

UGOTAVLJANJE MUTACIJSKIH SPREMENB V VARIABILNIH GENIH PREUREJENIH GENOV ZA TEŽKO VERIGO IMUNOGLOBULINA PRI BOLNIKI S KRONIČNO LIMFOCITNO LEVKEMIJO

MUTATIONAL STATUS OF REARRANGED IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN VARIABLE GENES IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

Tadej Pajič, Peter Černelč

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Ugotavljanje mutacijskih sprememb variabilnega gena preurejenega variabilnega dela gena za težko verigo imunoglobulina (IGHV) v klonu limfocitov B je pomemben neodvisen napovedni dejavnik pri oceni napovedi poteka bolezni pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo (B-KLL). Hitrejši potek bolezni napoveduje prisotnost nemutiranega variabilnega gena za IGHV v levkemičnih celicah, ki se pojavi pri približno 50 % bolnikov z B-KLL. Prisotnost gena VH3-21 pomeni neugoden izid bolezni in ni odvisen od mutacijskih sprememb. Namen naše raziskave je bil vpeljati in opredeliti mutacijske spremembe IGHV pri preiskovancih z B-KLL, določiti delež vpletenih genov IGHV in izsledke primerjati s tistimi v sloustvu.*
- Metode** *V raziskavo smo vključili 49 (19 žensk in 30 moških) bolnikov z B-KLL z različno klinično razvojno stopnjo (39 stadij A, 6 stadij B, 4 stadij C), ki prej niso bili zdravljeni s citostatiki. Mediana starosti bolnikov je bila 63 let, razpon od 37 do 88 let. Levkemične celice smo pridobili z gostotnim gradientnim centrifugiranjem venske krvi preko fikola in osamili RNA. Z obratnim prepisovanjem in verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili cDNA segmente preurejenih genov za težko verigo imunoglobulinov. Prisotnost identičnih pridelkov PCR (klonalnost) smo ugotovili po heterodupleksnem pristopu s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. S sekvenčno analizo pridelkov PCR smo pridobili nukleotidno zaporedje variabilnega gena za IGH. Izsledke sekvenčne preiskave smo primerjali z najbolj skladnim zaporedjem zarodne imunoglobulinske proge (germline) variabilnega gena. Nemutirani gen IGHV je gen, ki je skladen v več kot 98 % z najbolj skladno zarodno imunoglobulinsko progo.*
- Rezultati** *Delež nemutiranih bolnikov s B-KLL je bil 44,9 %, mutiranih 55,1 %. Najpogosteje se je pojavila podskupina genov IGHV3 (34,9 %). Sledita ji podskupini genov IGHV1 in IGHV4, ki sta bili najdeni v 28,5 in v 26,5 %. Podskupino genov IGHV2 smo dokazali pri 2 bolnikih (4,1 %), druge, IGHV2, IGHV5 in IGHV6 pa le pri posameznem bolniku. Najpogosteje vpleteni gen je gen IGHV1-69, ki se pojavi v 18,4 %. Sledita mu gena V4-34 in V4-39, ki se pojavita v 8,2 %. Gen V3-07, V3-11 in V3-23 smo ugotovili v 6,2 %, druge gene v manjšem deležu. Pri bolnikih z nemutiranimi geni IGHV se je najpogosteje pojavil gen V1-69 (32,5 %), pri bolnikih z mutiranimi geni IGHV gen IGHV4-34 (14,8 %). Gena V3-21 pri naših preiskovancih nismo ugotovili. Izsledke se ujema z manjšo pojavnostjo tega gena v sredozemskem prostoru (3 %).*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Asist. mag. Tadej Pajič, spec. med. biokem, Specializirani hematološki laboratorij Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njgoševa 4, 1525 Ljubljana, e.mail: tadej.pajic@kclj.si

Zaključki *V raziskavi smo ugotovili, da je delež nemutiranega gena IGHV v klonu limfocitov B preiskovanih bolnikov z B-KLL v skladu s podatki v slovtvu, torej okoli 50 %. Pojavnost nekaterih vpletenih genov IGHV in pogostnost somatskih mutacij se ujema z drugimi raziskavami, vendar bi bilo za dokončne zaključke potrebno raziskavo razširiti na večje število preiskovancev. Ta bi omogočila povednejšo geografsko primerjavo in prikazala natančnejšo sliko pojavnosti vpletenih genov IGHV v slovenskem prostoru.*

