

GENETIKAI INSTABILITÁS FOLLICULARIS LYMPHOMA
HISZTOLÓGIAI TRANSZFORMÁCIÓJA SORÁN

PhD értekezés tézisei

Dr. Nagy Mónika

Témavezető: Dr. Matolcsy András
Programvezetők: Dr. Kelényi Gábor
Dr. Kellermayer Miklós

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Patológiai Intézet
2001.

Összefoglalás

A follicularis lymphoma (FL) olyan B-sejtes non-Hodgkin lymphoma, melynek genetikai jellemzője a t(14;18) transzlokáció. A follicularis lymphoma klinikai progressziója és hisztológiai transzformációja gyakran másodlagos genetikai változásokkal jár, melyek megjelenhetnek kromoszómális és nukleinsav szinten egyaránt. Tanulmányunkban célul tűztük ki, hogy a FL transzformációja során vizsgáljuk a genetikai instabilitást és az instabilitás kialakulásában a hMHLH és hMSH mismatch repair gének szerepét. Vizsgálatainkat olyan betegek esetében végeztük el, akiknél a FL diffúz nagysejtes lymphomába (DLCL) progressziált. Nyolc beteg transzformáció előtti és utáni nyirokcsomó biopszia mintáit mikroszatellita analízisnek vetettük alá. Vizsgáltuk a hMHL1 és hMSH2 gének genetikai alterációját, valamint öt beteg tumornináit komparatív genomikus hibridizációval (CGH) tanulmányoztuk. A nyolc beteg FL illetve DLCL mináiból származó DNS-ek nyolc mikroszatellita markerrel történt analízise során tizennyolc eltérést találtunk. Mikroszatellita instabilitást (MSI) is és a heterozigotitáság elvesztését is („loss of heterozygosity” (LOH)) kilenc mikroszatellita lókuszon tapasztaltuk. Egy beteg esetében egy, két esetben kettő, egy esetben három és két esetben öt mikroszatellita lókuszon találtunk eltéréseket. Két esetben a FL és DLCL DNS-ek azonos mikroszatellita miniatúrat mutattak. A hMHL1 és hMSH2 gének mutációja nem volt kimutatható. A CGH-val vizsgált öt FL esetében két helyen volt kimutatható kromoszómagyaparápodás, míg a hisztológiai transzformációt szenvedett DLCL-es esetek analízise során 21 addicionális helyen

Kromoszómavesztés volt látható. Összehasonlítva a mikroszatellita és CGH változások számát a transzformáció során egy esetben nagy számú mikroszatellita változás nagy számú CGH eltéréssel társult, két másik esetben a nagy számú CGH eltérést kis számú mikroszatellita változás kísérte, míg két esetben a mikroszatellita analízis és a CGH vizsgálat is relative alacsony előfordulási genetikai eltéréseket mutatott. Ezen eredmények alapján feltelezhetjük, hogy a FL diffúz nagysejtes lymphomába történő transzformációja gyakran genetikai instabilitással jár, amely előfordulhat a gén bármely szakaszán akár nukleinsav vagy kromoszómális szinten, azonban a hMHL1 és hMSH2 génnek a folyamat során nem érintettek.

Bevezetés és célkitűzések

A follicularis lymphoma (FL) olyan B-sejtes non-Hodgkin lymphoma, amelynek klinikai lefolyása relative indolens. A FL agresszív diffúz nagysejtes lymphomába (DLCL) történő histológiai transzformációja az esetek 25-30 százalékában fordul elő a betegség késői fázisában. A histológiai transzformáció az esetek többségében a klinikai lefolyás progresszióját és rossz prognózist jelent.

A FL-k körülbelül 85-90%-a t(14; 18)(q32; q21) kromoszómális transzlokációt hordoz, amely a bcl-2 onkogén immunoglobulin (Ig) nehezélc génjéhez való juxtapozícióját okozza. Másodlagos genetikai elváltozások, mint például a c-myc, p53, ras, bcl-2 és bcl-6 génnek mutációja, allélvesztés, a p15^{INK4B} és a p16^{INK4A} génnek mutációja vagy hipermetilációja a FL transzformáció utáni stádiumához kapcsolhatóak.

