnus Ingelman-Sundberg** (Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet Stoccolma), (30 Gennaio 2004)

- “Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative” **Dott.sa Rita Clementi** (Università di Pavia), (3 Febbraio 2004)

- “TNF, anti-TNF ed autoimmunità” **Prof. Guido Valesini** (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza, Roma), (10 Marzo 2004)

- “Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes” **Frédéric Rieux-Laucat**, INSERM 429, Hôpital Necker, Paris (3 Maggio 2004)

- “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico” **Prof. Angiolo Benedetti**, Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Siena (28 Maggio 2004)

- “Virus e malattie autoimmuni” **Antonio Puccetti**, Università degli Studi di Genova (11 Giugno 2004)

- “Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems” **Prof. David Murphy**, The Sir Henry Wellcome Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology, University of Bristol (13 Giugno 2004)

- “Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity” **Prof. David Murphy**, The Sir Henry Wellcome Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology, University of Bristol (14 Giugno 2004)

- “Pitfalls of genetic studies in liver disease” **Prof. Christopher Day**, Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK (14 Giugno 2004)

- “pi3-kinase controls cardiac contractility and hypertrophy through kinase-dependent and independent functions” **Prof. Emilio Hirsch** (Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Torino), (29 Giugno 2004)

- “Meccanismi patogenetici della leucemia linfatica cronica” **Prof. Manlio Ferrarini**, IST e Università di Genova (30 Giugno 2004)

- “From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions” **Prof. Armando Bartolazzi**, Dipartimento di Patologia, Facoltà di medicina, Ospedale St. Andrea, Università La Sapienza, Roma (5 Luglio 2004)

PUBBLICAZIONI

Capello D, **Berra E**, Cerri M, Gaidano G.

POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. MOLECULAR ANALYSIS OF HISTOGENESIS AND PATHOGENESIS

Minerva Medica 95:53-64, 2004

Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M, Carbone A, Gaidano G. Additional authors: Deambrogi C, **Berra E**, Cerri M, Conconi A, Vendramin C, Gutierrez M, Botto B.

ABERRANT PROMOTER METHYLATION OF MULTIPLE GENES THROUGHOUT THE CLINICO-PATHOLOGIC SPECTRUM OF B-CELL NEOPLASIA

Haematologica 89:154-164, 2004

Cerri M, Capello D, Muti G, Rambaldi A, Paulli M, Gloghini A, **Berra E**, Deambrogi C, Rossi D, Morra E, Pasqualucci L, Carbone A, Gaidano G.

ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION OF PROTO-ONCOGENES IN POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

Br J Haematol in corso di stampa 2004

Capello D, Guarini A, **Berra E**, Mauro FR, Rossi D, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G.

EVIDENCE OF BIASED IMMUNOGLOBULIN VARIABLE GENE USAGE IN HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Leukemia in corso di stampa 2004

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI NAZIONALI:

XLV Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Bergamo 9-12 Novembre 2003

ABERRANT HYPERMUTATION OF MULTIPLE PROTO-ONCOGENES DURING THE TRANSFORMATION OF FOLLICULAR LYMPHOMA INTO DIFFUSE LARGE CELL LYMPHOMA

Berra E, Deambrogi C, Capello D, Rossi D, Pasqualucci L, Cerri M, Matolcsy A, Paulli M., Dalla-Favera R, Gaidano G.

MOLECULAR PATHOGENESIS AND HISTOGENESIS OF POSTTRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDER

Cerri M, Capello D, Muti G, **Berra E**, Oreste P, Deambrogi C, Rossi D, Dotti G, Conconi A, Viganò M, Magrini U, Ippoliti G, Morra E, Gloghini A, Rambaldi A, Paulli M, Carbone A, Gaidano G.

VIII Congresso della Società Italiana di Ematologia Sperimentale, Pavia, 14-16 Settembre 2004

EVIDENCE OF BIASED USAGE OF IMMUNOGLOBULIN VARIABLE GENES IN AIDS-

RELATED NON-HODGKIN'S LYMPHOMA: IMPLICATION FOR THE

PATHOGENESIS OF THE DISEASE

Berra E, Cerri M, Gloghini A, Deambrogi C, Rossi D, Franceschetti S, Larocca LM, Carbone A, Gaidano G, Capello D.

PHYSIOLOGICAL AND ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION MECHANISM IN PRIMARY BREAST LYMPHOMA: CLUES FOR THE HISTOGENESIS AND PATHOGENESIS OF THE DISEASE

Berra E, Marino M, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Rossi D, Franceschetti S, Vendramin C, Gloghini A, Carbone A, Gaidano G.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI INTERNAZIONALI:

45th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego Convention Center (CA, USA), 4-10 Dicembre 2003

SUBSET OF HIGHLY STABLE B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (B-CLL) DISPLAY A BIASED USAGE OF VH3-72 AND IgVK GENES: IMPLICATIONS FOR ANTIGEN RECOGNITION IN LEUKEMOGENESIS.

Capello D, Guarini A, Rossi D, **Berra E**, Mauro FR, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G.

ABERRANT SOMATIC HYPERMUTATION IS INVOLVED IN THE MOLECULAR PATHOGENESIS OF POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

Rossi D, Cerri M, Capello D, **Berra E**, Muti G, Rambaldi A, Paulli M, Gaidano G.