Ključne besede *kronična limfocitna levkemija; mutacijske spremembe; variabilni geni preurejenih genov za težko verigo imunoglobulina; verižna reakcija s polimerazo*

Abstract

Background *Mutational status of rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes (IGHV) in leukaemia cells of patients with chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) is important independent prognostic factor. The outcome of patients with leukaemia cells that use an unmutated IGHV gene is inferior to those patients with leukaemia cells that use a mutated IGHV gene. Unmutated VH genes can be observed in about half of all B-CLL cases. In addition, the VH3-21 gene usage is an unfavourable prognostic marker independent of the IGHV mutational status. The aims of the study were to determine the mutational status and IGHV gene usage in our cohort of patients with B-CLL and compare the results to those published in the literature.*

Methods *49 B-CLL patients (19 female, 30 male), median age 63 (range from 37 to 88 years) in various Binet stages (39 Binet A, 6 Binet B, 4 Binet C) were included in the study. All the patients were untreated at the time of blood collection. Leukaemia cells were isolated from venous blood samples of patients by the Ficoll density gradient centrifugation. Total cellular RNA was isolated from leukaemia cells and used to the prepare cDNA by reverse transcription. After heteroduplex analysis, clonal PCR products were identified with polyacrylamide gel electrophoresis. The PCR products were sequenced and mutational status was determined by comparing the sequence of the IGHV region of the patient sample to the most homologous germ line V sequence. Sequence that was homologous more than 98 % with their corresponding germ line sequence was considered unmutated.*

Results *Unmutated and mutated IGHV mutational status in our cohort of patients with B-CLL was found in 44.9 % and 55.1 %, respectively. At the IGH subgroup level, the most frequently used subgroup was IGHV3 (34.9 %), followed by IGHV1 and IGHV4, found in 28.5 % and 26.5 %, respectively. Subgroup IGHV2 was found out in 2 patients (4.1 %). The other subgroups, IGHV2, IGHV5 and IGHV6, were determined in one patient each. At the specific gene level, the most frequently used gene IGHV was IGHV1-69, found out in 18.4 %. Genes V4-34 and V4-39 were determined in 8.2 %, followed by genes V3-07, V3-11 and V3-23 identified in 6,2 % each. The others were identified at the lower frequency. In patients with unmutated IGHV genes, the most frequently observed gene was V1-69 (32.5 %). The most frequently used gene in mutated rearrangements was IGHV4-34 (14.8 %). The gene V3-21 was not found out in our cohort of patients and results bear similarity to the Mediterranean-based study (3 %).*

Conclusions *In the study performed, we have found out that the portion of unmutated IGHV genes of the clonal B lymphocytes was in agreement with the available data from the literature and was approximately 50 %. The gene usage and somatic mutations frequency were similar to those published in the literature. In the future, the population based investigations of IGHV gene use in large series of CLL patients may reveal the true frequencies of different IGHV genes in Slovenian region. Furthermore, the geographic comparison and more definitive conclusions could be made based on it.*

Key words *chronic lymphocytic leukaemia; mutational status; rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes; polymerase chain reaction*

Uvod

Kronično limfocitno levkemijo B-celic (B-KLL) uvrščamo med maligne limfome s počasnim naravnim potekom. Je najpogostejša oblika levkemije v zahodnem svetu. Vzroka za nastanek bolezni še ne poznamo. Pri več kot 95 % bolnikov ima klon levkemičnih celic membranske značilnosti limfocitov B. Klon zrelih levkemičnih limfocitov B se kopiči predvsem v kostnem mozgu in limfnih organih, kjer se normalno nahajajo in prehajajo v kri. B-KLL ločimo od drugih novotvorb zrelih celic B (limfomov) na osnovi citološke ocene, histološke preiskave kostnega mozga in bezgavk in s specifičnimi monoklonskimi protitelesi za posamezne membranske označevalce, ki so značilni za B-KLL.^{1,2}

