



Valore Prognostico e Predittivo dell'Analisi Molecolare nella Leucemia Linfatica Cronica (LLC)

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

A cura di: Lisa Bonello, Paola Francia di Celle

Coordinatori: Francia di Celle Paola, Venesio Tiziana

Partecipanti:

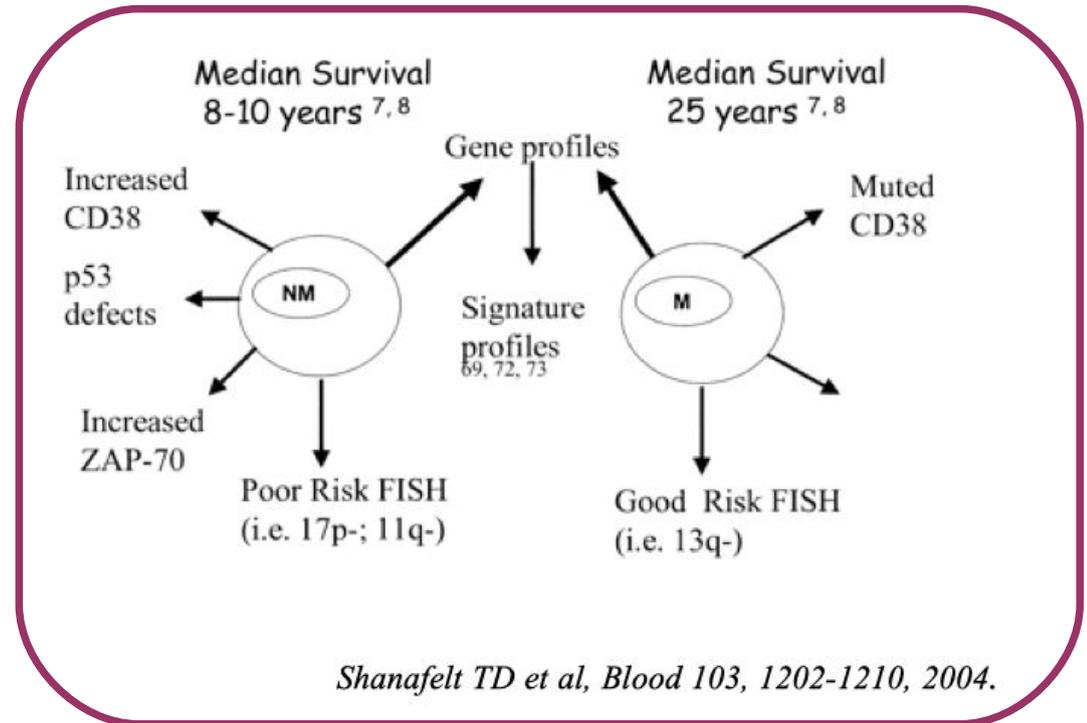
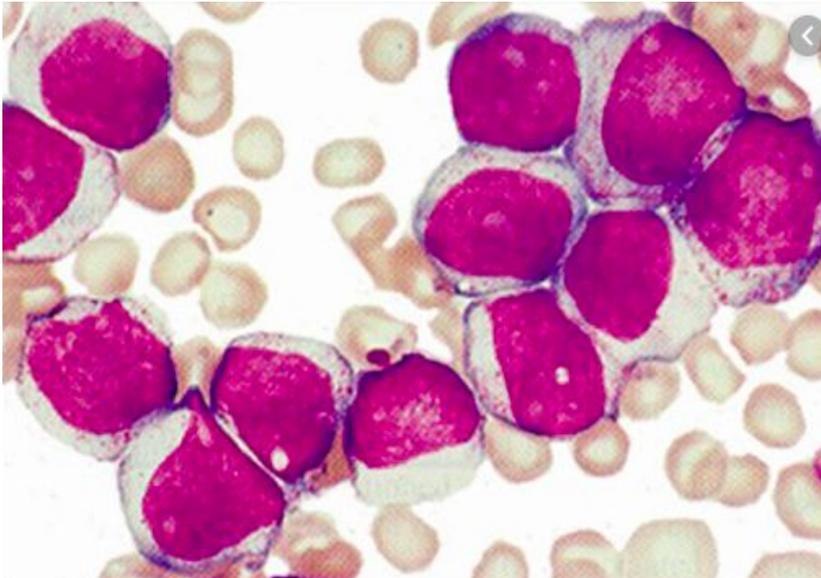
Cappia Susanna, Casorzo Laura, Di Benedetto Massimo, Falcone Patrizia Agnese, Giugliano Emilia, Giustetto Doriana, Maffè Antonella, Mariani Sara, Orecchia Sara, Pegoraro Fabiola, Rapa Ida, Saponaro Sara, Scaravaglio Patrizia, Scatolini Maria, Schillaci Francesca, Trisolini Elena, Veggiani Claudia, Verdun Di Cantogno Ludovica

VALORE PROGNOSTICO e PREDITTIVO dell'ANALISI MOLECOLARE nella LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (LLC)

Dr.ssa Lisa Bonello

Dr.ssa Paola Francia di Celle

Documento condiviso dal Gruppo di Patologia Molecolare – 3 ottobre 2019



Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute
Università degli Studi di Torino

Laboratorio di Patologia Molecolare
SC Anatomia e Istologia Patologica 1U
AOU Città della Salute e della Scienza di Torino



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TORINO



Le ANALISI MOLECOLARI per l'inquadramento della PROGNOSI nella LLC

La rilevanza degli studi molecolari nella gestione clinica della Leucemia Linfatica Cronica a cellule B (**LLC-B**) è supportata da una consistente letteratura che a partire dagli anni '90 ha approfondito il ruolo biologico del recettore delle Immunoglobuline (**Ig**) e della sua stimolazione da parte dell'antigene in correlazione con lo sviluppo della malattia.

Sappiamo oggi che nella LLC il clone neoplastico perfeziona la sua risposta attraverso un riarrangiamento clonotipico e successivamente può andare incontro a mutazioni ipersomatiche (**SHM**) in grado di rendere altamente specifica la risposta. Si delineano di conseguenza due tipologie di pazienti con LLC, mutati (**M**) e non-mutati (**UM**), che dal punto di vista clinico possono avere decorso clinico favorevole (i primi) o decisamente aggressivo (i secondi).

