

IL MONITORAGGIO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (LLA): QUANDO E PERCHÉ USARLA.

A.Biondi

Clinica Pediatrica Università di Milano-Bicocca; Centro di Ricerca "M.Tettamanti" Ospedale S.Gerardo, Monza.

Introduzione

Nonostante i significativi progressi ottenuti nella terapia della leucemia linfoblastica acuta (LLA), in particolar modo nel bambino, il problema della recidiva durante la terapia o precocemente dopo la sospensione della stessa rappresenta ancora uno dei "challenge" più rilevanti. Circa il 30% dei bambini e più della metà degli adulti con LAL presenta recidiva della malattia. La recidiva è probabilmente espressione della persistenza di un clone leucemico "resistente" alla terapia convenzionale e di conseguenza il monitoraggio della malattia potrebbe contribuire alla comprensione della "storia" biologica della malattia stessa. Non è infatti ancora noto per quanto tempo le cellule leucemiche persistono durante la fase di remissione della malattia, né se la determinazione precoce della recidiva possa rappresentare un vantaggio clinicamente rilevante. I diversi metodi che sono stati fino ad ora proposti per monitorare la malattia residua minima (MRM) nelle leucemie acute differiscono per la loro sensibilità e specificità nel discriminare la natura leucemica delle residue cellule blastiche riscontrate in un midollo durante la fase di terapia. Con le tecniche convenzionali di citomorfologia è possibile identificare l'1-5% di cellule leucemiche in una popolazione di cellule normali. La sensibilità aumenta in modo significativo (fino a $10^{-2}/10^{-3}$) quando vengono applicate tecniche immunologiche di doppia marcatura utilizzando anticorpi diretti contro antigeni di differenziazione delle serie mieloide e linfoide ed enzimi selettivamente espressi negli stadi più precoci dell'ontogenesi (ad es. l'enzima terminal deoxinucleotidil transferasi -Tdt- nelle LLA) (si veda la Ref.1 per una revisione sull'argomento).

I geni delle Immunoglobuline (Igs) e dei Recettori T per l'antigene (TcR): targets universali per lo studio della MRM nelle LAL

I geni delle Igs e TcR condividono un medesimo motivo strutturale caratterizzato dalla presenza di numerosi segmenti multipli e separati di DNA che codificano per le porzioni V,J,D e C delle catene pesanti e

leggere delle Igs e delle catene dei recettori T per l'antigene (TcR). Durante l'ontogenesi dei B e T linfociti, i geni delle Igs e dei TcR vengono assemblati mediante un processo di riarrangiamento somatico. I segmenti genici separati codificanti le regioni V, D, J vengono riuniti per formare un unico esone codificante la regione variabile. Lo studio del riarrangiamento dei geni delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline (Igs) e delle catene alfa, beta, gamma e delta dei TcR è divenuto il metodo più sensibile per valutare la clonalità di un'espansione linfoide e ha trovato diffuso impiego nella diagnostica immunoematologica. Lo studio genotipico delle malattie linfoproliferative ha sostanzialmente modificato negli ultimi anni la nostra comprensione e classificazione di tali patologie. Molte delle conoscenze acquisite sul riarrangiamento dei geni delle Igs e dei TcR (ricombinazione, "gerarchia" del riarrangiamento) e su altri meccanismi che amplificano il repertorio di specificità che possono essere generate da un linfocita B o T, sono state ottenute dallo studio delle malattie linfoproliferative. I contributi di tali ricerche di base hanno di ritorno fornito gli strumenti per una caratterizzazione molecolare (clonalità, stadio di differenziazione, stipse di appartenenza) di leucemie e linfomi. Lo studio genotipico è stato utilizzato per valutare la MRM durante la fase di remissione di pazienti affetti da leucemie e linfomi e per identificare precocemente la recidiva. Evidenze di riarrangiamento monoclonale sono state occasionalmente rilevate in pazienti durante la fase apparente di remissione ematologica e tale reperto ha preceduto l'evidente recidiva. Un limite all'applicazione di tale approccio risulta dalla sensibilità dell'analisi genotipica (1-5%) mediante Southern blot. Più di recente la disponibilità dell'amplificazione genica mediante PCR ha suggerito la possibilità di sviluppare strategie che, utilizzando tale marcatore di clonalità, possano essere utilizzate nella maggior parte dei casi di LLA. Come precedentemente indicato, l'ampia variabilità del repertorio antigenico è prodotta dalla ricombinazione casuale e stocastica dei diversi segmenti e dalla variabilità giunzionale determinata dall'aggiunta di extranucleotidi a livello delle giunzione VDJ. Come mostrato nella Fig.1, utilizzando una strategia che preveda l'amplificazione del riarrangiamento del clone leucemico all'esordio mediante primers per V e J è possibile identificare la sequenza nucleotidica della giunzione N (sia per i geni delle Igs che per i TcR). Un oligonucleotide complementare alla regione di giunzione rappresenta una sonda specifica del clone leucemico utilizzabile successivamente o come primer di una reazione di amplificazione ("allele specific-PCR-ASO) oppure come sonda da utilizzare per l'ibridazione di prodotti di PCR dopo dot-blot (2). L'analisi mediante Southern del tipo di riarrangiamento presente all'esordio della malattia può essere sostituita dalla diretta amplificazione delle più comuni ricombinazioni dei geni TcR g e d e

