A primer központi idegrendszeri lymphomák sejteredete, genomikai profilja és metabolikus vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Marosvári Dóra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezetők:
Dr. Reiniger Lilla, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Bödör Csaba, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:
Dr. Gergely Lajos, Ph.D, egyetemi docens
Félné Dr. Semsei Ágnes, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Buzás Edit, MTA levelező tagja, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Mikala Gábor, Ph.D, klinikai főorvos
Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D, egyetemi docens

Budapest
2020

I. Bevezetés

A primer központi idegrendszeri lymphomák (PCNSL), ritka, agresszív extranodális non-Hodgkin lymphomák, melyek a diagnóziskor csak az agyvelőt, gerincvelőt, agyburkokat és a szemet érintik; túlnyomó többségük diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL). Ezzel szemben központi idegrendszeri lymphoma kialakulhat extracerebrális lymphoma agyi manifesztációjaként is, ezeket szekunder központi idegrendszeri lymphomáknak (SCNSL) nevezzük.

Évek óta ismert, hogy szisztémás DLBCL-ben a tumorsejtek eredete alapján meghatározható molekuláris szubtípusnak (aktivált B-sejtes eredet- ABC; centrum germinatívum B-sejtes eredet- GCB) prognosztikai és terápiás jelentősége is van. Számos új terápiás szer közöttük a lenalidomide, a bortezomib és az ibrutinib hatékonyabbnak bizonyult ABC fenotípusú DLBCL-ben, míg GCB fenotípus esetén a BCL2, BCL6 és EZH2 gátlószerek tűnnek hatékonyabb terápiás modalitásnak. Az arany standard génexpressziós profil (GEP) meghatározáson alapuló módszer mellett számos

immunhisztokémiai (IHC) algoritmust dolgoztak ki az évek során a sejteredet meghatározására. Azonban a GEP vizsgálat a rutin diagnosztikában nehezen elérhető, az IHC módszerek pedig nem bizonyultak megbízhatónak. A digitális génexpresszió vizsgálatán alapuló, úgynevezett NanoString Lymphoma Subtyping Test (LST) segítségével azonban akár formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból is precízen meghatározható a sejteredet. A PCNSL sejteredetét vizsgálva ellentmondásos irodalmi adatok születtek. Míg az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján döntően ABC fenotípus jellemző, addig a GEP vizsgálatokkal közel azonos az ABC és a GCB eredetű esetek száma.

Az utóbbi években, az új-generációs szekvenálás fejlődésével, a PCNSL mutációs profiljának feltérképezése is megkezdődött, mely során a szisztémás DLBCL-hez hasonló mutációs mintázatot azonosítottak. A legtöbb eltérés az BCR/NFκB útvonal génjeit érinti (*MYD88*, *CD79B*, *CARD11*), emellett a *PIM1*, *PRDM1* és a *TBL1XR1* gének mutációi is gyakran megfigyelhetőek.

Számos daganattípusban, többek között a szisztémás DLBCL-ben, a proliferációt, a túlélést és a

növekedést szabályozó mTOR útvonal konstitutív aktivációja figyelhető meg. Az mTOR útvonal aktivitását gyakran az S6 fehérje foszforilációjával vizsgálják, ugyanakkor ismert az S6 mTOR független foszforilációja, többek között a metabolizmus szabályozásában szerepet játszó Per-Ant-Sim kináz (PASK) által is. A PCNSL esetén az mTOR útvonal aktivitásával kapcsolatban kevés irodalmi adat áll a rendelkezésünkre.

Az elmúlt években a molekuláris vizsgáló módszerek fejlődésével számos új prognosztikai markert és potenciális terápiás célpontot azonosítottak PCNSL-ben, amelyek alaposabb megismerése és a mindennapi diagnosztikus gyakorlatba való beágyazása elősegítheti a betegek személyre szabott terápiáját és hatékonyabb terápiás protokollok kidolgozását.