Napoved izida bolezni pri bolnikih z B-KLL še vedno temelji na kliničnem sistemu razvrščanja bolezni po Rai³ in Binetu.⁴ Bolezen razdelimo v klinično razvojne stopnje: v zgodnjo A, srednjo B ali napredovalo obliko bolezni C.^{1,3,4} V 80 % bolezni odkrijemo v zgodnji fazi. Vendar pri približno polovici bolnikov z zgodnjo kliničnorazvojno stopnjo A bolezen hitro napreduje, so neodzivni na običajno zdravljenje, imajo veliko okužb ali avtoimunskih zapletov in imajo bolj neugoden izid kot drugi. Tako oba klinična sistema razvrščanja bolezni ne moreta predvideti bolnikov, ki imajo hitrejši naravni potek in potrebujejo zgodnejše zdravljenje.

V zadnjih letih so se raziskave usmerile v proučevanje možnih kliničnih in bioloških dejavnikov, ki bi imele napovedni pomen in bi jih lahko vključili v klasično oceno napovedi in oceni odzivnosti na zdravljenje.⁵⁻⁹ Velik napredek v razumevanju in napovedi bolezni sta prispevali raziskavi, ki sta pokazali napovedni pomen somatskih hipermutacij v variabilnem genu preurejenega gena za težko verigo imunoglobulina (*IGHV*) v klonu limfocitov B.^{10,11} Hitrejši potek bolezni napoveduje prisotnost nemutiranega gena *V* težke verige imunoglobulina v levkemičnih celicah, ki se pojavi pri približno 50 % bolnikov z B-KLL.^{6,7,10,11} V večini raziskav so pokazali, da je ugotavljanje mutacijskih sprememb *IGHV* neodvisen napovedni dejavnik, še posebej pri bolnikih z zgodnjo klinično razvojno stopnjo; vendar obstaja izjema. Nadaljnje raziskave so pokazale napovedni pomen določenih družin genov *IGHV*. Prisotnost gena *VH3-21* pomeni neugoden izid bolezni, ki je neodvisen od mutacijskih sprememb.^{7,12-14}

Namen naše raziskave je bil vpeljati in opredeliti mutacijske spremembe *IGHV* pri preiskovancih z B-KLL, določiti delež vpletenih genov *IGHV* in izsledke primerjati s slovstvom. Preiskavo smo izvedli z obratnim prepisovanjem izolirane RNA iz levkemičnih celic in z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Pomnožili smo segmente cDNA preurejenih genov za težko verigo imunoglobulinov in prisotnost identičnih pridelkov PCR (klonalnost) ugotovili po heterodupleksnem pristopu s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. S sekvenčno preiskavo pridelkov PCR smo pridobili nukleotidno zaporedje variabilnega gena za *IGH*. Izsledke sekvenčne preiskave smo primerjali z najbolj skladnim zaporedjem zarodne imu-

noglobulinske proge (germline) variabilnega gena. Nemutirani gen *IGHV* je skladen v več kot 98 % z najbolj skladno zarodno imunoglobulinsko progo (germline) variabilnega gena.¹⁵

Bolniki in metode dela

Bolniki

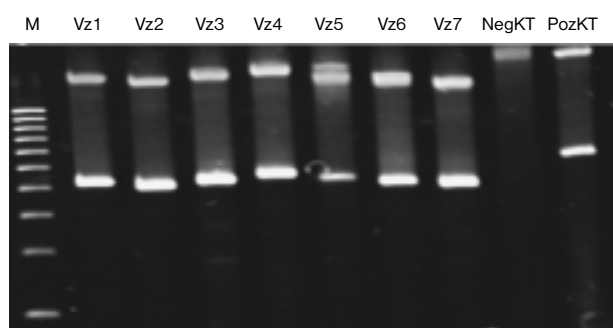
V raziskavo smo vključili 49 bolnikov z B-KLL z različno klinično razvojno stopnjo, vodenih v ambulanti Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Bolniki prej niso bili zdravljeni s citostatiki. Ob vključitvi v raziskavo je stadij A imelo 39 bolnikov, 6 bolnikov je imelo stadij B in 4 stadij C. Med bolniki je bilo 19 žensk in 30 moških. Mediana starosti vseh bolnikov je bila 63 let, razpon od 37 do 88 let. Mediana starosti žensk je bila 62, razpon od 37 do 88 let. Mediana starosti moških je bila 64, razpon od 47 do 82 let. Vsi bolniki so imeli ob odvzemu vzorcev limfocitov (več kot $5 \times 10^9/L$) in dokazan klon B-limfocitov z značilnim imunofenotipom za B-KLL (CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺).

