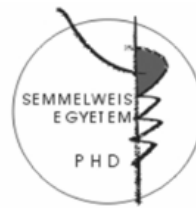


Klonális szelekció a follikuláris lymphomák klonális terjedése során

Doktori tézisek

Dr. Bognár Ágnes

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szepesi Ágota, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Masszi Tamás főorvos, PhD
Dr. Tarkovács Gábor egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Lakatos Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Kovács Gábor egyetemi docens, PhD
Dr. László Terézia egyetemi adjunktus, PhD

Budapest, 2006.

1. BEVEZETÉS

A follikuláris lymphoma (FL) a nyugat-európai országokban és az Egyesült Államokban a leggyakrabban előforduló felnőttkori lymphoma, mely a non-Hodgkin lymphomák 35-40-át, az alacsony malignitású (low-grade) B-sejtes lymphomák 75-80%-át teszi ki. Előfordulási frekvenciája 4 eset / 100. 000 személy évente. A diagnózistól való átlagos túlélési idő 8-10 év.

A betegek többségének a diagnózis idején a fájdalomtalan nyirokcsomó megnagyobbodástól eltekintve nincs más tünete, ugyanakkor betegségük közel 80 százalékban már előrehaladott klinikai stádiumba (Ann Arbour stage III-IV.) tartozik. A betegség érintheti a perifériás, mediasztinális és retroperitoneális nyirokcsomókat, továbbá a lépét és a májat; a csontvelő érintettség az esetek 60-80 %-ában igazolható. A FL-ák közel 90 %-a grade I. és grade II. csoportokba sorolható, melyeknek klinikai lefolyása indolens, a grade III. FL azonban többnyire agresszív viselkedésű megbetegedés.

A betegség indolens lefolyása ellenére kezelése nem teljesen megoldott, mely részben annak köszönhető, hogy klinikai megjelenésekor az esetek nagy részében már kiterjedt folyamatról van szó.

Az irodalmi adatok beszámolnak a FL lymphoma tumorsejtjeinek migrációjáról a nyirokcsomókon belül és az egyes nyirokcsomók között; kevésbé ismertek azonban annak részletei, hogy a tumor csontvelői érintettsége milyen mechanizmussal alakul ki.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Tanulmányunkban a FL csontvelői infiltrációjának kialakulási mechanizmusának vizsgálatát tűztük ki célul.

Fő kérdéseink a következők voltak:

- Ugyanaz-e a tumorsejtek jellegzetessége (morfológia, fenotípus, genotípus) a csontvelőben, mint a nyirokcsomóban?
- Mely tumorklónok infiltrálják a csontvelőt a FL csontvelői terjedése kapcsán?
- Igazolható-e klonális szelekció a csontvelői infiltráció során?
- Folyamatos-e a nyirokcsomói klónok csontvelőbe terjedése?
- A nyirokcsomói tumorklón fejlődésének melyik fázisában terjed a csontvelőbe?

Vizsgálataink során a kapott eredmények alapján a további kérdések merültek fel:

- Történik-e migráció a nyirokcsomó és csontvelő között?
- Szükséges-e a nyirokcsomói érintettség a csontvelői manifesztáció létrejöttéhez?

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A FL csontvelői érintettségének kialakulási útvonalának tanulmányozása céljából 21 kezeletlen FL-ás beteg nyirokcsomói és párhuzamos csontvelői mintáinak morfológiai és immunfenotípusos vizsgálatát végeztük el, valamint 3 kiválasztott esetben a mintákból származó IgV_H gének mutációs analízisét hajtottuk végre.

Az immunhisztokémiai festést a háromlépéses avidin-biotin immunperoxidáz módszerrel végeztük, CD20, bcl-2, Ki67, CD10, p53, CD21 és CD23 monoklonális antitestekkel.