II. Célkitűzések

- A primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák sejteredetének meghatározása NanoString LST technológia segítségével.
- A NanoString LST technológia és a hagyományos IHC módszerek összehasonlítása primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák esetén.
- A *CARD11, CCND3, CD79B, C-MYC, CSMD2, CSMD3, IRF4, KMT2D, MYD88, PAX5, PIM1, PRDM1, PTPRD és TP53* gének nagy érzékenységű célzott újraszekvenálása új-generációs szekvenálás segítségével, primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák esetén.
- Összefüggések keresése a sejteredet, a genom szintű eltérések és a betegek túlélése között primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomákban.
- Az mTOR útvonal aktivitásának meghatározása primer központi idegrendszeri lymphomákban.
- Az S6 riboszómális fehérje mTOR független foszforilációjának vizsgálata.

III. Módszerek

III/1. Szövetminták

Tanulmányunkban RNS és DNS alapú vizsgálataink során összesen 81 primer és 18 szekunder központi idegrendszeri lymphomában szenvedő beteg FFPE mintáit vizsgáltuk. A minták három centrumból álltak a rendelkezésünkre, a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből, a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetéből és a University College London (UCL) Neurológiai Intézetének Neuropatológiai osztályáról. Túlélési adatok 65 PCNSL és 17 SCNSL esetben álltak rendelkezésünkre.

III/2. Sejteredet meghatározása

RNS alapú vizsgálataink során 77 PCNSL, és 17 SCNSL mintából RNS-t izoláltunk, majd a digitális génexpresszió vizsgálaton alapuló NanoString LST teszt segítségével meghatároztuk a lymphoma minták sejteredetét. A NanoString LST módszer kivitelezése során az RNS mintákhoz először egyedi színkóddal

ellátott target-spectifikus reporter és capture próbákat adtunk, amit egy hibridizáló, komplexképző lépés követett. A komplexeket az úgynevezett nCounter Cartridge felületére rögzítettük. Végül a génexpresszió meghatározása a fluoreszcens színkódok leolvasásával történt, az nCounter Digital Analyzer segítségével. A szubtípus meghatározásához minden gén esetén meghatározható egy úgynevezett „linear predictor score" (LPS). Az LPS az egyes gének expressziós értékének és egy génenként eltérő súlytényezőnek a szummázásával adható meg, majd az előre definiált küszöbértékek alapján határozható meg a szubtípus.

III/3. Mutáció analízis

Ezenfelül 64 PCNSL-ben és 12 SCNSL-ben szenvedő beteg DNS mintájából 14 visszatérő mutációt hordozó gén (*CARD11, CCND3, CD79B, C-MYC, CSMD2, CSMD3, IRF4, KMT2D, MYD88, PAX5, PIM1, PRDM1, PTPRD* és *TP53)* nagyérzékenységű, célzott, új-generációs újraszekvenálását végeztük el a HiSeq 4000 szekvenáló készülék segítségével. A bioinformatikai

analízist követően a detektált variánsok egy részét Sanger szekvenálással validáltuk.

III/4. mTOR aktivitás meghatározása

Immunhisztokémiai vizsgálatunk során 31 PCNSL-ben és 51 nodális DLBCL-ben szenvedő beteg FFPE mintáit elemeztük. Az mTOR útvonal aktivitása mellett (p-mTOR, p-S6, p-4E-BP1, p(T389)-p70S6K1), vizsgáltuk mTOR független fehérjék expresszióját is (p-RSK, PASK, p(T229)-p70S6K1). Majd *in vitro*, egy DLBCL sejtvonalon (BHD1) a p-S6 expresszió változást mértük Western blottal és flow cytometriával, PASK inhibitorral (1μM, BioE-1115, Calbiochem) való kezelés hatására.

IV. Eredmények

IV/1. Agyi lymphomák molekuláris szubtípusa

A PCNSL esetében a NanoString LST-vel meghatározva a betegek 80,5%-ában ABC fenotípust, 13%-ában GCB fenotípust, míg 6,5%-ában UC fenotípust találtunk. Ezzel szemben a Hans algoritmussal 95%-ban non-GCB fenotípus, míg a maradék 5%-ban GCB fenotípus adódott.

A SCNSL esetekben NanoString LST-vel meghatározva 47% ABC fenotípusú, míg 53% GCB fenotípusú volt. A szuptípust Hans algoritmussal vizsgálva ugyanezt az eredményt kaptuk, azonban egy-egy eset volt, ahol a két módszer különböző fenotípust állapított meg.