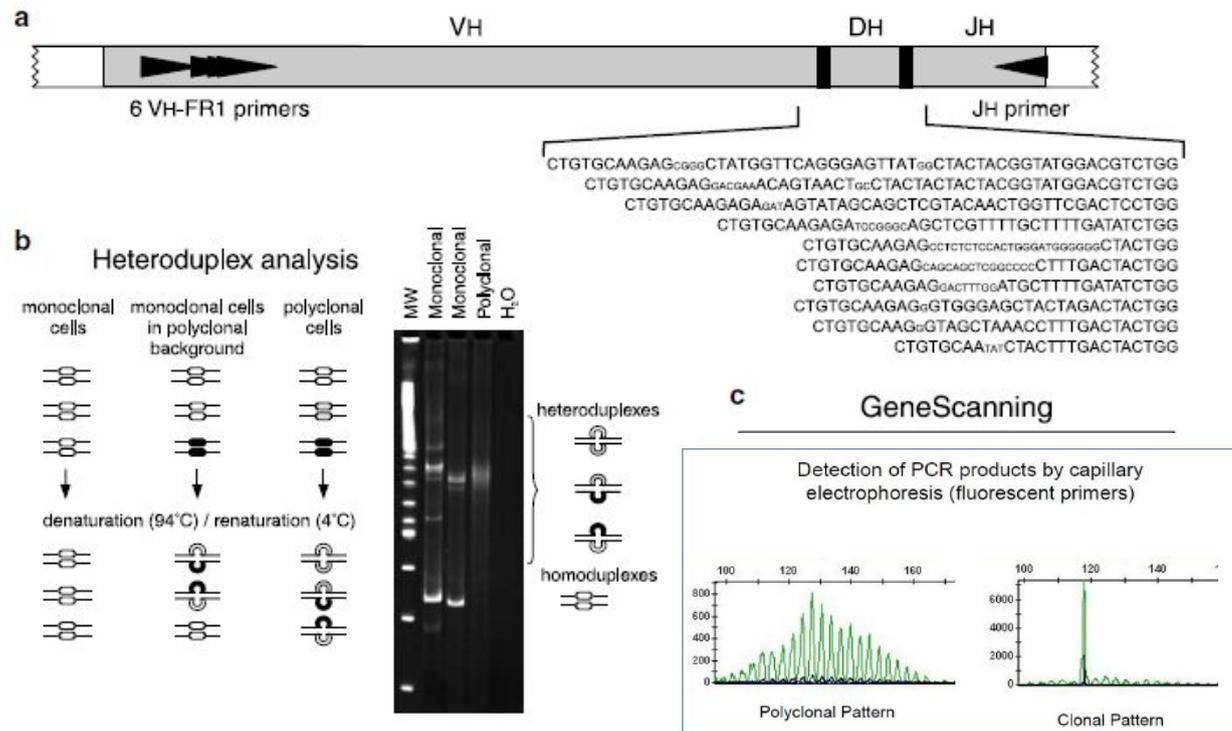
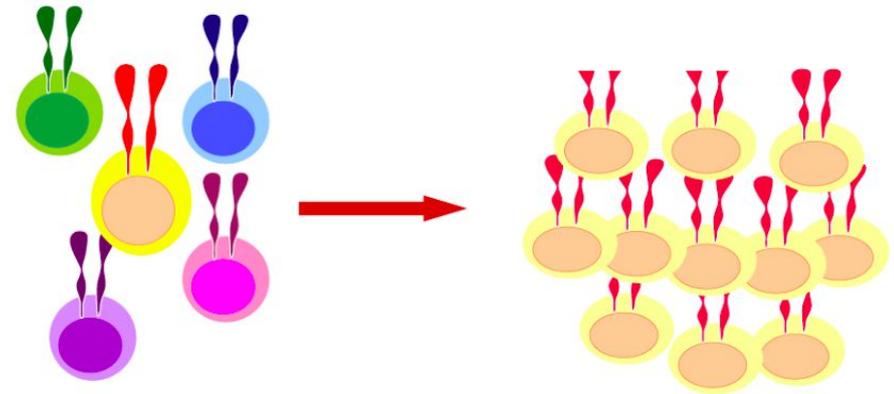
Alla dicotomia LLC M vs UM si aggiunge l'evidenza, raggiunta attraverso il sequenziamento dei geni Ig riarrangiati in un numero enorme di casi LLC, di particolari subset di riarrangiamento VDJ chiamati **Stereotipi**, anch'essi associabili a differenze di patogenesi e decorso della malattia. La profondità degli studi molecolari condotti fino ad oggi nella LLC permette anche di stabilire un diverso comportamento clinico in categorie di pazienti M e UM con particolari Stereotype già stratificati per alterazioni citogenetiche quali la delezione 17p e/o 11q.

In questo scenario il laboratorio di Patologia Molecolare si muove nello sviluppo e nella standardizzazione di analisi che forniscano un dato completo nella diagnosi di LLC anche indipendentemente dalla necessità clinica di trattamento. L'ematologo curante deve poter disporre di tutte le informazioni ad oggi validate con valore prognostico che completino una diagnosi basata su immunofenotipo e morfologia. Il riarrangiamento clonale Ig nella LLC, a differenza di altri marcatori, rimane stabile nel tempo e rappresenta nella sua completezza di analisi (IgVH, SHM e Stereotipi) un approfondimento molecolare al momento della diagnosi del quale tutti i pazienti idealmente sono meritevoli.

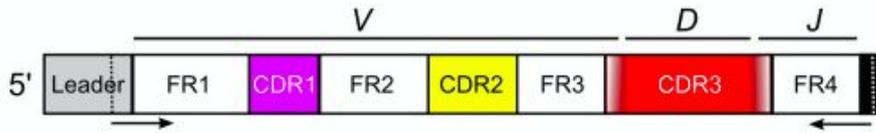
Il punto di partenza per le ANALISI MOLECOLARI nella LLC resta lo studio dei RIARRANGIAMENTI dei GENI LINFOCITARI

Poiché ogni linfocita riarrangia i geni delle Ig/TcR in modo del tutto individuale, il riarrangiamento rappresenta il **marcatore specifico** della singola cellula linfoide.

L'identificazione di un'unica sequenza Ig/TcR riarrangiata in una popolazione B/T-linfoide è la testimonianza che il clone neoplastico deriva da un'unica cellula capostipite ed è pertanto **monoclonale**.



II SEQUENZIAMENTO del RIARRANGIAMENTO CLONALE consente di valutare lo STATO MUTAZIONALE delle REGIONI VARIABILI delle CATENE PESANTI delle IMMUNOGLOBULINE (IgHV)



Sangue, agoaspirati, biopsie, FFPE



Estrazione DNA/RNA



Multiplex-PCR regione FR1L-JH



Sequenziamento diretto

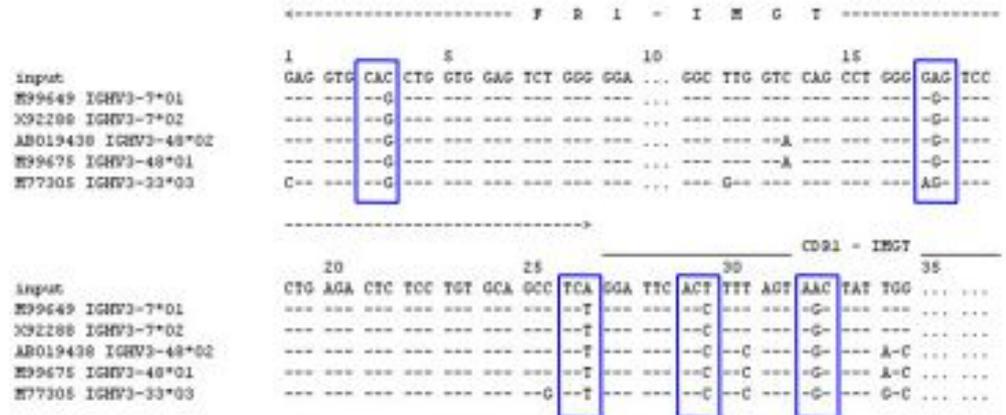


Corsa su elettroforetica su sequenziatore



Analisi riarrangiamento IgHV-IgHD-IgHJ

Alignment with [FR-IMGT](#) and [CDR-IMGT](#) delimitations



Allineamento delle regioni IgHV a sequenze germ-line con maggiore omologia di sequenza per la corretta identificazione delle mutazioni somatiche e calcolo della % di mutazioni:

$$\text{Stato mutazionale IgHV (\%)} = \frac{\text{n mutazioni}}{\text{n nt regione IgHV allineata}} \times 100$$