Natív szövetmintákból kisózásos módszerrel nyertünk genomikus DNS-t. A tumorklónok azonosítására és követésére az immunoglobulin nehézlánc gén szomatikus mutációs mintázatát használtuk; három kiemelt esetben az IgV_H gén PCR amplifikációját, klónozását, szekvenálását, majd a kapott szekvenciák alapján a tumorklónok filogenetikai analízisét hajtottuk végre.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink azt mutatják, hogy a FL sejtek citológiai grade-je, immunfenotípusa, és IgV_H génjeik mutációs mintázata a nyirokcsomói és csontvelői tumormintákban gyakran eltérő, ami azt jelzi, hogy a FL csontvelői infiltrációjának kialakulásában a tumorklonok klonális szelekciója fontos szerepet játszik. Eredményeink azt igazolják, hogy a csontvelő a nyirokcsomóéhoz hasonló mikrokozonyet biztosít, ahol a tumorsejtek megtartják IgV_H génjeik ongoing mutációs jellegét, és a mutációk eloszlása arra utal, hogy a sejtek antigén szelekción estek át.

Morfológiai összehasonlító vizsgálatunk során úgy találtuk, hogy a magasabb citológiai grade-ű nyirokcsomói mintákhoz tartozó csontvelői infiltrátumok grade-je az esetek nagy részében alacsonyabb a párhuzamos nyirokcsomói mintákénál. Ezek az eredmények egybehangozóak korábbi kutatások eredményeivel, melyek azt mutatják, hogy a FL csontvelői aggregátumait elsősorban kis centrociták alkotják, és csak ritkán fordulnak elő bennük centroblastok. A centrociták túlsúlyát a csontvelőben immunhisztokémiai vizsgálataink is alátámasztják. Ki67 és p53 jelöléssel kevesebb tumorsejt mutatkozott pozitív festődésűnek a csontvelőben, mint a nyirokcsomóban, azzal egybehangozóan, miszerint a

proliferációs aktivitás és a p53 pozitivitás a tumor grade-del összefüggést mutat. Ezen kívül, a csontvelői tumorsejtek ritkábban expresszáltak CD10-et, mint a nyirokcsomóiak. Mindezek az eredmények azt az elgondolást támasztják alá, mely szerint a csontvelői infiltrátumok általában alacsonyabb grade-ű FL-át képviselnek, mint a párhuzamos nyirokcsomói minták sejtei, és arra utalnak, hogy a csontvelői infiltráció kialakításában különböző fenotípusú klónok vesznek részt.

A csontvelői infiltrátumokban megfigyelhető kis, centrocita-szerű tumorsejtek intenzív klonális szelekciója azonban arra utalhat, hogy a FL interfollikuláris kompartmentje – mely szintén kis, centrocita-szerű sejtekből épül fel – gyakran terjed ki a csontvelőre. Saját eredményeink és irodalmi adatok igazolják, hogy a csontvelő mikrokörnyezete jobban hasonlít a nyirokcsomói folliculus környezetére, mint a parakortikális területére. A csontvelő tumorsejtjei CD21 és CD23 pozitív FDC-k közé ágyazódnak mind a paratrabekuláris, mind a follikuláris infiltrátumokban, hasonlóan a nyirokcsomói FL alapszerkezetéhez. A FDC-k jelenléte a csontvelő infiltrációban azt jelzi, hogy a FDC-k a FL mikrokörnyezetének nélkülözhetetlen elemei, feltételezhetően azért, mert a tumoros- nem tumoros sejtek kölcsönhatásai a tumoros B-sejtek apoptózisát meggátolják, és

biztosítják a tumorsejtek túléléséhez szükséges antigén stimulust.

A tumorsejtek IgV_H génjeiben zajló ongoing jellegű szomatikus hipermutáció a FL jól ismert jellegzetessége. Eredményeink alapján az IgV_H gének ongoing szomatikus hipermutációja a csontvelői érintettség sejtjeinek is sajátja, a nyirokcsomóhoz hasonlóan. A csontvelői és nyirokcsomói klónok mutációs frekvenciája gyakorlatilag azonos tartományba esik, azonban a nyirokcsomói és csontvelői klónok intraklonális divergenciája nem egyezett, ami azt jelzi, hogy a szomatikus hipermutációs aktivitás a két helyen egymástól függetlenül működik. Az IgV_H génekben található mutációs eloszlás, mind a csontvelőben, mind a nyirokcsomóban arra utalt, hogy a sejteken antigén szelekció zajlott. Ezek az eredmények szintén alátámasztják az elképzelést, miszerint a csontvelő olyan mikorkörnyezetet biztosít, ahol a FL sejtek megőrzik biológiai sajátosságaikat.