Úgy tűnik, a tumor fejlődésében és progressziójában számos genetikai instabilitást okozó hatás játszhat szerepet. A tumorok egy részében a genetikai instabilitás nukleotid szekvencia szinten, mint DNS replikációs hiba jelenik meg, amely általában a rövid repetitív szekvenciák (mikroszatelliták) hosszúságának eltérését okozza, így detektálható. A mikroszatellita instabilitás (MSI) gyakran jár együtt a DNS mismatch repair génnek szomatikus mutációjával. A genetikai instabilitás létrejöttének egy másik lehetséges útja a kromoszómák szegregációjában bekövetkező patológias változás. Az így kialakult genetikai instabilitásra kromoszómavesztés vagy -gyarapodás, transzlokációk, deléciók és amplifikációk jellemzőek.

Anyag és módszer

Beteganyag

Vizsgálatainkhoz nyolc, a Stanford University Medical Center illetve a Pécsi Egyetem Általános Orvostudományi Karának Patológiai Intézetében FL-nak véleményezett, frissen fagyasztott nyirokcsomó biopsziás mintát használtunk. A diagnózis minden esetben hisztopatológiai és immungenotípus vizsgálatokon alapult a Revised European-American Lymphoma klasszifikációnak megfelelően. Az első nyirokcsomó biopszia után négy esetben a szövettani vizsgálatok grade I. citológiai stádiumú FL-t igazoltak, három esetben a diagnózis grade II. citológiai stádiumú FL volt, míg egy esetben a citológiai stádium grade III. fokozatú volt. A második mintavétel utáni diagnosztikus vizsgálatok mind a nyolc esetben diffúz nagysejtes lymphomát igazoltak. Minden, általunk használt mintában monoklonális IgH nehezlánc génátrendeződést és t(14;18) transzlokációt tapasztaltunk. A második mintavétel utáni nyirokcsomó biopsziás mintákat mindegyikében azonos Ig nehezlánc génátrendeződést és azonos t(14;18) transzlokációs töréspontot találtunk, ami az első és második nyirokcsomó biopsziából származó minták azonos klonális eredetére enged következtetni.

DNS izolálás

Genomikus DNS-t natív szövetmintákból teljesít NaCl felhasználásával, kisózasos módszerrel nyertünk. A szövetmintákból izolált DNS koncentrációját 260 nm hullámhosszon határoztuk meg denzitometriai segítségével. A DNS tartalom meghatározása után a mintákat 4°C-on tároltuk.

Mikroszatellita instabilitás vizsgálatok

Nyolc, különböző kromoszómaszakaszra specifikus mikroszatellita marker használtunk: 5 dinukleotid szekvenciát (DCC, D6S262, D3S1261, D3S1262, MYC), egy trinukleotid primert (AR) és két tetranukleotidot (ACTB2 és FGA). Minden mikroszatellita génszakaszt polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltunk. A primerszekvenciák kiválasztásához a Genome Data Bank és Integrated DNA technologies szekvenciáit használtuk. A PCR termékeket 6%-os poliakrilamid-TBE gélben 70 Watton hosszúságtól függően 2-4 órán át futtattuk. A géleket 10%-os ecetsavban fixáltuk, szárítottuk majd 70°C-on röntgenfilme exponáltuk.

A hMLH1 és hMSH2 gének polimeráz láncreakción alapuló "Single Strand Conformation Polymorphism" vizsgálata

A hMLH1 gén PCR-SSCP vizsgálatát öt exonon végeztük el (Exon 9, 11, 14, 15 és 16). A hMSH2 gén esetében a PCR-SSCP analízis a cDNS 2020-2225 nukleotid pozíciójában történt, a genomikus DNS intron/exont tartalmazó flanking régiójának megfelelően. A hMLH1 és hMSH2 gének PCR-SSCP analízisének vizsgálata korábban közlétt leírásoknak megfelelően történt. A PCR termékeket a mikroszatellita szekvenciák PCR-SSCP vizsgálatával azonos módon, 6%-os poliakrilamid-TBE gélben 70 Watton, hosszúságtól függően 2-4 órán át elektroforezizáltuk. A géleket 10%-os ecetsavban fixáltuk, majd szárítás után 70°C-on röntgenfilme exponáltuk.