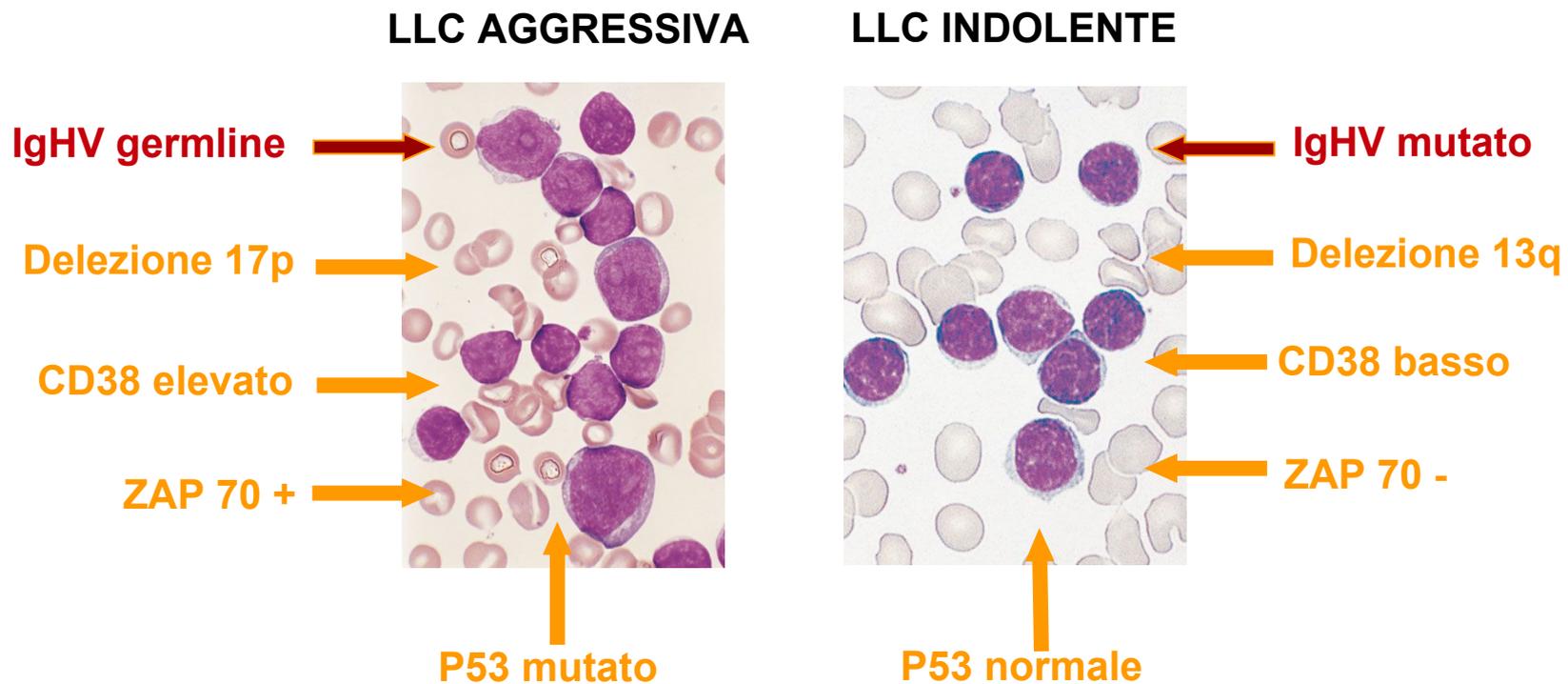
http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest

<2% di differenze rispetto alla sequenza IgHV germ-line più simile: **non Mutato (UM)**

>2% di differenze rispetto alla sequenza IgHV germ-line più simile: **Mutato (M)**

2-3% di differenze rispetto alla sequenza IgHV germ-line più simile: **Bordeline**

SIGNIFICATO PROGNOSTICO dello STATO MUTAZIONALE di IgHV nella LLC



IgHV-Mutated CLL (~ 60%)

La cellula neoplastica origina in fase maturativa Ag dipendente nel Centro Germinativo (post-CG)

Basso rischio di lesioni genetiche e evoluzione clonale

IgHV-Unmutated CLL (~40%)

La cellula neoplastica origina in una fase di maturazione linfocitaria

Ag indipendente (pre-CG)

Elevata predisposizione a lesioni genetiche e evoluzione clonale

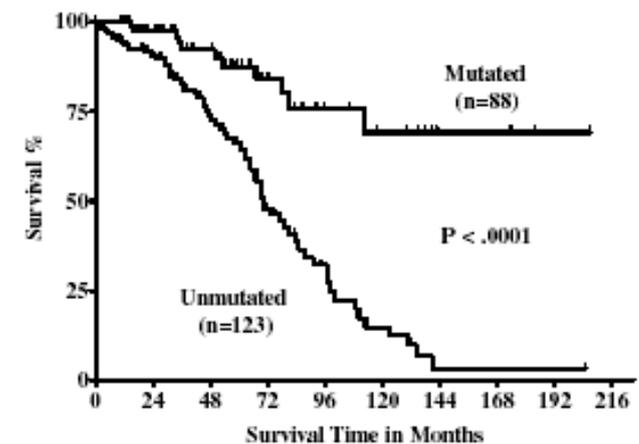


Figure 1. Prognostic significance of the IgV mutation status in 211 chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients.

II SEQUENZIAMENTO del RIARRANGIAMENTO IgH consente anche definire lo STEREOTIPO del CLONE CLL

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence: (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV4-34*01 F	score = 1267	identity = 94.04% (268/285 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ6*02 F	score = 246	identity = 90.00% (54/60 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD3-22*01 F	D-REGION is in reading frame 2	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.10]	[8.7.17]	CARGHAWTDTYYYYFALDWW

Identificazione del riarrangiamento IgHV-IGHD-IGHJ

#1	IGHV1/5/7 IGHD6-19 IGHJ4 CDR3 13 aa U-CLL	AR. [NQ]W[AVLI] FD.
#2	IGHV3-21 no IGHD identified IGHJ6 CDR3 9 aa M-CLL/U-CLL	[AVLI] . [DE] M[DE] .
#4	IGHV4-34 IGHD5-18 IGHJ5 CDR3 20 aa M-CLL	[AVLI]RG [KRH]RYYYYG. [DE] .
#8	IGHV4-39 IGHD6-13 IGHJ5 CDR3 19 aa U-CLL	A YSSSW NWFDP

Major stereotyped BcR subsets in CLL

- ✓ >30% di casi di LLC mostra elevata omologia di sequenza a livello della giunzione IGHV-IGHD-IGHJ (CDR3) dovuta al riconoscimento di antigeni comuni
- ✓ Suddivisi in 19 categorie di CDR3 con simili caratteristiche cliniche e biologiche
- ✓ Subset #2/IgHV3-21 (~3% dei geni IgHV nelle LLC) è un fattore prognostico sfavorevole, indipendentemente dallo stato mutazionale di IgHV
 - La prognosi nei casi non-subset #2/IgHV3-21 è uguale ai casi con mutazioni somatiche simili
- ✓ Subset #8/IgHV4-39 ha un rischio 17 volte maggiore di trasformazione a Sindrome di Richter

Il ruolo di ERIC nell'analisi mutazionale di IgH

Nel corso degli anni in cui la ricerca ha portato avanti gli studi biologici che sono stati la base dell'integrazione delle analisi molecolari nella gestione clinica della LLC, sono state anche definite le Linee Guida per i laboratori attivi nel settore.

Il Gruppo European Research Initiative on CLL (ERIC) ha pubblicato le prime Raccomandazioni nel 2007* riguardanti le metodiche di sequenziamento da utilizzare per la caratterizzazione dello stato mutazionale (ancora in gran parte artigianali), i criteri di interpretazione delle analisi e le indicazioni per la refertazione.

1. L'impegno di ERIC è volto in parte ad armonizzare le attività del Network attraverso:

1) un forte supporto ai laboratori sia nello sviluppo delle metodologie che nelle criticità dell'interpretazione;

2) l'organizzazione di workshop educazionali;

3) l'attivazione di programmi di verifica di qualità esterna (VEQ) che permetta ai laboratori partecipanti di disporre di una specifica certificazione;

4) l'ottimizzazione della comunicazione tra clinica e laboratorio.