A FL sejtjeinek IgV_H génjeiben leírt intraklonális divergencia alapján feltételezhető, hogy az ongoing szomatikus hipermutációs aktivitás a lymphoma kialakulása során megtartott. Ennek megfelelően, a különböző tumorklónok IgV_H gén szekvenciái információt nyújthatnak a FL klonális evolúciójával kapcsolatosan. Annak érdekében, hogy további betekintést nyerhessünk a FL csontvelői

érintettségének klonális szelekciós folyamatába és a klonális fejlődésbe, válogatott FL-ás esetek nyirokcsomói és párhuzamos csontvelői biopsziás mintáiból nyert IgV_H gén szekvenciák származási analízisét végeztük el. A filogenetikai fák mindhárom esetben kimutattak egy olyan csontvelői klónokból álló homogén csoportot, mely a származási fán korai leágazást ad. Ezek a csontvelői clusterek nem tartalmaztak nyirokcsomóból származó klónokat, ami azt jelzi, hogy a csontvelői infiltráció egy részének kialakulása a FL klonális evolúciójának korai eseménye, amely valószínűleg a nyirokcsomói tumorklónoktól függetlenül fejlődik ki. Ezek az eredmények nagyban alátámasztják azt az elképzelést, miszerint a FL szubklónjai esetleg elsődlegesen a csontvelőben fejlődnek ki, és ezek a klónok nem „metasztatizálnak” a nyirokcsomóba. Az eltérő klonotípusú tumorklónok fejlődése a nyirokcsomóban és a csontvelőben egybehangzik azzal a korábban leírt eredménnyel, mely szerint a FL-t két különböző klón alkotja és a klonális szelekció legalább két sejtcsoportban zajlik párhuzamosan.

A FL klonális terjedése során nagyfokú tumorsejt migráció jellemző a nyirokcsomói folliculusok, valamint a folliculusok és az interfolliculáris terek között. Vizsgálataink során bizonyítékot találtunk arra vonatkozóan, hogy a tumorsejtek migrálnak a nyirokcsomó és a csontvelő között.

Egy korábbi hipotézis szerint a t(14;18) transzlokáció a $D-J_H$ vagy a V_H-DJ_H összekapcsolódás hibájának következtében alakul ki, és a FL lymphomagenézis kiindulópontjának tekinthető. A t(14;18) transzlokációt hordozó pre-neoplasztikus B-sejtek bekerülnek a keringésbe, és a nyirokcsomókba jutnak, ahol egy további genetikai behatás éri a sejtet –az FDC-ken keresztül történő antigén stimuláció révén–, melynek következtében neoplasztikus transzformáció következik be.

A csontvelő infiltráció kialakulásának magyarázatára egy másik elképzelés az úgynevezett „importing modell”-t javasolta, melynek alapján a „nyirokcsomó-tapasztalt” FL sejtek magukkal hozzák a nyirokcsomóból azt a mikrokörnyezetet, amely elősegíti a tumorsejtek növekedését a csontvelőben.

Jelen tanulmányunk eredményei a FL csontvelői érintettségének pathogenezisébe engednek betekintést, és kialakulási útvonalaira vonatkozóan szolgálnak új megfigyelésekkel. Eredményeink arra utalnak, hogy a csontvelői infiltráció egy alternatív útvonalon keresztül jön létre.

Abból, hogy a csontvelőben olyan tumorklónokat sikerült azonosítanunk, amelyek nem nyirokcsomói eredetű klónok leszármazottai, arra következtethetünk, hogy a t(14;18)

transzlokációt hordozó, keringő pre-neoplasztikus B-sejtek a csontvelőbe kerülhetnek (homing), vagy hogy esetleg nem is jutnak a keringésbe, hanem a csontvelőben maradnak. Ezeket a pre-neoplasztikus B-sejteket a csontvelőben jelen lévő FDC-ken keresztül antigén stimulus érheti, melynek eredményeként tumorsejteké válnak. Az irodalmi adatok szerint a csontvelőben FDC prekursorok vannak jelen, és lehetséges, hogy az itt fejlődő pre-neoplasztikus B-sejtek valamilyen módon indukálják, vagy aktiválják őket, melynek következtében képesekké válnak a tumorsejteké való transzformációra és a tumorsejtek túléléséhez szükséges mikro környezet kialakítására.