Komparatív genomikus hibridizáció és digitális képanalízis

A komparatív genomikus hibridizáció Kallioniemi és tsai adatai alapján történt, kisebb módosításokkal. Röviden, nick transzlokáció során a tumor DNS-eket SpectrumGreen-12-dUTP-vel, a normál DNS-eket SpectrumRed-5-dUTP-vel jelöltük. A próbalegyet denaturáltuk, majd inkubáltuk, mielőtt a normál metafázis lezajlott volna. Majd a sejtmagokat 4,6-diamino-2-fenylindole festékkel festettük. A hibridizáció minőségének ellenőrzéséhez negatív (eltérő módon jelölt normál DNS versus normál DNS) és pozitív kontrollt (SpectrumGreen-12-dUTP jelölt, citogenetikailag jól karakterizált MPE-600 emlőtumor sejtvonal) használtunk. Zeiss fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott multicolor kvantitatív képanalizáló rendszerrel vizsgáltuk és értékeljük a metafázisban hibridizált mintákat. A szűrke tartományban elemzett képeket monokróm töltésszenzitív készülékkel elemeztük. Az automatikus interkromoszómális háttérkirovás után a kromoszóma szegmentáció analízisére DAPI kép-küszöböléssel történt. A zöld és piros fluoreszcens intenzitásprofil a kromoszóma mediális tengelye mentén mért fluoreszcens értékek integrálásával számítottuk ki. Adatainkat 6-10 kromoszóma 3 vagy több metafázisnak analízisével nyertük. A DNS szekvenciák gyarapodásaként fogadtuk el azokat az értékeket, ahol a hibridizált kromoszóma területek zöld (tumor) : piros (normál) aránya >1.15. A kromoszóma szubregióban megjelenő éles csúcsot „over-representáció”-ként kezeljük, amit DNS amplifikációnak tekintettünk. DNS veszteségnek ítéltük, ha a kromoszómális régióban a hibridizáció zöld/piros aránya <0.85.

Eredmények és következtetések

Mikroszatellita analízis

A FL és a megfelelő diffúz nagysejtes lymphoma párokat minden esetben párhuzamosan vizsgáltuk, nyolc mikroszatellita markerrel. Pozitív lökust véleményeztünk, ha a FL-ből származó DNS és a transzformált DLCL-ből származó DNS minták elektroforetikus migrációja különbözött volt. Egyértelműen MSI-nak nyilvánítottuk azokat az eseteket, ahol a DLCL-ből származó DNS minták migrációja során egy vagy több migrációs csík eltérést láttunk a neki megfelelő FL-ből származó DNS mintához képest. A heterozigotitás elvesztését (loss of heterozygosity, LOH) azokban az esetekben tekintettük pozitívnak, ahol az elektroforézis során a FL-ből származó DNS több migrációs csíkot mutatott, mint a DLCL-ből származó DNS minta. A nyolc beteg FL illetve DLCL mintáiból származó DNS-ek mikroszatellita markerrel történt analízise során 18 eltérést találtunk. Mind MSI-t, mind LOH-t találtunk 9 mikroszatellita lokuszon. Egy esetben egy, két esetben kettő, egy esetben három és két esetben öt mikroszatellita lokuszon találtunk eltérést. Két esetben a FL és DLCL DNS-ek azonos mikroszatellita mintázatot mutattak.

A hMLH1 és hMSH2 gének PCR-SSCP vizsgálata

A hMLH1 és hMSH2 gének PCR-SSCP vizsgálatát nyolc beteg esetében végeztük el. Az első és második biopszia során nyert mintákat minden esetben párhuzamosan vizsgáltuk. A PCR-SSCP vizsgálatok során minden esetben normál migrációs mintázatot találtunk, ami hangsúlyozza annak a valószínűségét, hogy a hMLH1 és hMSH2 gének nukleotid

eltérései nem fordulnak elő sem FL-ban sem annak transzformált, DLCL változatában.

CGH analízis

A CGH vizsgálatot öt esetben végeztük el. Egy FL esetében tapasztaltunk kromoszómális egyenlőtleniséget, míg a DLCL-es esetek mindegyike mutatott kromoszómális eltérést. A FL esetében két lókuszon tapasztaltunk DNS amplifikációt, amelyek szintén jelen voltak a DLCL-be progressiót, azonos betegből származó DNS minta esetében. A transzformált DLCL mintákban a kromoszómamanyérés és -vesztés heterogén módon fordult elő. DNS túlprodukciót nyolc különböző lókuszon tapasztaltunk, DNS alulprodukció pedig 10 különböző lókuszon volt látható. A 18-as kromoszóma megduplázódását tapasztaltuk két esetben, a 13q31-pter többszörös előfordulása szintén két esetben volt látható, mint visszatekintő genetikai eltérés.