Ad oggi esistono in Italia 18 laboratori certificati ERIC per lo studio mutazionale di IgH: in Piemonte i laboratori certificati sono il Lab. Patologia Molecolare Città della Salute e della Scienza (Torino) e il Lab. di Ematologia dell'Università del Piemonte Orientale (Novara).

*ERIC recommendations for IGHV gene mutational analysis in CLL (Ghia, Leukemia 2007)

ERIC recommendations for IGHV gene mutational analysis in CLL for problematic cases (Langerak, Leukemia 2011)

Immunoglobulin Gene Sequence Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia: Updated ERIC recommendations (Rosenquist, Leukemia 2017)

ANALISI MOLECOLARI a SCOPO PREDITTIVO nella LLC

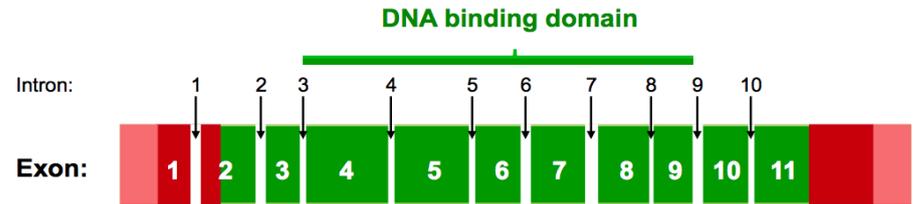
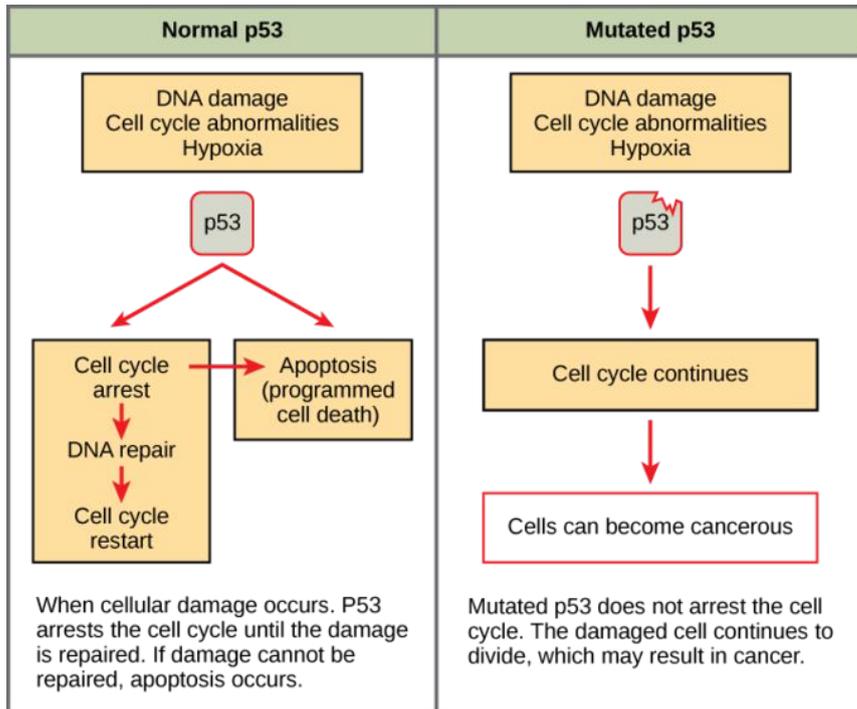
Pazienti con LLC asintomatici, in stadio iniziale o intermedio che non presentano adenopatie massive, indipendentemente dalla presenza alla diagnosi di uno o più fattori di rischio biologico, in linea generale non vengono trattati. Tuttavia nel momento della scelta terapeutica il processo decisionale tiene conto dell'età e delle condizioni cliniche generali del paziente ma anche delle caratteristiche biologiche della sua malattia.

E' noto come la delezione del braccio corto del cromosoma 17 (del17p) si associ ad un'elevata resistenza alla chemioterapia anche associata all'immunoterapia (anti CD20). L'80% di questi casi presenta mutazioni del gene TP53 ed esistono pazienti con FISH negativa al 17 con mutazioni di TP53. Entrambe le alterazioni genetiche si riscontrano in una categoria di pazienti ad altissimo rischio con sopravvivenza mediana inferiore a 24 mesi.

Lo sviluppo di nuove terapie target rivolte verso le BTK (Ibrutinib) o PIK3delta (Idelalisib) sono risultate molto efficaci anche nel controllo della LLC interferendo nella via del segnale mediata dal B Cell Receptor. Questi inibitori inducono l'uscita delle cellule leucemiche dagli organi linfatici secondari e migliorano significativamente il decorso clinico dei pazienti soprattutto nei casi che dal punto di vista biologico sono refrattari alla terapia convenzionale (VH UM, TP53/17p alterati).

Anche per l'analisi mutazionale per TP53 nella LLC i laboratori si sono nel tempo organizzati per fornire un dato immediatamente fruibile nella clinica a completamento dell'indagine FISH per le anomalie dei cromosomi 11, 13 e 17. Il test ancora prevalentemente basato su sequenziamento classico (Sanger) viene eseguito su richiesta dell'ematologo curante e a differenza dello stato mutazionale può variare e quindi essere ripetuto nel tempo per orientare la decisione terapeutica.

TP53: funzioni, struttura e analisi mutazionale



Il gene TP53 è formato da 11 esoni, un mRNA di 2586nt e da una proteina di 393aa codificata a partire dall'esone 2

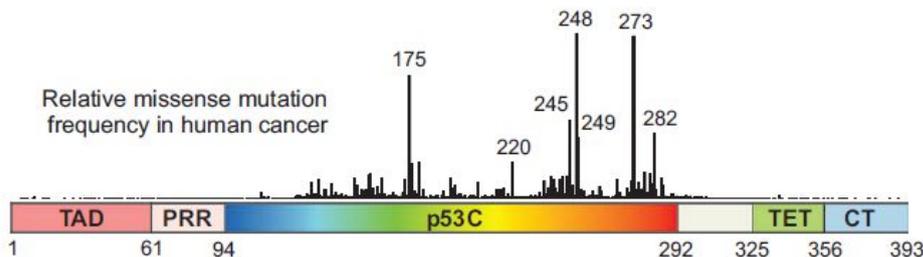
Materiali: sangue, agoaspirati, prelievi biotici, FFPE

Metodica: PCR su DNA per gli esoni 2-11 (almeno 4-9) + sequenziamento Sanger

Analisi dei dati: allineamento con sequenze *wild type* mediante utilizzo di software per l'identificazione di varianti (Mutation Surveyor, SnapGene)

Conferma: 2a PCR indipendente

Sensibilità: ~10% (almeno 50% cellule tumorali)

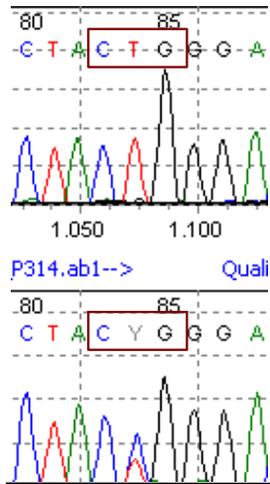


Hot spots e frequenza relativa delle principali mutazioni di TP53 nei tumori umani (Joerger et al, Ann Rev Biochem 2008)

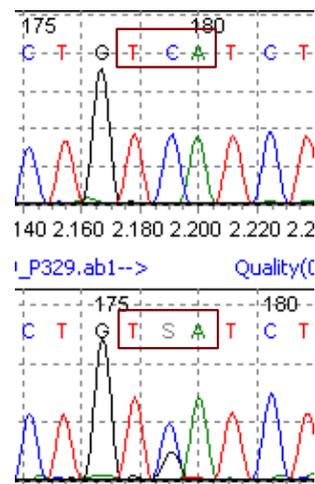
ERIC Recommendations on TP53 mutation analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia.