della delezione di Igk, osservabili nelle "B-cell precursor" LLA, come indicato nella Tab.1.

Il prodotto di amplificazione viene successivamente separato mediante gel di poliaccrilamide per confermare la natura monoclonale del campione in esame e per ottenere mediante escissione della banda, un materiale direttamente analizzabile per ottenere la sequenza di giunzione (3). Numerose sono le variabili che si sono dimostrate rilevanti al fine della sensibilità del metodo: tra queste, il numero di cellule analizzabili e la qualità del campione da cui viene estratto il DNA. La sensibilità non può essere superiore al reciproco del numero di cellule del campione. In una reazione di PCR la massima quantità utilizzabile è pari a 1-2 ug di DNA che corrispondono a circa $1.6-3.2 \times 10^5$ cellule. Il numero di copie di genoma analizzabili può essere pertanto incrementato solo eseguendo diverse singole reazioni di PCR. Nel caso delle LLA, non è possibile utilizzare il sangue periferico per valutare la MRM durante le fasi di remissione, poiché il normale background dei linfociti T o B che utilizzano gli stessi segmenti di ricombinazione a quelli dimostrati nel clone leucemico, riducono significativamente la sensibilità della sonda clone-specifica.

La valutazione dei risultati di MRM è nella maggior parte dei casi eseguita mediante analisi semiquantitativa. L'intensità del campione in esame viene confrontata con il segnale di intensità ottenuto in campioni di progressive diluizioni del DNA estratto alla diagnosi della malattia con DNA estratto da cellule mononucleate isolate da un pool di donatori sani. Più di recente, metodi più accurati sono stati proposti per ridurre al minimo la variabilità dei risultati e favorirne la comparabilità. L'utilizzo di uno standard interno di amplificazione di un segmento di DNA, clonato in un plasmide, corrispondente ad una determinata ricombinazione VJ o VDJ, di peso molecolare differente a quelli normalmente osservabili, incluso in ogni reazione di PCR, può permettere un confronto più accurato dell'intensità della banda ottenuta dall'amplificazione del campione leucemico e di conseguenza una stima quantitativa della MRM.

Più di recente si è resa disponibile una nuova tecnologia per la valutazione quantitativa dei prodotti di PCR, denominata "real-time-quantitativePCR" (RQ-PCR) (4). Con questo approccio è possibile utilizzare l'attività esonucleasica della Taq polimerasi nella sua direzione 5'-3' per la determinazione e quantificazione di un prodotto specifico di PCR durante la reazione stessa di amplificazione. Mentre procede la reazione di PCR, una sonda che riconosce una sequenza interna al prodotto di amplificazione viene degradata con la conseguente emissione ed accumulo di un segnale fluorescente. Grazie alla determinazione in tempo reale dei singoli prodotti di amplificazione, il metodo è particolarmente rapido ed accurato nella determinazione di diluizioni seriali durante il monitoraggio della malattia. La RQ-PCR sembra essere particolarmente utile per la valutazione quantitativa della MRM, come già riportato nel monitoraggio di alcune traslocazioni