IV/2. PCNSL és SCNSL mutációs profilja

A PCNSL-ben a leggyakrabban mutált génnek a *MYD88* (66%) bizonyult, melyet a *PIM1* (41%), a *KMT2D* (31%) és a *PRDM1* (30%) gének eltérései követtek. Az SCNSL esetén leggyakrabban mutáció a

PRDM1 (50%) gént érintette, a *MYD88* (42%), a *PIM1* (25%) és a *KMT2D* (17%) mutációi mellett.

A mutációk előfordulását összevetve a molekuláris szubtípussal azt a megfigyelést tettük, hogy PCNSL-ben az *IRF4*, a *CD79B*, a *C-MYC*, a *CARD11*, a *CSMD2* és a *CSMD3* gének mutációi az ABC fenotípus esetén gyakoribbak, míg a GCB fenotípus esetén a *TP53*, a *PAX5*, és a *CCND3* gének eltéréseit detektáltuk többször.

A sejteredet és a mutációs profil összefüggéseit a túléléssel vizsgálva a PCNSL és SCNSL betegek túlélése között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. Meglepő módon vizsgálatunkban a sejteredetnek nem volt hatása a túlélésre: nem volt szignifikáns különbség sem az összes agyi lymphoma esetben, sem a PCNSL eseteket nézve. Ezzel szemben a *CD79B* mutációt hordozó esetekben szignifikánsan rövidebb OS volt megfigyelhető az összes agyi lymphomában, és az PCNSL esetekben is. Emellett a *MYD88* és a *CCND3* mutációk jelenléte kedvezőbb túléléssel járt együtt az összes agyi lymphoma és a primer központi idegrendszeri lymphoma esetekben is.

IV/3. PCNSL mTOR aktivitása

A metabolikus profilt vizsgálva arra következtetésre jutottunk, hogy a PCNSL-t az mTOR útvonal konstitutív aktivitása nem jellemzi. Fokozott p-S6 expressziót a PCNSL esetek 83,9%-ában figyeltünk meg, ezzel szemben mTOR útvonal aktivitását mindössze az esetek 25,8%-ában detektáltunk. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy az S6 fehérje foszforilációja PCNSL-ben mTOR független módon történik, ezért immunhisztokémiával vizsgáltuk három mTOR független kináz aktivitását, melyek közül egyedül a PASK expresszióját figyeltük meg. Majd *in vitro* vizsgálataink során PASK inhibitor kezelés hatására jelentős p-S6 expresszió csökkenést figyeltünk meg Western blottal és flow cytometriával.

V. Következtetések

- A primer központi idegrendszeri lymphomák molekuláris szubtípusa magasabb arányban bizonyult centrum germinatívum eredetűnek, mint korábban ismert volt.
- Meghatároztuk a primer és szekunder központi idegrendszeri lymphomák mutációs profilját. A PCNSL esetén a leggyakrabban mutált génnek a *MYD88* (66%) bizonyult, melyet a *PIM1* (41%), a *KMT2D* (31%) és a *PRDM1* (30%) gének eltérései követtek. A leggyakrabban mutáció SCNSL esetén a *PRDM1* (50%) gént érintette, a *MYD88* (42%), a *PIM1* (25%) és a *KMT2D* (17%) mutációi mellett.
- A primer központi idegrendszeri lymphomák közül kizárólag az ABC fenotípus esetén fordult elő az *IRF4*, a *CD79B*, a *C-MYC*, a *CARD11*, a *CSMD2* és a *CSMD3* gének mutációja, míg GCB fenotípus esetén gyakoribbak a *TP53*, a *PAX5*, és a *CCND3* gének eltérései.
- Agyi lymphomák sejteredete nem mutatott összefüggést a túléléssel.

- A *CD79B* mutációk jelenléte kedvezőtlen kimenetellel társult agyi lymphomákban.
- A *MYD88* és a *CCND3* mutációk jelenléte kedvezőbb túléléssel járt együtt az összes agyi lymphoma és a primer központi idegrendszeri lymphoma esetekben is.
- PCNSL-ben az mTOR útvonal aktivitása nem jellemző, ugyanakkor fokozott p-S6 expresszió gyakran figyelhető meg, ami valószínűleg mTOR független módon történik.
- A PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase (PASK) feltehetően részt vesz az S6 fehérje foszforilálásában.