S. Pospisilova, et al.: on behalf of the European Research Initiative on CLL (ERIC). *Leukemia*, 2012

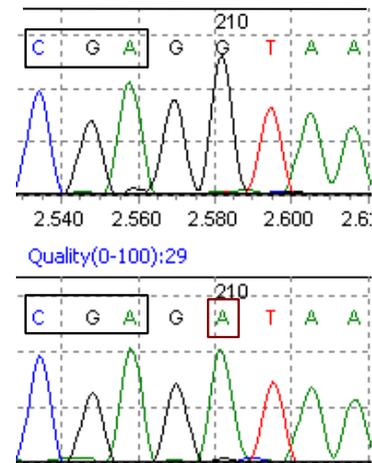
Analisi mutazionale di TP53: esempi di mutazioni e loro catalogazione su IARC TP53 database



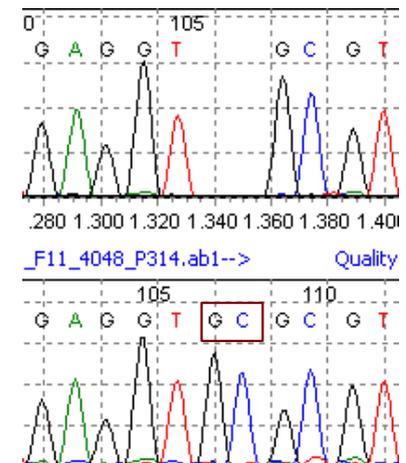
c.974C>T, p.L265P
missense ex 8



c.281C>G, p.S94*
stop codon ex 4



c.919+1G>A, p.?
splice site int 8



c.816_817insGC, p.?
frameshift ex 6

<input type="checkbox"/>	cDNA description	Protein description	Exon number	Effect	TA Class	SIFTclass	Somatic count	Germline count	CellLine count	Validated SNP	SNP link
<input checked="" type="checkbox"/>	c.830G>T	p.C277F	8-exon	missense	non-functional	deleterious	54	0	5	no	763098116

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs763098116

**** With Likely pathogenic allele ****

<input type="checkbox"/>	cDNA description	Protein description	Exon number	Effect	TA Class	SIFTclass	Somatic count	Germline count	CellLine count	Validated SNP	SNP link
<input checked="" type="checkbox"/>	c.215C>G	p.P72R	4-exon	missense	NA	NA	0	0	0	validated	1042522

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1042522

**** With Benign ,Uncertain significance,drug-response allele ****

Analisi dei dati e report: distinzione tra **VARIANTI PATOGENICHE** e **NON PATOGENICHE** mediante confronto con appositi database (IARC TP53, dbSNP, Cosmic)

SIGNIFICATO PROGNOSTICO della INATTIVAZIONE di TP53 nella LLC

Anomalie di TP53:

5-10% pazienti non trattati

40-50% pazienti con malattia avanzata o refrattaria a CT

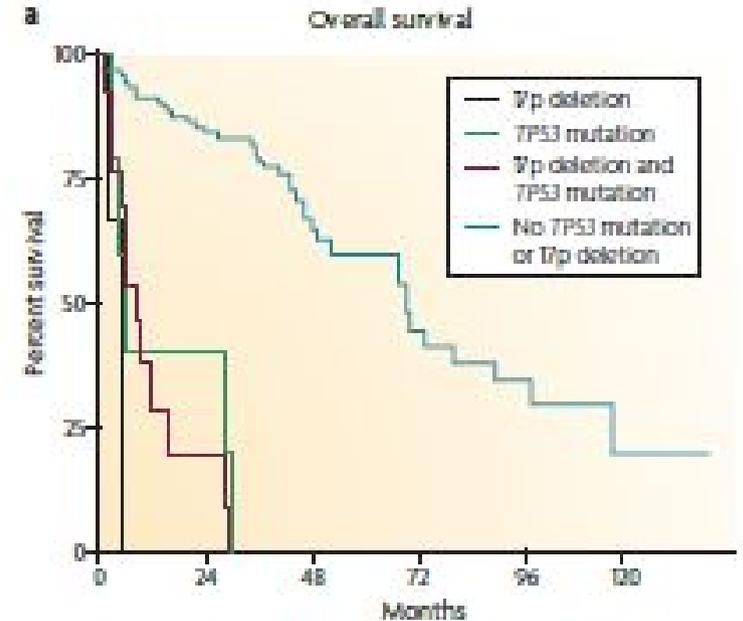
17p13 del + TP53 mut: 70%

17p13 del: 20%

TP53 mut: 10%



prognosi sfavorevole
rapida progressione di malattia
necessità precoce di trattamento
forte predittore di risposta a terapia



Zenz T et al, Nature Reviews Cancer, 2010

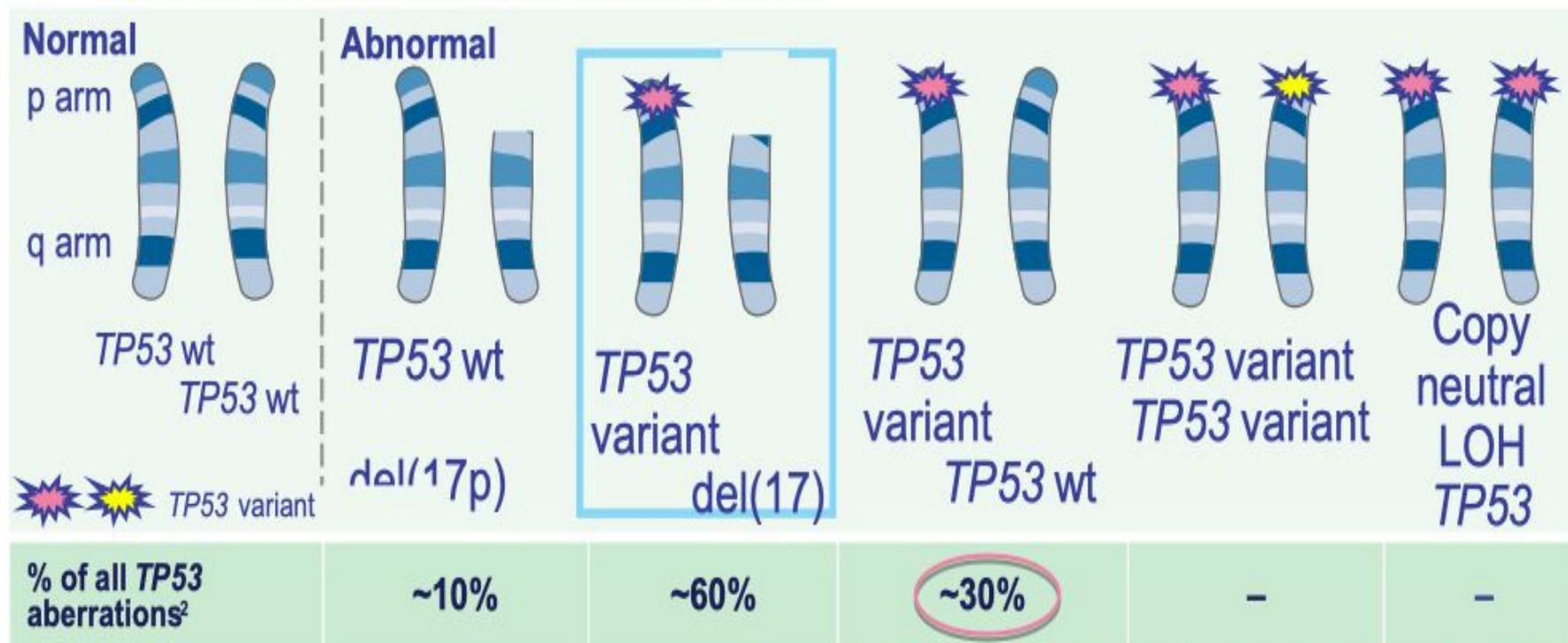
Quando eseguire lo studio delle alterazioni di TP53:

1. In pazienti con malattia attiva che necessitano di un trattamento di 1a linea
2. In pazienti con TP53 *wild type* e assenza di del17p al momento del trattamento e che devono essere testati ad ogni cambio di terapia
3. In tutti i pazienti inclusi in clinical trials

Loss of p53 function in CLL can occur due to del(17p) and/or TP53 variants



- The *TP53* gene resides on the short arm of chromosome 17; del(17p) is associated with loss of the *TP53* allele¹

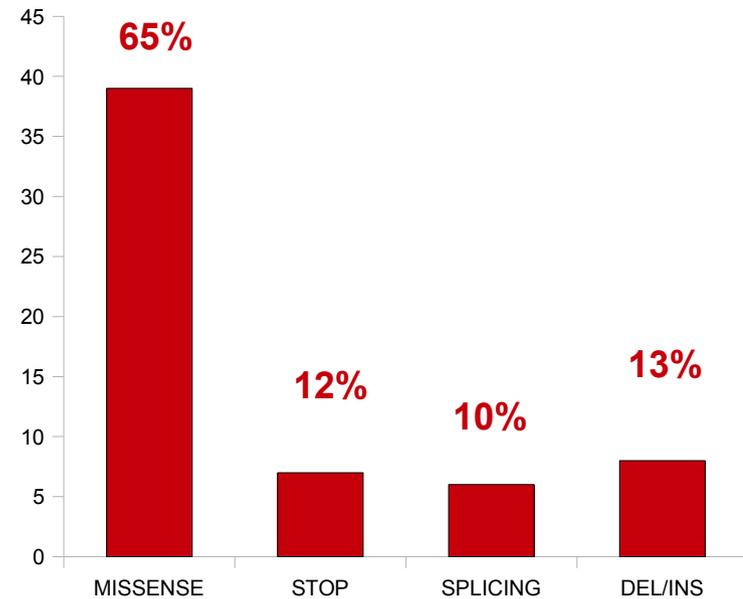
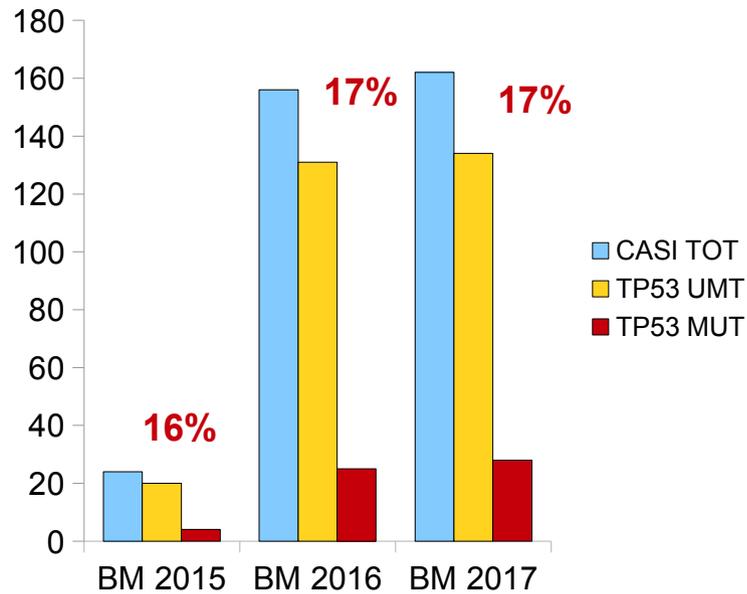


FISH testing alone (without sequencing for *TP53* variants) would miss >30% of all *TP53* aberrations

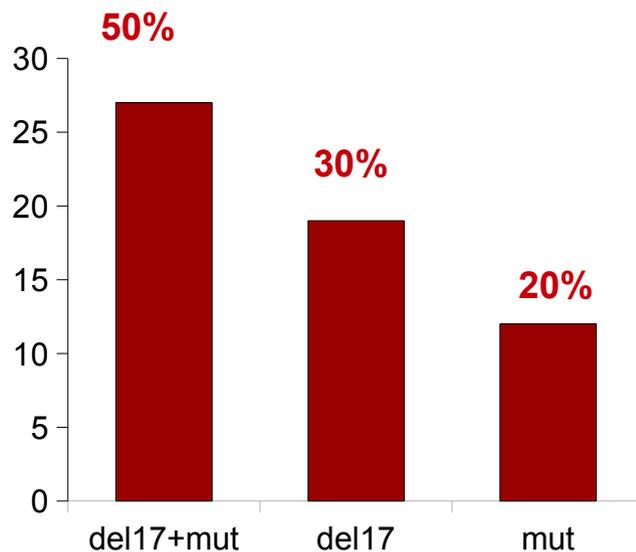
LOH, loss of heterozygosity; wt, wild-type.

1. Surget S, et al. *Onco Targets Ther* 2014;7:57–68; 2. Malcikova J, et al. *Hum Mutat* 2014;35:663–71.

Analisi mutazionale di TP53: dati del Lab Patologia Molecolare Città della Salute e della Scienza di Torino



Casistica e frequenza mutazioni TP53 2015-2017 (n=342)



Frequenza e tipi di varianti di TP53 osservate (n=60)

Frequenza delle alterazioni di TP53 rilevate in FISH e BM (n=58)

Guidelines recommend testing for *TP53* variants and/or del(17p) prior to initial and subsequent therapy



Guideline recommendations for detection of *TP53* aberrations in clinical practice*

	Initial treatment	Subsequent treatment
iwCLL 2008 ¹	FISH for del(17p) is desirable before treatment	Repeat FISH analyses before subsequent treatment
BCSH 2012 ²	Screen for the presence of a <i>TP53</i> abnormality prior to initial treatment	Screen for the presence of a <i>TP53</i> abnormality prior to subsequent treatment
ESMO 2015 ³	FISH for detection of del(17p) and in the absence of del(17p), molecular genetics for detection of <i>TP53</i> variants (at least exons 4–10, eventually exons 2–11)	FISH and <i>TP53</i> variant analyses should be repeated before relapse treatment is administered
ERIC 2016 ⁴	ERIC recommends <i>TP53</i> variant analysis at each progression requiring treatment (minimum exons: 4–9; optimum exons 2–11)	

*Guidelines are constantly being updated and recommendations may change.

BCSH, British Committee for Standards in Haematology; ERIC, European Research Initiative on CLL; ESMO, European Society for Medical Oncology; iwCLL, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia.