Določitev mutacijskih sprememb variabilnega gena v preurejenem genu za težko verigo imunoglobulina

Bolnikom z B-KLL smo odvzeli vensko krvi in pridobili levkemične celice z gradientnim centrifugiranjem periferne krvi preko fikola. Iz njih smo osamili RNA z reagenčnim kompletom High Pure RNA Isolation Kit (ROCHE). RNA smo obratno prepisali v komplementarno DNA (cDNA) z encimom reverzno ranskriptazo SuperScript II (Invitrogen), heksamernimi oligonukleotidi (Applied Biosystems) in drugimi potrebnimi reagenti po navodilih proizvajalca reverzne transkriptaze.

Z reagenti in po navodilih kompleta IGH Somatic Hypermutation Assay (*InVivoScribe* Technologies) smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo vzorcev cDNA in pomnožili celoten (FR1-FR3) ali del variabilnega (CDR1-FR3) cDNA segmenta gena *V* preurejenega gena za težko verigo imunoglobulina (geni *V/D/J*). Prisotnost identičnih pridelkov PCR (klonalnost) smo ugotovili po heterodupleksnem pristopu s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (6 % Tris-borat-EDTA poliakrilamidni gel Novex (Invitrogen), elektroforezna kadička (XCell *SureLock* Mini-Cell, Invitrogen), pogoji, 200 V, 35 min) in barvanjem gelov z barvilom SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen). Heterodupleksni prisotop vključuje denaturacijo pridelka PCR (DNA) na visoki temperaturi (94 °C, 5 minut), ki ji sledi takojšen padec temperature (4 °C, led, 60 minut). Pri tem se verige DNA ponovno združujejo, vendar se velik del verig DNA nepravilno veže na druge neskladne verige DNA. Nastanejo večje zanke v dvoverižni DNA, ki znatno zmanjšajo možnost potovanja DNA skozi poliakrilamidni gel. Če je večina pridelka PCR identična, se ta v tem postopku ponovno veže s skladnimi pridelki. Ti pridelki PCR normalno potujejo skozi poliakrilamidni gel (Sl. 1). Na tak način izboljšamo ločitev identičnih od ne-identičnih pridelkov PCR. Po gelski elektroforezi in barvanju gelov smo

iz gela izrezali identični pridelek PCR in ga za sekvenčno reakcijo prečistili z reagenčnim kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Sekvenčno reakcijo smo naredili z regenti in po protokolu kompleta za sekveniranje (Applied Biosystems) in za sekveniranje uporabili oligonukleotid *IGHJH*, ki se prilega v genu *J* preurejenega gena *IGH*. Z genetskim analizatorjem nukleotidnih zaporedij (ABI 310 Applied Biosystems) smo pridobili nukleotidno zaporedje variabilnega gena za *IGH* v pridelkih PCR. Nukleotidno zaporedje smo vstavili v analizo orodje, dostopno v svetovnem spletu (IgBLAST, National Center for Biotechnology Information), ki poišče najbolj skladno zaporedje zarodne imunoglobulinske proge (germline) variabilnega gena in določi delež mutacij. Nemutirani gen *IGHV* je gen, ki je skladen v več kot 98 % z najbolj skladno zarodno imunoglobulinsko progo.¹⁵



Sl. 1. Prikaz poliakrilamidne gelske elektroforeze pridelkov PCR bolnikov s kronično limfocitno levkemijo (B-KLL) po heterodupleksnem pristopu.