Eredményeink alapján, összefoglalva elmondható, hogy a FL csontvelői érintettségének kialakulásában a tumorsejtek klonális szelekciója fontos szerepet játszik. A csontvelő infiltrációt heterogén tumorsejt populáció alkotja, kialakulása a klonális evolúció különböző pontjain mehet végbe. A csontvelő olyan mikro környezetet biztosít a FL sejtek számára, ahol azok biológiai jellege és az IgVH gének ongoing hipermutációs aktivitása a nyirokcsomói tumorsejtekével megegyező. A FL csontvelői érintettségének kialakulására vonatkozó új elképzelésünk, mely arra utal, hogy a nyirokcsomói és csontvelői tumorsejtek klonális szelekciója különböző útvonalakon keresztül mehet végbe, magyarázatul

szolgál a FL megjelenésének szisztémás természetére, valamint arra vonatkozóan is, hogy miért van gyakran a korai stádiumban lévő, alacsony tumor terhelésű betegeknek csontvelő infiltrációja.

5. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Á Bognár, B Csernus, Cs Bődör, L Reiniger, Á Szepesi, E Tóth, L Kopper, A Matolcsy: Clonal Selection in the bone marrow infiltration of follicular lymphoma. *Leukemia* 19: 1656-1662, 2005. (IF.5,81)

B Csernus, B Timár, Z Fülöp, **Á Bognár**, Á Szepesi, T László, P Jáksó, R Warnke, L Kopper, A Matolcsy: Mutational analysis of *IgV_H* and *BCL-6* genes suggests thymic B-cell origin of mediastinal (thymic) B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 45 (10), 2105-2110, 2004. (IF.1,147)

B Timár, Z Fülöp, B Csernus, C Angster, **Á Bognár**, Á Szepesi, L Kopper, A Matolcsy: Relationship between the mutational status of *V_H* genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia* 18: 326-330, 2004. (IF. 5,81)

Egyéb témában megjelent közlemények

L Reiniger, Cs Bodor , **Á Bognár**, Z Balogh, J Csomor, Á Szepesi, L Kopper, A Matolcsy. Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. *Leukemia.*: 20(6):1089-95,2006. *(IF.5,81)*

Cs Bődör, **Á Bognár**, L Reiniger, Á Szepesi, E Tóth, L Kopper, A Matolcsy: Aberrant somatic Hypermutation and expression of activation-induced cytidine deaminase, RNA in mediastinal large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 129: 373-376, 2005. *(IF. 3,195)*

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Kopper Lászlónak, a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet igazgatójának, hogy PhD tanulmányaimat intézetében végezhettem.

Köszönettel tartozom laborvezetőknek, Dr. Matolcsy Andrásnak, lelkes támogatásáért, munkám gondos irányításáért, türelméért, tanácsaiért. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szepesi Ágotának, aki őszinte véleményével segítette munkámat, és mindig hozzájárult ügyeim gördülékeny menetéhez. Szeretném megköszönni Dr. Csomor Juditnak az építő beszélgetéseket és az „anyai“ gondoskodást.

Bárányné Pallag Adriennek és Lengyel Anikónak lelkiismeretes laboratóriumi munkájáért tartozom köszönettel.

Köszönöm a szakmai és emberi támogatást, az együtt töltött vidám perceket barátaimnak és kollégáimnak, Dr. Reiniger Lillának, Bödör Csabának, Dr. Angster Christinének, Dr. Fülöp Zsoltnak, Dr. Timár Botondnak és Dr. Csernus Balázsnak.

Végül köszönöm szüleimnek, hogy gyökereket és szárnyakat adtak, és bíztak bennem, hogy jól használom őket; és köszönöm férjemnek, aki feltétel nélkül hisz bennem és döntéseimben.