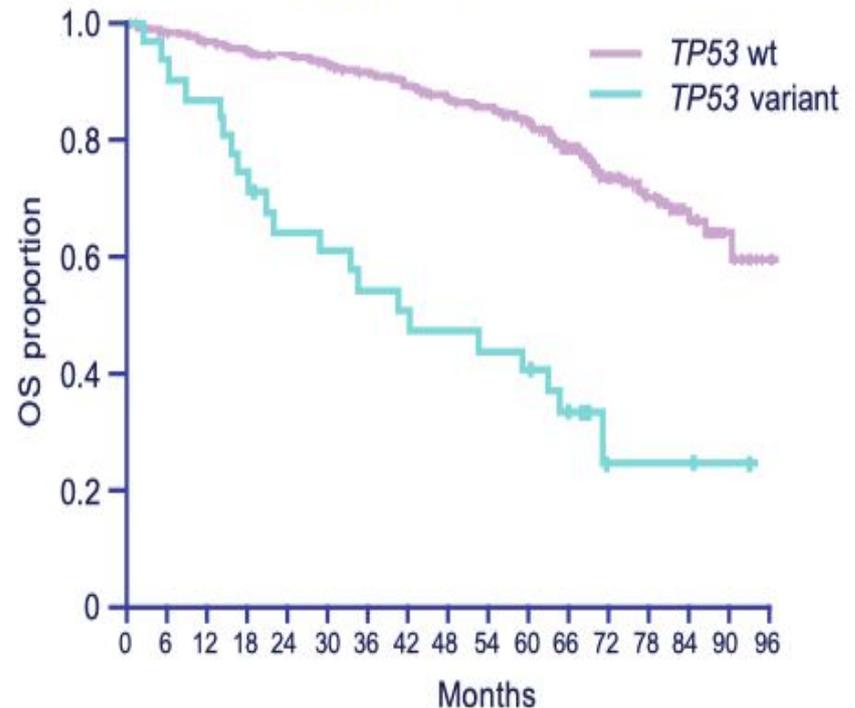
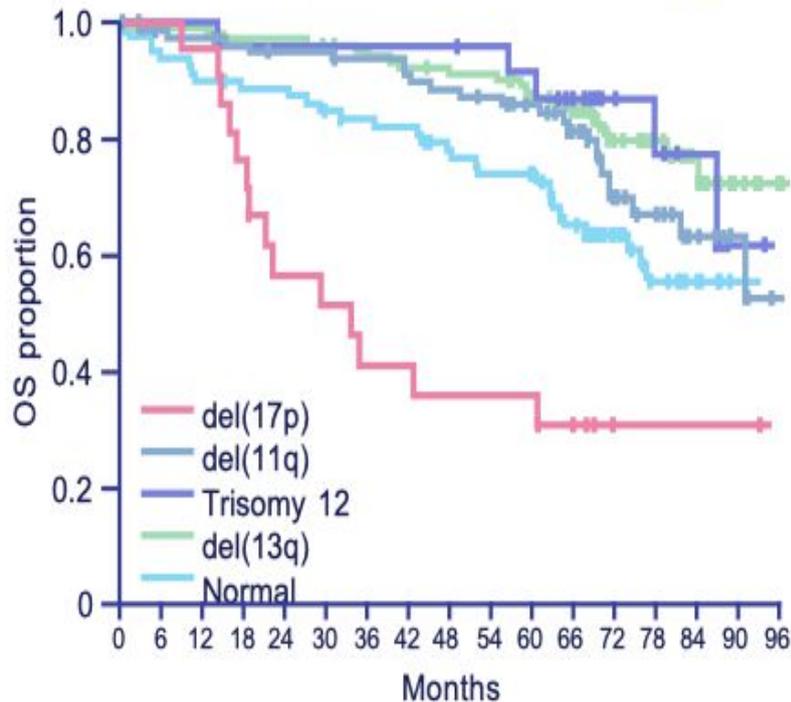
1. Hallek M, et al. *Blood* 2008;**111**:5446–56; 2. Oscier D, et al. *Br J Haematol* 2012;**159**:541–64; 3. Eichhorst B, et al. *Ann Oncol* 2015;**26**(Suppl 5):v78–84; 4. Pospisilova S. *TP53 Network Activities*. ERIC, 2015. Available at: <http://www.ericll.org/pages/meeting/tp53networkactivitiespospisilova>. Last accessed June 2016.

COMPORTAMENTO CLINICO dei PAZIENTI del(17p) o TP53 mutati

Patients with del(17p)/*TP53* variants have a poor response to chemoimmunotherapy



OS in patients receiving chemoimmunotherapy (FCR)



- Median OS in patients carrying a *TP53* variant was 42.2 months, but was not reached and is >96 months in *TP53* wt patients ($p < 0.001$)
- Median PFS was significantly lower in *TP53* variant patients (15.4 vs 59.0 months; $p < 0.001$)

Il ruolo di **ERIC** nell'analisi mutazionale di **TP53**

Anche per l'analisi mutazionale della TP53 il gruppo ERIC si è impegnato al fine di favorire una corretta integrazione tra laboratori e unità cliniche e standardizzare procedure di laboratorio e strategie di trattamento nella LLC.

Per quanto riguarda le analisi molecolari è stato stilato il protocollo per il sequenziamento tradizionale di tutti gli esoni del gene TP53 (2-11) e sono stati stabiliti i criteri di lettura/interpretazione e formalizzazione dei risultati*.

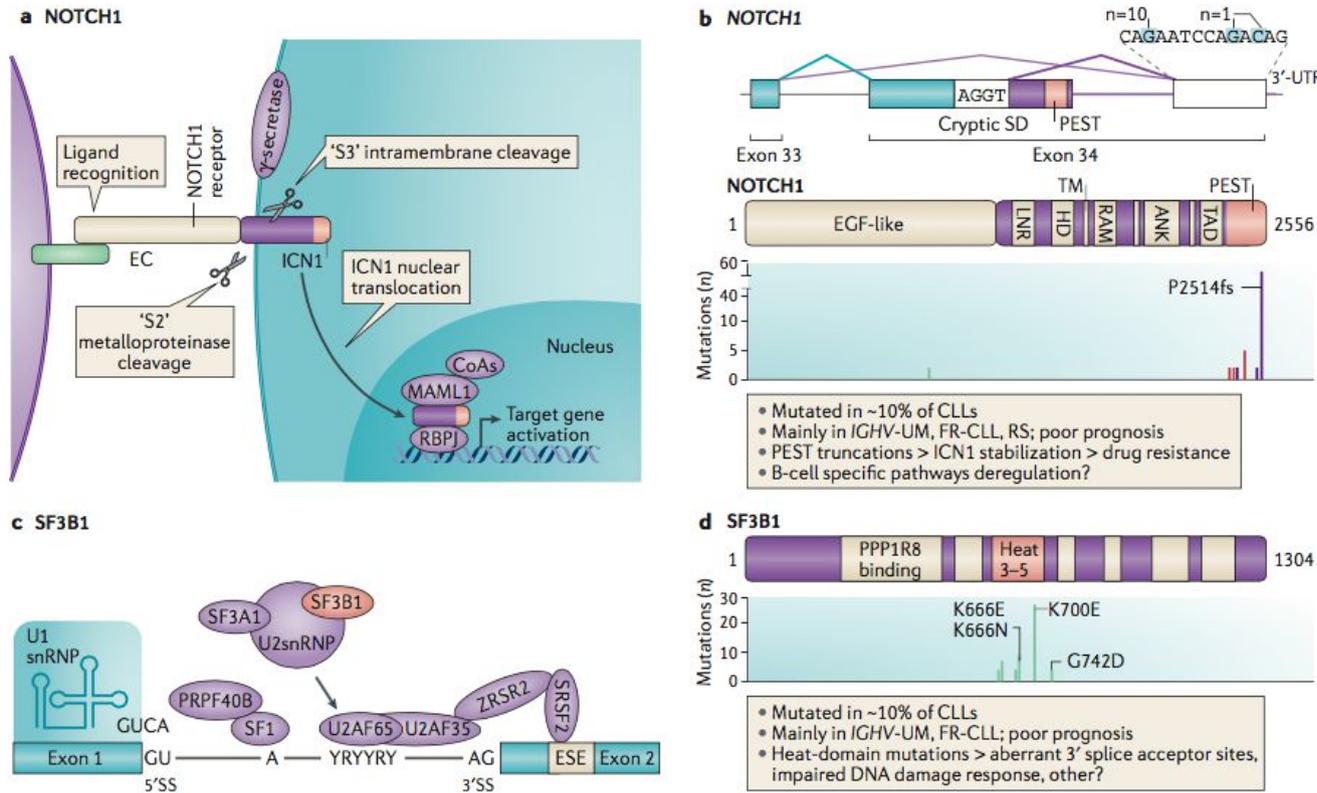
E' in corso così come in tutti gli ambiti della diagnostica molecolare un'attività di sviluppo e messa a punto di protocolli NGS che a regime semplificheranno e potenzieranno questo tipo di indagine.