VI. Saját publikációk jegyzéke

VI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Marosvári D**; Nagy N; Kriston Cs; Deák B; Hajdu M; Bödör Cs; Csala I; Bagó AG; Szállási Z; Sebestyén A; Reininger L. Discrepancy Between Low Levels of mTOR Activity and High Levels of P-S6 in Primary Central Nervous System Lymphoma May Be Explained by PAS Domain-Containing Serine/Threonine-Protein Kinase-Mediated Phosphorylation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 77: 268-273. (2018). **IF: 3,460**

2. Bödör Cs; Alpár D; **Marosvári D**; Galik B; Rajnai H; Bátai B; Nagy Á; Kajtár B; Burján A; Deák B; Schneider T; Alizadeh H; Matolcsy A; Sebastian B; Storhoff J; Chen N; Liu MD; Ghali N; Csala I; Bagó AG; Gyenesei A; Reiniger L. Molecular subtypes and genomic profile of primary central nervous system lymphoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. (2019) *doi: 10.1093/jnen/nlz125.* **IF: 3,460***

VI.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Gángó AP; Alpár D; Galik B; **Marosvári D**; Kiss R; Fésüs V; Aczél D; Eyüpoglu E; Nagy N; Nagy Á; Krizsán Sz; Reiniger L, Farkas P; Kozma A; Ádám E; Tasnády Sz; Réti M; Matolcsy A; Gyenesei A; Mátrai Z; Bödör Cs. Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *International Journal of Cancer.* 146: 85-93. (2019). **IF: 4,982**

2. Szurián K; Csala I; **Marosvári D**; Rajnai H; Dezső K; Bödör Cs; Piurkó V; Matolcsy A; Reiniger L. EZH2 is upregulated in the proliferation centers of CLL/SLL lymph nodes. *Experimental and Molecular Pathology*. 105: 161-165. (2018). **IF: 2,350**

3. Fesüs V; **Marosvári D**; Kajtár B; Király PA; Demeter J; Gurbity Pálfi T; Egyed M; Plander M; Farkas P; Mátrai Z; Matolcsy A; Bödör Cs. A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic

leukaemia]. Orvosi Hetilap. 158: 220-228. (2017). **IF: 0,322**

4. Kiss R; Király PA; Gaál-Weisinger J; **Marosvári D**; Gángó AP; Demeter J; Bödör Cs. A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. [Molecular monitoring of myeloid leukemia]. Magyar Onkológia. 61: 57-66. (2017)

5. Király AP; Alpár D; Fesüs V; **Marosvári D**; Matolcsy A; Bödör Cs. Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgalómódszereinek alapjai. [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology]. Magyar Onkológia. 60: 88-98. (2016).

6. Király PA; Kállay K; **Marosvári D**; Benyó G; Szőke A; Csomor J; Bödör Cs. Familiáris myelodysplasiás szindróma és akut myeloid leukaemia klinikai és genetikai háttere [Clinical and genetic background of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia]. Orvosi Hetilap. 157: 283-289. (2016). **IF: 0,349**

7. **Marosvári D**; Alpár D; Király PA; Rajnai H; Reiniger L; Bödör Cs. A krónikus limfocitás leukémia genetikai háttere az újgenerációs szekvenálás korszakában [The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia]. Magyar Onkológia. 60: 118-125. (2016).

8. Rajnics P; Kellner Á; Karádi É; Moizs M; Bödör Cs; Király PA; **Marosvári D**; Andrikovics H; Egyed M. Increased Lipocalin 2 level may have important role in thrombotic events in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Leukemia Research. 48: 101-106. (2016). **IF: 2,501**

9. **Marosvári D**; Téglási V; Csala I; Marschalkó M; Bödör Cs; Timár B; Csomor J; Hársing J; Reiniger L. Altered MicroRNA Expression in Folliculotropic and Transformed Mycosis Fungoides. Pathology and Oncology Research. 21: 821-825. (2015) . **IF: 1,940**