A mikroszatellita analízis és a CGH vizsgálat összehasonlítása

A FL hisztológiai transzformációja során elvégzett mikroszatellita analízis és a CGH vizsgálatok során a nyolc FL beteg mintái közötti öben mind a mikroszatellita analízis mind a CGH vizsgálat kivielezhető volt. Két esetben a mikroszatellita analízis is és a CGH vizsgálat is relative alacsony előfordulási genetikai eltéréseket mutatott, két esetben a mikroszatellita eltérés alacsony számban vagy egyáltalán nem fordult elő, bár a CGH analízis magasabb előfordulást jelzett, s egy esetben mind a mikroszatellita, mind a CGH vizsgálatok nagy számú genetikai eltérést detektáltak.

A FL hisztológia transzformációjához és klinikai progressiójához kapcsolódó molekuláris biológiai mechanizmusok meghatározása és megértése kulcslépés lehet a lymphoma patogenezisének megértésében csakúgy, mint a diagnózis fellállításában és a kezelésben. Eredményeink szerint a FL DLCL-be történő hisztológiai transzformációja gyakran mikroszatellita változásokkal illetve kromoszómális szinten DNS gyarapodással és/vagy veszítéssel jár. Ezek az adatok felvetik annak lehetőségét, hogy a FL hisztológiai transzformációja és klinikai progressiója során a nukleinsav és kromoszómális szinten jelenlévő genetikai instabilitás fontos prognosztikai faktor lehet.

Habár a MSI non-Hodgkin lymphomákban meglehetősen ritka jelenség, számos tény egyértelműen azt sugallja, hogy különböző hematopoetikus tumorok klonális evolúciója és klinikai progressiója során mikroszatellita instabilitás alakulhat ki. Jelen tanulmányunk alapján egyértelműen feltételezhetjük, hogy a FL hisztológiai transzformációja mikroszatellita instabilitással asszociált. Nyolc olyan eset közül, ahol a FL DLCL-be való transzformációja megtörtént, négyben a második biopsziás anyagból nyert DNS két vagy több lókuszon is olyan kromoszómális változásokat mutatott, amelyek nem voltak láthatóak a hisztológiai transzformáció előtti FL nyírokcsomóbiopszia mintáiban. Habár a tanulmányunkban használt, hisztológiai transzformációt szenvedett FL-k nem tumoros szöveti mintái nem voltak elérhetőek, adataink szerint a mikroszatellita instabilitás késői változás a FL hisztológiai transzformációja során.

A FL hisztológiai transzformációja során nyolc eset közül kettőben gyakori MSI előfordulást láttunk, ezekben az esetekben a nyolc

mikroszatellita marker közül öt mutatott eltérést. Tanulmányunkban a hMLH1 és hMSH2 mismatch repair gének leggyakrabban mutációt szenvedő exonjait vizsgáltuk, ám strukturális elváltozást nem tudtunk kimutatni.

A követéses CGH analízis öt FL-s beteg esetében két helyen jelzett kromoszóma gyarapodást, míg a transzformált DLCL-es esetek analízise során 21 addicionális helyen találtunk DNS kópiaszámbeli eltérést. Ezen eltérések között megnövekedett kópiaszám szerepelt tíz helyen és csökkenést a DNS állománya 11 kromoszóma régióban. A FL transzformációja során CGH-val tapasztalt eltérések többségét megfigyelték más típusú NHL-kban is. Ezen eltérések általános jellemzője a heterogenitás, azaz a genomszerte detektálható elváltozások jelenléte. Ez, a több gént is érintő imbalance nagyobb valószínűséggel tehető felelőssé a FL transzformációjáért, mint az egy specifikus régióra korlátozódó kromoszómagyarapodás vagy -vesztés. Előző citogenetikai tanulmányok is megerősítik azt a megállapítást, hogy a FL hisztológiai transzformációja gyakran jár együtt komplex kariotípusú változásokkal és közülük jónéhány eltérő gyakorisággal visszatérő változás.

Összességében, vizsgálataink szerint a FL klonális evolúciója során fellépő genetikai instabilitás mind nukleinsav, mind kromoszómális szinten létrejövő változások eredménye. A genetikai és/vagy epigenetikus hatások a genom teljes egészében okozhatnak instabilitást, azonban ennek bizonyítására a tumorklonokban a FL hisztológiai transzformációja során fellépő multiplex genetikai rendellenességek további tanulmányozására volna szükség.