Anche per l'analisi mutazionale di TP53, come per lo studio mutazionale dei geni IgHV, ERIC ha istituito dei programmi di VEQ con relativa certificazione di durata triennale del laboratorio. Al momento esistono in Italia 25 laboratori aderenti; in Piemonte i laboratori certificati sono: il Lab. Patologia Molecolare Città della Salute e della Scienza (Torino) e il Lab. di Ematologia dell'Università del Piemonte Orientale (Novara).

* ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia (Pospisilova, Leukemia 2012)

ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in CLL – Update on methodological approaches and results interpretation (Pospisilova, Leukemia 2018)

Lo scenario delle ALTERAZIONI GENICHE implicate nella PATOGENESI dell' LLC è molto ampio e complesso (1)



NOTCH1-mut (~10%)

Transmembrane receptor mutations in PEST domain (exon 34, c.7544_7545delCT - **p.P2514fs** in 80-90%)

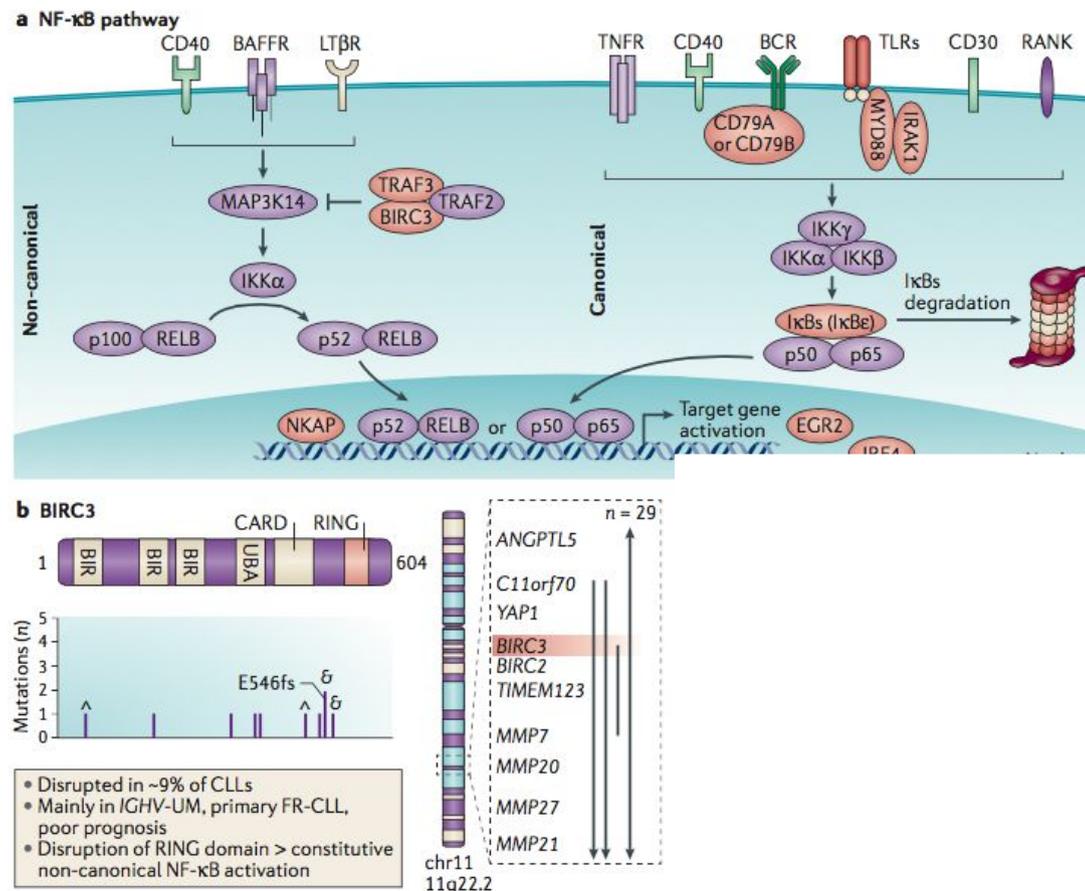
- ✓ negative impact on OS
- ✓ increased risk of Richter's Syndrome (45% vs 4%)
- ✓ ~40% of Notch1-mut CLL carry trisomy 12 → poorer survival

SF3B1-mut (~10%)

Member of the spliceosomal machinery, missense mutations in exons 13-15 (codons 662, 666, **700**, 704, 742)

- ✓ negative impact on OS
- ✓ significant association with del11q and ATM mutations

Lo scenario delle ALTERAZIONI GENICHE implicate nella PATOGENESI dell' LLC è molto ampio e complesso (2)



BIRC3-disr (~10%)

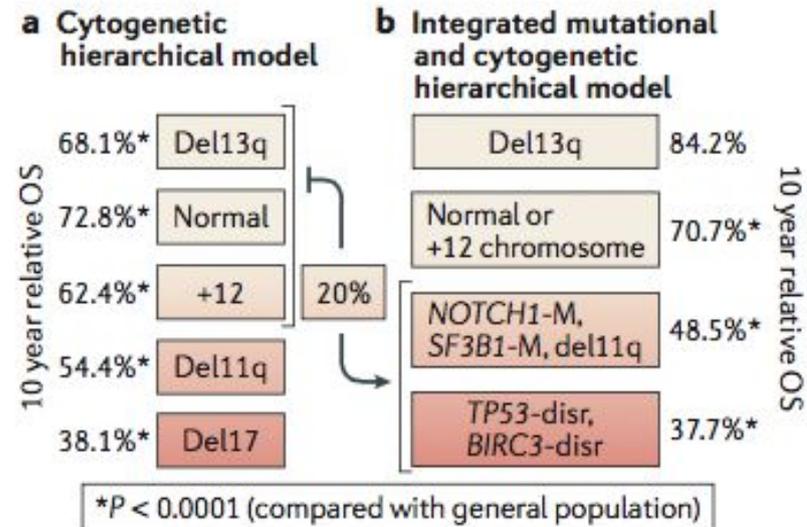
Disrupted by mutations and/or deletions

Rare in early phase of the disease, they accumulate in progressive and refractory CLL

Very dismal poor prognosis, similar to TP53 mutated patients

With ATM is the target of del11q

Si va delineando nella LLC un nuovo MODELLO PROGNOSTICO/PREDITTIVO in grado di integrare CARATTERISTICHE CITOGENETICHE e MOLECOLARI



Prognostic value of CLL associated genes

Fabbri R and Dalla Favera R, Nature Reviews, 2016

IgHV mutations: durable remission after FCR

TP53 defects: indication to targeted agents (ibrutinib, idelalisib+rituximab)

NOTCH1 mutations: resistance to rituximab

BTK and PLCG2 mutations: resistance to ibrutinib

Predictive CLL biomarkers

Rossi D, Gaidano G, Br J Cancer, 2016

Principali SOCIETA' SCIENTIFICHE e PROVIDER impegnati nello studio della LLC



dbSNP
Short Genetic Variations



ARResT/AssignSubsets



International Agency for Research on Cancer



IARC TP53 Database