Madeži v pričakovanem razponu (od 395 do 465 bp za cDNA, 480 do 550 bp za DNA) pomenijo prisotnost identičnega (klonalnega) pridelka PCR v vzorcih (1–7); NegKT, negativna (normalna) kontrola DNA za ne-identiče (poliklonalne) pridelke PCR; PozKT, pozitivna kontrolna DNA za identične (klonalne) pridelke PCR; M, označevalec DNA velikosti od 100 do 1000 bp.

Figure 1. Sample heteroduplex analysis of clonal PCR products on polyacrylamide gel in chronic lymphocytic leukemia patients (B-CLL).

Valid size range (395–465 bp for cDNA, 480–550 for DNA) of amplified PCR products in samples (1–7) indicated clonal PCR product; NegKT, Negative (Normal) polyclonal control DNA; PozKT, Positive clonal control DNA; M, DNA size marker, the 100 bp ladder.

Rezultati

Preiskavo določitve mutacijskih sprememb *IGHV* smo pred kratkim uvedli v naš laboratorij in pri tem spoštovali priporočila Evropske pobude za raziskavo bolezni KLL.¹⁵ Do nastanka tega prispevka smo uspeli določiti mutacijske spremembe 49 nezdravljenim bolnikom s kronično limfocitno levkemijo, ki so bili redno spremljani v ambulanti Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Iz primerjave sekvenčnih preiskav naših vzor-

cev PCR z mednarodno bazo podatkov za zarodne imunoglobulinske proge (germline) variabilnega gena (gen *V*) smo določili delež prisotnosti somatskih hipermutacij v genu *V*. Z uporabo predlagane meje, kjer je nemutirani gen *V* gen, ki je skladen v več kot 98 % z najbolj skladno zarodno imunoglobulinsko progo (germline) gena *V*, smo določili, da je delež nemutiranih bolnikov 44,9 %, mutiranih 55,1 % (Razpr. 1).

Razpr. 1. Ugotavljanje mutacijskih sprememb in variabilnih genov v preurejenem genu za težko verigo imunoglobulina pri preiskovancih s kronično limfocitno levkemijo (B-KLL).

Table 1. Mutational status and gene usage in the rearranged variable regions of the immunoglobulin heavy chains in chronic lymphocytic leukemia patients (B-CLL).

Vpleteni gen	Mutiran (št. oseb, %)	Nemutirani (št. oseb, %)	Skupaj (št. oseb, %)
Gene usage	Mutated (No., %)	Unmutated (No., %)	All (No., %)
<i>V1-02</i>		1 (4,5)	1 (2,0)
<i>V1-03</i>	2 (7,4)		2 (4,1)
<i>V1-18</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V1-24</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V1-69</i>	1 (3,7)	8 (36,5)	9 (18,4)
<i>V2-05</i>	1 (3,7)	1 (4,5)	2 (4,1)
<i>V3-07</i>	3 (11,2)		3 (6,2)
<i>V3-11</i>		3 (13,7)	3 (6,2)
<i>V3-15</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V3-23</i>	2 (7,4)	1 (4,5)	3 (6,2)
<i>V3-30</i>		2 (9,1)	2 (4,1)
<i>V3-33</i>	2 (7,4)		2 (4,1)
<i>V3-48</i>	2 (7,4)		2 (4,1)
<i>V3-74</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V4-04</i>	2 (7,4)		2 (4,1)
<i>V4-30</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V4-34</i>	4 (14,8)		4 (8,2)
<i>V4-39</i>	1 (3,7)	3 (13,7)	4 (8,2)
<i>V4-61</i>		1 (4,5)	1 (2,0)
<i>V4-59</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V5-a</i>		1 (4,5)	1 (2,0)
<i>V6-1</i>	1 (3,7)		1 (2,0)
<i>V7-4-1</i>		1 (4,5)	1 (2,0)
Skupaj All	27 (55,1)	22 (44,9)	49 (100)

Pri naših preiskovancih smo določili vseh sedem družin genov *IGHV*. Najpogosteje uporabljena podskupina gena *IGHV* pri analiziranih bolnikih je bila podskupina genov *IGHV3*, najdena pri 17 od 49 bolnikov (34,7 %). Sledita ji podskupini genov *IGHV1* in *IGHV4*, ki sta bili najdeni pri 14 (28,5 %) in 13 bolnikih (24,5 %). Podskupino gena *IGHV2* (*V2-05*) smo dokazali pri 2 bolnikih (4,1 %), ostale *IGHV5*, *IGHV6* in *IGHV7* pa le pri posameznem bolniku (Razpr. 1).