cromosomiche come la t(9;22), t(14;18) e t(8;21). Più di recente dati preliminari sono stati riportati anche per i geni delle Ig e TcR quando utilizzati come target per la valutazione della MRM. Nella Fig.2 sono riportati schematicamente i risultati comparativi dei due approcci relativi ad un caso esemplificativo.

Quale impatto dello studio della MRM nell' approccio al paziente con LLA?

La maggior parte dei dati fino ad ora pubblicati sono relativi alle LLA del bambino. In tale contesto i dati inizialmente prodotti da diversi gruppi sulla correlazione tra MRM ed evoluzione clinica sono risultati contraddittori (si veda ref.1). Sebbene in alcune serie di pazienti sia stata osservata una buona correlazione tra persistenza di malattia, valutata come MRM, e la successiva recidiva (5,6), in altre casistiche l'osservazione di MRM anche a 1-2 anni dalla diagnosi, in pazienti rimasti in remissione completa, ha sollevato qualche dubbio sul suo reale significato (7). I risultati ottenuti più recentemente su casistiche più ampie e più omogenee per trattamento hanno permesso di cominciare a delineare un pattern di comportamento della MRM nelle LLA del bambino più omogeneo anche utilizzando strategie diverse. I dati indipendenti di numerosi gruppi hanno indicato che la persistenza di malattia al termine della prima fase di induzione (come misura della citoriduzione e di conseguenza indirettamente di sensibilità al trattamento) ben correla con la probabilità di successive ricadute (8,10). Altri studi hanno invece indicato nella persistenza di malattia specie al termine della fase di consolidamento, l'elemento di maggiore significatività più che la positività rilevata ad un determinato momento della terapia (10). In tale contesto si collocano i dati ottenuti nell'ambito del gruppo cooperativo "I-Berlin-Frankfurt-Munster" (I-BFM) che comprende centri dei seguenti paesi europei: Germania, Italia, Olanda ed Austria. Lo studio condotto su 240 bambini affetti dal LAL, si è proposto di valutare il valore predittivo della MRM mediante amplificazione della regione di giunzione dei geni TcRd, TcRg, Igk e TAL-1. La negatività della MRM ai diversi tempi del trattamento è risultata significativamente associata ad una bassa incidenza di recidive (3-15% a tre anni), e al contrario un incremento di 5-10 volte degli eventi (39-86% a tre anni) si è osservato nei casi di MRM positiva. Il dato della MRM è risultato essere un fattore prognosticamente indipendente da altri parametri clinici e biologici della malattia all'esordio, in particolar modo quando valutata alla fine dell'induzione e prima del consolidamento. A questi tempi di trattamento, la presenza di un livello di MRM $\leq 10^{-2}$ è risultato associato ad un'incidenza di almeno tre volte superiore di recidive a confronto con i casi con MRM $\leq 10^{-3}$. L'analisi della MRM a tempi più tardivi dalla diagnosi è risultata ancora più significativa

nell'identificare i pazienti con successiva recidiva. In base ai dati di MRM relativi ai tempi precoci è stato possibile stratificare i pazienti in funzione del rischio relativo di ricaduta, fornendo le basi per un futuro suo utilizzo in protocolli clinici.

Conclusioni

L'approccio molecolare allo studio della malattia residua in pazienti affetti da leucemia acuta conferma lo straordinario impatto che le tecniche di biologia molecolare hanno avuto in campo emato-oncologico. Ciò che diventa ovviamente rilevante, considerando il sempre più rapido affinamento e semplificazione delle tecniche di analisi molecolare, è la possibilità di dimostrare dal punto di vista sperimentale il significato di una remissione "molecolare" in rapporto alla risposta terapeutica, alla prognosi e in ultima analisi alla sopravvivenza dei pazienti affetti da leucemia acuta.