A dolgozat alapját képző közlemények

Matolcsy A, Nagy M, Kisfaludy N, Kelényi G.: Distinct clonal origin of low-grade MALT-type and high-grade lesions of a multifocal gastric lymphoma. *Histopathology* 1999 Jan;34(1):6-8

László T, Nagy M, Kelényi G, Matolcsy A.: Immunoglobulin V(H) gene mutational analysis suggests that blastic variant of mantle cell lymphoma derives from different stages of B-cell maturation. *Leuk Res* 2000 Jan;24(1):27-31

Szereday Z, Csernus B, Nagy M, László T, Warnke RA, Matolcsy A.: Somatic mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene is associated with intracolonial diversity and clonal selection in histological transformation of follicular lymphoma. *Am J Pathol* 2000 Mar;156(3):1017-24

Matolcsy A, Borbényi Z, Demeter J, Egyed M, Fekete S, Földi J, Gergely L, Kajtar P, Kelényi G, Kiss A, László T, Lechoczky D, Losonczy H, Nagy M, Pál K, Pálóczy K, Radványi G, Semsei I, Varga G, Udvardy M: Minimális reziduíus betegség detektálása B-sejtes tumorokban immunoglobulin nehézlánc géne specifikus PCR segítségével. *Orv Hetil.* 2000 Jun;18;141(25):1403-06

Nagy M, Balázs M, Ádám Z, Petkó Z, Timár B, Szereday Z, László T, Warnke RA, Matolcsy A: Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia* 2000 Dec;14(12):2142-48

Közlemények, előadások és poszterek:

- Nagy M, Matolcsy A: Magas malignitású centroblastoma klonális evolúciója follicularis lymphoma hisztológiai transzformációja során. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 1997, Szeged (előadás)
- Nagy M., Matolcsy A.: Magas malignitású centroblastos lymphoma klonális szelekciója follicularis lymphoma hisztológiai transzformációja során. A Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság XVII. Kongresszusa Szeged, 1997. április (előadás)
- Nagy M, Matolcsy A: A Magyar Hematológiai Társaság XVII. Kongresszusa, Székesfehérvár 1998 április (előadás)
- Nagy M, Fülöp Zs, Matolcsy A: Genetikai instabilitás vizsgálata a mérsékelt malignitású non-Hodgkin lymphomák progressziója során. Pathologus Kongresszus, Gyula, 1998 augusztus (előadás)
- Nagy M, Fehér K, László T, Szomor Á, Losonczy H, Kelényi G, Matolcsy A: A T-sejt receptor γ -géntartandózás vizsgálata lymphoproliferatív kórképekben polimeráz láncreakció segítségével. Orv Hetil 1999 Oct 31:140(44):2441-44
- Nagy M, Kerl K, Gindre P, Berczy M, Nador RG, Hurwitz N, Gudar F, Borisch B: Preferential T_H2 cytokine profil in BCL-6 positive T-cell non-Hodgkin lymphomas. 65thme Assemble Annuelle de la Société Suisse de Pathologie, Aarau, 1999 november (előadás)
- Matthes T, Poole J, Nagy M, Stelling MJ, Easton J, Boehlen F, Michel M, Beris P, Tullen E: First example of the Inab phenotype in a black individual. [4154] The American Society of Hematology 42nd annual meeting and exposition. San Francisco, 2000 December (poszter)
- Nagy M, Zubler R, Chapuis B, Matthes T: Analysis of transcription factor expression of multiple myeloma. 69thme Assemble Annuelle de la Société Suisse de Médecine Interne, Lausanne, 2001 május (poszter)

Kerl K, Vonlanthen R, Nagy M, Bolzonello NJ, Gindre P, Hurwitz N, Gudar F, Borisch B, Nador RG: Structural alterations on the 5' non-coding region of the BCL-6 proto-oncogene are not correlated with overproduction of the BCL-6 protein on T cell non-Hodgkin's lymphomas. Lab Invest 2001 (Közlésre elfogadva)

Matthes T, Nagy M, Stelling M-J, Easton J, Boehlen F, Michel M, Beris P, Tullen E: Splenic infarction in a patient with the Inab phenotype. Transfus 2001 (Közlésre elfogadva)