Če podrobneje ocenimo vpletene gene *IGHV*, ugotovimo, da najpogosteje sodeluje pri obravnavanih bolnikih gen *IGHV1-69*, ki se pojavi pri 9 od 49 bolnikov (18,4 %). Vsak od genov *V4-34* in *V4-39* se pojavi pri 4 bolnikih (8,2 %). Drugi geni *IGHV* in njihov delež izmed vseh preiskovanih bolnikov so prikazani v Razpredelnici 1.

Pri bolnikih z mutiranim genom *IGHV* je največ bolnikov imelo vpleteno družino genov *IGHV3* (11 bolnikov), sledi mu *IGHV4* (8 bolnikov) in *IGHV1* (5 bolnikov). V skupini bolnikov z mutiranim statusom je

bil najpogosteje vpletni gen *V4-34* (4 bolniki, 14,8 %). Gena *V3-21*, katerega prisotnost, ne glede na mutacijske spremembe, pomeni slab napovedni dejavnik, pri naših preiskovancih nismo ugotovili. Pri bolnikih z nemutiranih statusom se je najpogosteje pojavil gen *V1-69* (8 bolnikov, 36,5 %), sledita mu gena *V3-11* (3 bolniki, 13,7 %) in *V4-39* (3 bolniki 13,7 %).

Razpravljanje

Določanje mutacijskih sprememb v variabilnem genu preurejenega gena za težko verigo imunoglobulina (*IGHV*) v klonu limfocitov B je pomemben neodvisen napovedni dejavnik pri oceni napovedi poteka bolezni bolnikov z B-KLL.^{10,11} Pri 49 obravnavanih bolnikih z B-KLL smo ugotovili prisotnost nemutiranega gena *IGHV* v 44,9 %. Delež je v skladu z objavljenimi podatki iz slovtva, kjer se ta giblje okrog 50.^{8-11, 13, 16, 20} Dosedanje raziskave določanja mutacijskih sprememb pri B-KLL so potrdile, da so v preureditev genov *IGHV* pogosteje vključene določene podskupine in specifični geni. Podskupine genov *IGHV*, ki so jih najpogosteje ugotovili pri preureditvi genov *IGHV* pri B-KLL, so *IGHV1*, *IGHV3* in *IGHV4*.^{10, 16-19} Tudi v naši raziskavi smo najpogosteje potrdili te podskupine genov, saj zajemajo skupaj kar 89,7 % vseh primerov.

Lokus *IGHV* vsebuje veliko genov *V*, vendar se nekateri med njimi pogosteje pojavijo pri bolnikih z B-KLL.^{10, 16-19} Med njimi so geni *IGHV1-69*, *IGHV3-07*, *IGHV3-23*, *IGHV4-34* in *IGHV4-39*, ki so tudi v naši raziskavi pogosteje zastopani (Razpr. 1). V naši raziskavi nekoliko odstopa gen *V3-11*, ki smo ga ugotovili pri 3 bolnikih, vendar je tudi število preiskovancev v primerjavi z drugimi raziskavami manjše. Za dokončne zaključke bi bilo potrebno raziskavo razširiti na večje število preiskovancev. Tudi pogostnost somatskih hipermutacij v genih *IGHV* ni enovita. Zaznati je mogoče hierarhijo prisotnosti somatskih hipermutacij v genih *IGHV*, saj je največ genov mutiranih v podskupini *IGHV3*, sledi ji podskupina genov *IGHV4* in *IGHV1*, kar smo dobili tudi pri naši preiskavi (11 bolnikov *IGHV3*, 8 bolnikov *IGHV4*, 5 *IGHV1*). Ta pojav je še bolj viden pri posameznih genih. Tako je za gen *IGHV1-69* značilno, da nosi izredno malo mutacij, tudi v naši raziskavi, kjer je delež tega gena med nemutiranimi največji, kar 36,5 % in je v skladu z opažanji drugih preiskav. Po drugi strani je vrsta genov, *IGHV3-07*, *IGHV3-23* in *IGHV4-34*, ki imajo zelo visok delež mutacij.^{10, 13, 16-20} Ti geni so najpogosteje zastopani tudi pri naših bolnikih z mutiranimi mutacijskimi spremembami (Razpr. 1).