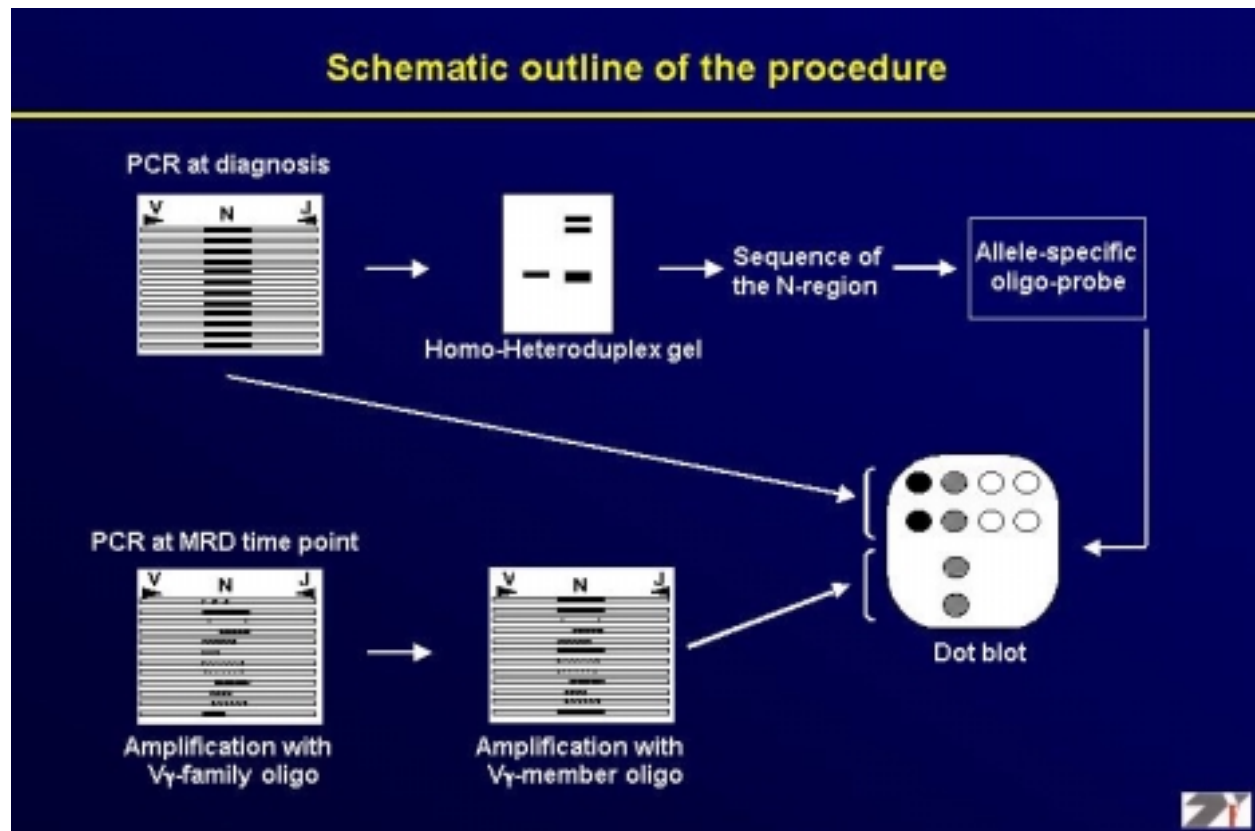
Bibliografia

1. Campana D and Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85:1416,1995
2. MJPongers-Willemsse, T Seriu, F Stolz, E d'Aniello, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13:110,1999
3. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heteroduplex analysis of T-cell receptor γ gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 83:3271,1994
4. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986,1996
5. Biondi A, Yokota S, Hansen-Hagge TE, Rossi V, Giudici G, Maglia O, Basso G, Tell C, Masera G, Bartram C. Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: analysis of patients in continuous complete remission or with consecutive relapse. *Leukemia* 6:282,1992
6. Brisco MJ, Condon J, Hughe E, Neoth SH, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343:196,1994
7. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TF. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 336:317,1997
8. Costan-Smith E, Behm FG, Behm FG, Sanchez J et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute

lymphoblastic leukaemia. Lancet 351:550,1998

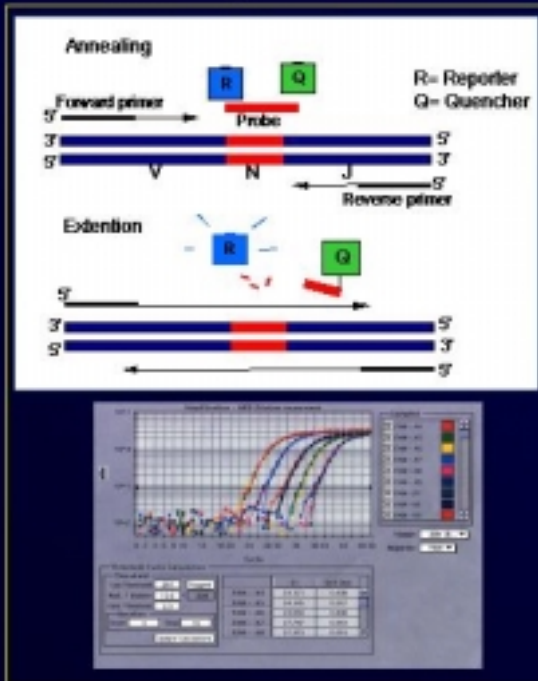
9. Cavè H, J van der Werff Ten Bosch, S Suci, C Guidal et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 339:591,1998

10. Jvan Dongen, T Seriu, ERPanzer-Grumayer, A Biondi et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 352:1731,1998

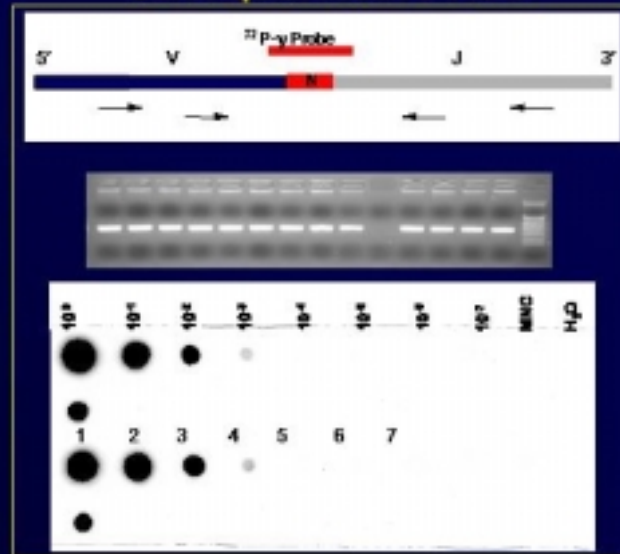


Dot-blot vs TaqMan analyses

RealTime Quantitative-PCR



Semi-quantitative PCR



Most frequent recombination occurring in B-cell-precursor and T-ALL

B-cell-precursor

IgH	VH1 to 7- JH	90-95%
	FR3- JH	
TcR γ	Vg1-Jg1.3/2.3	55%
	Vg1-Jg1.1/2.1	
	VgII-Jg1.3/2.3	
	VgII-Jg1.1/2.1	
	VgIV-Jg1.3/2.3	
	VgIV-Jg1.1/2.1	
Igk	VkI-Kde	50%
	VkII-KDe	
	VkIII-KDe	
	VkIV-Kde	
	intron RSS-Kde	
TcR δ	Vd2-Dd3	40%
	Dd2-Dd3	

T-ALL

TcR γ	Vg1-Jg1.3/2.3	90-95%
	Vg1-Jg1.1/2.1	
	VgII-Jg1.3/2.3	
	VgIII-Jg1.3/2.3	
	VgIV-Jg1.3/2.3	
TcR δ	Vd1-Jd1	40%
	Vd2-Dd3	
	Vd2-Jd1	
	Vd3-Jd1	
	Dd2-Dd3	
TAL1	Sil-Tal	15%