Nedavne raziskave so pokazale, da neodvisno od mutacijskih sprememb pomeni prisotnost gena *IGHV3-21* slabši izid bolezni. V severni Evropi (Skandinavske države in Velika Britanija) je delež tega gena pri B-KLL bolnikih velik, med 8 in 11 %.²⁰⁻²² V Skandinavskih državah je po pogostnosti na drugem mestu, takoj za genom *IGHV1-69*.²⁰ Ravno nasprotno je v mediteranskem prostoru, kjer je večja raziskava držav Francije, Španije, Grčije in Italije pokazala prisotnost gena le v 3 %.¹⁶ V našem naboru

bolnikov z B-KLL tega gena nismo dokazali, kar potrjuje, da je lahko pojavnost tega gena v slovenskem prostoru pri B-KLL bolnikih manjša in se približuje k deležu, ki je značilen za sredozemski prostor. Razlogi za različno geografsko pojavnost genov niso poznani. V splošnem sklepajo na vpliv specifičnega genetskega ozadja, odvisnega od raznolikosti sestave zarodne proge lokusa *IGHV* ali določenega neznanega dejavnika iz okolja.¹⁶

Zaključki

Določitev mutacijskih sprememb v variabilnem genu preurejenega gena za težko verigo imunoglobulina (*IGHV*) v klonu limfocitov B je neodvisen dejavnik pri oceni napovedi poteka bolezni bolnikov z B-KLL, ki smo jo uspešno uvedli v delo našega laboratorija. V raziskavi smo ugotovili, da je pojavnost nekaterih vpletenih genov *IGHV* in pogostnost somatskih mutacij podobna tistim iz slovtva, vendar bi bilo za dokončne zaključke potrebno raziskavo razširiti na večje število preiskovancev. Ta bi omogočila ustrežnejšo geografsko primerjavo in prikazala natančnejšo sliko pojavnosti in delež mutacij vpletenih genov *IGHV* v slovenskem prostoru. Nenazadnje je pomen uvedbe preiskave tudi v tem, ker omogoča naše nadaljnje raziskave pri bolnikih z B-KLL.

Literatura

- Černelč P. Limfatične novotvorbe. Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. Interna medicina. 3. izdaja. Ljubljana: Littera Picta; 2005. p. 1250-68.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Mature B-cell neoplasms in pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues World Health Organization Classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2001.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975; 46: 219-34.
- Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. Cancer 1977; 40: 855-64.
- Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004; 163-83.
- Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. Leukemia 2003; 17: 133-7.
- Stilgenbauer S. Chronic lymphocytic leukemia: genetics for predicting outcome. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 185-90.
- Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukaemia. Blood 2002; 100: 1410-16.
- Montserrat E. New prognostic markers in CLL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 279-84.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1848-54.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig VH gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1840-47.
- Thorsélius M, Kröber A, Murray FThunberg U, Tobin G, Bühler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in V H3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. Blood 2006; 107: 2889-94.

13. Tobin G. The immunoglobulin genes: structure and specificity in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2007; 48: 1081–86.
14. Potter KN, Orchard J, Critchley E, Mockridge CI, Jose A, Stevenson FK. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire; *Blood* 2003; 101: 3082–4.
15. Editorial. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 1–3.
16. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105: 1678–85.
17. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515–25.
18. Kipps TJ, Tomhave E, Pratt LF, Duffy S, Chen PP, Carson DA. Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 5913–7.
19. Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; 15: 288–94.
20. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, Merup M, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the V_H3-21 gene display highly restricted V2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; 101: 4952–7.
21. Lin K, Manocha S, Harris RJ, Matrai Z, Sherrington PD, Pettitt AR. High frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the V_H3-21 gene segment. *Blood* 2003; 102: 1145–6.

Prispelo 2008-02-27, sprejeto 2008-03-03
